



HAL
open science

**Plantes du Paraguay - Etude de quatre plantes
bioactives utilisées contre les nématodes
gastro-intestinaux**

Griselda Asuncion Meza Ocampos

► **To cite this version:**

Griselda Asuncion Meza Ocampos. Plantes du Paraguay - Etude de quatre plantes bioactives utilisées contre les nématodes gastro-intestinaux. Biologie végétale. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2022. Français. NNT : 2022INPT0007 . tel-04190283

HAL Id: tel-04190283

<https://theses.hal.science/tel-04190283>

Submitted on 29 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme GRISELDA ASUNCION MEZA OCAMPOS

le jeudi 3 février 2022

Titre :

Plantes du Paraguay - Etude de quatre plantes bioactives utilisées contre les nématodes gastro-intestinaux

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

Directeur(s) de Thèse :

M. HERVÉ HOSTE

M. MIGUEL TORRES ÑUMBAY

Rapporteurs :

MME STEFANIA PERRUCCI, UNIVERSITA DI PISA

Membre(s) du jury :

MME MARIE MAGDELEINE CARINE, INRA PETIT BOURG, Président

M. EMMANUEL LIENARD, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. HERVÉ HOSTE, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

MME STELLA MACIEL, Universidad Nacional de Asuncion, Membre

M. MIGUEL TORRES ÑUMBAY, Universidad Nacional de Asuncion, Membre

*Cette thèse est dédiée à mes parents : Ana et Felipe pour leur soutien
inconditionnel. À mon Nery pour sa patience, compagnie et amour. À ma sœur
Esther et à mon petit Facundo.*

*J'en aurais long et beaucoup à dire, mais ce que je ressens le besoin de faire,
c'est de vous dire « Merci ». Pour plein de choses, mais pour une en particulier,
celle d'avoir toujours cru en moi.*

À la mémoire de Rocky, Kike, Loky, Marrana ♡

And people stayed home

*And people stayed home
And read books and listened
And rested and exercised
And made art and played
And learned new ways of being
And stopped
And listened deeper
Someone meditated
Someone prayed
Someone danced
Someone met their shadow
And people began to think differently
And people healed
And in the absence of people who lived in ignorant ways
Dangerous, meaningless, and heartless,
Even the earth began to heal
And when the danger ended
And people found each other
Grieved for the dead people
And they made new choices
And dreamed of new visions
And created new ways of life
And healed the earth completely
Just as they were healed themselves.*

Viral poem on social distancing due COVID 19 written by Kitty O'Meara, a retired teacher in
Madison, Wisconsin in March 2020.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée avec le soutien financier du gouvernement du Paraguay et le programme de Becas Carlos Antonio Lopez (BECAL).

Une partie des travaux présentés ont été réalisés dans l'équipe INMD (interactions Nématodes Milieu Digestif) de l'Unité Mixte de Recherche 1225, de l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement/ Ecole Vétérinaire de Toulouse et aussi au sein de l'Université Nationale d'Asuncion, Paraguay.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, Dr. Hervé Hoste, merci d'avoir accepté d'être mon directeur et mon guide pendant toutes ces années. Vous êtes un directeur exemplaire, toujours à l'écoute et disponible. Nous avons eu de nombreux moments mémorables. Honnêtement, je vous suis très reconnaissante pour vos nombreuses corrections et pour vos nombreux conseils dans ma vie et pour ma carrière professionnelle. Vous avez pleinement contribué à la réussite de cette thèse. Je pourrais faire une page de remerciements et ce serait quand même insuffisant, *pero gracias de todo corazon*

Merci à Pr. Dr. Miguel Torres Ñumbay, mon co-directeur de thèse, professeur de la Faculté de Vétérinaire de la Université National d'Asuncion (FCV/UNA) pour son accompagnement, sa bonne humeur, pour être toujours à l'écoute et pour me faciliter la vie avec toutes les démarches administratives. Gracias Doctor !

Je remercie les deux membres de mon comité de thèse, le Dr. Nelson Alvarenga et le Dr. Emmanuel Liénard pour avoir accepté de participer au suivi de ma thèse au cours de ces trois ans.

Merci, aux deux rapporteurs Dr. Carine Marie-Magdeleine -Chevry et Pr. Stefania Perrucci qui ont accepté de juger ce document et aussi aux autres membres du jury, Dr Stella Maciel ; Dr Emmanuel Lienard.

Ma première année s'est déroulée au Paraguay, afin de préparer et de mener l'enquête ethnobotanique et ethno-vétérinaire. Merci à toutes les personnes qui ont répondu à mes enquêtes, à tous ceux et toutes celles qui m'ont donné leurs connaissances, je vous en remercie beaucoup.

J'ai travaillé avec l'Université Nationale d'Asuncion (UNA) et différentes facultés, je remercie toutes les autorités de cette maison d'études de m'avoir apporté leur soutien.

Après l'enquête, je suis passée à la Faculté de Chimie (FCQ) de l'UNA pour la préparation des extraits végétaux, sous la direction du Dr Nelson Alvarenga et de son équipe. Durant cette période, j'ai eu l'opportunité de rencontrer certaines personnes qui ont soutenu mes idées, qui m'ont conseillé et qui ont participé à ce projet. Je vous en remercie pour tout !

Merci à tout le personnel technique et administratif de FCQ. Merci à Olga pour m'avoir accueilli dans le laboratoire, pour répondre toujours à mes questions. Merci à José Ayala, technicien de l'unité pour ta patience et ta bonne humeur. Merci José pour ton amitié.

Merci au Département Botanique, pour avoir préparé les exemplaires de plantes et à tout le personnel technique et administratif. Particulièrement au Dr. Gloria Delmás pour sa patience, sa collaboration et sa gentillesse.

Je remercie la Faculté des Sciences Exactes et Naturelles (FACEN) qui a énormément contribué à la préparation des échantillons des plantes et des extraits. Je remercie spécialement toutes les autorités pour sa collaboration. Merci à MsC. Claudia Pereira et MsC Francisco Ferreira pour leur aide et leur disponibilité.

Un merci tout particulier à ma maison d'études, la Faculté des Sciences Vétérinaires (FCV), notamment au Département de Physiologie Animale, qui était en charge d'organiser plusieurs conférences avec les étudiants et m'a ainsi aidée dans mes heures de formation complémentaire. Un grand merci à tous les professeurs et surtout au responsable de l'unité le Pr. Dr. Miguel Torres Ñumbay pour son soutien inconditionnel.

Merci au Dr. Martha Lara de la FCV pour m'avoir donné la possibilité de faire mes heures complémentaires de formation pendant ses cours, merci aussi pour les voyages, pour le maté, les alfajores, las milanesas et la bonne humeur.

Merci à tout le personnel de l'Université National de Canindeyú (UNICAN, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FCAA) pour m'avoir accueillie chaleureusement. Ma gratitude aux Prof. Dr. Aristides Brito Cano et au Prof. Dr. José Daniel Samaniego.

Merci aussi à tous les étudiants et étudiantes de troisième année (2019/2020) de la Filial Santani y Central, pour leur disponibilité et leur curiosité.

Merci au Service National de Santé Animale du Paraguay (SENACSA), merci à tout le personnel : le président, tous les chefs d'unité, directeurs, personnel administratif, technique de SENACSA, je n'oublie pas votre collaboration. Merci d'avoir préparée, guidée et fait en sorte que nous ayons eu trois très belles journées de discussions, de souvenirs, d'échanges de connaissances. En particulier, je veux remercier au Dra Cynthia Zárate, pour m'avoir suggéré de parler au personnel et de promouvoir notre travail auprès des éleveurs. Gracias infinitamente !

Merci à Amaias Avalos et Liz Noguera, pour avoir accepté de faire partie de cette expérience avec moi. Merci et *je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

Mes deux dernières années de thèse se sont déroulées principalement sur le site de l'école vétérinaire de Toulouse (ENVT) dans l'Unité Mixte de Recherche 1225, Equipe INMD.

Merci à Dr. Christine Citti pour m'avoir acceptée depuis 2018 au sein de l'Unité de Recherche Mixte - UMR 1225 - « Interactions Hôtes-Agents Pathogènes. Merci de votre accueil pendant toutes ces années.

Merci au Pr. Jean Luc Guerin nouveau directeur de l'Unité UMR 1225. Je vous souhaite le meilleur dans votre gestion. Également, je remercie à tout le personnel administratif : Amandine Lampin, Oriana Darcheville, Aurélie Labrador, Pascale Faure, Marie Lafon, Cyrielle Carrière, Laurence Lecompte, Audrey Espes et les techniciens de l'équipe INMD pour leur aide, leur soutien et la bonne ambiance apportée au quotidien. SETHA, merci de m'avoir formé aux techniques *in vitro*. Je te souhaite du succès dans tous tes projets. Eric, merci pour tous les bons moments, votre bonne humeur restera toujours dans mes souvenirs. Osmite, merci ma chérie, ta présence dans le laboratoire était fantastique. Merci pour ton merveilleux caractère, ta patience, pour être une vraie amie. Excellente professionnelle, attentionnée et avec un cœur d'or. *Je te souhaite le meilleur dans la vie et j'aime ton bébé depuis le jour 1 !*

Merci à tous mes collègues qui sont passé par l'unité ces dernières années ; Martha Oliveira et Mozzy, Caroline Sprengel, Bruno Dallago, Camille G, Lin Messi qui ont passé du temps de travail et de loisir avec moi pendant quelques mois ou semaines. Chacun / chacune est spéciale pour moi ! Je vais mettre une partie spéciale pour Michela

Maestrini, pour son amitié, ses conseils. Merci à la vie de t'avoir trouvé Micheeee ! *¡¡¡Te quiero mucho y tambien a Canelo !*

Merci au Dr. Mohamed Haddad de l'Université Paul Sabatier Equipe PHARMAVET pour sa collaboration, ses conseils et sa prédisposition toujours à l'écoute. *Merci Dr !*

Merci à tous et toutes les collaborateurs(es) du ferme expérimental de CIIRPO.

Merci à toutes les stagiaires qui sont passées par le laboratoire, je remercie beaucoup chacune d'entre vous, pour le bon temps passé, pour m'aider à parler la langue française (grâce à vous je fais beaucoup de progrès), pour faire que le temps passe vite ! *Camille, Léa T, Léa V, Kenza, Anny A, Sarah P, Sarah M, Alice, Marine, Héline.* Aussi un grand merci à Léa Bordes, Jeremy Lesueur.

Un grand merci à Federico Mora et á Liz Garcete. Pour moi, ils étaient les visages visibles de ce projet dès le premier jour et ils étaient aussi les premières personnes que je voudrais remercier pour leur soutien pendant toutes ces 5 années de bourse. Sans oublier bien sûr, toute l'équipe technique et administrative qui travaille pour BECAL PY, Maria José, Raquel, Virginia, aux membres de l'UEP. *Gracias ! Les deseo exitos en todos sus proyectos futuros !*

Merci également à tous/toutes mes collègues de BECAL France 02, Autogestionada04, notamment avec évidente favoritisme aux Grupe « Papadas lo que me decis ».

Merci aussi, á tous/toutes les professeurs de l'Alliance Française (Asuncion), spécialement au Prof. Carlos et à tous les professeurs de l'Institut Touraine (Tours). Un immense merci et ma gratitude éternelle.

J'essaie de n'oublier personne, mais fondamentalement chaque personne qui est arrivée au cours de ces trois années, a contribué à la réalisation de cette thèse.

Ce furent trois années de grande croissance personnelle et professionnelle.

Je termine par cette simple phrase : Merci à tous pour m'avoir accompagnée.

Griselda

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| AH: anthelminthique ou anthelminthic | NGI : nématodes gastro-intestinaux |
| ANOVA : analyse de variance | OMS/WHO : organisation mondiale de santé; world health organization |
| Ag : antigène | OPS : organisation panaméricaine de la santé. |
| CPAI/AIBP: co produits agro industriels ou agro industrial by-products | m/z rapport masse/charge atomique |
| Da : daltons | ml : millilitre/ millilitre |
| EC50 : effective concentration 50% ou concentration efficace 50% | OPG/EPG : nombre d'oeufs par gramme de fèces/ eggs par gramme |
| EGC : epigallocatechol (epigallocatechin) | PCR : polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne |
| EGCG : epigallocatechin gallate | PBS : phosphate buffer saline |
| EHA: egg hatch assay ou test d'éclosion des œufs | PRR: pattern recognition receptors |
| FAO: food and agriculture organization | PVPP: polyvinyl polypyrrolidone |
| GABA: acide gamma aminobutyrique | PCV: packed cell volume |
| GC: gallocatéchol (gallocatechin) | RA : résistance aux anthelminthiques/ anthelmintic resistance |
| GCG: gallocatéchol gallaïc (gallocatechin gallate) | RMN : résonance magnétique nucléaire |
| GIN: gastrointestinal (aux) nematodes | SD : standard déviation/ écart-type |
| HCl: acide hydrochlorhydrique | SGI : strongles gastro-intestinaux |
| HPLC : chromatographie en phase | TT : tannins totaux |
| Liquide à haute performance | TC : tannins condensés |
| HE/OE: huile essentielle/ essential oils | TH : tannins hydrolysables |
| Kg : kilogramme | µg : microgramme / microgram |
| LEIA : larval exsheathment inhibition assay ou test d'inhibition de dégagement larvaire | |
| L1s : larves de stade 1 | |
| L2s : larves de stade 2 | |
| L3s : larves de stade 3 | |
| L4s : larves de stade 4 | |
| LMIA : larve migration inhibition assay ou test d'inhibition de la migration larvaire | |
| MT : médecine traditionnelle | |
| MSP/PSM : métabolites secondaires des plantes ou plant secondary metabolites | |
| MS : spectrométrie de masse | |
| MP/PM : medicinal plants/plantes médicinales | |
| mU TYR: milliunités de tyrosine | |

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 4 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 8 |
| RESUME | 14 |
| INTRODUCTION | 17 |
| I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 19 |
| 1. Caractéristiques générales de l'élevage des petits ruminants au Paraguay | 19 |
| 2. Les parasitoses gastro intestinales chez les petits ruminants | 20 |
| 2.1. Les nématodes gastro – intestinaux (NGI) | 20 |
| 2.2. Biologie des NGI | 25 |
| 2.3. Eco - Epidémiologie des infestations NGI | 30 |
| 2.4. Conséquences des infestations par des NGI | 36 |
| 2.5. Physiopathologie de l'infestation par des NGI | 38 |
| 2.6. Méthodes de diagnostic des NGI | 40 |
| 3. Les traitements conventionnels : les molécules anthelminthiques (AH) de synthèse | 47 |
| 3.1. Les familles d'AH disponibles en médecine vétérinaire | 48 |
| 3.1. Avantages des traitements AH de synthèse | 54 |
| 3.2. Limites d'utilisation des AH de synthèse | 54 |
| 4. La résistance aux AH de synthèse dans les populations de NGI (RA) et la mise en place des stratégies de lutte alternatives | 56 |
| 4.1. Généralités | 56 |
| 4.2. Mécanisme de RA | 57 |
| 4.3. La notion de Refuge | 57 |
| 4.4. Facteurs favorisant le développement et la diffusion des RA | 58 |
| 4.5. Comment ralentir l'apparition et la diffusion des RA ? | 59 |
| 4.6. Les méthodes de lutte alternatives mises en place contre les NGI | 60 |
| 5. Médecine Traditionnelle (MT) et la recherche de l'activité biologique des plantes | 65 |
| 5.1. Généralités et concepts | 65 |
| 5.2. Situation de la MT dans le monde | 66 |
| 5.3. La recherche d'activité biologique des plantes | 68 |
| 5.4. Sélection des plantes à potentiel bioactif | 69 |
| 5.5. Préparation des plantes pour la recherche d'activité biologique | 70 |
| 5.6. Modèles expérimentaux pour la recherche de l'activité AH des plants | 71 |

| | |
|--|------------|
| 6. Métabolites Secondaires (MSP) et la recherche de l'activité biologique des plantes | 74 |
| 6.1. Généralités | 74 |
| 6.2. Classification des MSP | 75 |
| 6.3. Les Tanins | 78 |
| 7. Les plantes étudiées | 83 |
| 7.1. <i>Kyllinga odorata</i> Valh | 84 |
| 7.2. <i>Cassia occidentalis</i> L. | 88 |
| 7.3. <i>Artemisia absinthium</i> L. | 91 |
| 7.4. <i>Verbena litoralis</i> Kunth | 95 |
| <i>II. OBJECTIFS</i> | <i>99</i> |
| <i>III. TRAVAIL PERSONNEL</i> | <i>101</i> |
| CHAPITRE I | 102 |
| ARTICLE 1 | 105 |
| <i>Introduction</i> | <i>106</i> |
| CHAPITRE II | 126 |
| ARTICLE 2 | 129 |
| ARTICLE 3 | 156 |
| CHAPITRE III | 175 |
| ARTICLE 4 | 179 |
| ARTICLE 5 | 217 |
| <i>IV. DISCUSSION GENERALE</i> | <i>232</i> |
| <i>V. CONCLUSION</i> | <i>247</i> |
| <i>VI. PERSPECTIVES</i> | <i>248</i> |
| <i>VII. BIBLIOGRAPHIE</i> | <i>250</i> |
| <i>VIII. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</i> | <i>280</i> |

TABLE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Morphologie de <i>H. contortus</i> | 24 |
| Figure 2. Morphologie de <i>T. colubriformis</i> | 25 |
| Figure 3. Cycle biologique des NGI | 25 |
| Figure 4. Températures optimales qui favorisent l'écllosion des œufs et L3s | 26 |
| Figure 5. Processus de dégainement larvaire de la larve infestante..... | 28 |
| Figure 6. Représentation de facteurs épidémiologiques NGI | 31 |
| Figure 7. Note d'état corporel..... | 40 |
| Figure 8. Illustration d'une Carte FAMACHA | 41 |
| Figure 9. Index d' diarrée en vue arrière train ovins, Dag score | 42 |
| Figure 10. Index diarrée Score DISCO | 42 |
| Figure 11. Illustration de lame Mac master..... | 43 |
| Figure 12. Illustration d'un appareil de Baermann | 44 |
| Figure 13. Schéma d'une larve 3 infestante de nématode | 44 |
| Figure 14. Représentation d'un processus d'analyse de micro centrifugation | 45 |
| Figure 15. Structure chimique générale des benzimidazoles | 48 |
| Figure 16. Structure chimique du lévamisole | 49 |
| Figure 17. Structure chimique : Ivermectine | 50 |
| Figure 18. Structure chimique : closantel et nitroxinil | 50 |
| Figure 19. Structure chimique du Monepantel..... | 51 |
| Figure 20. Structure chimique du Derquantel | 52 |
| Figure 21. Les pays dotés d'une législation MT (OMS, 2019) | 67 |
| Figure 22. Pays ayant des réglementations pour les médicaments à base de plantes (OMS, 2019)..... | 67 |
| Figure 23. Pays utilisant des MT y compris issus de la médecine indigène (OMS,2019) | 68 |
| Figure 24. Les principales méthodes <i>in vitro</i> utilisées..... | 72 |
| Figure 25. Classification des tanins selon leurs structures chimiques | 79 |
| Figure 26. Structure chimique des flavan-3-ols. | 80 |
| Figure 27. Représentation de <i>K. odorata</i> Valh..... | 85 |
| Figure 28. Illustration botanique de <i>K. odorata</i> Vahl..... | 85 |
| Figure 29. Distribution géographique de <i>K. odorata</i> . Tropicos® | 86 |

| | |
|---|----|
| Figure 30. Présentation de la plante au marché. <i>K. odorata</i> Valh. | 87 |
| Figure 31. Représentation de <i>C. occidentalis</i> | 89 |
| Figure 32. Illustration botanique de <i>C. occidentalis</i> | 89 |
| Figure 33. Distribution géographique de <i>C. occidentalis</i> . Tropicos®..... | 90 |
| Figure 34. Présentation de la plante au marché. <i>C. occidentalis</i> | 91 |
| Figure 35. Représentation d’ <i>A. absinthium</i> | 92 |
| Figure 36. Illustration botanique d’ <i>A. absinthium</i> | 93 |
| Figure 37. Distribution géographique d’ <i>A. absinthium</i> Tropicos® | 93 |
| Figure 38. Présentation de la plante au marché (frais et sec) <i>A. absinthium</i> | 94 |
| Figure 39. Représentation de <i>V. litoralis</i> | 96 |
| Figure 40. Illustration botanique <i>V. litoralis</i> | 96 |
| Figure 41. Distribution géographique de <i>Verbena litoralis</i> Tropicos® | 97 |
| Figure 42. Présentation de la plante au marché (frais et sec). <i>V. litoralis</i> | 98 |
| Figure 43. Stratégie de travail et objectifs de la thèse | 99 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Les principaux NGI d'ordre Strongyloidea et leur localisation anatomique. | 22 |
| Tableau 2. Temps (en jours) de changement de stade larvaire..... | 27 |
| Tableau 3. Relation entre FAMACHA/hématocrite | 41 |
| Tableau 4. Les 6 familles d'AH utilisées contre les NGI en médecine vétérinaire..... | 53 |
| Tableau 5. Comparaison des différents test <i>in vitro</i> . Equipe INMD..... | 73 |
| Tableau 6. Classes d'homopolymères des <i>flavan -3 – ols</i> | 80 |
| Tableau 7. Propriétés et usages thérapeutiques de <i>K. odorata</i> | 86 |
| Tableau 8. Propriétés et usages thérapeutiques de <i>C. occidentalis</i> | 90 |
| Tableau 9. Propriétés et usages thérapeutiques de <i>A. absinthium</i> | 94 |
| Tableau 10. Propriétés et usages thérapeutiques de <i>V. litoralis</i> | 97 |
| Tableau 11. Résumé des valeurs d'EC 50 (unité = µg/ml) | 237 |
| Tableau 12. Résumé des valeurs des pourcentages d'inhibition (%) avec /sans PVPP. | 240 |
| Tableau 13. Les modèles plus représentatifs des CPAI | 243 |

RESUME

Les infestations par les nématodes gastro-intestinaux (NGI) représentent un problème économique et sanitaire majeur chez les ruminants au pâturage dans le monde entier. Les NGI les plus communs sont : *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.* et *Teladorsagia spp.* Depuis l'apparition des anthelminthiques (AH) de synthèse en 1950, la lutte contre ces infestations reposait principalement sur l'utilisation de ces molécules chimiques mais, l'utilisation continue et *quasi* exclusive de ces AH a provoqué le développement et la diffusion mondiale de résistance aux AH chez les petits ruminants. La lutte chimique n'apparaît donc plus comme une option durable de maîtrise des NGI. Depuis 20 ans, ce constat a stimulé l'exploration de méthodes alternatives de contrôle des NGI. Parmi elles, les plantes bioactives et leurs métabolites secondaires (MSP), notamment les tannins, représentent une option largement explorée. **Cette thèse s'inscrit dans cette approche de recherche de plantes bioactives identifiées sur la base de connaissances traditionnelles. Elle est organisée en 3 axes qui incluent des objectifs spécifiques (3 Chapitres et 5 articles) :**

1) Collecte des données ethno vétérinaires – Pour identifier des plantes d'intérêt AH par une enquête ethnobotanique réalisée au Paraguay, afin de sélectionner des plantes bioactives comme alternatives potentielles pour lutter contre les NGI. A la suite de cette enquête, 4 plantes ont été retenues (*Kyllinga odorata*, *Cassia occidentalis*, *Artemisia absinthium*, *Verbena litoralis*) sur la base de critères pré établis et des extraits ont été préparés pour la suite de cette thèse.

2) Essais *in vitro* – Pour valider et comparer sur la base de 2 essais *in vitro* (sur les larves (LEIA) ou les œufs (EHA)) les effets AH des 4 plantes sélectionnées. Deux espèces, *H. contortus* et *T. colubriformis* ont été les modèles expérimentaux de NGI. En complément, des analyses métabolomiques par UPHLCMS ont été menées pour caractériser les possibles composés bioactifs impliqués. Les principaux résultats obtenus ont montré : 1) une activité AH *in vitro* sur les larves et les œufs pour 3 des 4 plantes, l'exception étant *V. litoralis*. 2) *H. contortus* s'est avéré moins sensible aux effets des 3 plantes que *T. colubriformis*. 3) Pour *C. occidentalis*, des monomères de polyphénols (flavanols, flavones) semblent en partie responsables des propriétés AH. Pour *K. odorata* et *A. absinthium*, les effets AH semblent associés à d'autres métabolites que les polyphénols comme la luvategin (*K. odorata*) ou l'artémisine (*A. absinthium*).

3) Essai *in vivo* – But : conduire un essai *in vivo* pour confirmer les effets AH sur des infestations par des NGI et la résilience de l'hôte d'une complémentation de la ration par des granulés déshydratés à base de ressources riches en tannins d'origine tempérées et tropicales (Amérique du Sud) . Dans cette étude, les agnelles consommant le complément riche en tannins et extraits de plantes ont montré une réduction d'excrétion des œufs dans les fèces proche de la signification statistique ($P < 0.08$) et une amélioration des critères de la résilience de l'hôte (*i.e.* meilleur gain de poids, état corporel). En conclusion, ces résultats semblent valider l'intérêt de la démarche adoptée et développée à partir de connaissances populaires traditionnelles pour identifier puis confirmer des alternatives à base de plantes afin d'exploiter des ressources et molécules naturelles comme sources futures d'aliments voire de médicaments nouveaux applicables chez les petits ruminants pour gérer les NGI.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematode (GIN) infections represent a major economic and health problem in grazing ruminants worldwide. The most common GINs are: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.* and *Teladorsagia spp.* Since the appearance of synthetic anthelmintics (AH) in 1950, the fight against these infections has relied mainly on the use of these chemical molecules. However, the continuous and almost exclusive use of these AH has caused the development and worldwide distribution of resistance to AH in small ruminants. Chemical control therefore no longer appears to be a sustainable option for controlling GIN. For 20 years, this finding has stimulated the exploration of alternative methods to control GINs. Among them, bioactive plants and their secondary metabolites (PSM), in particular tannins, represent a widely explored option. **This thesis is part of this research approach for bioactive plants identified on the basis of traditional knowledge.** It is organized into **3 axes which include specific objectives (3 Chapters and 5 articles):** **1) Data collection** – Identification of ethnoveterinary plants of AH interest by an ethnobotanical - ethnoveterinary survey carried out in Paraguay, to select bioactive plants as potential alternatives to control GIN. Following this investigation, 4 plants were selected based on pre-established criteria (*Kyllinga odorata*, *Cassia occidentalis*, *Artemisia absinthium*, *Verbena litoralis*) and plant extracts were prepared for the rest of this thesis. **2) In vitro tests** - to validate and compare on the basis of 2 *in vitro* tests (on larvae (LEIA) or eggs (EHA)) the AH effects of the 4 selected plants. Two species, *H. contortus*, and *Trichostrongylus colubriformis* were the experimental models of GIN. In addition, metabolomic analysis by UPHLCMS were carried out to characterize the possible bioactive PSM involved. The main results obtained showed: 1) some *in vitro* AH activity on larvae and eggs for 3 of the 4 plants, the exception being *V. litoralis*. 2) *H. contortus* was found to be less sensitive to the effects of all 3 plants than *T. colubriformis*. 3) For *C. occidentalis*, polyphenols (flavanols, flavones) seem mainly responsible for AH properties. For *K. odorata* and *A. absinthium*, AH effects appear to be associated with other metabolites such as Luvategin (*K. odorata*) or Artemisin (*A. absinthium*). **3) In vivo assay** - to confirm the AH effects on GIN infections and the host resilience. This relied on diet supplementation with dehydrated pellets based on temperate and tropical resources (South America) rich in tannins and bioactive plant extracts. In this study, ewes consuming the supplement rich in tannins plus plant extracts showed a non-significant reduction in egg excretion in the feces, and an improvement in the criteria of host resilience (*i.e.*, better weight gain, body condition score). In conclusion, these results seem to confirm the interest in the approach developed from traditional popular knowledge to identify and confirm plant-based alternatives to exploit natural resources and/or develop novel molecules as future sources of drugs or even new drugs against GINs in small ruminants.

RESUMEN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) representan un importante problema económico y sanitario en los rumiantes que pastan en todo el mundo. Los NGI más comunes son: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.* y *Teladorsagia spp.* Desde la aparición de los antihelmínticos sintéticos (AH) en 1950, la lucha contra estas infecciones se ha basado principalmente en el uso de estas moléculas químicas. Sin embargo, el uso continuo y casi exclusivo de estos AH ha provocado el desarrollo y distribución mundial de la resistencia al AH en pequeños rumiantes. Por tanto, el control químico ya no parece ser una opción sostenible para controlar los NGI. Desde hace 20 años, este hallazgo ha estimulado la exploración de métodos alternativos para controlar las NGI. Entre ellos, las plantas bioactivas y sus metabolitos secundarios (MSP), en particular los taninos, representan una opción ampliamente explorada. **Esta tesis forma parte de este proceso de investigación de plantas bioactivas identificadas a partir de conocimientos tradicionales.** Esta organizada en **3 ejes que incluyen objetivos específicos (3 capítulos y 5 artículos):** **1) Recolección de datos** - Identificación de plantas ethno-veterinarias de interés AH mediante un relevamiento etnobotánico-ethno-veterinario realizado en Paraguay, con el fin de seleccionar plantas bioactivas como posibles alternativas para controlar los NGI. Tras esta investigación, se seleccionaron 4 plantas en base a criterios preestablecidos (*Kyllinga odorata*, *Cassia occidentalis*, *Artemisia absinthium*, *Verbena litoralis*) y se prepararon extractos de plantas para las siguientes etapas de esta tesis. **2) Ensayos *in vitro*** - para validar y comparar sobre la base de 2 ensayos *in vitro* (en larvas (LEIA) y en huevos (EHA)) los efectos AH de las 4 plantas seleccionadas. Dos especies, *H. contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* fueron los modelos experimentales de NGI. Además, se llevaron a cabo análisis metabolómicos por UPHLCMS para caracterizar los posibles MSP bioactivos involucrados en la actividad AH. Los principales resultados obtenidos mostraron: 1) cierta actividad AH *in vitro* sobre larvas y huevos para 3 de las 4 plantas, con la excepción de *V. litoralis*. 2) Se encontró que *H. contortus* es menos sensible a los efectos de las 3 plantas que *T. colubriformis*. 3) Para *C. occidentalis*, los polifenoles (flavanoles, flavonas) parecen ser los principales responsables de las propiedades AH. Para *K. odorata* y *A. absinthium*, los efectos de AH parecen estar asociados con otros metabolitos como Luvategin (*K. odorata*) o Artemisin (*A. absinthium*). **3) Ensayo *in vivo***: para confirmar los efectos AH sobre las infecciones por GIN y la resistencia del huésped. Para ello se basó en la suplementación dietética con gránulos deshidratados a base de recursos templados y tropicales (Sudamérica) ricos en taninos y extractos de plantas bioactivos. En este estudio, las ovejas que consumieron el suplemento rico en taninos más extractos de plantas mostraron una reducción no significativa en la excreción de huevos en las heces, por el contrario, una mejora en los criterios de resiliencia del huésped (es decir, aumento de peso, mejor estado corporal) fue observada. En conclusión, estos resultados parecen confirmar el interés del enfoque desarrollado a partir del conocimiento popular tradicional para identificar y confirmar alternativas vegetales con el fin de explotar los recursos naturales y / o desarrollar nutraceúticos o incluso podrían servir de base de nuevos fármacos para el control de NGI en pequeños rumiantes.

INTRODUCTION

Les nématodes gastro-intestinaux (NGI) communément appelés strongles gastro-intestinaux (SGI) représentent un problème majeur en élevage des petits ruminants au pâturage.

La méthode de contrôle habituelle depuis 1950 était l'utilisation de traitements anthelminthiques (AH) de synthèse. Malheureusement, cette méthode est devenue de moins en moins efficace en raison du développement de résistances aux anthelminthiques (RA).

Depuis les années 1980, un intérêt croissant pour la recherche d'alternatives aux traitements AH pour ralentir l'apparition des RA a été noté. Parmi ces alternatives, l'utilisation de plantes qui contiennent des métabolites secondaires (MSP) à effet AH est une des options exploitées. Une des stratégies pour collecter ces informations est l'enquête ethnobotanique. Elle consiste à étudier l'interaction entre les populations et leur environnement, dont les plantes utilisées en MT, avec une approche anthropologique incluant l'étude des croyances - c'est-à-dire basée sur "*la culture locale*".

La plupart des études du type ethno se concentrent sur une population ou un groupe ethnique spécifique. Néanmoins la collecte d'informations auprès des populations urbaines et mixtes (*i.e.* métisse) est minime (Balick et al., 2000).

À notre connaissance, très peu d'études ont traité des plantes médicinales utilisées par la population du Paraguay. L'originalité de cette thèse réside dans des informations recueillies auprès d'une population hétérogène. Quatre-vingt-quinze % de la population du Paraguay est considérée comme métisse (Pérez-Torres, 2012) et 63% de la population habite dans une zone urbaine (DGEEC, 2002).

Notre travail de thèse a principalement porté sur l'évaluation des effets anthelminthiques de quatre plantes médicinales contre les larves infestantes (L3) et les œufs de NGI des petits ruminants par utilisation des test *in vitro* puis d'essais *in vivo* et de caractériser leurs métabolites secondaires afin de les suggérer comme alternative de contrôle des NGI. Ces plantes ont été mentionnées à la suite d'une enquête ethno botanique.

Cette thèse se présente sous forme d'articles acceptés, publiés ou prêts à soumission.

Avant de présenter nos résultats et de les commenter, une revue bibliographique sera présentée pour mieux cerner le sujet à traiter. Puis, les résultats seront exposés par chapitres (trois au total) et discutés : Chapitre I – Enquête ; Chapitre II – Essais *in vitro* ; Chapitre III – Bioproduits et un essai *in vivo.*, pour terminer par une discussion générale et des perspectives.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Caractéristiques générales de l'élevage des petits ruminants au Paraguay*

L'élevage de petits ruminants au Paraguay est encore en développement. En comparaison avec d'autres pays de la région comme par exemple, l'Argentine (4.000.000 caprins ; 14.000.000 ovins) la population des petits ruminants en Paraguay est petite. Elle est estimée entre 150.000 et 400.000 (FAO, SENACSA, 2018).

Les principales races ovines présentes au Paraguay sont : Criolla, Santa Inès, Hampshire Down, Texel, Suffolk, Border Leicester, Corriedale, Romney Marsh. Parmi les races caprines : Criolla, boer, anglo-nubienne, alpine française, Saanen et Toggenburg.

La production de petits ruminants en élevage est généralement complémentaire à l'élevage bovin. Dans le cas de l'élevage à petite échelle, il est considéré comme un élément d'épargne des familles. Le système de production le plus répandu est le système extensif en prairies naturelles, certains avec enclos de nuit. Une minorité des éleveurs utilise des systèmes semi-intensifs, gérés sous forme de pâturage en rotation ou avec une supplémentation fourragère.

La production caprine et ovine au Paraguay est un secteur économique en développement avec des perspectives économiques prometteuses. Bien qu'il y ait eu de nombreuses avancées ces dernières années, beaucoup reste à faire pour considérer cette production comme compétitif et attractif. Les principales limites pour la production de petits ruminants mentionnées sont : les conflits sociaux, le manque de programmes sanitaires principalement sur la parasitose, l'accès au financement et le manque de technologies adaptées aux conditions des éleveurs (FAO,2004).

Des sources officielles rapportent la présence de plus de 70% d'anthelminthique résistance (RA) dans l'une des familles les plus important pour la catégorie laitière (*i.e.* Benzimidazoles), chez les ovins (Maciel et al., 1996). La recherche d'alternatives pour le contrôle de la RA, basée sur l'utilisation des ressources naturelles, peut être vue comme un outil pour améliorer et promouvoir l'intérêt pour la production de petits ruminants au Paraguay et dans la région.

2. Les parasitoses gastro intestinales chez les petits ruminants

Les parasitoses gastro-intestinales (*e.g.* coccidioses, distomatoses, téniasis, strongyloses) sont un problème majeur en élevage des petits ruminants. Les pertes financières et agricoles causées par les parasites gastro-intestinaux ont un impact substantiel sur la rentabilité des exploitations. Par exemple, les coûts annuels associés aux maladies parasitaires sont évalués à des dizaines de milliards de dollars dans le monde, sur la base des ventes d'antiparasitaires par les laboratoires pharmaceutiques, hors pertes de production (Roeder et al., 2013).

Parmi les parasitoses gastro-intestinales chez les petits ruminants, les nématodes du tractus digestif sont les plus prévalents, communément appelés strongles gastro-intestinaux (SGI)¹ ou strongles digestifs (Euzéby, 1963). Les maladies causées par des SGI sont appelées les strongyloses.

Les strongyloses sont répandues dans l'élevage de petits ruminants, leur évolution chronique et subclinique habituellement discutée fait souvent sous-estimer leur importance réelle, habituellement confondues avec déficits nutritionnelles.

Le contrôle des SGI est considéré comme un élément essentiel de la gestion de la santé de troupeaux au pâturage. Les petits ruminants présentent ainsi une réceptivité et une sensibilité aux infestations par les SGI plus importantes que les bovins (Ravinet et al., 2017).

2.1. Les nématodes gastro – intestinaux (NGI)

Les nématodes gastro – intestinaux appartiennent à l'ordre des Strongylida et à deux super familles distinctes : Les Trichostrongyloidea (capsule buccale absente ou très réduite) ; Les Strongyloidea (capsule buccale infundibuliforme pourvue ou dépourvue de lames tranchantes) (Euzéby, 1963) (Table 1).

La plupart des NGI des petits ruminants appartiennent à la famille des Trichostrongylidae, subdivisée en quatre sous-familles : *Haemonchinae*, *Trichostrongylinae*, *Ostertagiinae*, *Cooperiinae*.

¹ Pour faciliter la lecture dans ce document SGI et NGI sont considérés comme synonyme

La classification mentionnée ci-dessus, est basée sur la distinction entre différentes espèces de Trichostrongles qui a été réalisée depuis longtemps à partir des caractéristiques morphologiques et bases anatomiques des vers adultes (*e.g.* longueur, aspect de la bourse caudale et de la capsule buccale, longueur et forme des spicules).

Actuellement, le développement de techniques de phylogénie moléculaire permet d'affiner voire de réviser la classification des Trichostrongles par des outils moléculaires sur la base du polymorphisme de l'ADN génomique ou des gènes eux-mêmes ou du polymorphisme de certaines enzymes des Trichostrongles (Gouÿ De Bellocq et al., 2001 ; Delannoy-Normand, 2010).

Chez la plupart des petits ruminants au pâturage existe un poly-parasitisme (plusieurs espèces de strongles colonisent différentes portions du tube digestif au même moment chez un même individu, constituant une communauté d'helminthes).

Certaines espèces de NGI ont une action pathogène majeure (*Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*) tandis que d'autres (*Cooperia curticei*, *Oesophagostomum venulosum*) sont rarement pathogènes seuls, mais contribuent aux gastro-entérites parasitaires en cas de poly-parasitisme (Zajac, 2006).

1 **Tableau 1.** Les principaux NGI d'ordre Strongyloidea et leur localisation anatomique chez les petits ruminants

2

| Super Famille | Famille | Sous Famille | Genre | Espèces (exemples) | P | Localisation anatomique |
|----------------------|--------------------|----------------------|------------------|----------------------------------|-----|-------------------------|
| Trichostrongyloidea | Trichostrongylides | Haemonchinae | Haemonchus | <i>H. contortus</i> | +++ | Abomasum |
| | | Trichostrongylinae | Trichostrongylus | <i>T. colubriformis</i> | + | Intestins grêle |
| | | | | <i>T. axei</i> | | Abomasum |
| | | Osteargiinae | Ostergia | <i>Teladorsagia circumcincta</i> | ++ | Abomasum |
| | | | | <i>O. ostertagi</i> | | Abomasum |
| | | Cooperiinae | Cooperia | <i>C. curticei</i> | + | Intestin grêle |
| | | | | <i>C. oncophora</i> | | Intestin grêle |
| | | Nematodirinae | Nematodirus | <i>N. battus</i> | + | Intestin grêle |
| | | | | <i>N. helvetianus</i> | | |
| | | | | <i>N. spathiger</i> | | |
| <i>N. filicollis</i> | | | | | | |
| Strongyloidea | Strongylidae | Oesophagostomatiinae | Oesophagostomum | <i>O. columbianum</i> | +++ | Caecum -Colon |
| | | | | <i>O. venulosum</i> | | |
| | Chabertiidae | Chabertiinae | Chabertia | <i>C. ovina</i> | + | Tube digestif |

P : Pouvoir pathogène (+ bas, ++ moyenne, +++ fort).

Parmi les espèces NGI qui affectent les petits ruminants, les deux espèces qui font l'objet de notre étude sont : I) *H. contortus* et II) *T. colubriformis* en raison de :

- (a) leur prévalence en systèmes d'élevage au pâturage,
- (b) leur impact sanitaire et économique,
- (c) la prévalence des résistances aux anthelminthiques reportées dans le monde,
- (d) le modèle dans l'équipe INMD,
- (e) leur large répartition dans le monde (climat tempéré et tropical),
- (f) les localisations anatomiques différentes (i.e. recommandations pour test *in vitro*)

A continuation, les caractéristiques plus importantes de ces deux espèces de NGI seront brièvement décrites :

1. *Haemonchus contortus*

- Identification macroscopique :

Les nématodes adultes de *H. contortus* sont très facilement identifiables par leur emplacement dans l'abomasum et leur grande taille. La longueur moyenne du mâle est de 1,0 à 2,0 cm et celle de la femelle de 1,8 à 3,0 cm (Roeber et al., 2013).

- Identification microscopique :

L'extrémité antérieure est composée d'une ébauche de capsule buccale en entonnoir, renfermant une petite lancette dans le fond, qui permet aux parasites d'atteindre la lumière des capillaires sanguins de la muqueuse abomasale.

Les mâles sont caractérisés par une bourse copulatrice formée de deux grands lobes latéraux, d'un petit lobe dorsal asymétrique soutenu par une côte en Y et deux spicules (0,5 mm) (Aymeric, 2011) (Figure1A). Chez les femelles, la vulve est localisée au quart de la longueur du corps en avant de l'extrémité caudale, et est en général surmontée d'une languette supra-vulvaire (Bussiéras et Chermette, 1988) (Figure1B).

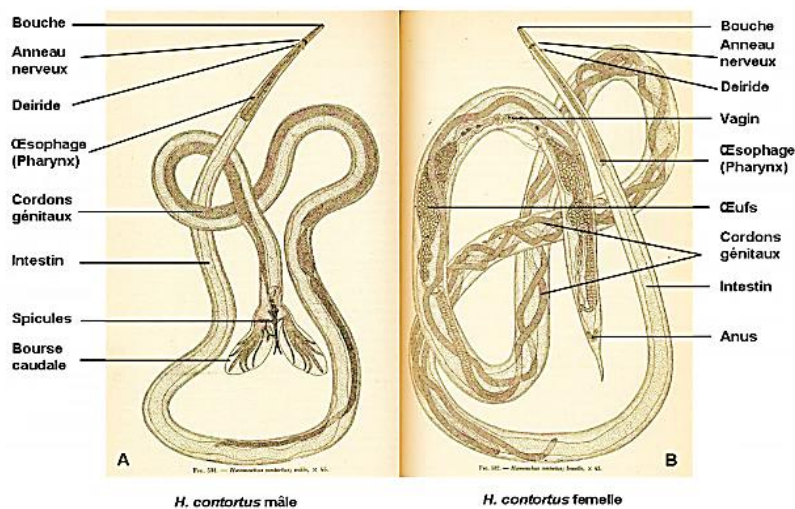
- Distribution géographique :

Sa distribution géographique est mondiale en raison de ses grandes capacités d'adaptation aux variations climatiques. Le parasite trouve des conditions chaudes et humides très favorables dans les pays tropicaux et subtropicaux (O'Connor et al., 2006) ; cependant, au fil des ans, une prévalence a également été signalée dans les régions tempérées en raison des changements climatiques (Rose et al., 2016).

- Le pouvoir pathogène :

Il est principalement lié à son action spoliatrice chez l'hôte (*e.g.* mode d'alimentation hématophage ayant pour conséquence une spoliation de sang et une anémie), mais également à un effet traumatique local (lors de la phase parasitaire intra-muqueuse des stades larvaires et lors de la phase de nutrition des adultes).

Figure 1. Morphologie de *H. contortus* (représentation schématique d'un mâle en FigA et d'une femelle en FigB).



Source illustration : (Neveu-Lemaire, 1936 ; Euzeby, 1963)

2. *Trichostrongylus colubriformis*

- Identification macroscopique :

Les mâles peuvent atteindre 6 mm et les femelles jusqu'à 8 mm de long. Les adultes, difficilement discernables à l'œil nu se logent dans des tunnels créés entre les cellules épithéliales et s'accrochent aux vellosités grâce à la présence des crêtes cuticulaires (Giles, 1892).

- Identification microscopique :

Ils ont de petites stries transversales dans leur cuticule et une capsule buccale minuscule avec trois lèvres indéfinies (Vicente et al., 1997). Les mâles ont une poche copulatoire bien développée avec un gubernaculum naviculaire et des spicules courts, épais, de couleur brunâtre en forme de « harpon » (Figure2A). Les femelles ont l'ouverture vulvaire ovale ; la queue est courte et se termine en pointe (Figure2B) (Ratko, 2008).

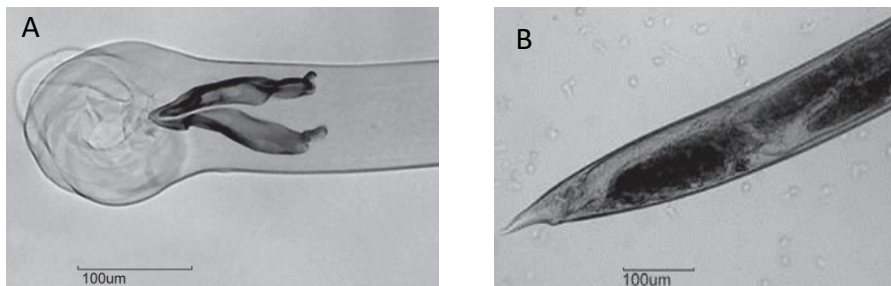
- Distribution géographique :

T. colubriformis est une espèce cosmopolite. Elle se développe dans les régions à climat tempéré, subtropical et tropical mais est légèrement plus sensible aux basses températures (Lacroux, 2006 ; O'Connor et al., 2006).

- Le pouvoir pathogène :

Il est lié au développement de l'entéropathie, qui provoque une atrophie plus ou moins sévère des villosités intestinales. *T. colubriformis* est chymivore. Il est responsable, dans la forme aiguë, de diarrhées profuses, de déshydratation et de mortalité chez les jeunes ; dans la forme chronique, de diarrhées intermittentes et d'une baisse de production chez les animaux adultes (Chartier et al, 1981).

Figure 2. Morphologie de *T. colubriformis* (photo de mâle A, femelle B)

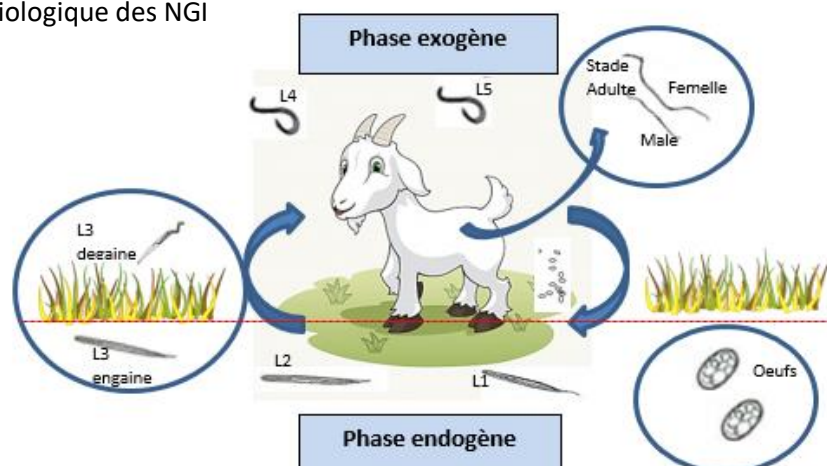


Source illustration : (Talamiri et Amarante, 2014)

2.2. Biologie des NGI

Le cycle biologique des NGI est un cycle de vie monoxène, ce qui signifie qu'un seul hôte. L'hôte définitif est impliqué dans le cycle et comporte deux phases l'une exogènes et l'autre endogène. Dans les deux espèces des NGI présentées ci-dessus, le cycle est identique (Figure3).

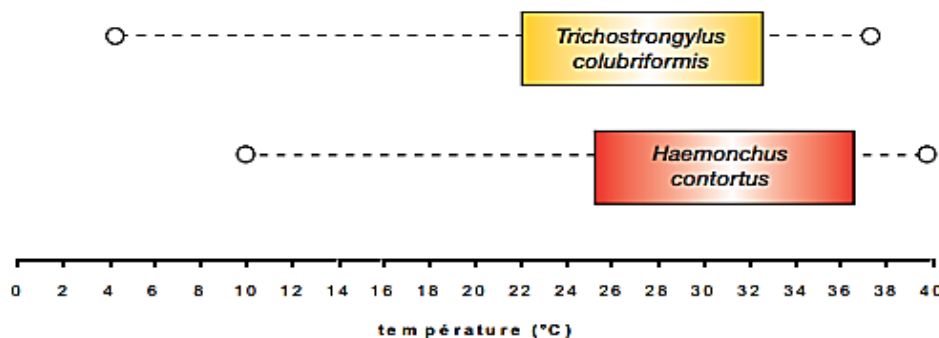
Figure 3. Cycle biologique des NGI



a. La phase exogène

La phase exogène débute par l'élimination d'œufs pondus par les vers femelles dans les matières fécales de l'hôte. Si les conditions de température et d'humidité sont favorables les œufs éclosent en larves rhabditiformes de 1er stade (L1). Cette larve L1 devient une larve L2. Ces stades intermédiaires L1 et L2 sont peu résistants dans le milieu extérieur et elles se nourrissent. La larve L2 à son tour subit une mue qui la fait passer au stade de larve strongyloforme (L3) : la larve infestante L3. Cette larve L3 est protégée par la cuticule de la L2 et ne se nourrit pas (la L3 est entièrement enfermée dans la gaine). Ses réserves glycolipidiques et lipidiques lui permettent de vivre et de se déplacer. La L3 possède un hygrotropisme positif, un phototropisme négatif et un géotropisme négatif (Graber et Perrotin, 1983). En général, le développement des larves de *T. colubriformis* se produit dans une gamme de température optimale d'environ 22 ° C à 32 ° C. *H. contortus* est souvent décrit comme un parasite des tropiques et se développe en L3 avec un succès plus élevé à des températures allant de 25 ° C à 37°C. (Figure4).

Figure 4. Températures optimales (blocs de couleur) et zones de tolérance (en pointillé) qui favorisent l'éclosion des œufs et leur transformation en L3s chez les NGI.



Source illustration : (O'Connor et al. 2006)

b. La phase endogène

La phase endogène ou phase parasitaire proprement dite commence par l'ingestion des larves L3 par l'hôte lors du pâturage. Une fois ingérées les L3 sortent de leur gaine dans le compartiment qui précède le site occupé par l'étape adulte (rumen pour *H. contortus*, abomasum pour *T. colubriformis*) (Hertzberg et al., 2002) puis, les L3 dégainées pénètrent dans les muqueuses pour continuer leur développement en larves du 4ème stade (L4). Après la mue, les larves 4 retournent dans la lumière du tube digestif

et vont évoluer en stade 5 ou stade juvénile (S5). Les S5 sont par la suite considérés comme adultes une fois la maturité sexuelle acquise (Sommerville, 1957).

Le temps écoulé entre l'ingestion des L3s par l'hôte et la première ponte d'œuf par les vers femelles est appelée la période prépatente (Novilla, 2005).

Au terme de cette période prépatente, les œufs sont émis dans la lumière de l'appareil digestif et éliminés avec les fèces sur la pâture (Anderson et Rings, 2009). La plupart des NGI commencent à produire des œufs environ trois semaines après l'infestation.

La phase endogène est une étape décisive dans le cycle des NGI. Un résumé des étapes de développement larvaire après ingestion sont détaillées dans le (Tableau2).

Tableau 2. Temps (en jours) de mue de stade larvaire d'*H. contortus* et de *T. colubriformis*

| Etapes du parasite | <i>H. contortus</i> | <i>T. colubriformis</i> |
|---|-----------------------|-------------------------|
| Présence des larves L3, dans l'organe cible après ingestion | 2 ^{ème} | 2 - 5 ^{ème} |
| Mue des larves L3, en Larves L4 | 4 - 5 ^{ème} | 7 - 8 ^{ème} |
| Evolution des larves L4 en S5 | 9 - 11 ^{ème} | 15 ^{ème} |
| Période pre- patente | 15 - 21 | 15 - 21 |

Source Tableau : (Veglia, 1915 ; Soulsby, 1982 ; Lacroux, 2006).

Pour une bonne compréhension de la biologie des larves et pour comprendre le comportement des populations de nématodes deux concepts doivent être définis : 1. Le processus dégainement larvaire ; 2. Le phénomène d'hypobiose.

1. Le processus de dégainement larvaire

La perte de la gaine est un phénomène actif en réponse à certaines stimulations intrinsèques et extrinsèques. Tous les nématodes subissent quatre mues cuticulaires, du L1 à l'adulte mature.

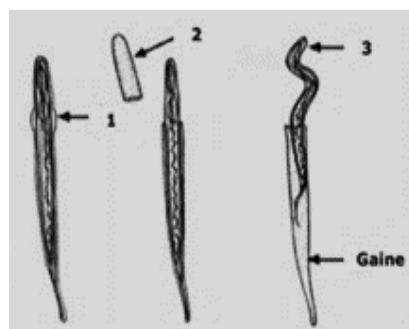
Le processus de mue se déroule en trois étapes générales : (1) léthargie, dans laquelle l'activité du ver diminue ; (2) l'apolyse, dans laquelle l'ancienne cuticule se sépare de l'hypoderme ; et (3) l'ecdysis, dans laquelle l'ancienne cuticule est complètement perdue et la larve émerge comme la prochaine étape avec une nouvelle cuticule (Singh et Sulston, 1978, Page et al., 2014).

Pour la phase externe : après éclosion des œufs les larves ont 2 mues. Le processus de mue est contrôlé par le système endocrinien de la larve (œuf – L1 – L2) il est suggéré que le retard de dégainement de la L2 est à cause de la suspension des mécanismes endocriniens normaux (Rogers et Sommerville, 1957, Hertzberg et al., 2002).

Lors la phase interne : après ingestion des L3, un stimulus de l'hôte est nécessaire pour relancer le développement. Ce stimulus provoque la sécrétion et l'excrétion par des cellules glandulaires de la L3 (par des pores excréteurs) d'un fluide riche en protéases et acétylcholinestérases, un processus qui détermine le site de dégainement dans le tractus gastro-intestinal (Sommerville, 1957 ; Rogers, 1966). Ces stimuli dépendent de l'espèce de NGI. Pour *H. contortus* une exposition à un environnement riche en bicarbonate / dioxyde de carbone, pH neutre est requise ; cependant, pour *T. colubriformis*, une valeur de pH acide, l'acide chlorhydrique et la pepsine, 100% CO₂ sont requis (Silverman et Podger, 1964, Hertzberg et al., 2002) , la variation de température lors de l'ingestion en tant que stimulus a été mentionnée par (Rogers et Sommerville, 1963).

Le dégainement de la larve infestante s'opère ensuite en 3 étapes successives : 1) la formation d'un anneau indenté dans la partie antérieure de la gaine ; 2) la digestion et la séparation de la coiffe du reste de la gaine ; 3) la sortie de la L3 (Gamble et Zajac, 1992) (Figure5).

Figure 5. Processus de dégainement larvaire de la larve infestante



Source illustration : (Brunet, 2008).

2. Le phénomène de l'hypobiose

Dans le cycle de vie des NGI il arrive dans certaines circonstances que les larves s'enkystent dans la muqueuse digestive et retardent leur développement pendant le passage de L3 à L4, ce phénomène s'appelle « l'hypobiose larvaire ou du développement retardé des larves ».

Le terme « hypobiose » (dérivé du grecque « hupo » signifiant sous et « bios » signifiant vie), désigne une période de vie « endormie » des larves, durant laquelle elles ne conservent qu'un niveau de métabolisme très bas tout en pouvant reprendre leur développement normal (Bosc, 2016).

Horak en 1981 a suggéré qu'il existe essentiellement deux types d'hypobiose chez les nématodes parasites : a) Hypobiose non spécifique et b) hypobiose saisonnier.

- a) L'Hypobiose non spécifique peut survenir à tout moment et ses causes peuvent être des facteurs liés à l'hôte ou aux parasites qui affectent l'environnement immédiat du nématode, provoquant une inhibition du développement.
- b) L'Hypobiose saisonnier représente un événement annuel au cours de la même saison et dépend de l'adaptation des nématodes à un environnement particulier et de leur réceptivité à des stimuli environnementaux externes agissant sur les larves infectieuses provoquant un arrêt à un stade ultérieur de développement.

Plusieurs stimuli inductifs potentiels ont été étudiés pour l'hypobiose saisonnière *tels que*: température (Rose et al., 2016) ; stimuli environnemental (*i.e.* généralement par une réponse aux signaux environnementaux qui annoncent l'arrivée de conditions défavorables) (Chapman, 1982), photopériode (Lützelshwab et al., 2005). Le rôle hormonal a été aussi étudié, les résultats ont montré que les larves de *H. contortus* possèdent d'éventuels récepteurs de progestérone P4-R et répondent à cette hormone en inhibant leur processus de mue, suggérant ainsi la participation de la progestérone dans le phénomène hypobiose (Gutiérrez-Amézquita et al., 2017).

Le processus exact d'entrée ou de sortie de l'hypobiose est encore partiellement compris, il peut être dû au statut immunitaire de l'hôte (plus hypobiose chez les animaux plus âgés), au climat (Charlier et al., 2020).

Le phénomène de hypobiose est considéré un problème en élevage car : i) permet au parasite d'avoir un grand nombre de formes infectieuses disponibles à des moments du cycle de vie de l'hôte (pre – post partum) qui coïncident avec la présence de jeunes animaux sensibles assurant ainsi la transmission d'une génération à l'autre. La réactivation simultanée constitue un pic larvaire de printemps (Meradi et al., 2016) ; II) il peut favoriser le développement de la résistance aux anthelminthiques, car les L4 enkystées sont moins sensibles aux anthelminthiques (Zajac, 2006 ; Zajac et Garza, 2020).

2.3. Eco - Epidémiologie des infestations NGI

Pour évaluer une maladie telle que les helminthiases, la triade épidémiologique traditionnelle (*e.g.* hôte, parasite, environnement) doit être élargie pour inclure des approches d'écologie évolutive, économiques et sociaux comme éléments intrinsèques de l'influence de l'environnement sur la maladie comme a été proposé par (Moreno-Romieux et al., 2017) ; et (Charlier et al., 2020).

Donc, désormais en médecine vétérinaire nous ne parlons plus seulement que « d'épidémiologie », mais d'un concept plus large d'éco - épidémiologie (dont, « Eco » correspond à : économique – écologique).

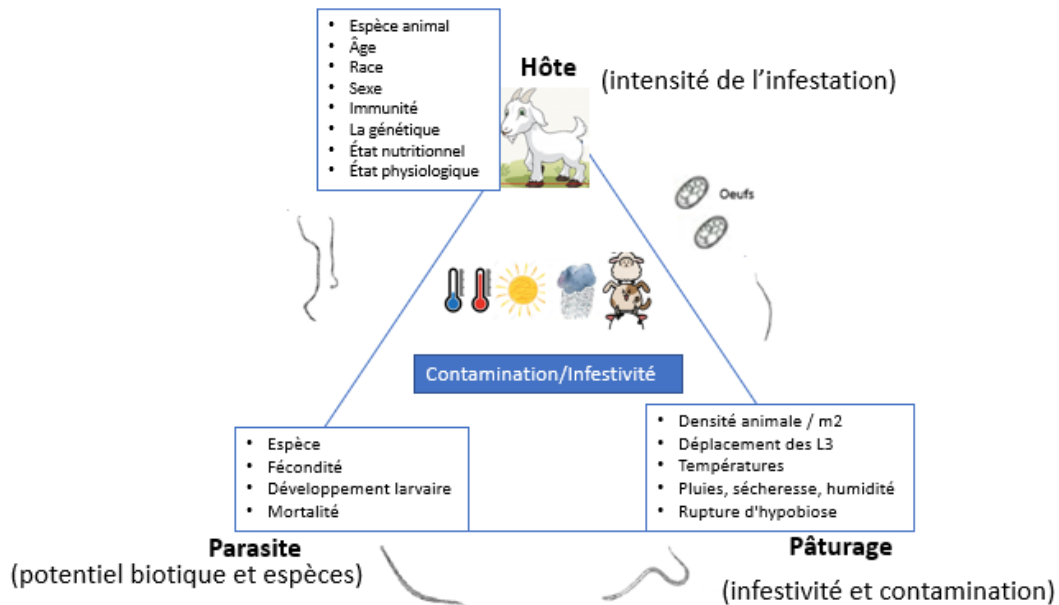
La présence dans une région des parasites, y compris les nématodes, est limitée par le potentiel biotique, par la répartition des hôtes possibles et par des caractéristiques environnementales.

Pour mieux comprendre l'épidémiologie des infestations par NGI, certains concepts seront mentionnés ci-dessous :

- **Le potentiel biotique** est défini comme la capacité d'un organisme à réussir sur le plan biologique et est mesuré par la fertilité (Hermann, 2017).
- **L'intensité de l'infestation** de l'hôte dépend *du nombre* de L3s ingérées mais aussi des caractéristiques de l'hôte (réceptivité).
- **L'infestivité** dépend du nombre d'œufs déposés, de leur vitesse de développement et de la survie des L3s. La notion d'infestivité correspond à la *quantité de L3s* présentes sur une parcelle *qui peuvent être ingérés par les animaux*.
- **La contamination**: la contamination fait référence au nom de stades de vie libres L3 *viabiles par unité de surface* (abondance) le nombre de larves 3 par kg d'herbe ou m2 de pâturage (Mounport et al., 1989).

Au cours d'une saison de pâturage, les problèmes à cause des parasites dans la production sont liés aux trois facteurs : I) aux parasites (potentiel biotique et espèces), II) au niveau de parasites présents dans l'animal (intensité de l'infestation), III) au niveau de parasites présents dans les pâturages (infestivité et contamination) (Figure6).

Figure 6. Représentation de facteurs épidémiologiques qui favorisent l'apparition des infestations par NGI



Les facteurs de conditionnement des infestations par les NGI peuvent être résumés en trois, en suivant la typique triade épidémiologique en : A) au niveau du parasite ; B) au niveau du pâturage ; C) au niveau de l'hôte.

A. Au niveau du parasite :

1. Espèce de parasite : selon l'espèce du parasite et sa prévalence, des prédictions de sa distribution dans l'environnement peuvent être faites et donc des mesures de gestion peuvent être appliquées.
2. Prolificté/Fécondité : la prolificté est le mécanisme complet de fertilité des femelles mesuré par nombre d'œuf / jour/mois/an.

H. contortus est un nématode très fécond, une femelle peut produire 10.000 œuf/jour, et les larves sur les pâturages peuvent s'accumuler rapidement pendant la saison de pâturage, *T. colubriformis* est moins fécond, une femelle peut produire 100 œufs/jour (Coyne et Smith, 1992).

3. Développement des stades larvaires : ce phénomène se caractérise par des conditions différentes pour leur développement et leur survie.

Les deux premiers stades larvaires (L1 et L2) sont les plus vulnérables aux situations climatiques. Les larves L3 et œufs sont plus résistants.

4. Développement optimal des L3 : la survie sur le pâturage des formes larvaires libres (L3s) dépend des conditions climatiques et de l'espèce de parasite.

Comme la larve L3 ne peut pas se nourrir tant qu'elle reste dans l'environnement, la survie est donc conditionnée par leurs réserves énergétiques, qui sont consommées en relation directe avec la température ambiante (O'Connor et al., 2006).

5. Mortalité des larves : le taux de mortalité inclut les formes larvaires libres dans une certaine zone, il est influencé par la température, l'espèce, l'humidité.

En saison sèche, les larves présentes sur l'herbe ont une mortalité significative tandis que celles dans les matières fécales migrent avec difficulté (Zajac, 2006). En temps chaud la plupart des larves disparaissent des pâturages en 3 mois en moyenne (Rose et al., 2016).

B. *Au niveau du pâturage*

- L'espèce animale et le chargement des parcelles : le chargement est par définition le rapport entre un nombre d'animaux et une surface (d'une parcelle) disponible (en kg de poids vif par ha).

Les principales sources de parasitisme dans les prairies naturelles sont les animaux de la même espèce. Ainsi, plus il y a d'animaux de la même espèce dans une superficie donnée, plus les niveaux d'infestation sont élevés en relation avec le niveau de chargement des parcelles (Hoste et al., 2001 ; Wilson et al., 2001).

- Déplacement des L3 dans la pâture : elles peuvent migrer à la fois latéralement et verticalement, mais, cette migration est affectée par la température de l'air, l'humidité du sol et l'humidité relative.

Les L3s sont très mobiles en phase liquide, elles se déplacent sur l'herbe suivant un phototropisme négatif et un hygrotropisme positif, pour cette raison les deux moments qui favorisent le plus les infestations des hôtes sont tôt le matin et au crépuscule, lorsque l'ensoleillement est réduit et quand la rosée recouvre l'herbe (Rogers et Sommerville, 1963 ; Smith et Sherman, 2009). Pendant le temps chaud et sec, lorsqu'il n'y a pas d'humidité sur l'herbe ou quand l'humidité est faible, les larves sont incapables de migrer sur l'herbe. Le type de fourrage semble également influencer la migration des larves sur les pâturages (Amaradasa et al., 2010).

Certaines larves de *H. contortus* peuvent migrer jusqu'à 90 cm des boulettes fécales, mais la plupart restent à environ 10 cm des matières fécales. De plus la plupart des larves NGI ne peuvent pas migrer verticalement à plus de 5 cm du sol. Les animaux contraints de brouter du fourrage court ingèrent beaucoup plus de larves que lorsqu'ils broutent du fourrage haut (Zajac et Garza, 2020), Ceci explique que les chèvres au comportement de cueilleur sont généralement moins infestées que les moutons au comportement de brouteur (Hoste et al., 2001 ; Brunet, 2008).

C. Au niveau du l'hôte

Les facteurs liés au l'hôte sont liées à la résistance ou à la résilience, ainsi qu'aux mécanismes d'immunité.

- **La résistance** est définie comme l'aptitude de l'hôte à mettre en place et maintenir des réponses de nature immunitaire qui modifient la biologie des vers en limitant leur installation, développement ou reproduction, ou en provoquant l'élimination de populations établies (Douch et al., 1996 ; Hoste et al., 2006).
- **La résilience** est l'aptitude de l'hôte à supporter les effets pathologiques du parasitisme NGI et à maintenir une production malgré les infestations. Elle est aussi défini comme la capacité d'un hôte parasité à supporter les effets du parasitisme par les NGI (Mahieu, 2014).
- **Mécanismes d'immunité** : le développement de l'immunité aux NGI est complexe et très variable. Cette immunité correspond à la mise en place de deux types de mécanismes : réponse innée et/ou acquise.

1. *L'immunité innée* : « Réponses rapides et non spécifiques au pathogène »

L'immunité innée constitue la première ligne de défense en détectant la présence et la nature de l'infection. Elle agit sur trois fronts distincts : mécanique, chimique et cellulaire.

Les barrières physiques innées à l'établissement et à la survie des NGI sont particulièrement pertinentes. L'action mécanique au niveau du tractus gastro-intestinal, l'épithélium représente une barrière physique et est impliquée dans la reconnaissance des antigènes larvaires et l'activation de la réponse immunitaire acquise (Mcrae et al., 2015).

Plusieurs études ont montré que l'infestation par les NGI est suivie d'une augmentation de la production de mucus par les cellules qui se situent à la surface du tractus gastro-intestinal. Le mucus est composé en grande partie de protéines appelées mucines qui lui donnent une consistance visqueuse et de molécules ayant une action antimicrobienne ou de stimulation de l'inflammation. La contractilité des muscles lisses entériques serait également modifiée en réponse à l'infestation (Kim et Khan, 2013).

2. *L'immunité acquise* : « Réponses plus tardives et spécifiques au pathogène »

Elle repose sur des mécanismes dont la mise en place nécessite du temps et qui, souvent, ne démontrent leur pleine efficacité que lors d'un second contact avec l'antigène (Ag). Cette capacité de reconnaissance conduit à l'établissement d'une mémoire immunitaire : ça veut dire que « *si le même antigène pénètre à nouveau dans l'organisme, la réponse immunitaire est plus rapide et plus efficace* ».

Chez les ovins et les caprins, cette réponse immunitaire serait associée au rôle des lymphocytes T de type TH2– CD4+ qui produisent des interleukines de type IL-4, IL-13, IL-5 et IL-9 (Karanu et al., 1997) et des lymphocytes B (Pérez et al., 2001), (Pérez et al., 2008). Une mastocytose tissulaire, des taux élevés de globules leucocytes, une éosinophilie sanguine et tissulaire et une production accrue d'anticorps (majoritairement de type Ig1, IgA et IgE) ont également été décrits lors d'infestations par les trichostrongles (Pérez et al., 2003 ; Lacroux, 2006 ; González-Garduño et al., 2021).

L'impact des NGI chez les animaux :

L'effet ou l'impact que les NGI provoquent chez les animaux dépend de leur sensibilité aux infestations, qui est associée à des facteurs extrêmement complexes tels que : *l'espèce animale, l'âge, le sexe, la génétique, les aspects zootechniques* (tels que l'état physiologique et la parité) sont mentionnés comme facteurs à prendre en compte pour établir des mesures de lutte et de contrôle des parasites.

- L'espèce animale : l'espèce de l'hôte module la réceptivité aux nématodes NGI. Ainsi, à la suite d'infestations répétées par les NGI, la réponse immunitaire observée est moins efficace chez les caprins que chez les ovins (Hoste et al., 1999).
- L'âge des animaux : de manière générale, les jeunes animaux sont les plus sensibles et réceptifs aux infestations. Ces différences de réceptivité selon l'âge seraient

surtout liées à l'acquisition d'une immunité à la suite des infestations répétées (Smith et Sherman, 2009).

- Le sexe : dans la population de moutons de race Soay de St Kilda (Ecosse) une étude a montré que les mâles présentaient une prévalence et une intensité en nématodes plus importantes que les femelles. Ferrari et collègues, suggèrent même que les mâles sont responsables de l'infestation parasitaire dans la population hôte (Guilland, 1992 ; Ferrari et al., 2004).
- La génétique : les animaux résistants vont participer à la réduction du niveau de contamination de la pâture en ingérant une partie des larves infestantes et en excréant peu ou pas d'œufs dans la pâture (Aguerre, 2019). Des différences inter-races et inter-lignées (intra-races) de résistance aux nématodes NGI ont été décrites chez les ovins et caprins (Bishop et Morris, 2007 ; Bricarello et al., 2005 ; Hoste et Torres-Acosta, 2011). Au Mexique, les génotypes natives tels que Red Maasai, Santa Inés, Criolla, Pelibuey et mexicain créole sont plus résistants à *H. contortus* (González-Garduño et al., 2021).
- La reproduction : chez les brebis ou les chèvres en gestation, des augmentations d'excrétion fécale d'œufs (OPG) de nématodes ont été couramment observées autour de la mise bas, le phénomène étant décrit comme le « periparturient rise » où des variations endocrines et nutritionnelles en augmentent la susceptibilité aux NGI et au phénomène de hypobiose (Cattadori et al., 2019). Chez les mâles, les performances de reproduction exigent également un coût, l'effort reproductif génère le compromis de l'élaboration, plus un investissement individuel dans le terme d'effort pour la reproduction, outre que l'individu est sujet à des infections par des parasites (Hoste et Torres-Acosta, 2011)
- L'effet de performances de reproduction (prolificité des femelles reproductrices) : selon certaines études chez les ovins et caprins, des niveaux d'OPG sont supérieures en fonction de la parité (multipares vs primipares) (Haile et al., 2007 ; Bishop & Morris, 2007). Le taux d'OPG des agneaux issus de naissances simples ont des valeurs inférieures à celles d'une double ou triple naissance. Dans une étude, plus de 90 % des brebis porteuses de triplés ont nécessité un traitement, démontrant le risque élevé de traitement chez les brebis ayant de grandes portées (Aguirre-Serrano et al., 2020).

- Niveau de production : une réceptivité élevée au parasitisme NGI et des conséquences pathologiques plus sévères ont été rapportées à plusieurs reprises chez les animaux présentant les meilleurs niveaux de production. Ces niveaux d'infestation plus élevés pourraient s'expliquer par à une plus forte consommation d'herbe au pâturage conduisant à des infestations plus conséquentes, en raison d'ingestion de L3 plus élevée (Chartier et Hoste, 1994 ; Hoste et al., 1999).
- Sur dispersion – Dispersion excessive : au sein d'un même troupeau, tous les animaux n'excrètent pas (œufs) avec la même intensité et ne contribuent pas de la même façon à la contamination de la pâture, du fait d'une répartition dite agrégée des NGI ; cette distribution binominale négative est respectée par la plupart des macro parasites et implique qu'une minorité d'individus hébergent la majorité des parasites (Gaba et al., 2005). Ce concept a été récemment remasterisé en utilisant ces variables dans les modèles prédictifs : *Overdispersion* (en anglais) (Warburton et Vonhof, 2018).

2.4. Conséquences des infestations par des NGI

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les infestations par des NGI peuvent être dues à plusieurs facteurs qui dépendent des parasites, de l'hôte et aussi de l'environnement. Chez les petits ruminants, les conséquences des NGI diffèrent selon le niveau d'infestation de l'hôte et des espèces présentes.

Les conséquences des infestations par des NGI peuvent être divisées en : I) conséquences sur la production et, II) conséquences sur la santé animale.

- **Conséquences sur la production animale**

Le parasitisme interne des moutons et des chèvres est le problème médical le plus important affectant la santé et la production animales dans une grande partie du monde (Mekonnen, 2021). Le coût estimé attribué aux infections helminthiques pour l'industrie européenne est de 1,8 milliard d'euros par an, serait (Rose et al., 2020).

De multiples études ont montré que le parasitisme NGI est responsable de retard de croissance des jeunes animaux, que ce soit chez les agneaux ou les chevreaux qui se traduisent par des réductions de poids de carcasse à l'abattage (Kyriazakis et al., 1996).

Pour quantifier ces pertes, de nombreuses études ont comparé les gains moyens quotidiens (GMQ) de veaux traités et non traités. Selon les publications, les pertes associées aux nématodes gastro-intestinaux vont de 150 à 315 g/jour de GMQ (Charlier et al., 2014).

Les infestations par les NGI ont été régulièrement associées à des baisses de production de lait et, de manière plus rare, à des modifications de la composition du lait, chez les plus fortes productrices (Chartier et Hoste, 1994). Des altérations de la qualité de la laine (plus fine et plus cassante) ont été observées chez les animaux parasités.

Les conséquences économiques assumées par le producteur/éleveur sont également considérables. Les coûts liés aux mesures de contrôle, les visites du vétérinaire en cas d'épisode clinique et le traitement des animaux malades sont des conséquences économiques directes (*e.g.* le diagnostic, le traitement à l'échelle du troupeau). Par exemple : Les dépenses pour le déparasitage des génisses représentent 79% des coûts sanitaires totaux engagés pour l'élevage du troupeau de renouvellement sur un an (Fourichon et al., 1999).

Au-delà de ces conséquences économiques il faut d'additionner aussi les couts indirects tels que l'estimation de perdre de heures de travail et des infestations subcliniques, qui engendrent des frais importants (*e.g.* diminution du gain de poids quotidien, diminution quantité du lait par jour).

- **Signes cliniques des infestations des NGI chez les petits ruminants**

L'évolution clinique des NGI est généralement chronique. L'état des animaux évolue peu à peu et peut conduire à la mort. D'abord, des symptômes généraux apparaissent tels qu'une baisse d'appétit, un amaigrissement progressif, une asthénie ou des signes de malnutrition. Par la suite, en fonction des espèces impliquées deux grands syndromes sont distingués :

- *Le syndrome anémique :*

Pâleur des muqueuses, des troubles digestifs discrets et aussi un œdème sous-glossien. Ce syndrome apparaît souvent associé à des symptômes généraux (*e.g.* avec une baisse d'appétit, une baisse d'état corporel, une asthénie, voire une cachexie à des symptômes locaux, à des symptômes sanguins (avec une anémie microcytaire hypochrome) (Bussieras et Chermette, 1995).

L'haemonchose ovine se manifeste essentiellement par un syndrome d'anémie

- *Le syndrome digestif :*

Il se traduit par un appétit irrégulier avec éventuellement du « pica », une diarrhée profuse rebelle aux traitements symptomatiques et polydipsie. *T. colubriformis* chez son hôte altère les mécanismes de digestion et d'absorption des nutriments, car provoque une atrophie des villosités intestinales (Abbott et al., 2007).

Les infestations par *T. colubriformis* et *Teladorsagia* généralement se manifeste par un syndrome digestif.

2.5. Physiopathologie de l'infestation par des NGI

La présence de NGI génère un stimulus qui induit une réponse dans l'organisme de l'hôte et est capable de provoquer une succession de processus que nous présentons ci-dessous comme : Mécanismes à niveau tissulaire et Mécanismes chez l'organisme animal.

- **Les mécanismes physiopathologiques à niveau tissulaire**

Les altérations physiopathologiques sont à cause des effets mécaniques et des effets liés aux produits d'excrétion-sécrétion des NGI.

- *Effet mécanique :*

Les dommages aux muqueuses digestives sont dus en partie à un effet mécanique des nématodes. Les vers sont capables de dissocier ou d'endommager les tissus digestifs de l'hôte à l'aide de structures anatomiques spécialisées (capsule buccale). De plus, la cuticule des vers intestinaux aurait un effet abrasif sur les entérocytes, favorisé par le contact étroit qui s'établit entre le parasite et les villosités intestinales (Bussieras et Chermette, 1995).

« *Action spoliatrice des NGI* » la spoliation sanguine se produit de deux manières : perte de sang directe due à l'hématophagie, en particulier *H. contortus* ; et les lésions muqueuses produites par les vers (Mallet et Lesage, 1987; Hoste et al.,1997).

- *Effets des produits d'excrétion-sécrétion :*

Les modifications physiopathologiques sont en partie provoquées par des substances synthétisées par les parasites (ES). Elles sont de nature biochimique variée :

lipides, prostanoides, mucopolysaccharides, peptides, protéines et glycoprotéines (Hoste et al., 1997).

Les rôles des produits d'ES ont été peu connus mais plusieurs hypothèses ont été proposées tels que: inhibition du péristaltisme du tube digestif, modulation de la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte, dégradation des protéines tissulaires et sanguines, prolifération de cellules épithéliales, activité anticoagulante, modifications des sécrétions digestives et du transport hydro-électrique, les produits faciliteraient l'accès du parasite aux vaisseaux sanguins et empêcheraient la coagulation du sang ainsi prélevé pour la nutrition du parasite, jouant un rôle de protéases détruiraient les immunoglobulines produites par l'hôte, qui se fixent normalement à la surface de la cuticule du parasite, certaines substances participeraient à l'inactivation du complément ou des médiateurs libérés par les cellules inflammatoires (Hoste et al., 1997 ; Lejeau, 2002 ; Sabater, 2012).

- **Mécanismes physiopathologiques à niveau de l'organisme animal**

La diminution de la production et les symptômes cliniques observés chez les petits ruminants parasités peuvent s'expliquer par trois altérations de la physiologie digestive :

1. *Effets du parasitisme NGI sur l'appétit :*

La perte d'appétit est progressif et tellement plus important que le parasitisme est massif. Il y a même des cas d'anorexie complète. Les mécanismes de cette baisse de l'appétit sont encore mal connus. Une augmentation des taux sanguins d'hormones peptidiques gastro-intestinales telles que la gastrine et la cholécystokinine pourraient jouer un rôle par stimulation du centre de satiété (Hoste et al., 1997).

2. *Mal-digestion et malabsorption :*

Le phénomène de mal digestion est causé par un dysfonctionnement des glandes gastriques, qui sécrètent normalement de l'acide chlorhydrique (HCl) et du pepsinogène, qui se transforme alors en pepsine. La pepsine est utilisée comme marqueur d'infestation de NGI (on verra plus tard **2.6**).

Le phénomène de malabsorption est dû à l'abrasion des villosités et à la destruction des entérocytes. Elle est aggravée par l'altération de la perméabilité des épithéliums et l'absorption des toxines dues à l'implantation des vers (Hoste et al., 1997).

3. Effets de perturbations du métabolisme protéique :

Les pertes protéiques sont liées aux fuites plasmatiques ou de sang, aux lésions des muqueuses, à la réponse immunologique ou à l'augmentation de la synthèse de mucoprotéines. Ensuite, des mécanismes de compensation de ces pertes de protéines pour assurer la survie de l'animal seront actives (Hoste et al., 1997). La synthèse des protéines sera intensifiée pour maintenir l'homéostasie sanguine et tissulaire (renouvellement de l'épithélium digestif). Le métabolisme protéique découle alors du parasitisme par les nématodes NGI. Les résultats de (Knox et al., 2006) ont suggéré que, les activités du phosphore, du calcium et du fer sont modifiés par la présence des vers.

2.6. Méthodes de diagnostic des NGI

Le diagnostic des infections à NGI chez les petits ruminants repose sur un contrôle efficace de la maladie. Le but de cette partie est de fournir un bref aperçu pour résumer les différentes méthodes utilisées pour le diagnostic des NGI chez des animaux vivants et sur des animaux morts.

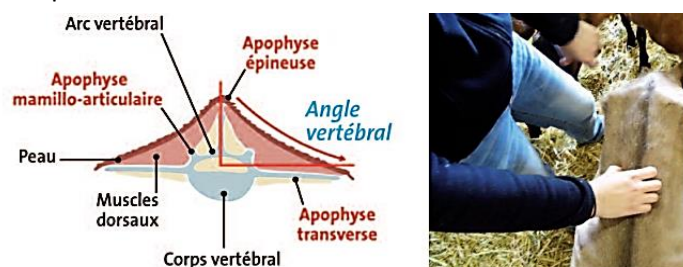
A. Diagnostic sur l'animal vivant

1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique est effectué chez les animaux (direct) à l'aide des indicateurs subjectives tels que : la note état corporel (NEC), l'indice FAMACHA, l'index de diarrhée (ID).

- NEC : l'évaluation de l'état corporel se fait par palpation dorsolombaire des animaux, une note d'état corporel (NEC) étant attribuée sur une échelle allant de 1 (cachectique) à 5 (très grasse). Des demi-points peuvent être utilisés (Figure7).

Figure 7. Note d'état corporel



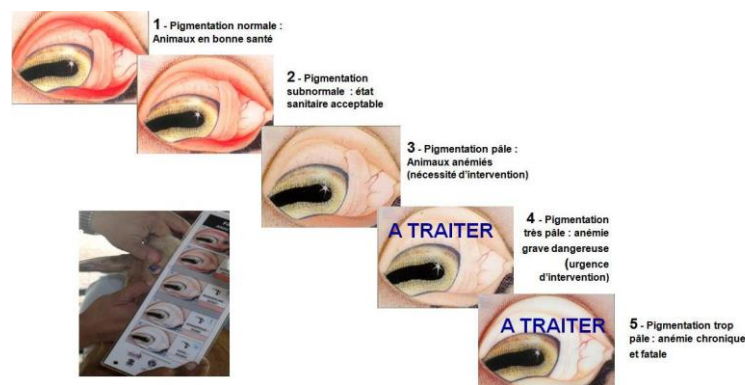
Source illustration : Institute d'élevage Fiche : D97205

Une diminution de la NEC par rapport aux attentes GMQ (gains moyenne quotidien) attendues ou même une perte de poids, devrait conduire à la suspicion de strongylose subcliniques. Cet outil doit être considéré *avec modération* et comparé à d'autres éléments de suspicion, tels que le diagnostic clinique et de laboratoire.

- FAMACHA® : le système FAMACHA® est le plus connu des indicateurs subcliniques en élevage ovin/caprin. Il s'agit d'une méthode basée sur l'évaluation de la couleur de la muqueuse oculaire, reflétant le degré d'anémie de l'animal (Vatta et al., 2001).

Cette méthode permet d'identifier les animaux nécessitant un traitement anthelminthique, en supposant que l'anémie découle d'une infestation par *Haemonchus contortus*. Le terme FAMACHA est un acronyme pour son auteur sud-africain, le Dr Faffa Malan, **FA**ffa **MA**lan **CHA**rt (Figure8).

Figure 8. Illustration d'une Carte FAMACHA



Source illustration (Vatta et al.,2002)

Un étude fait a 2012 a montré l'existence d'une corrélation entre la note de la muqueuse oculaire et l'hématocrite de l'animal (chèvres) (Fondraz, 2012) (Tableau3). Ce système a été développé afin d'établir des seuils pour la mise en place de traitements sélectifs : il est recommandé de ne traiter que les animaux souffrant d'anémie sévère (score de 4 et 5) pour éviter la mortalité.

Tableau 3. Relation entre FAMACHA/hématocrite

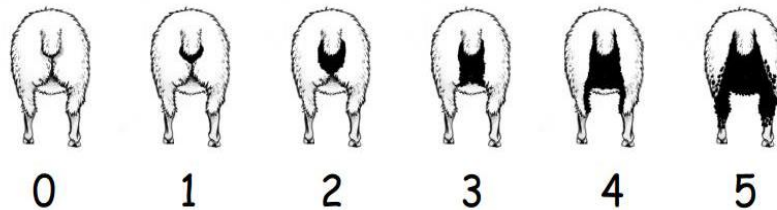
| Note FAMACHA | HEMATOCRITE (Ht)% |
|--------------|-------------------|
| 1 | Ht >28 |
| 2 | 23 > Ht< 27 |
| 3 | 18> Ht< 22 |
| 4 | 13> Ht< 17 |
| 5 | Ht <12 |

Source Tableau : (Fondraz, 2012)

- L'index d'diarrée : il s'agit d'une évaluation subjective de l'extension des souillures fécales présentes au niveau de l'arrière-train des animaux ou des fèces dans les échantillons, il nous permet d'apprécier la consistance et la couleur des selles la présence de sang, de diarrhée, de mucus. Il existe 2 index à tenir en compte : l'index Dag score et l'index DISCO.

Dag score : est un index défini par (Larsen et al., 1994). Une note est attribuée de 0 (absence de souillure fécale) à 5 (Figure9).

Figure 9. Index d'diarrée en vue arrière train ovins, Dag score



L'indice *DISCO* : a été élaboré par (Hördegen et al., 2006), et attribue un score à la consistance des fèces de 1 à 3 (Figure10).

La note 1 est attribuée aux fèces d'aspects normaux, en « pellets », soit 40% MS ; la note 2 est attribuée aux fèces mous, d'aspect « bouse de vache », soit 26% MS ; la note 3 est attribuée aux fèces semi-liquides retrouvées lors de diarrhée, soit 16%.

Figure 10. Index diarrée Score DISCO



2. Examens Parasitologiques

2.1. Examen microscopique des fèces

Dans l'évaluation microscopique des fèces l'indicateur objectif indirect est : la mesure d'OPG (œufs par gramme). Il s'agit d'indicateurs de l'intensité d'infestation de l'animal par les NGI. La mesure de l'intensité de l'excrétion fécale d'œufs de strongles est l'indicateur parasitologique le plus utilisé sur le terrain. Elle s'obtient par la réalisation de coproscopies (Raynaud, 1970).

L'examen microscopique des fèces se fait grâce à l'aide de deux techniques : Technique quantitative (Coproscopie) et Technique qualitative (Coproculture).

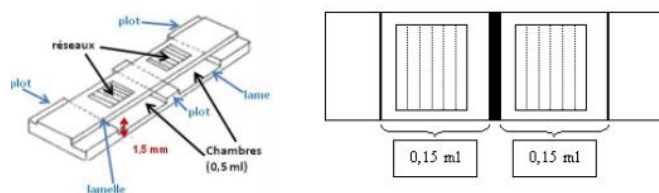
a. Technique quantitative de Coproscopie :

Le comptage des œufs dans les matières fécales permet une évaluation indirecte de la charge parasitaire des ruminants. Sa valeur dépend non seulement du nombre d'adultes présents dans le tube digestif mais également de leur fécondité. C'est une méthode simple, nécessitant peu de matériel et qui peut donc être utilisée en élevage par les vétérinaires et autres professionnels (Bonfont et Canellas, 2014).

La technique de Mac Master : consiste à compter les éléments parasitaires (œufs) présents dans un volume donné de suspension de matières fécales en utilisant une lame spéciale comportant une chambre d'analyse.

La lame de Mac-Master est constituée de 2 compartiments séparés par une cloison. Chaque compartiment détient une grille de lecture sur son plafond, cette grille est composée de 6 cellules (Figure11). Illustration internet.

Figure 11. Illustration de lame Mac master

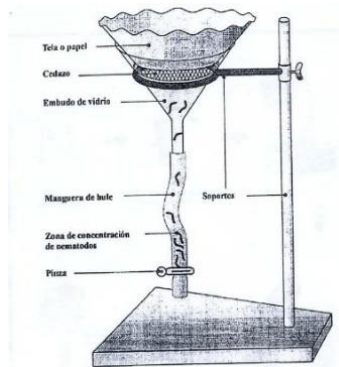


b. Technique qualitative de coproculture : la coproculture parasitaire consiste à faire évoluer des œufs présents dans les fèces en larves, puis identifier les genres des NGI présents.

La coproculture consiste à mettre les échantillons dans un récipient identifié et daté, un couvercle est placé (sans le recouvrir complètement), les paramètres d'humidité (entre 50 et 80%), température de 23-25°C, oxygénation satisfaisante (aération des prélèvements, brassage des coprocultures épaisses) sont maintenus pendant 7 à 10 jours. Après cette période de mise en culture, les larves sont récupérées en utilisant la technique de Baermann.

Technique de récupération des larves de Baermann : elle permet de mettre en évidence les larves vivantes de nématodes qui sont attirées par l'eau (hydrotropisme et géotropisme positif). L'appareil de Baermann consiste en un entonnoir muni d'un tube à son extrémité pour recueillir le liquide avec les larves (Figure12)..

Figure 12. Illustration d'un appareil de Baermann



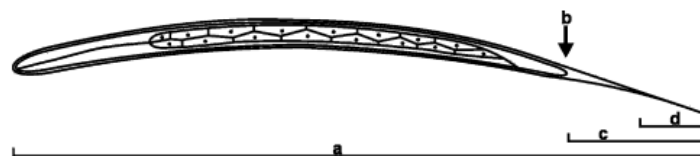
2.2. Identification des larves

a. Identification morphologique

Pour identifier les parasites présents dans les fèces, il est important d'observer différents critères morphologiques du L3s. Un protocole d'identification standardisé a été établi dans la littérature vétérinaire, avec les clés pour le diagnostic des genres des nématodes chez les ruminants domestiques au niveau régional et mondial (van Wyk et Mayhew, 2013) (Figure13). Une fois les larves collectées, elles sont examinées au microscope optique. Elles sont préparées entre la lame et la lamelle et sont immobilisées après un passage rapide à travers la flamme ou avec du Lugol. Cette approche est considérée comme le "gold standard" pour des raisons d'économie et aussi, parce qu'avec une bonne formation, la différenciation est relativement bonne. Malgré cela, elle a l'inconvénient de ne pas permettre la différenciation univoque de tous les genres. Elle est longue, laborieuse à réaliser, elle imprécise et elle ne peut être informatisée, automatisée, est une technique : manuelle.

Figure 13. Schéma d'une larve 3 infestante de nématode

(a : longueur totale ; b : extrémité de la queue larvaire ; c : gaine de la queue ; d : filament) (van Wyk & Mayhew, 2013).



Source illustration : (Borgstede et Hendriks,1974) ; (van Wyk & Mayhew, 2013).

b. Techniques d'identification moléculaire

Technique moléculaire PCR : la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a montré une sensibilité et une spécificité élevées pour la détection de l'ADN du parasite. L'objectif des diagnostics NGI en utilisant des méthodes moléculaires est toujours lié aux œufs et/ou aux larves cultivées (Reslova et al., 2021).

Les technologies basées sur l'ADN (ADN nucléaire (ADNr), ADN mitochondrial (ADNmt) ou éléments d'ADN répétitifs) ont eu un impact majeur dans de nombreux domaines de la parasitologie, y compris l'identification des parasites, le diagnostic des infections, l'organisation et l'étude de la résistance à anthelminthiques (Harris et Crandall, 2000).

Avec l'avènement de la réaction en chaîne de polymérase (PCR) la recherche parasitologique a été révolutionnée, trouvant une large applicabilité, principalement parce que, sa sensibilité permet l'amplification de gènes ou de leurs fragments avec des quantités infimes de matériel parasite. Comme toutes les techniques de diagnostic conventionnelles, les techniques moléculaires doivent être standardisées et validées dans chaque laboratoire (Barreto, 2020).

2.3. Examens physio - pathophysiologiques

a. Paramètres hématologiques

Les principaux paramètres sont l'hématocrite (PCV) et le nombre d'éosinophiles.

- L'hématocrite : représente le volume occupé par les globules rouges par rapport au volume de sang total. Packed-cell volume (PCV) par ses sigles en anglais. Sa mesure permet de déterminer si un animal présente une anémie. Les effets du parasitisme hématophage sur la santé animale sont généralement suivis par des mesures de PCV.

Cette valeur est utile pour l'appréciation rapide de l'existence et de la sévérité d'une anémie. Il s'exprime en %. Les valeurs physiologiques de l'hématocrite chez les ovins varient de 30 à 35% et chez le caprins 32 – 38%. La mesure est obtenue suite à une centrifugation du sang et correspond donc à l'hématocrite (Figure14). Illustration internet.

Figure 14. Représentation d'un processus d'analyse de micro centrifugation



- L'éosinophilie : est définie comme le nombre d'éosinophiles du sang périphérique. Le nombre normal d'éosinophiles dans le sang va de 0 à 1000 cellules/ml chez le mouton (Hoffman, 1981).

Les causes sont multiples, mais il s'agit le plus souvent de réactions allergiques ou d'infections parasitaires. Cette mesure a été signalée comme un bon indicateur d'une infection parasitaire et d'une immunité protectrice contre les parasites. Les leucocytes éosinophiles fixent la coloration à l'éosine et sont ainsi identifiables parmi tous les globules blancs présents dans le sang total (Khidou, 2016).

b. Méthodes biochimiques – Sérologie

Ces méthodes reposent principalement sur la détection et la mesure de paramètres, tels que le pepsinogène, la gastrine dans le sérum, qui peuvent être révélateurs d'infections parasitaires. Bien que nous n'ayons pas testé la sérologie pour cette thèse, nous en reparlerons brièvement.

- Dosage du pepsinogène

Le dosage de pepsinogène est un bon indicateur d'infestation par les NGI. Cette proenzyme digestive, présente dans l'abomasum, passera dans la circulation sanguine par des lésions de la muqueuse causées par les larves de strongles. Si le taux de pepsinogène est « élevé », la pression parasitaire a été importante (Kerboeuf, 2004).

En milieu acide, le pepsinogène est transformé en pepsine, laquelle agit ensuite sur un substrat protéique riche en acides aminés aromatiques. Les acides aminés aromatiques ainsi libérés sont colorés spécifiquement (réactif de Folin et Ciocalteu). Leur concentration est comparée à celle d'une gamme étalon de tyrosine. Les résultats sont exprimés en milliunités de tyrosine (mU TYR) (Sabater, 2012).

- Dosage de gastrine

La gastrine est une hormone polypeptidique synthétisée à partir d'un précurseur, la progastrine, qui stimule la sécrétion du suc gastrique (HCl notamment comme sécrétagogue) et la contraction des muscles lisses de l'intestin. La gastrine module également l'appétit des animaux par action au niveau du système nerveux central.

Le dosage de gastrine, ne peut être effectuée que par un petit nombre de laboratoires équipés d'équipements spécifiques, car la méthode d'essai (par Radio Immuno Test) nécessite l'utilisation d'éléments radio avec un personnel autorisé. De ce fait, elle n'est jamais réalisée en routine chez les petits ruminants en raison d'un coût trop élevé. Le

dosage du pepsinogène et le dosage de la gastrine fournissent pratiquement les mêmes informations (Sabater, 2012).

B. Diagnostics nécropsiques : Bilans parasitaires

L'autopsie ou nécropsie : examen de toutes les parties d'un cadavre. Dans le cas des NGI, nous ne nous intéressons qu'au tube digestif. Une autopsie est le seul moyen de diagnostic précis.

Si l'autopsie est réalisée rapidement après la mort, les adultes *H. contortus* sont facilement visualisables à la surface de la caillette en raison de leur grande taille (3 cm) et de leur coloration rouge. Chaque portion : abomasum, intestin grêle, gros intestin est examiné séparément. Chacune des parties délimitées est ouverte dans le sens de la longueur et débarrassée de son contenu sous un mince filet d'eau (Bassirou, 1993).

Le comptage des vers totaux (*Total Worm Count*) représente un travail long mais est un outil intéressant lors d'infestations expérimentales. Les échantillons sont observés à la loupe binoculaire puis au microscope et les vers adultes sont dénombrés et identifiés selon des critères de diagnose spécifique : *taille, de la bourse caudale des mâles*. Ce comptage n'est pas réalisable en routine, et doit être pratiqué par un laboratoire spécialisé en helminthologie dans le cadre de bilans parasitaires (Eichstadt, 2017).

3. Les traitements conventionnels : les molécules anthelminthiques (AH) de synthèse

Les antiparasitaires de synthèse sont considérés comme des traitements conventionnels, ces médicaments disposent donc d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Le premier anthelminthique moderne mis sur le marché fut la Phénothiazine, en 1939 (Bussieras et Chermette, 1995). Depuis l'apparition de molécules de synthèse, la maîtrise des NGI des petits ruminants repose prioritairement sur l'administration répétée de AH de synthèse (Kaplan, 2004). Les AH de synthèse sont administrés dans un but curatif (traitement) ou préventif (prophylaxie).

Les NGI comptent environ 200 à 400 ganglions nerveux avec des neurones sensoriels et moteurs. Les neurones sensoriels sont capables de répondre à un grand panel de stimulations chimiques, thermiques, mécaniques, lumineuses. Le système nerveux des NGI est la cible de nombreuses classes d'anthelminthiques (Sutherland et Scott, 2009),

beaucoup de molécules chimiques sont aussi utilisées comme des neuromédiateurs : l'acétylcholine, l'acide gamma aminobutyrique, le glutamate, la sérotonine, des peptides, l'histamine, le monoxyde d'azote, des catécholamines, etc.

Les AH de synthèse peuvent être classés en différentes familles selon leur mode d'action : large spectre et spectre étroit. Aussi ils sont classés en deux catégories : ceux qui tuent les vers, appelés *vermicides*, et ceux qui les paralysent, appelés *vermifuges*.

3.1. Les familles d'AH disponibles en médecine vétérinaire

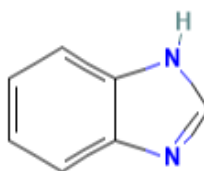
Il existe six familles d'AH de synthèse disponibles sur le marché mondial pour le contrôle des NGI : les benzimidazoles et les probenzimidazoles, les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines, les lactones macrocycliques, les salicylanilides, les dérivés amino-acétonitriles et les spiroindoles. Les deux dernières familles sont les plus récentes.

1. Les benzimidazoles et les probenzimidazoles

Cette famille comprend quatre substances actives ayant une activité nématocide au niveau gastro-intestinal : albendazole, fenbendazole, mébendazole et oxfendazole (Taylor et al., 2016). Cette famille regroupe de nombreux représentants qui présentent une structure chimique commune (Figure 15) (National Center for Biotechnology Information, 2021). Les benzimidazoles agissent en bloquant certains systèmes enzymatiques du métabolisme anaérobie des parasites, les privant ainsi de leurs ressources énergétiques (Prichard, 1973), mais également en inhibant la formation des microtubules du cytosquelette des parasites sans altérer ceux de l'hôte (Hafsi et al., 2012). Les benzimidazoles ont un large spectre d'activité, ils ont une action contre les nématodes à tous les stades (œufs, larves et adultes) mais également une action sur les ténias (cestodes) et certaines molécules contre la grande et la petite douve en fonction des doses (albendazole)(Fournier, 2020). Ces molécules sont administrées par voie orale uniquement, ils sont commercialisés sous forme de solution, de bolus ou incorporés dans des blocs de compléments minéralo-vitaminiques (Smith et Sherman, 2009).

Figure 15. Structure chimique générale des benzimidazoles

Source Illustration : Pubchem C7H6N2



2. *Les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines*

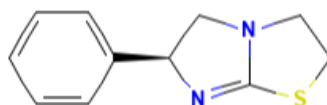
Les imidazothiazoles (lévamisole) et les tétrahydropyrimidines (pyrantel, morantel) présentent des structures chimiques différentes mais, partagent le même mode d'action. Ils sont des agonistes de l'acétylcholine. Leur action est produite par liaison aux récepteurs nicotiques du parasite, entraînant une paralysie spastique du vers puis, sa mort. Cette union induit une modification de la perméabilité de la membrane postsynaptique provoquant une contraction musculaire, suivie d'une paralysie spastique et enfin la mort des vers (Martin et al., 1993 ; Köhler, 2001).

Ce groupe comprend : le lévamisole, le tétramizole, le morantel, le pyrantel, le praziquantel.

Dans la famille des Imidazothiazoles, le lévamisole représente la molécule la plus largement utilisée en élevage. Le lévamisole est un 6-phényl-2,3,5,6-tétrahydroimidazo [2,1-b] [1,3] thiazole qui a la configuration S (Figure16) (National Center for Biotechnology Information, 2017).

Le Lévamisole s'administre par voie injectable ou orale selon les formulations. Il est rapidement absorbé et excrété, il n'y a pas de rémanence. Parmi les anthelminthiques, il dispose de l'index thérapeutique (rapport efficacité-toxicité ou bénéfice-risque) le plus faible, la dose thérapeutique étant proche de la dose toxique (Abbott et al., 2007).

Figure 16. Structure chimique du lévamisole



Source illustration : Pubchem CID 26879

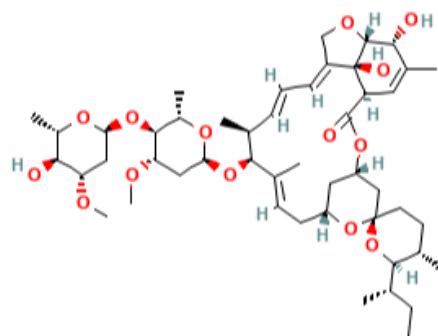
3. *Les lactones macrocycliques*

Les lactones macrocycliques comprennent deux sous familles : les avermectines (ivermectine et doramectine, eprinomectine) et les milbémycines (moxidectine) (Blackhall et al., 2003). Ce sont des agonistes du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et du récepteur au glutamate. Ceci entraînerait une inhibition du contrôle nerveux des muscles du pharynx, de l'utérus et des muscles du corps du

vers, conduisant à la mort du vers par paralysie. La lactone macrocyclique la plus représentative est l'ivermectine (Figure17) (National Center for Biotechnology Information, 2021)

Les lactones macrocycliques sont disponibles en formulations orales, injectables et pour-on. Elles sont d'une grande sécurité d'emploi vu leur site d'action. Toutes ces molécules sont reconnues comme très efficaces à faibles doses, elles ne sont pas toxiques et elles ont un très large spectre contre toutes les formes des NGI des ovins (Bowman, 2014).

Figure 17.Structure chimiques Ivermectine



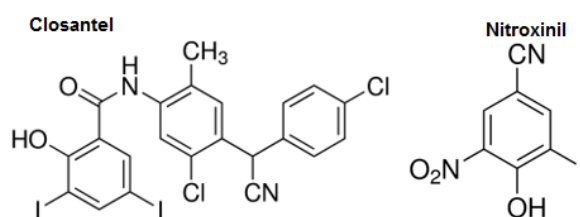
Source illustration : Pubchem CID 6321424

4. Salicylanilides

Le closantel et le nitroxinil sont des anthelminthiques de la famille des salicylanilides. Ces molécules possèdent un spectre d'action étroit : elles ne sont efficaces que contre les nématodes strictement hématophages (*H. contortus*), contre *F. hépatique* chez les ovins, et contre les larves L1 à L3 d'*Æstrus ovis* (diptère dont les larves parasitent les cavités nasales des ovins) dans le cas du closantel. Le closantel (famille des salicylanilides) et le nitroxinil (nitrophénol) agissent par découplage spécifique de la phosphorylation oxydative mitochondriale des cellules digestives du parasite sans affecter celles de l'hôte (Swan, 1999 ; Hafsi et al., 2012) (Figure18) (ChemSpider, 2021).

Le closantel s'administre par voie orale ou injectable selon les spécialités. Il est souvent retrouvé en association avec d'autres molécules (e.g. oxfendazole, mébendazole, ivermectine) de manière à élargir son spectre aux NGI non-hématophages et aux cestodes (Jacquet et al., 2014).

Figure 18.Structure chimique closantel et nitroxinil



Source illustration : ChemSpider. Internet

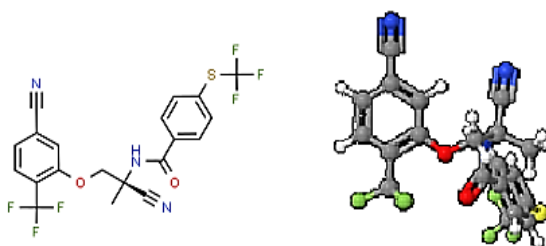
5. Dérivés d'aminocétonitrile (AADs)

Le seul représentant pour le moment est le monépantel. Le monépantel a été commercialisé pour la première fois en 2009 en Nouvelle-Zélande (Eichstadt, 2017).

Le monépantel a été développé suite à l'apparition de résistance aux lactones macrocycliques (Epe et Kaminsky, 2013). Concernant le mode d'action, des études suggèrent qu'il agirait comme un agoniste nicotinique, pour un récepteur nicotinique lié à une acétylcholinestérase, spécifique (Kaminsky et al., 2008).

Pour éviter l'apparition de phénomènes de résistance, son utilisation est limitée à un maximum de deux traitements par an, idéalement en alternance avec d'autres familles. Le spectre d'activité du monépantel inclut les 4 stades larvaires et les stades pré adultes et adultes d'un large spectre d'espèces de nématodes. Le monépantel s'administre uniquement par voie orale. La structure chimique est présentée dans (Figure19) (ChemSpider, 2021)

Figure 19. Structure chimique Monepantel



Source : Illustration Chemspider. Internet

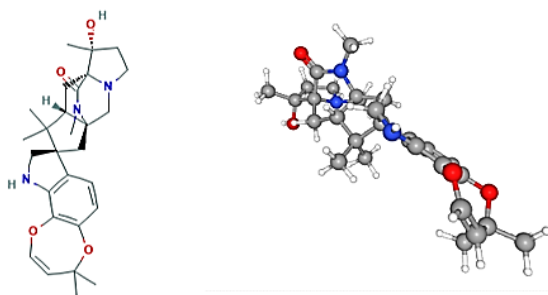
6. Spiroindoles + Abamectine

Le derquantel est un dérivé semi-synthétique du paraherquamide appartenant à la classe des spiroindoles. La seule formulation disponible est associée à l'abamectine, une molécule appartenant à la familles des lactones macrocycliques (Little et al., 2010).

Son mode d'action est mal connu mais, il semble concerner les adultes et L4 des principales espèces de strongles gastro-intestinaux (à l'exception des L4 de *Nematodirus spp.*, *O. venulosum*, *C. ovis* et *Cooperia spp.*).

Le derquantel est un antagoniste cholinergique. Sa liaison au récepteur nicotinique inhibe la fixation de l'acétylcholine et conduit à la paralysie flasque du nématode (Geurden et al., 2012 ; Eichstadt, 2017). La structure chimique est présentée en (Figure20) (National Center for Biotechnology Information, 2021b).

Figure 20.Structure chimique du Derquantel



Source : Illustration Pubchem. Internet

Un résumé de ces 6 familles d'AH utilisées contre les NGI, les représentants, leur spectre d'action, leur mécanisme d'action, est présenté au (Tableau 4).

Tableau 4. Les 6 familles d'AH utilisées contre les NGI en médecine vétérinaire

| Famille | Représentants | Spectre, mode d'action | Mécanisme d'action |
|---|-----------------------------|--|---|
| Benzimidazoles Pro-Benzimidazoles | Albendazole | Large spectre Vermicide Œufs, larves adultes et L4 | β -Tubuline Inhibition de la formation des microtubules du cytosquelette dysfonctionnement des fonctions cellulaires. |
| | Oxfendazole | | |
| | Febantel | | |
| | Fenbendazole | | |
| | Thiabendazole | | |
| Imidazothiazoles | Lévamisole | Spectre étroite Vermifuge Adultes | Récepteurs à l'acétylcholine estérase Paralysie spastique. |
| Lactones macrocycliques | Ivermectine | Large spectre Vermicide Adultes + L4 | Canaux Cl contrôlés par le glutamate Paralysie flasque par hyperpolarisation. |
| | Doramectine | | |
| | Moxidectine | | |
| Les salicylanilides- halogénophénols | Closantel | Spectre étroit <i>H. contortus</i> Vermicide Adultes et L4 | Découpeurs spécifiques de la phosphorylation oxydative mitochondriale Limite la production d'ATP. |
| | Nitroxinil | | |
| Les dérivés Aminocétronitrile | Monepantel | Large spectre Vermicide Larves + Adultes | Agoniste nicotinique Découplage spécifique de la phosphorylation oxydative. |
| Spiroindoles + Abamectin | Derquantel (+ abamectin) | Vermicide Adultes et L4 | Antagoniste cholinergique Paralysie flasque du nématode. |

3.1. Avantages des traitements AH de synthèse

- Grande efficacité sur un large spectre de nématodes gastro - intestinaux chez les diverses espèces animales.
- Activité potentielle étendue contre d'autres parasites (exemple des ectoparasites, cestodes, trématodes).
- Connaissance des modes d'action sur les vers.
- La plupart des AH sont de faible toxicité directe pour les animaux traités.
- Informations disponibles sur la pharmacologie et la pharmacocinétique de ces molécules pour prévenir toute toxicité indirecte pour le consommateur et émettre des recommandations d'emploi.
- Simplicité d'utilisation pour les éleveurs et les vétérinaires.

3.2. Limites d'utilisation des AH de synthèse

Au cours des dernières décades, l'inquiétude des consommateurs concernant la qualité des produits d'origine animale s'est accrue. Ces préoccupations sont liées à la santé publique et à l'environnement.

Les résidus de médicaments dans les produits d'origine animale (*e.g.* lait et viande) peuvent représenter une menace potentielle pour la santé des consommateurs. Il a été démontré que certains AH présentent des effets toxicologiques, des propriétés telles que la tératogénicité, l'embryotoxicité, la neurotoxicité, la goitrogénicité et la mutagénicité (Kinsella et al., 2009). L'autre préoccupation est liée à l'apparition de résidus d'AH dans l'environnement et aux effets écotoxicologiques chez des organismes non ciblés (Floate et al., 2005).

A cause de ces deux facteurs déjà mentionnés, les règles d'utilisation des AH de synthèse sont encadrées pour limiter l'utilisation de ces produits. Ces restrictions sont particulièrement fortes chez les ruminants laitiers et dans les modes de production répondant aux critères de l'Agriculture Biologique.

3.2.1. Résidus dans les produits de consommation

Les règles d'utilisation des médicaments de synthèse, incluant les AH sont de plus en plus restrictives. Les pouvoirs publics ont fixé les doses thérapeutiques adaptées à chaque espèce animale, voire chaque stade physiologique, et les dates limites d'emploi

avant mise sur le marché des produits animaux, pour limiter l'exposition des consommateurs (ANSES, 2002).

La communauté européenne (UE) a établi une loi qui exige un contrôle systématique et uniforme de tous les groupes de médicaments vétérinaires (dont les AH de synthèse font partis) dans les aliments dans tous les pays membres (Parlement Européen et Conseil, 2019). D' autre part, tous les pays membres FAO établissent la LMR (limite minimal résidus) pour les médicaments vétérinaires recommandée par le Codex Alimentarius, l'Union européenne et/ou les réglementations du États-Unis (FAO, 2018). Par exemple, en France, le fébantel, l'oxfendazole et le fenbendazole (trois molécules benzimidazoles) et l'éprinomectine (lactones macrocycliques) en 2015, ne disposaient pas d'AMM avec des délais d'attente nulles pendant la lactation chez les petits ruminants (Peters, 2015). D'autres molécules telles que : lévamisole, ivermectine, doramectine, moxidectine, closantel, albendazole, netobimine, mebendazole sont interdites chez les femelles laitières, dont le lait ou ses dérivés sont destinés à la consommation humaine (Peters, 2015). En tenant en compte cette information, il faut garder à l'esprit que les lois évoluent en fonction des événements et de la recherche. De plus, cela peut varier d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre.

3.2.2. *Résidus dans l'environnement*

Les anthelminthiques et leurs métabolites excrétés dans l'environnement peuvent aussi présenter une écotoxicité plus ou moins marquée. Les benzimidazoles et les lactones macrocycliques peuvent conduire à un ralentissement de la dégradation des fèces par les vers de terre (Yeates et al., 2007), ainsi qu'à une diminution des populations d'insectes coprophages (McKellar, 1997; Lumaret et Errouissi, 2002). Certains benzimidazoles ont en plus un effet fongicide marqué (Robinson et al., 1965) pouvant avoir un impact négatif sur les champignons saprophytes ou nématophages (Paraud et al., 2004 ; Sanyal et al., 2004).

Les effets écotoxiques des anthelminthiques ont dans un premier temps été jugés secondaires au vu des bénéfices pour la santé et la production des animaux d'élevage, mais compte tenu de la lenteur de dégradation de certains molécules dans l'environnement, les conséquences de leur utilisation massive et prolongée sont préoccupantes (McKellar, 1997 ; Mahieu, 2014).

4. La résistance aux AH de synthèse dans les populations de NGI (RA) et la mise en place des stratégies de lutte alternatives

L'utilisation des AH de synthèse pour contrôler des infestations par des NGI rencontre plusieurs limites. Mais, c'est surtout le développement de résistances aux AH de synthèse dans les populations de NGI qui représente le phénomène le plus préoccupant, en particulier chez les petits ruminants (Rose et al., 2020).

4.1. Généralités

Une population de NGI résistante aux AH est définie comme une population ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'AH habituellement létales pour des individus de cette espèce (Wolstenholme et al., 2004).

La résistance anthelminthique (RA) est héritable et sélectionnée. En effet, les survivants des traitements AH transmettent des gènes de résistance à leur progéniture.

Les vers résistants par mutation génétique sont au début peu nombreux, mais leur développement et leur abondance sont favorisés par une pression de sélection, due à l'emploi répété de AH (Geary et al., 2012).

La RA chez les NGI a été signalée dans le monde entier chez plusieurs espèces de nématodes, contre la plupart des classes d'anthelminthiques et parfois simultanément plusieurs classes différentes (*i.e.* multirésistances) (Waller, 1997). Des résistances aux AH de synthèse ont désormais été mentionnées pour toutes les espèces de NGI des petits ruminants, principalement pour *H. contortus*, *Trichostrongylus spp.* et *Teladorsagia spp.* (Besier, 2007).

La RA a été trouvée dans toutes les familles connues et couramment utilisées en médecine vétérinaire (benzimidazoles et pro-benzimidazoles, imidazothiazoles, salicylanilides, lactones macrocycliques) (Lanusse et Prichard, 1993 ; Kaminsky et al., 2008 ; Roeber et al., 2013).

Deux nouvelles molécules ont été lancées (monépantel et une combinaison derquantel/abamectine) sur le marché pour offrir des alternatives de contrôle chimique. Néanmoins, en moins de 5 ans après son lancement, des cas de résistances au monepantel ont déjà été signalés (Scott et al., 2013 ; Mederos et al., 2014). En ce qui concerne la deuxième option, une efficacité réduite de la combinaison

derquantel/abamectine a été évoquée par (Sales et Love, 2016), 6 ans après sa validation comme alternative chimique (Little et al., 2010).

La résistance (*ou* les résistances) aux AH est désormais considérée comme le *statu quo* dans la plupart des pays producteurs de moutons dans le monde. Des études transversales répétées en Europe et en Amérique du Sud ont montré une aggravation de la situation, avec une résistance à la fois à plusieurs médicaments et chez plusieurs espèces, qui deviennent de plus en plus commun (Mphahlele et al., 2020).

Bien qu'il n'y ait pas beaucoup d'informations sur la situation actuelle de la RA en petits ruminant au Paraguay, l'une des données les plus représentatives correspond aux résultats d'une enquête régionale en Amérique du Sud (Argentine, Uruguay, Brésil et Paraguay) réalisée par la FAO en 1996. Ces résultats ont indiqué que les niveaux de résistance chez les moutons étaient de 73 % aux benzimidazoles, 68 % au lévamisole, 73 % et 47 % aux avermectines (orales et injectables) respectivement. Les niveaux de résistance étaient similaires pour les trois genres de nématodes : *Haemonchus contortus*, *Ostertagia* et *Trichostrongylus* (Maciel et al., 1996).

4.2. Mécanisme de la RA

Plusieurs types de résistance ont été décrits selon les capacités des parasites à résister à une substance unique, à un groupe de substances ayant le même mode d'action ou à un ensemble de composés qui ont des modes d'action différents.

- Résistance simple : vis-à-vis d'un anthelminthique (i.e. une molécule)
- Résistance de famille : à un groupe de substances ayant le même mode d'action, c'est la plus fréquente. Donc, il corresponde a une famille.
- Résistance multiple : a un ensemble de composés qui ont des modes d'action différents. Donc, correspondant a des familles différentes.

4.3. La notion de Refuge

La notion de « refuge » est désormais reconnue comme étant un concept fondamental dans la lutte contre les résistances. Le principe est de conserver une population conséquente d'individus sensibles, de manière à « diluer » les allèles de résistances parmi les allèles sauvages et donc freiner la diffusion de la résistance au sein des populations des NGI (Besier, 2012).

En pratique, la taille de la population refuge doit être prise en compte à chaque décision de traitement. Par exemple, en Europe le traitement de tout le troupeau lors de la remise à l'herbe en début de printemps diminue fortement la taille de la population refuge. A cette période, peu de larves infestent les prairies et le refuge est presque exclusivement constitué des stades parasites dans le tube digestif. A l'inverse, un traitement lors du pic larvaire d'été est moins préjudiciable puisque les stades libres constituant le refuge sont abondants (Jacquet et al., 2014).

4.4. Facteurs favorisant le développement et la diffusion des RA

L'apparition de phénomènes de résistance est favorisée par de nombreux facteurs :

a) *Inhérents à l'espèce de parasite :*

- La durée du cycle biologique, (*i.e.* le temps séparant deux générations) est un facteur important « plus le cycle biologique est court, plus la diffusion du caractère résistant sera rapide ».
- Proliféricité : un autre facteur est que la résistance se propage d'autant plus rapidement que l'espèce concernée est proliférique. Ceci explique notamment la forte prévalence de résistance décrite chez *H. contortus* (Wolstenholme et al., 2004).

b) *Inhérents à la molécule, à la façon dont elle est employée :*

- Alternance de famille d'AH : il est conseillé d'alterner les familles de molécules chaque année, voir à chaque traitement. Les molécules récentes, le monépartel et le derquantel, quand elles sont disponibles commercialement, ne doivent pas être utilisées en seconde intention mais intégrées à la rotation des anthelminthiques afin de retarder l'apparition des résistances aux molécules plus anciennes (Eichstadt, 2017).
- L'utilisation de procédés rémanents comme les diffuseurs intraruminaux exerce une pression de sélection permanente.
- La fréquence d'utilisation d'un AH conduit à une pression de sélection élevée et favorise l'extension des résistances. Un rythme d'utilisation d'une molécule ou d'une famille de molécule d'anthelminthiques trop rapproché conduit à une sélection rapide des lignées de strongles résistants.

c) *Inhérents à la gestion d'élevage :*

- Les erreurs de dosage (surdosage/sous-dosage) : la posologie et la voie d'administration indiquées sur le mode d'emploi du médicament doivent être scrupuleusement respectées. En exposant les vers à des doses non létales (sous-dosage) cela conduit à une sélection élevée d'individus résistants en éliminant les vers les plus sensibles. La dose administrée à un lot doit être déterminée à partir du poids de l'animal le plus lourd du lot. Un autre point à tenir en compte, est de connaître les caractéristiques spécifiques de l'espèce. Les chèvres montrent un métabolisme hépatique particulier par rapport aux ovins qui explique des particularités pharmacologiques de nombreuses molécules AH. Par conséquent, la dose des chèvres devrait être calculée comme deux fois celle des moutons, sinon elles seraient traitées avec une dose plus faible que nécessaire (sous-dosage) (Chartier et al., 2001).
- Introduction d'animaux parasités par une souche résistante dans un troupeau, le transfert de gènes de résistance est aussi possible suite à un transfert d'animaux (importation, vente). Les animaux introduits dans un élevage doivent être placés en quarantaine et être traités avec une combinaison de deux à trois anthelminthiques, afin d'éliminer la majorité des allèles de résistance provenant de l'élevage d'origine (Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009, Eichstadt, 2017).

4.5. Comment ralentir l'apparition et la diffusion des RA ?

Afin de préserver l'efficacité des traitements AH et de ralentir l'apparition et la diffusion des résistances, il est devenu nécessaire d'utiliser ces molécules de façon plus raisonnée, à partir de la compréhension des facteurs extrinsèques favorisant le développement des résistances (Hoste et al., 2002 ; Waller et Thamsborg, 2004).

Le traitement anthelminthique raisonné consiste à ne pas traiter tous les animaux au même moment. Désormais, il est classique de distinguer deux types de traitements : *Traitements Ciblés et Traitements Sélectifs*.

Les traitements ciblés concernent l'ensemble d'un lot en particulier selon les critères (*e.g.* male/femelle/primipares/multipares/adultes/jeunes). Par exemple, il est possible de décider de traiter un lot lorsque la moyenne de l'excrétion fécale d'œuf dépasse un

seuil prédéfini. Cette identification a été effectuée par la mesure des taux d'OPG (*i.e.* œuf par gramme) (Bonfont et Canellas, 2014 ; Hoste et al., 2002).

Le traitement sélectif ce traitement est décrit en Anglais sous le terme « *Targeted Selective Treatment* » (acronyme TST) il se base soit sur la reconnaissance des signes cliniques ou subcliniques notamment dans le cadre du système FAMACHA® (Van Wyk et Bath, 2002) ; soit par l'analyse des données épidémiologiques antérieures (Hoste et al., 2002).

4.6. Les méthodes de lutte alternatives mises en place contre les NGI

Les méthodes de contrôle de NGI sont proposées de temps en temps afin d'améliorer la production animale et de viser de nouvelles stratégies en santé animale au pâturage. Ces stratégies sont en constante évolution et s'adaptent en fonction des populations, des moyens économiques. Dans cette partie, nous présenterons des stratégies de lutte ou de maîtrise contre les NGI selon une approche proposée par (Torres-Acosta et Hoste, 2008).

1. Réduire le contact entre les L3 et l'hôte

Cette approche est basée sur la compréhension de l'infestivité. Tarir la contamination du pâturage a pour but de bloquer le cycle biologique des NGI du pâturage en maîtrisant son infestivité, et de réduire ainsi les risques de contact entre hôtes sensibles et L3s (Häring et al., 2008).

Diverses méthodes agronomiques de gestion du pâturage existent pour atteindre cet objectif :

- a. La méthode de prévention : consiste à mettre des animaux sains sur des pâtures propres (*i.e.* exemptes de L3s).
- b. La méthode d'évasion : consiste à transférer des animaux traités par des AH de pâtures contaminées vers des pâtures « propres ». Cette méthode a été proposée dans les années 1970 avant l'apparition de la RA. Aujourd'hui, cette méthode est considérée comme un facteur de risque.

La contrainte de ces méthodes (a, b) est qu'elles nécessitent une grande disponibilité de zones destinées au pâturage.

c. La dilution vise à réduire l'infestivité (*i.e.* le risque parasitaire) du pâturage : cette méthode pourrait être divisée en 2 possibilités i) Dilution dans l'espace et le temps et II) Dilution dans le temps (Hoste et al., 2004).

I. Dilution dans l'espace : l'assainissement par pâturage mixte, alterné ou simultané. Une diminution de chargement par hectare par le mélange d'animaux sensibles au parasitisme avec des animaux résistants.

Entre animaux d'âges différents, entre 2 espèces animales ayant des spécificités différentes pour des espèces de NGI (*i.e.* : bovin/ovin, chevaux/petits ruminants (Waller, 2004 ; Quijada Pinango, 2015)).

II. Dilution dans le temps : différents procédés respectant le concept de dilution dans le temps peuvent conduire à un assainissement plus ou moins exhaustif des parcelles, et donc à une diminution des infestations animales.

d. La décontamination active des pâturages : des méthodes de décontamination active des prairies chimiques (*i.e.* la chaux ou la cyanamide calcique, a été évoquée pour décontaminer les prairies par les L3) (Hoste et al., 2004) ; physiques (*i.e.* le retournement par labour des prairies ou le brûlage contrôlé des pâturages permettent de décontaminer les prairies) (Legarto et Leclerc, 2007) ; contrôle biologique (*i.e.* l'utilisation de champignons nématophages, des spores de *Bacillus thuringiensis* (Wei et al., 2003 ; Torres-Acosta et Hoste, 2008, Mahieu, 2014)).

2. Améliorer la résistance de l'hôte

Cette approche est basée sur le renforcement de la résistance de l'hôte par l'amélioration de la ration (*i.e.* apport protéique et énergétique), la vaccination ou la sélection génétique.

a. Nutrition : la notion d'immunonutrition a été suggérée car, l'amélioration de la ration conduit à une meilleure résilience par une réduction des conséquences des infestations subcliniques et à une résistance améliorée (Hoste et al., 2008).

b. Vaccination : le principe général de la vaccination vise à mettre en contact préventivement l'hôte avec de faibles doses d'antigènes d'agent pathogènes (y compris des parasites) de manière à stimuler ses défenses immunitaires et ainsi, à le

protéger vis-à-vis de tout contact futur par ces mêmes agents pathogènes (Jackson et Miller, 2006).

Le développement commercial de vaccins contre les helminthes a commencé dès les années 1950, entraînant le développement de vaccins tels que le Dictol[®] (Smith, 1999) contre les strongles pulmonaires. Au cours des dernières décennies, des efforts importants ont été déployés pour développer un vaccin contre *H. contortus*. Un grand nombre de vaccins candidats ont été testés et ont été envisagés à l'aide de diverses stratégies de vaccination, notamment des vaccins à sous-unités recombinantes, des vaccins à ADN et des vaccins protéiques pour vérifier leur efficacité pour les réponses immunitaires protectrices contre l'infection à *H. contortus* (Ehsan et al., 2020).

Barbervax[®] a été enregistré le 1er octobre 2014, fabriqué par l'institut de recherche Moredun Research Institute (Ecosse). Barbervax[®] a été testé au Brésil, Suisse, Afrique, Uruguay, Ecosse. En 2018, des résultats prometteurs avec des vaccins dans des environnements tropicaux ont indiqué que les agneaux vaccinés avec Barbervax[®] montraient une réduction de 80% en nombre d'œufs de *Haemonchus spp.*, par rapport aux agneaux non vaccinés (Bassetto et al., 2018).

c. Sélection génétique : l'objectif de la sélection génétique est d'obtenir des individus de plus en plus performants, génération après génération en choisissant les meilleurs individus d'une population à la vue de la résistance aux NGI.

La sélection d'animaux résistants aux NGI est une approche envisagée, sur des bases scientifiques, depuis près de 50 ans afin de réduire l'emploi des AH des synthèses (Pomroy, 2006). Il existe plusieurs méthodes pour sélectionner les animaux les plus résistants, telles que : la variabilité de la résistance par race ou entre individus au sein d'une même race sélectionnés sur la base de mesures OPG (Aguerre, 2019).

Les races qui ont évolué dans un environnement favorable aux NGI et qu'ont subi une forte pression de sélection sont aujourd'hui les plus résistantes. Les races les plus résistantes sont tropicales ou subtropicales telles que : Red Massai, Florida Native, Gulf Coast Native, Barbados Blackbelly et Ste Croix chez les moutons ou la race créole chez les chèvres (Bishop et Morris, 2007).

3. Traiter ou Perturber la biologie des vers

Cette approche cherche soit à éliminer les NGI par un emploi plus pertinent des AH de synthèse (*e.g.* Traitements ciblés, sélectifs) ou soit à perturber la biologie de vers par usage de molécules naturelles bioactives (*e.g.* l'Aromathérapie, la Phytothérapie et le concept d'Alicaments).

- La phytothérapie utilise des plantes entières ou en extraits, sous forme séchée, en poudre ou encore d'extraits liquides, administrées à l'animal en infusion, décoction ou macération.
- L'aromathérapie est une branche particulière de la phytothérapie qui correspond à l'usage des Huiles Essentielles (HE) à des fins thérapeutiques (Grosmond, 2012, Labre, 2012).

Avant l'apparition des anthelminthiques de synthèse et leur développement par les industries pharmaceutiques au milieu du XX siècle. La pharmacopée humaine et vétérinaire comptaient sur les plantes pour lutter contre les NGI chez les animaux (Corley et Godley, 2011). Puis, avec l'apparition des premières molécules contre le NGI et leurs multiples avantages (*e.g.* faible coût, faible toxicité, efficacité) l'utilisation des plantes médicinales a été plus ou moins oubliée.

Pour la plupart des continents et particulièrement dans les pays en voie de développement, la médecine traditionnelle basée sur un savoir empirique d'utilisation des plantes (ethnomédecine) reste très répandue, encore aujourd'hui (Manke et al., 2015, Khamesipour et al., 2021). L'usage de plantes à propriétés anthelminthiques représente un moyen de lutte efficace contre les parasites gastro-intestinaux en général y compris contre les strongles résistants aux anthelminthiques conventionnels (Waller et Thamsborg, 2004 ; Githiori et al., 2005).

L'activité anthelminthique des plantes est liée à la présence de certaines substances spécifiques appelées métabolites secondaires (MSP) (Bruneton, 2009).

En médecine vétérinaire, les modes d'utilisation des ressources naturelles sont :

1) *Sous la forme de remède médicinal*, 2) *Alicament* (Hoste, 2018)

- Le remède médicinal est une préparation à base de plantes. Il est en fait un mélange complexe de composés actifs qui peut être utilisé dans une action curative à court terme : *Phytothérapie* ou *Aromathérapie*

- Alicament (*i.e.* Nutraceutical, en anglais) sont des plantes utilisées à la fois pour leurs valeurs nutritionnelles et pour leurs propriétés sanitaires. Elles sont proposées aux animaux pendant plusieurs jours, le but visé étant avant tout préventif. L'efficacité de cette approche, dépend d'un seuil de concentration des MSP.

Les principaux avantages de l'exploitation de plantes à propriétés AH sont la disponibilité locale des ressources, *a priori* l'absence actuelle de résistances aux composés actifs de ces plantes chez les vers, et un faible coût par rapport aux AH de synthèse, critère très important pour les petits éleveurs.

5. Médecine Traditionnelle (MT) et recherche de l'activité biologique des plantes

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, parmi toutes les alternatives utilisées dans la lutte contre les NGI, la recherche des nouvelles substances à propriétés anthelminthiques en produits végétaux est une option envisageable.

Les connaissances des plantes sont venues de la population de chaque région en fonction de leurs expériences. Par conséquent, la recherche de l'activité biologique des plantes peut être considérée comme *une redécouverte du savoir*.

5.1. Généralités et concepts

Certains concepts et définitions seront évoqués ci-dessous pour mieux comprendre l'importance de la médecine traditionnelle comme alternative aux AH.

- La médecine traditionnelle (MT) a été définie comme la somme des connaissances, des compétences et des pratiques fondées sur les théories, les croyances et les expériences indigènes de différentes cultures, qu'elles soient explicables ou non, utilisées dans le maintien de la santé ainsi que dans la prévention, le diagnostic, l'amélioration ou le traitement d'une maladie physique et mentale (WHO, 2019).
- La médecine indigène (MI) a été définie comme l'ensemble des connaissances et des pratiques, explicables ou non, utilisées pour diagnostiquer, prévenir ou éliminer les maladies physiques, mentales et sociales. Ces connaissances ou pratiques peuvent s'appuyer exclusivement sur l'expérience et l'observation passées transmises oralement ou par écrit de génération en génération. Ces pratiques sont originaires du pays dans lequel elles sont pratiquées.
- La médecine ethno vétérinaire est considérée comme l'étude interdisciplinaire et holistique des systèmes de connaissances locaux associés aux pratiques, aux aptitudes, aux convictions et aux structures sociales relatives à la production animale, afin de les appliquer à des projets de développement agricole visant à améliorer le niveau de productivité du bétail et ainsi améliorer le mode de vie des populations (McCorkle, 1995).
- Politique nationale : une politique nationale comprend des principes directs pour la future politique, planification ou orientation un projet. La politique nationale est

élaborée par l'autorité gouvernementale compétente dans le pays. La politique nationale MT peut s'agir d'une politique conçue exclusivement ou elle peut être intégrée à d'autres politiques nationales, telles que la politique nationale sur les médicaments ou la politique commerciale (WHO, 2019).

- Le terme législation a été défini comme suit : un ensemble de règles concernant le domaine de la MT. Ces règles sont établies par une autorité, généralement le gouvernement et des comités consultatifs, et sont appliquées par les systèmes judiciaire et juridique de ce pays.

Les plantes, leurs extraits et les HE (huiles essentielles) sont utilisés en médecine traditionnelle, constituant notamment une source de molécules potentiellement actives contre les pathogènes, y compris les parasites.

Certaines molécules obtenues à partir de plantes telles que : l'armoise, la quinine et l'émétine ont été utilisées dans le traitement de maladies telles que le paludisme et l'amibiase (Anthony et al., 2005).

Les ressources en phytothérapie sont tirées des connaissances populaires et parfois elles ont été formalisés en pratiques de médecine vétérinaire avant l'apparition de la pharmacopée de synthèse (Cerbelaud, 1910).

5.2. Situation de la MT dans le monde

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) près de 80% des populations dépendent de la MT. Les schémas d'utilisation de la MT diffèrent entre et dans les États Membres en fonction de plusieurs facteurs, tels que la culture, l'importance historique et la réglementation : I) Utilisation dans les pays où la MT constitue l'une des sources premières de soins de santé ; II) Utilisation de la MT en raison d'influences culturelles et historiques ; III) Utilisation de la MT comme thérapie complémentaire (Abdullahi, 2011, WHO, 2013).

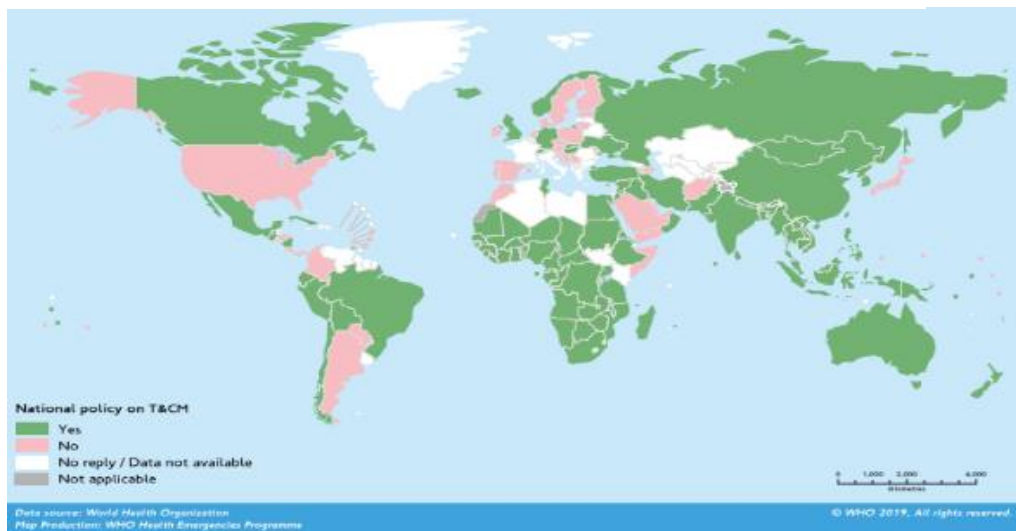
L'OMS invite les États Membres à considérer la MT comme une partie importante de leur système de santé et à s'appuyer sur les travaux introduits dans la Déclaration de Beijing, adoptée en 2008 par le Congrès de l'OMS sur la MT.

Une enquête menée auprès des pays membres de l'OMS a révélé qu'en 2018, plus de 85% de tous les États Membres de la Région africaine et de l'Asie du Sud-Est ont déclaré avoir une politique nationale pour la MT. Dans la Région du Pacifique occidental

et dans la Région de la Méditerranée orientale, 63% et 43% des États Membres, respectivement, disposaient d'un cadre de politique nationale, tandis que dans la Région des Amériques et la Région européenne les pourcentages étaient respectivement de 31% et 21%.

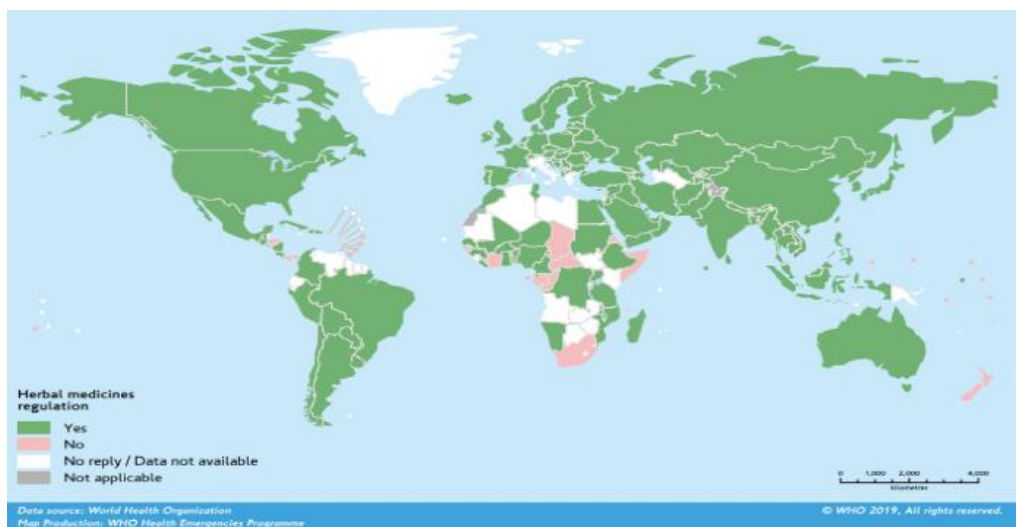
Les pays dotés d'une législation MT ont des approches différentes pour la concession de licences, la distribution, la fabrication et la vente de médicaments traditionnels (WHO, 2019)(Figure21).

Figure 21. Les pays dotés d'une législation MT (OMS, 2019)



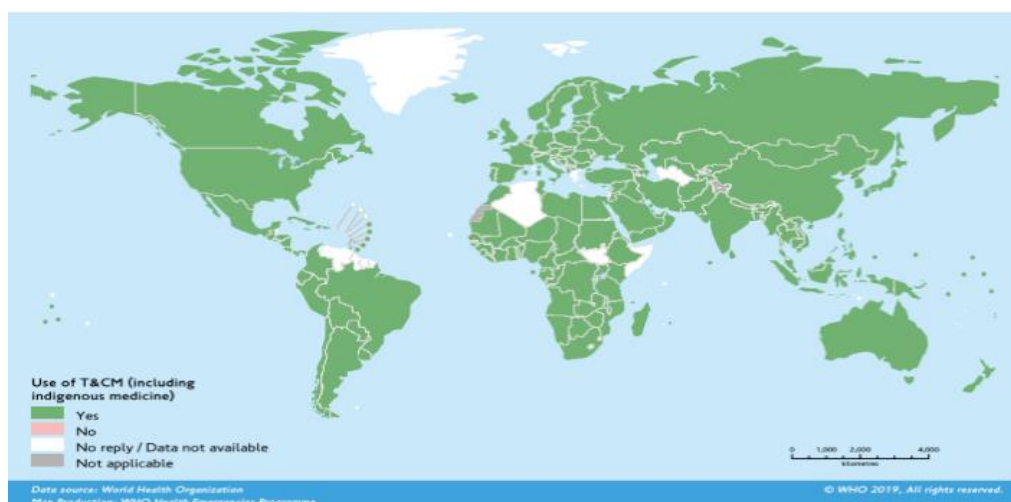
En 2018, plus de 50% des États membres interrogés avaient développé les deux, soulignant la reconnaissance du rôle et de l'importance de la MT et les médicaments à base de plantes dans les systèmes de santé (Figure22).

Figure 22. Pays ayant des réglementations pour les médicaments à base de plantes (OMS, 2019)



Poursuivant les résultats de cette enquête, 170 (soit 88 %) de tous les États membres ont reconnu l'utilisation de la MT et de MI. Y compris le Paraguay et la France. Les pratiques de MT incluent, l'acupuncture, la médecine ayurvédique, chiropratique, la phytothérapie, homéopathie, naturopathie, ostéopathie, médecine traditionnelle chinoise, médecine Unani (Figure23).

Figure 23. Pays utilisant des MT y compris issus de la médecine indigène (OMS,2019)



5.3. La recherche d'activité biologique des plantes

Les plantes ont toujours été une source de curiosité et d'études dans la communauté scientifique. Chaque année, la recherche sur les plantes augmente en raison I) du besoin de nouvelles molécules pour le traitement des maladies émergentes et ré émergentes et II) du grand nombre d'espèces végétales qui n'ont toujours pas été caractérisées sur leur activité chimique ou biologique.

Les recommandations pour les recherches sur les plantes à propriétés bioactives sont d'être menées par une équipe pluridisciplinaire dotée d'expérience en médecine vétérinaire, biochimie, botanique, anthropologie et sociologie en vue de cerner les interfaces existantes entre ces différentes disciplines (Torres-Acosta & Hoste, 2008).

Il existe plusieurs étapes à prendre en compte avant de mener une investigation, parmi lesquelles le choix du type d'approche de sélection de plantes et la préparation des plantes pour leur analyse expérimentale ultérieure que sont des étapes dites « critiques ».

5.4. Sélection des plantes á potentiel bioactif

Afin de faciliter le choix de la méthode de sélection des plantes, ces trois approches ont été proposés par (Krief, 2003) :

1. Approche *chimio-taxonomique* :

Cette approche de collecte vise à sélectionner certaines plantes selon la taxonomie ou la phytochimie. Ces données peuvent être basées sur les résultats d'études antérieures, qui relient une activité biologique à la présence d'une substance active identifiée.

Généralement, *si* la taxonomie est utilisée : des familles de plantes qui présentent une certaine activité biologique seront choisies ; *si* des connaissances phytochimiques sont utilisées : certaines familles de plantes particulièrement riches en principes actifs cibles seront choisies.

A titre d'exemple de cette approche, le Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) a été longtemps étudié pour sa teneur en tanin et les propriétés antiparasitaires associées. Cela laisse supposer que d'autres légumineuses ont une haute teneur en tanins et donc des propriétés bioactives associées à ces molécules (Macadam et al., 2013).

2. Approche *ethno-pharmacologique* :

Cette approche se base sur la connaissance par les populations locales de leur environnement. « *Si la plante est utilisée par les hommes depuis des siècles de manière empirique pour se soigner, on peut penser que son utilisation est due à son efficacité* ».

Selon une étude, 25 % des plantes actives ont été confirmées *in vitro* après sélection par la méthode ethnobotanique, par rapport à 6 % avec l'utilisation d'un échantillonnage aléatoire. Cela donne une indication de l'avantage de l'utilisation de la collecte et sélection basée sur les savoirs traditionnels (Balick, 1990).

3. Approche *systématique* :

Cette approche est basée sur la collecte de plantes d'une certaine zone, basée sur des données du type : climatiques, géographiques. C'est une approche intéressante parce qu'est préparé sans une étude de fond et le criblage biologique sera le seul critère de sélection.

A titre d'exemple de cette approche : les études de diversité avec une liste de plantes d' une région (Tng et al., 2016).

5.5. Préparation des plantes pour la recherche d'activité biologique

Dans l'étude de l'activité biologique des ressources naturelles, l'une des méthodes les plus largement utilisées est l'utilisation *d'extraits de plantes* pour leur application ultérieure dans des essais *in vitro* et *in vivo*.

Les 5 étapes pour la préparation des extraits de plantes pour validation d'efficacité selon (Jara, 2010) et (Swami Handa et al., 2008) sont détaillées ci-dessous :

1. Sélection de plantes : le processus de sélection dépend des objectifs de chaque projet.
2. Dessiccation : la dessiccation peut se faire lentement lorsqu'il est nécessaire de stimuler l'action enzymatique, ou elle peut être rapide quand on veut l'éviter. Il existe deux types de dessiccation :
 - Dessiccation naturelle : c'est un procédé lent et peu coûteux. Plateaux, clôtures galvanisées, papiers éparpillés sur une charpente en bois, etc. peut être utilisé.
 - Dessiccation artificielle : permet de contrôler la température, l'humidité et le temps de traitement. Généralement c'est plus approprié, de courte durée, utile là où l'humidité est très élevée. Pour le séchage artificiel peuvent être utilisés : tunnels de séchage, tours de séchage, étuve à vide, etc.
3. Broyage et stockage : pour le broyage un mixer de laboratoire. Pour le stockage, des endroits frais, secs sont nécessaires.
4. Sélection du type d'extraction : pour la préparation d'extrait il faut tenir compte du fait qu'il existe différentes méthodes pour extraire les principes actifs contenus dans la plante qui nécessitent un liquide d'extraction qui dépendra du procédé technique et de la nature chimique du principe actif.

L'extraction, terme utilisé en pharmacie, implique la séparation des parties actives des tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs.

4.1. Les méthodes d'extraction le plus utilisées :

- Macération : par macération, on entend le contact prolongé pendant un certain temps du produit végétal avec un solvant, constituant un ensemble mixte homogène.

- Infusion : les infusions sont préparées en faisant macérer le produit végétal pendant une courte période avec de l'eau froide ou bouillante.
 - Digestion : c'est une forme de macération dans laquelle une chaleur modérée est utilisée pendant le processus d'extraction.
 - Décoction : dans ce processus, produit végétal est bouilli dans un volume spécifique d'eau pendant un temps défini ; puis il est refroidi et égoutté ou filtré. Cette procédure convient à l'extraction de composants solubles dans l'eau et thermodurcissables.
 - Extraction continue à chaud (Soxhlet) : dans cette méthode, la plante brute finement broyée est placée dans un sac poreux ou "dé à coudre" en papier filtre solide, qui est placé dans la chambre E de l'appareil Soxhlet.
5. Ultrasons : la procédure implique l'utilisation d'ultrasons avec des fréquences comprises entre 20 kHz et 2000 kHz; cela augmente la perméabilité des parois cellulaires et produit de la cavitation.
 6. Les procédures de concentration et de séchage : ces procédures doivent garantir la sécurité et la stabilité des constituants actifs. Le séchage sous pression réduite (par exemple à l'aide d'un Rotavapor) est largement utilisé. La lyophilisation est de plus en plus employée, car permet de stabiliser les extraits dans le temps.

5.6. Modèles expérimentaux pour la recherche de l'activité AH des plants

En tenant compte du fait qu'il n'existe pas de méthodes scientifiques standardisées pour évaluer l'activité anthelminthique des produits traditionnels vétérinaires, les méthodes qui sont utilisées actuellement sont des adaptations des tests *in vitro* et *in vivo* utilisés usuellement pour évaluer l'efficacité et détecter la résistance des parasites aux anthelminthiques chimiques modernes (Coles et al., 1992).

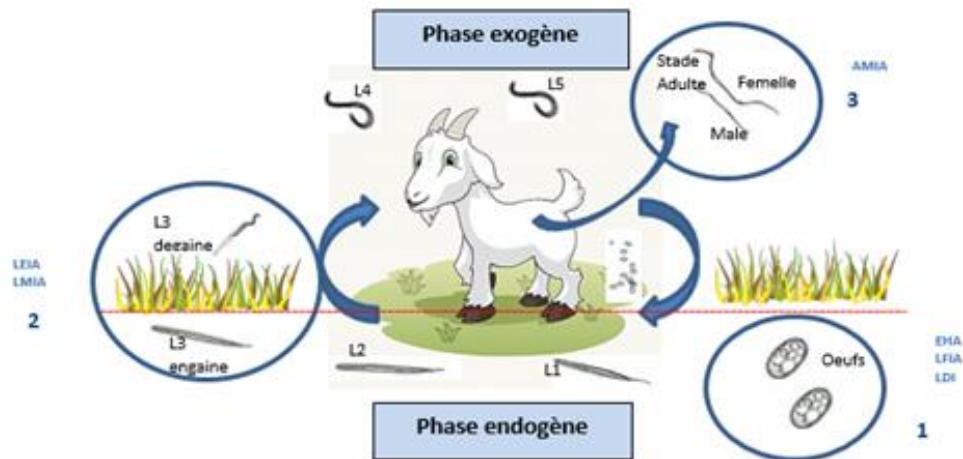
La finalité de ces tests sont de vérifier l'efficacité anthelminthique des composants chimiques naturels (Athanasiadou et al., 2005).

5.6.1. Les tests *in vitro*

Les tests biologiques de validation *in vitro* de l'activité AH des produits traditionnels sont des mesures indirectes et crédibles de l'efficacité du produit sur les

œufs (immatures ou matures), les larves (L1 ou L3) et les vers adultes du parasite étudié comme modèle (Figure 24).

Figure 24. Les principales méthodes *in vitro* utilisées pour évaluer l'activité AH contre les NGI chez les ruminants selon les stades du parasite



1. Œufs et leur développement jusqu'à la larve :
 - Test d'inhibition d'éclosion des œufs - EHA (egg hatch assay)
 - Test d'inhibition de nutrition des L1 - LFIA (larval feeding inhibition assay)
 - Test d'inhibition du développement larvaire - LDIA (larval development inhibition assay)
2. Larve 3 - Infestante:
 - Test d'inhibition du dégainement larvaire - LEIA (larval exsheathment inhibition assay)
 - Test d'inhibition de la motilité larvaire - LMIA (larval motility inhibition assay)
3. Adultes :
 - Test d'inhibition de la motilité des adultes - AMIA (adult motility inhibition assay)

Les tests *in vitro* permettent un screening standardisé de nombreux échantillons, ils ont pour avantage d'être reproductibles, sensibles et fiables, ils supportant l'hypothèse d'un effet direct sur les vers. Certains tels que LEIA et EHA permettent de réaliser des études quantitatives (effet-dose) et qualitatives. Faible cout. Grâce à

l'utilisation antérieure de tests *in vitro*, l'utilisation d'animaux dans la recherche est réduite.

Une comparaison des avantages et inconvénients entre test *in vitro* est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5. Comparaison des différents test *in vitro*. Equipe INMD

| Comparaison des différents tests <i>in vitro</i> | | | | | | |
|--|---------|---------|------------|-------------------------|------------------|------|
| Test | Stade | Phase | Difficulté | Equipement | Reproductibilité | EC50 |
| EHA | Œuf | Externe | 2 | Microscope inversé | Bonne | Oui |
| LDA | Œuf | Externe | 2 | Microscope inversé | Moyenne | Oui |
| LFIA | L1 | Externe | 2 | Microscope Fluorescente | Bonne | Oui |
| LMIA | L3 | Interne | 2 | Stereomicroscope | Bas | Non |
| LEIA | L3 | Interne | 1 | Microscope | Bonne | Oui |
| AMIA | Adultes | Interne | 3 | Animal | Bas | Non |

*1 (simple); 2 (modérée); 3 (forte)

5.6.2. Les tests *in vivo*

Les essais *in vivo* peuvent être classés en deux types selon le mode d'infestation : Expérimentales et Infestations naturelles

1. Test *in vivo* en conditions expérimentales

Des tests biologiques *in vivo* dans des conditions expérimentales ont permis de préciser chez l'hôte les répercussions de l'ingestion d'extraits végétaux aux différentes étapes clés du cycle biologique des nématodes (éclosion et développement des œufs, infestant les larves 3, vers adultes).

2. Test *in vivo* en condition d'infestations naturelles

Les tests biologiques *in vivo* en condition d'infestations naturelles sont moins nombreux et l'interprétation de leurs résultats est plus limitée en raison :

- De la présence de plusieurs populations de nématodes d'espèces différentes dans tout le tube digestif.
- Des niveaux d'infestations incontrôlées et très variable.
- Interactions possibles entre les populations de parasites.

Les recommandations pour ce type de test sont une bonne planification de mesures coproscopiques dans les fèces avant et après application des plantes, il doit être fait avec plus de rigueur méthodologique/technique pour pouvoir comparer les résultats. Ce type d'essais *in vivo* présente un intérêt majeur qui est de se rapprocher des modes de conduite observées dans les divers systèmes d'élevage et d'explorer comment des modes diversifiés de distribution des nutriments module, à des degrés variables, la dynamique des infestations (Quijada Pinango, 2015).

6. *Métabolites Secondaires (MSP) et recherche de l'activité biologique des plantes*

Cette thèse vise à évaluer des plantes bioactives, il est donc compréhensible de présenter un résumé des différents groupes des MSP présents chez les plantes auxquelles, peut-être, nous pourrions relier l'activité biologique.

L'impact de l'utilisation des plantes bioactives et leurs composants sur divers paramètres physiologiques chez l'hôte est étudié depuis plusieurs années. Environ 80.000 plantes bioactives sont reconnues pour leur importance dans l'amélioration de la santé et de la productivité des animaux dans le monde (Bernhoft et al., 2008).

Dans cette partie, nous parlerons brièvement des MSP, généralités et leur classification. Ensuite, nous concentrerons notre intérêt sur un groupe particulier appartenant à des composés phénoliques qui ont attiré l'intérêt des nombreux scientifiques pour leurs propriétés contre les NGI : *les tanins*, les plantes à tanins étant le modèle privilège d'étude du laboratoire où s'est déroulé cette thèse.

6.1. Généralités

Le terme métabolite correspond par définition à un composé organique intermédiaire ou issu du métabolisme. Les plantes possèdent des métabolites, ceux-ci sont à leur tour divisés en : "primaires" ou essentiels pour la plante (protéines, glucides et lipides), et "secondaires". Les métabolites secondaires des plantes (MSP) sont le reflet de la vie d'un écosystème ; ils participent à la régulation de la démographie des plantes, ou des populations d'animaux qui établissent des relations avec les plantes. Ils ont donc un rôle écologique ; par exemple, en attirant les insectes pollinisateurs, ou, au contraire, en repoussant les insectes ravageurs et les organismes pathogènes. Chaque espèce de

plante possède un profil particulier de MSP (Dao, 2008). Sa fonction est associée à des mécanismes de défense des plantes contre la prédation par des insectes ou des herbivores (Athanasidou et Kyriazakis, 2004).

Les MSP sont produites à différents endroits de la cellule végétale dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement. Leur concentration varie en fonction des conditions agronomiques, de récolte et de conservation. Les MSP sont fragiles (= sensibles à la température, l'humidité et aux traitements technologiques appliqués) (Marie-Magdeleine, 2009). De façon générale, le rôle des MSP est en lien avec sa localisation au sein de la plante (Pathak, 1963).

Les plantes bioactives contiennent des métabolites secondaires bioactifs. Bioactif signifie qu'ils ont une influence sur la physiologie et la santé des animaux. Les rapports entre avantages des plantes bioactives, leurs composants (MSP) et les effets sur la santé animale sont de plus en plus nombreux. Pour citer quelques exemples : augmentation de la production de stéroïdes sexuels, augmentation du nombre de spermatozoïdes, augmentation de la qualité du pelage et de la peau, diminution du risque de météorisation, diminution de la prévalence de la rétention placentaire et des mammites chez les petits ruminants, la stimulation immunitaire, les effets psychologiques pour réduire le stress, entre autres, ont été mentionnés (Zeineldin et al., 2020). Cependant, l'utilisation des plantes bioactives et de leur composants (MSP) rencontre des limites. La consommation de plantes riches en MSP par les herbivores peut entraîner une réduction de l'apport de nutriments par réduction d'ingestion, une perte de poids (Villalba et al., 2004) une toxicité, une digestibilité réduite et une altération du métabolisme ruminal (Kawas et al., 2010).

L'identification de molécules naturelles à l'aide de méthodes chimiques modernes a mis en évidence la diversité des molécules de différentes classes biochimiques à potentiel AH, telles que : les protéinases (Steppek et al., 2004), les saponines (Deepak et al., 2004), les tanins condensés (Paolini et al., 2003), des lectines (RIOS -Alvares, 2016).

6.2. Classification des MSP

La classification des MSP comprend des grands groupes : les composés terpéniques, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Chacun de ces groupes contient une grande diversité de composés qui ont des activités très importantes et diversifiées en biologie.

I. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Les terpénoïdes et les stéroïdes forment l'une des plus grandes familles de MSP. Ils sont issus des mêmes précurseurs. Ces composés se trouvent dans les graines, les fleurs, les feuilles, les racines et le bois des plantes supérieures ainsi que dans les mousses, les algues.

Les terpénoïdes, parfois appelés isoprénoïdes, forment une classe large et de composés organiques rencontrés dans la nature, similaires aux terpènes, dérivant d'unités isopréniques à cinq atomes de carbone assemblées et modifiées de milliers de façons (formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène) (Ludwiczuk et al., 2017).

Les stéroïdes sont un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes. Ils forment une vaste famille chimique qui regroupe toutes les molécules naturelles dont le squelette carboné polycyclique s'apparente au gonane (perhydro-1,2-cyclopenténophénanthrène) (Poon et al., 2018).

Les caroténoïdes et les saponines appartiennent également à la famille chimique des terpénoïdes. Les caroténoïdes sont formés à partir de la polymérisation d'une cinquantaine d'unités isopréniques, est généralement admis qu'ils suivent des voies métaboliques similaires à celles des lipides. Les caroténoïdes sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries dont les cyanobactéries. Les saponines sont des glycosides stéroïdes ou triterpénoïdes, du nom de leurs propriétés savonneuses (chaque molécule est composée d'un élément liposoluble et d'un élément hydrosoluble) trouvé dans les plantes et certains organismes marins (Yang et al., 2014, Ludwiczuk et al., 2017).

Certaines plantes à stéroïdes et à triterpènes ont montré une efficacité AH sur des NGI à différents stades de développement (Qamar et al., 2005), (Marie-Magdeleine, 2009). L'effet AH des composés de ce groupe vis-à-vis des NGI est attribué à plusieurs composés divers tels que : les triterpènes (Githiori et al., 2006), des saponines (Deepak et al., 2002), le terpinen-4-ol (Grando et al., 2016).

II. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques complexes contenant un cycle azoté hétérocyclique. Les alcaloïdes proviennent du règne végétal et animal. Environ

20.000 alcaloïdes sont connus, la plupart étant isolés de plantes. Mais, des alcaloïdes ont également été trouvés dans des micro-organismes, des organismes marins tels que les algues, les dinoflagellés et les poissons-globes, et des animaux terrestres tels que les insectes, les salamandres et les crapauds (Verpoorte, 2004).

Les plantes sont considérées comme la plus ancienne source d'alcaloïdes, et à l'origine de certains des alcaloïdes les plus largement reconnus, tels que la morphine, la quinine, la strychnine et la cocaïne (O'Connor, 2010).

La classification des alcaloïdes sur la base de leur biogenèse peut être divisée en trois classes : I. Les alcaloïdes véritables (dérivés des acides aminés dont l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et dont l'activité pharmacologique est significative), II. Les pseudo-alcaloïdes (ne sont pas des dérivés des acides aminés) et III. Les proto-alcaloïdes (dérivés des acides aminés dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique) (Bruneton, 2009).

Cette famille et ses structures identifiées à ce jour sont une piste de recherche d'activité AH (Dubois et al., 2019). Les effets AH d'alcaloïdes envers différents NGI ont été évalués (Lima et al., 2017 ; Yang et al., 2018 ; da Silva et al., 2021). Concernant le mécanisme d'action des alcaloïdes expliquant l'effet AH, il a été suggéré qu'ils pourraient agir sur le système nerveux des helminthes provoquant une paralysie (Zajíčková et al., 2020) de la même façon que certains AH de synthèse (e.g. Lévamisole).

III. Les composés phénoliques

Ce sont des MSP caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou liées avec des glucides. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (e.g. racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, grains et écorce).

Selon leur voie de genèses dans la plante, on distingue les shikimates et les acétates. Parmi les shikimates, les phénols, les coumarines, les lignanes, les dérivés d'extension du phénylpropane et les tanins sont mentionnés et parmi les polyacétates ou polykétides : les quinones (Bruneton, 2009).

Les composés phénoliques sont très répandus dans la nature et sont souvent des composants d'extraits de produits naturels. Beaucoup de ces composés apparaissent fréquemment cités dans la littérature scientifique dédiée aux produits naturels, en

particulier dans les études utilisant des extraits de plantes dans la recherche d'effets antioxydants ou anthelminthiques (Garcia-Bustos et al., 2019).

L'effet AH de composés phénoliques envers différents NGI a été évalué (Pierpoint, 2004 ; Castañeda-Ramírez et al., 2017). Dans ce groupe, les tanins condensés ont été reçus une attention particulière en raison de leur présence dans de nombreuses plantes (Paolini, 2004 ; Chan-Pérez et al., 2017).

6.3. Les Tanins

Au cours des 20 dernières années, la plupart des résultats de recherche *in vitro* et *in vivo* sur les plantes aux propriétés AH chez les petits ruminants parasités et les applications possibles dans les conditions d'élevage ont été liées à la consommation des fourrages de légumineuses riches en tanins, plantes riches en tanins condensés (Hoste et al., 2006, 2011 ; 2015).

6.3.1. Généralités

Une des premières définitions de Tanins évoquée en 1973 mentionne que ce sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da (Bate-Smith, 1973). Le terme de tanins (*ou tannins*) correspond à toute substance d'origine végétale ou minérale ayant la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 2009). Les tanins possèdent de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de se complexer avec de nombreuses macromolécules telles que les protéines et les glucides, ou avec les ions métalliques (Bravo, 1998).

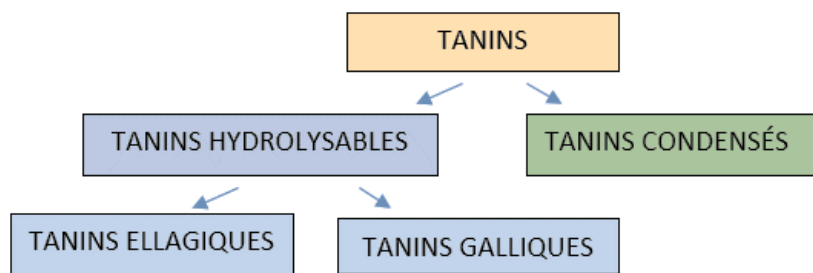
Les tanins sont largement distribués dans le règne végétal, dans les arbres, arbustes et plantes herbacées y compris les légumineuses des régions tropicales, arides ou semi-arides et / ou tempérées. Ces MSP sont cités dans plusieurs familles botaniques : Betulaceae (*Betula*), Cesalpiniaceae (*Ceratonia*), Cistaceae (*Cistus*), Cupressaceae (*Juniperus*), Ericaceae (*Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*), Fagaceae (*Castanea*, *Quercus*), **Fabaceae** (*Cytisus*, *Genista*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*), Rosaceae (*Crataegus*, *Rosa*, *Rubus*) et Salicaceae (*Salix*) et autres (Yarihuamán & Zárate, 2008) ; (Romero Lara, 2000) ; (Hervás, 2001) ; (Galindo et al., 2005).

Chez les végétaux, tous les organes peuvent contenir des tannins: racines, rhizomes, écorce, feuilles, fleurs, fruits, graines. Les tannins sont majoritairement stockés dans les tissus épidermiques et sub-épidermiques, mais peuvent être aussi présents dans le péricarpe (des fruits) et dans les racines. La teneur en tanins plus ou moins élevée des légumes est conditionnée par les facteurs environnementaux, saisonniers et de phénologie végétale (García, 2004 ; Brunet, 2008). Pour une espèce donnée, le stade végétatif influence également la teneur en tannins (Jean-Blain, 1998). La synthèse des tannins est généralement augmentée en réponse à un stress environnemental quel que soit son origine, tel qu'un stress hydrique, un appauvrissement du sol ou un ensoleillement trop fort (Bennick, 2002). Un stress engendré par l'agression des végétaux par des herbivores ou des pathogènes induit une synthèse accrue de métabolites secondaires et un stockage important de tannins, en particulier des tannins condensés, au niveau de la zone attaquée (Woodward & Coppock, 1995).

6.3.2. Classification chimique des tannins

Les tannins sont des polyphénols variés qui possèdent une haute affinité pour les protéines et les polysaccharides. On distingue deux types de tannins, selon leurs structures (Figure 25).

Figure 25. Classification schématique des tanins selon leurs structures chimiques



I. Les tannins hydrolysables (TH)

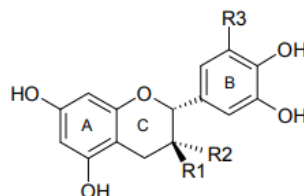
Le terme « tannin hydrolysable » décrit leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Les TH sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation peuvent être responsables d'effets néfastes sur l'organisme (*i.e.* intoxications) lors d'ingestion trop massive, en provoquant des lésions hépatiques et rénales, décrites chez les moutons (Zhu et al., 1992) ou les bovins (Plumlee et al., 1998).

Selon la nature de l'acide-phénol les TH sont classés en : I) Les tannins galliques qui possèdent un acide gallique, et II) Les tannins éllagiques possèdent un acide hexahydroxyphénique. Les tannins éllagiques sont obtenus suite à un couplage oxydatif entre des molécules d'acide gallique (Mueller-Harvey, 2001).

II. Les tannins condensés (TC)

Ce sont des polyphénols de haut poids moléculaire. L'unité de base (ou monomère) des tannins condensés est un flavan-3-ol (Figure 26). Dans cette structure chimique la présence d'un hydrogène (H) ou d'un groupement phénol (OH) aux positions R1, R2 et R3 permet d'identifier diverses classes de flavan-3-ols (Tableau 6)

Figure 26. Structure chimique des flavan-3-ols.



Source illustration : ChemSpider

Tableau 6. Classes d'homopolymères des *flavan-3-ols*

| Flavan-3-ols | Classes des homopolymères | R1 | R2 | R3 | OH |
|-------------------------------|---------------------------|----|----|----|----|
| <i>Catéchol (C)</i> | Procyanidols | OH | H | H | 5 |
| <i>Epicatéchol (EC)</i> | Procyanidols | H | OH | H | 5 |
| <i>Gallocatéchol (GC)</i> | Prodelphinidols | OH | H | OH | 6 |
| <i>Epigallocatéchol (EGC)</i> | Prodelphinidols | H | OH | OH | 6 |
| <i>Fisétinidinol</i> | Profisétidinols | H | H | H | 4 |
| <i>Robinétidinol</i> | Prorobinétidinols | H | H | OH | 5 |

Source Tableau : (Brunet, 2008)

Les monomères des prodelphinidols (ou prodelphinidins) sont différenciés de ceux des procyanidols (ou procyanidins) par la présence d'un groupement OH en position R3, ce qui leur confère une capacité accrue à se fixer aux protéines (Aerts et al., 1999; Schofield et al., 2001). Parfois, le flavan-3-ol est estérifié avec un acide gallique en position R2. Les propriétés biologiques des TC sont modifiées par la présence d'un ou plusieurs acides galliques (Brunet et Hoste, 2006).

Les végétaux supérieurs contiennent majoritairement deux classes d'homopolymère : i) Les procyanidins composés uniquement de catéchol (C) ou

d'épicathécol (EC) ; II) Les prodelphinidins constitués uniquement de gallocathécol (GC) ou d'épigallocathécol (EGC). Deux autres classes d'homopolymères sont plus rarement rencontrées : les profisetidinols (profisetinidins) et les prorobinétinidols (prorobinetinidins) (Mueller-Harvey, 2006).

6.3.3. *Les effets des tannins chez les petits ruminants selon le type*

La consommation de plantes riches en tannins induit des effets contradictoires chez les ruminants. Pour cette raison il est important de distinguer les effets produits par les TH de ceux dus aux TC.

- *Les tannins hydrolysables (TH)* : la consommation des plantes riches en TH entraîne des effets toxiques. En général, les empoisonnements d'animaux après la consommation de plantes riches en tannins sont attribués à la présence de TH, en particulier de gallotannins (Paolini, 2004).
- *Les tannins condensés (TC)* : sont rarement associés à une toxicité aiguë chez les ruminants, car, en raison de leur poids moléculaire élevé, ils sont peu absorbés par la muqueuse gastro-intestinale. Les TC ont été associés à des effets bénéfiques sur la santé et la production animale lorsqu'ils sont ingérés de façon modérée (Brunet, 2008), et ce sont ceux qui retiennent notre attention.

6.3.4. *Effets bénéfiques des TC sur la santé des petits ruminants*

- La consommation de plantes contenant des TC en quantité modérée influe sur la croissance des jeunes animaux (Leathwick et Atkinson, 1998). La consommation de TC contribue à la prévention de la météorisation spumeuse.
- Chez les ruminants, l'ingestion de TC influence le niveau de production et la qualité du lait et a été associée à une augmentation de la production (Min et al., 2003)
- Des effets sur la reproduction ont été évoqués ; par exemple, une corrélation positive entre le nombre de jours de pâture sur du lotier cornicule (2 à 3% TC) et le taux d'ovulation des brebis a été notée (Ramírez-Restrepo et al., 2004).
- La consommation de fourrages riches en TC induit une augmentation de la matière sèche de la matière fécale, et par conséquent contribuerait à la prévention d'épisodes diarrhéiques (Min et al., 2001)

- Les effets bénéfiques des TC sur la santé des ruminants concerne avant tout les conséquences sur le parasitisme gastro-intestinal notamment par les NGI et à moindre degré les coccidies (Hoste et al., 2012).
- Des études *in vivo* ont montré que le remplacement de 45 % du régime alimentaire par *Lespedeza cuneata* ou *Desmodium paniculatum*, ayant une concentration de tanins condensés de 2,6 et 9,0 %, respectivement, provoque une diminution de la production de CH₄ sans compromission des fermentations ruminales (Naumann et al., 2015).

6.3.5. Mécanisme d'action des TC contre les NGI

Le mécanisme par lequel les TC exercent leur action antiparasitaire n'est pas exactement connu. Deux hypothèses sont évoquées pour expliquer les effets de la TC sur les NGI chez les petits ruminants : i) un effet direct, de type pharmacologique, lié aux propriétés propres des TC sur les nématodes ; ii) un effet indirect d'amélioration de la réponse immunitaire de l'hôte contre les vers.

- **Directe** : l'activité AH des TC s'expliquerait par un effet direct sur les parasites, en perturbant des fonctions ou des structures vitales pour les nématodes, comme par exemple l'intégrité de la cuticule des vers adultes ou de la gaine des larves 3 infestantes (deux structures riches en proline et en hydroxyproline), changement de l'ultrastructure des larves, l'altération de l'hypoderme, la présence de vacuoles dans le cytoplasme et la dégénérescence et/ou la mort des cellules musculaires et intestinales (Brunet et al., 2011 ; Rira, 2019).
- **Indirecte** : une augmentation de la réponse immunitaire de l'hôte infesté. Les légumineuses fourragères ont tendance à avoir une bonne valeur nutritionnelle, ce qui peut aussi expliquer le meilleur comportement observé chez les ruminants parasités lorsqu'ils consomment du Sulla (*Hedysarum coronarium*), du Sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) (Githiori et al., 2006; Tzamaloukas, 2006).

7. *Les plantes étudiées*

Dans les pays tropicaux, les géo helminthiases humaines sont présentes dans toute la région et on estime qu'une personne sur trois est infectée, en particulier les enfants. Les infections parasitaires, causées par les amibes, les vers et les ténias, restent un problème pour la population, en raison des déficiences du système de santé et du climat tropical humide propice au développement des vers (OPS, 2020).

Dans le cadre de la sélection des plantes pour cette thèse, nous avons pris en compte une approche basée sur l'ethnopharmacologie comme critère scientifique principal. En première partie, nous avons effectué une enquête ethnobotanique/ethno vétérinaire pour identifier les plantes utilisées pour traiter les problèmes gastro intestinaux chez l'homme et chez les animaux.

Les plantes auxquelles des propriétés anthelminthiques sont attribuées étaient nombreuses et appartiennent à différentes familles botaniques (les résultats de l'enquête seront présentés au **Chapitre I – Article 1**). Pour cette raison, sur la base des résultats de cette enquête, nous avons sélectionné 4 plantes médicinales qui ont répondu aux critères suivants :

- *Leur disponibilité et leur facilité d'obtention.*
- *Originalité (peu ou pas d'informations scientifiques locales/mondiale sur ses effets anthelminthiques chez petits ruminants).*
- *La popularité de son utilisation.*

7.1. *Kyllinga odorata* Valh

7.1.1. Intérêt

Le genre *Kyllinga* Rottb. (Cyperaceae) comprend environ 45 espèces originaires de régions chaudes. Il existe quatre espèces de *Kyllinga*, *K. brevifolia* Rottb., *K. odorata* Vahl, *K. pumila* Michx, *K. vaginata* Lam. Il convient de noter que la seule espèce acceptée comme plante médicinale au Paraguay est l'espèce *Kyllinga odorata* Valh (González et al., 2009).

7.1.2. Synonymes et noms communs

Synonymes : *Cyperus sesquiflorus*, *Kyllinga leucocephala*, *Kyllinga martiana*, *Kyllinga pellucido-albida*, *Kyllinga triceps*.

Noms vernaculaires : Kapi'í kati (Paraguay) ; Jengibrillo (Mexique, Colombie) ; Naaté Ilale (Tanzanie) ; Wayapi (Guyana Fr) ; Suo cao shu (Chine) ; Capim - barata, Capim – cheiroso (Brazil) ; Flat sedge, umbrella sedge (US).

7.1.3. Classification taxonomique

- Phylum : Tracheobiont
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Liliopsida
- Sous-classe : Commelinidae
- Famille : Cyperaceae
- Genre : *Kyllinga*
- Espèce : *odorata*

7.1.4. Description morphologique

Plante vivace et crépitante, de 0,05m à 0,30m de hauteur. Rhizome couvert d'écailles brunes provoquant de nombreuses racines fines. Base de la tige épaissie, foliée à la base. Feuille entière, lisse ou épineuse à la marge. Inflorescence dans les épis denses des épillets sessiles, avec répartition des bractées feuillues. Epillets 1-2, expiré avec glume jusqu'à maturité.

Fleurs hermaphrodites, parfois aussi mâles, à deux étamines. Achène comprimé latéralement, biconvexe, ovale, brun noirâtre (Monti et Mandrile, 1998). (Figure 27, 28)

Figure 27. Représentation de *K. odorata* Valh



Figure 28. Illustration botanique de *K. odorata* Vahl

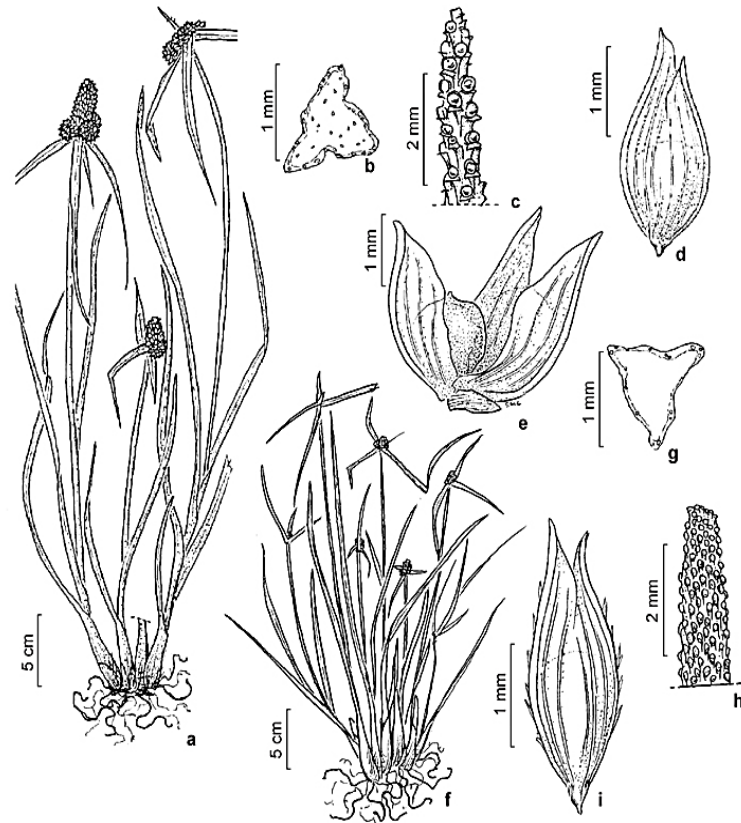


Figura 2 - *Kyllinga odorata* Vahl – a. hábito; b. corte transversal do escapo; c. ráquis; d. espigueta uniflora; e. espigueta biflora (a-c. *E.Gomes 67*, d-e. *S.M. Costa 10*). *Kyllinga pumila* Michx. – f. hábito; g. corte transversal do escapo; h. ráquis; i. espigueta (*S.M. Costa 120*).
Figure 2 - *Kyllinga odorata* Vahl – a. habit; b. transversal section of culm; c. rachis; d. flowered spikelet; e. flowered spikelet (a-c. *E.Gomes 67*, d-e. *S.M. Costa 10*). *Kyllinga pumila* Michx. – f. habit; g. transversal section of culm; h. rachis; i. spikelet (*S.M. Costa 120*).

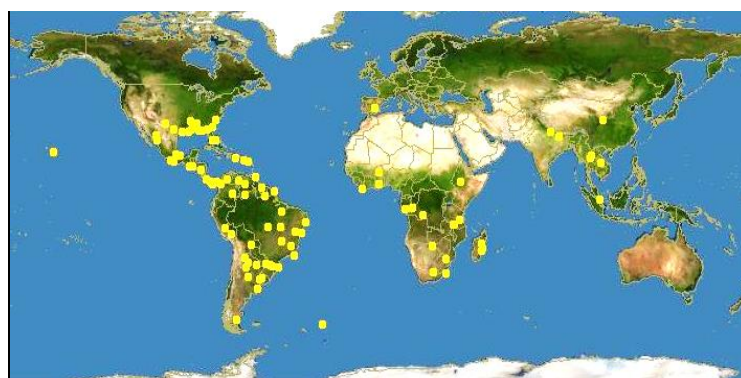
Source : SM Costa 120.Internet.

7.1.5. Distribution et origine de la plante

La famille des *Cyperaceae* est représentée dans le monde par 115 genres, dont plus de 3.700 espèces réparties dans les régions froides, chaudes tempérées et tropicales des deux hémisphères (Zuloaga et al., 2012).

Originnaire d'Asie, mais naturalisé et souvent cultivé en Afrique, en Australie, dans les îles du Pacifique, dans le sous-continent indien et en Amérique centrale, en Amérique du Nord et du Sud (Tucker et al., 2006) (Figure29).

Figure 29. Distribution géographique de *K. odorata*. Tropicos®



7.1.6. Propriétés et usages thérapeutiques

K. odorata est une plante aromatique à laquelle de multiples fonctions sont attribuées allant des problèmes digestifs aux problèmes mentaux (Tableau7).

Tableau 7. Propriétés et usages thérapeutiques de *K. odorata*

| Indication | Partie de la plante | Références |
|---|---------------------------|---|
| Anti diabétique | Rhizome | (Sudipta et al., 2012) |
| Analgésique | Feuille, parties aérées | (Amor et al., 2009) |
| Dysenterie | Feuille, Chaumes | (Vendruscolo et al., 2005) |
| Sudorifique, Digestif, antispasmodique, diurétique | Feuilles, Chaume, Rhizome | (Céspedes et al., 2011), (Fonseca, 2015) |
| Augmentation de la sécrétion des glandes vulvo-vaginales. | Rhizome | (Monti & Mandrile, 1998) |
| Lutte contre les insectes | Rhizome | (Degen et al., 2004) ; (Majumder, 2013) |
| Antiseptique local ; cataplasme | Rhizome | (Calderón et al., 2006) |
| Anxiété, troubles nerveux, Problèmes mentaux | Feuilles, rhizome, chaume | (Da Mota, 2003); (Pinto de Oliveira et al., 2017) |
| Problèmes urinaires, rénaux | Plante entière | (Rivera Ayala & Flores Martínez, 2016) |

Au Paraguay, la racine est la partie de la plante utilisée et sa vente sur les marchés se fait dans un « macito¹ » (Figure30). *Macito: groupement compact d'une plante (ou une partie) enveloppée de feuilles de noix de coco.

Figure 30. Présentation de la plante au marché. *K. odorata* Valh.



Source : <https://www.abc.com.py/>

7.2. *Cassia occidentalis* L.

7.2.1. Intérêt

Cassia occidentalis L. est une plante largement étudiée pour ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antiparasitaires (Yadav et al., 2010). Parmi ses multiples usages, elle est mentionnée en Afrique et en Amérique du Sud comme substitut du café, d'où son nom de « Cafetillo ». Elle est considérée comme « mauvaises herbes comestibles » ou « nourriture contre la faim » dans les villages hausas de l'Afrique (Humphry et al., 1993). Sa toxicité est bien connue qui peut être à l'origine de décès par empoisonnement spontané chez les ruminants au pâturage (Nwude, N.; Parsons, 1977).

7.2.2. Synonymes et noms communs

Synonymes : *Cassia caroliniana*, *Cassia ciliata* Hoffmanns, *Cassia falcata*, *Cassia foetida*, *Cassia macradenia*, *Cassia obliquifolia*, *Cassia planisiliqua* L. *Cassia plumieri* DC.

Noms communs : Taperyva hû (Paraguay) ; Brusca, Guanina, Martinica, Platanillo (Cuba, Equateur) ; Café Negro, Hedionda (Puerto Rico) ; Bois Puante, Casse Puante (Antilles) ; Coffee Senna, Stinking Weed (US) ; Hucho, Habilla, Habilla Prieta, Hediondillo, Mezquitillo, Vainillo (Mexique) ; Faux kinkéliba, casse puante, séné à café, casse – café (France).

7.2.3. Classification taxonomique

- Division : Trachéophyte
- Classe : Magnoliopsida.
- Sous-classe : Rosidae
- Commande : Fabales
- Famille : Fabaceae
- Genre : *Cassia*
- Espèce : *occidentalis*

7.2.4. Description morphologique

Plante qui mesure entre 0,50 et 1,50 m de hauteur, glabre. C'est une espèce annuelle qui peut vivre plus d'un an dans des conditions favorables. Cette plante se multiplie

uniquement par graines. Les feuilles, alternes, glabres, légèrement pubescentes sur la face inférieure, portées par un court pétiole, sont composées paripinal et longues de 10 à 15 cm. A la base du pétiole, se trouvent deux stipules triangulaires étroites, de 2 à 4 mm de long, précocement caduques. Les fleurs, de 1,5 à 3 cm de diamètre, solitaires ou groupées est de couleur jaune, d'environ 13 mm de long, 10 étamines inégales, dont 6 fertiles (2 grandes et 4 petites) et 4 staminodes, un ovaire linéaire, arqué, glabre, portant un stigmate. Le fruit est une gousse oblongue, de 10 à 15 cm de long sur 7 à 8 mm de large. La gousse, beige à maturité. Elle contient de 20 à 60 graines disposées en ligne et séparées par une fine membrane (Parsons et Cuthbertson, 2001) (Figure31, 32).

Figure 31. Représentation de *C. occidentalis*



Figure 32. Illustration botanique de *C. occidentalis*

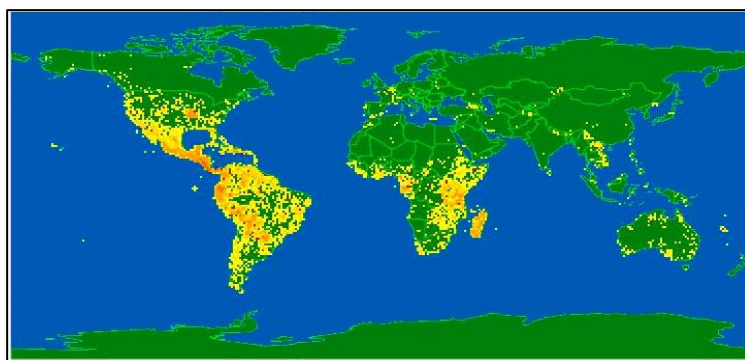


Source : internet

7.2.5. Distribution de la plante

Le genre *Cassia* contient environ 700 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales du monde. *C. occidentalis* a une distribution pantropicale et est probablement originaire d'Amérique tropicale. L'espèce est maintenant présente en Asie, en Afrique, en Amérique du Nord, en Amérique centrale, dans les Caraïbes, en Amérique du Sud et en Océanie (Figure 33)

Figure 33. Distribution géographique de *C. occidentalis*. Tropicos®



7.2.6. Propriétés et usages thérapeutiques

Presque toutes les parties de *C. occidentalis* sont utilisées à des fins médicinales traditionnelles. Les usages sont présentés dans (Tableau 8).

Tableau 8. Propriétés et usages thérapeutiques de *C. occidentalis*

| Indication | Partie de la plante | Références |
|---|---------------------|---|
| Inflammation des yeux Diarrhée, dysenterie, constipation, fièvre, cancer, eczéma et maladies vénériennes. | Plante complète | (Payne-Jackson & Alleyne, 2004) ; (Noelli, 1998) |
| Antiasthmatiques, antibactériens, antidotes toxiques (serpents), antispasmodiques, antifongiques, anti hépatotoxiques, anti-inflammatoires, antipaludiques, antiviraux, carminatifs, dépuratifs, dépuratifs. | Racine | (Watt, 2014), (Yadav et al., 2010) |
| Maladies de la peau. Fractures osseuses, fièvre, teigne, affections cutanées, infections de la gorge et plaies. Hygiène dentaire | Feuilles | (Fenner et al. 2006) |
| Fébrifuge | Graines | (Singh et al., 2014) |
| Contre l'anxiété, les antidépresseurs | Gousses | (Vijayalakshmi et al., 2013) |

Au Paraguay, la racine est la partie de la plante utilisée (Figure 34).

Figure 34. Présentation de la plante au marché. *C. occidentalis*



7.3. *Artemisia absinthium* L.

7.3.1. Intérêt

L'*Artemisia* a été qualifiée de « mère de toutes les herbes » pour ses innombrables propriétés évoquées depuis l'Antiquité par les Égyptiens, puis transmises aux Grecs. Le genre *Artemisia* est l'un des plus grands de la famille des Astéracées, composé de plus de 800 espèces. *Artemisia absinthium* L, est utilisé comme médicament depuis des temps immémoriaux, et parmi les actions les plus signalées, les problèmes digestifs et antiparasitaires se distinguent (Ariño, 1999). L'effet antiparasitaire est attribué à certains des composants de son huile essentielle (e.g. thujone, thuyol et isotuyone) présents dans les feuilles et les sommités fleuries de la plante.

7.3.2. Synonymes et noms communs

Synonymes : *Absinthium vulgare*, *Absinthium officinale*.

Noms communs : Ajenjo (Argentine, Chili, Colombie, Paraguay, Pérou, Honduras) ; Herbe a vers, Absinthe, grande absinthe (France) ; Aluina, Alvina, Herva dos vermes, herva santa, losna (Brazil) ; Nayqatamisa (Bolivie).

7.3.3. Classification taxonomique

- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Famille : Asteraceae
- Genre : *Artemisia*
- Espèce : *absinthium*

7.3.4. Description morphologique

Arbuste vivace de 0,5 à 1 m de haut, ramifié alternativement et serré vers l'apex. Sa couleur est blanchâtre en raison des crins épais et gris qui recouvrent les tiges et les feuilles. Il se caractérise par des feuilles alternes légèrement lancéolées, des inflorescences en grappes terminales de couleur jaune avec de petites fleurs papillons. L'Artemisia est une plante très aromatique et ses feuilles ont un goût amer. Les tiges poussent à partir d'un rhizome ligneux et sont ramifiées herbacées ; Ils sont ligneux, dodus et durcissent lorsque la saison de floraison arrive. Les branches sont fines, fines et souples. Feuilles : pétiolées, alternes, pubescentes sur la face inférieure, ce qui lui confère une texture soyeuse. Les feuilles les plus hautes contiennent les sommités fleuries, restant non divisées, et en dessous se trouvent d'autres qui n'ont pas plus de 3 ou 5 segments. Les fleurs sont regroupées en têtes avec un bol hémisphérique plat de plus de 3 à 5 mm de diamètre et de couleur jaune, avec 30 à 40 fleurs dans chacune d'elles (Stübing & Peris, 1998) (Figure 35,36).

Figure 35. Représentation d'*A. absinthium*



}

Figure 36. Illustration botanique *A. absinthium*

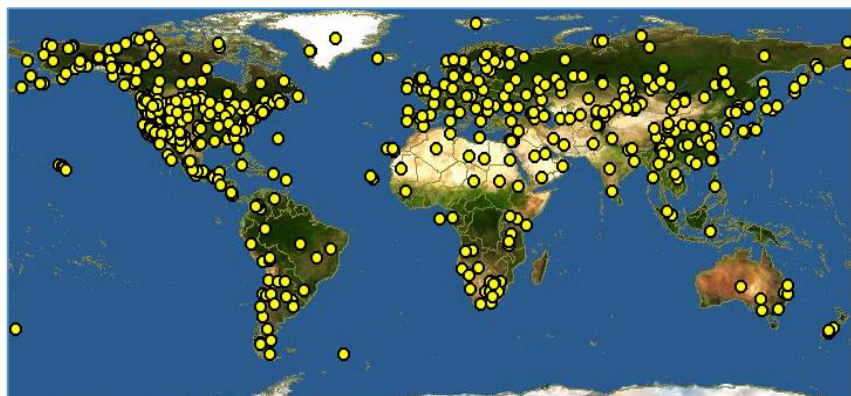


Source : internet

7.3.5. Distribution de la plante

Artemisia absinthium est originaire des régions tempérées, ses habitats vont de l'Europe, l'Écosse, la Scandinavie, la mer Méditerranée, du sud à l'Afrique du Nord, à l'est jusqu'en Sibérie et au nord de l'Inde. La plante s'est naturalisée en Amérique du Nord et du Sud. Cette plante pousse naturellement dans les champs non cultivés et au bord des routes, sur les pentes rocheuses, préférant les sols arides, non acides, limoneux ou sableux, riches en azote, phosphore et potassium, formant souvent des colonies (Judžentiene, 2016) (Figure37).

Figure 37. Distribution géographique d' *A. absinthium* Tropicos®



7.3.6. Propriétés et usages thérapeutiques

Parmi toutes les propriétés qui lui sont attribuées, l'absinthe est particulièrement connue pour ses douleurs d'estomac, elle stimule l'appétit et est également un excellent vermifuge. Son usage médicinal de l'Antiquité au XVIIIe siècle a fait place à une mode excessive d'alcool d'absinthe, au point d'assimiler la plante à l'esprit populaire.

Un certain nombre d'études ont été menées sur *A. absinthium* montrant la diversité des effets pharmacologiques qu'elle possédait, ils sont mentionnés dans le (Tableau 9).

Tableau 9. Propriétés et usages thérapeutiques de *A. absinthium*

| Indication | Partie de la plante | Références |
|--|-----------------------------|--|
| Traitement du paludisme, antidote à l'opium | Parties aériennes | (Ariño, 1999) |
| Anti malaria | Parties aériennes | (Zafab et al., 1990) ; (Ahamad et al., 2019) |
| Antibactérien | Plants entière | (Ramezani et al., 2004) |
| Anthelminthique | Parties aériennes, feuilles | (Tariq et al., 2009) ; (Mravčáková et al., 2020) |
| Antifongique | Feuilles | (Houicher et al., 2015), (Rodríguez-Torres et al., 2019) |
| Anti cancérigène | Feuilles | (Emami et al., 2009) ; (Koyuncu, 2018) |
| Hepatoprotecteur | Parties aériennes | (Gilani & Janbaz, 1995); (Amat et al., 2010); (Moacă et al., 2019) |
| Analgésique, antipyrétique, anti inflammatoire | Feuilles | (Hadi et al., 2014) |
| Problèmes de peau, ulcères | Parties aériennes | (Batiha et al., 2020) |
| Problèmes mentaux, dépression | Feuilles | (Bora & Sharma, 2010) ; (Tobyn et al., 2011) |

Au Paraguay les parties aériennes sont utilisées et la vente sur les marchés s'effectue dans les présentations illustrées (Figure 38)

Figure 38. Présentation de la plante au marché (frais et sec) *A. absinthium*



7.4. *Verbena litoralis* Kunth

7.4.1. Intérêt

La famille de *Verbénacées* comprend 1.035 espèces et 36 genres à distribution pantropicale. On trouve peu d'espèces dans les régions tempérées. Le genre *Verbena* est composé de 250 espèces de plantes herbacées ou semi-arbustives originaires de tous les continents (Rahmatullah et al., 2011).

Plusieurs genres de *Verbénacée* ont été étudiés en raison de leurs propriétés médicinales (Santos et al., 2015), (Pérez Zamora et al., 2018). Il a été démontré qu'il contient des glycosides de caféoyle et d'iridoïde (Umasa & Castro, 1990). *V. litoralis* semble souvent être limitée aux habitats perturbés comme les bords de routes, les berges des cours d'eau.

7.4.2. Synonymes et noms communs

Synonymes : *Verbena affinis*, *Verbena caracasana*, *Verbena carolina* var, *Verbena glabrata* var, *Verbena integrifolia*, *Verbena integrifolia* f. *albiflora*, *Verbena sedula*.

Noms communs : *Verbena cimarrona*, *Verbena montañosa* (Guatemala); *Yerba sagrada* – *Verbena í* (Paraguay) ; *Seashore vervain*, *Brazilian vervain* (US) ; *Curalotodo*, *Hierba de la Ictericia*, *Hierba de la Verbena*, *Hierba Santa*, *Hierba Verbena*, *Verbena de San Juan*, *Verbena Española* (Espagne et Latino Amérique), *Vervain* (France).

7.4.3. Description taxonomique

- Sub- phylum : Angiospermae
- Classe : Dicotyledonae
- Commande : Lamiales
- Famille : Verbenaceae
- Genre : Verveine
- Espèce : *Verbena*

7.4.4. Description morphologique

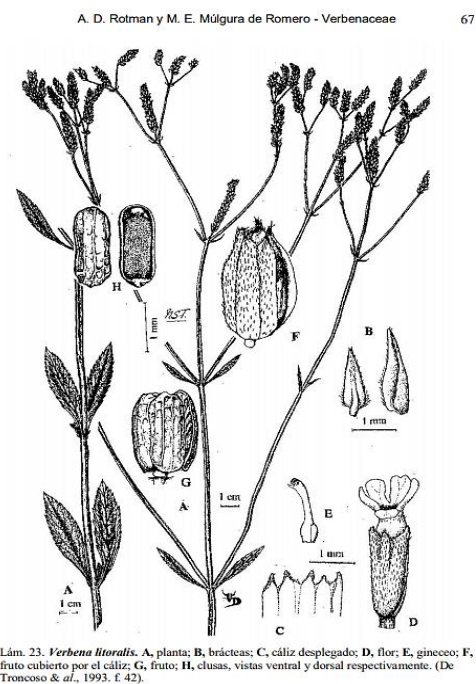
Plante herbacée vivace, parfois ligneuse à la base. Sa taille va jusqu'à 2 m de haut. La tige est dressée ou presque dressée, souvent ramifiée abondamment atteignant 1,2 cm d'épaisseur à la base. Les feuilles sont opposées, sessiles ou à pétioles jusqu'à 1 cm de

long, lancéolées (à base large et apex étroit) à ovales (ovoïdes) ou oblancéolées (inversées lancéolées). L'inflorescence présente épis terminaux, pédonculés, essentiellement disposés en triades proliférantes, souvent une panicule terminale complexe (amas d'amas), épis de 2 à 12 et atteignant 20 cm de long. Les fleurs, ont un calice de 2 à 3 mm de long, à dents minuscules, hispidulum (petits poils raides et un peu longs) ou pubérule (à poils courts); corolle violette, violette ou bleue, parfois blanche. Les fruits généralement divisés en 4 méricarpes cylindriques, d'environ 1,5 mm de long, réticulés (en réseau) uniquement en haut, striés dans la partie restante, brun, blanc-muricate (couvert de plus ou moins cylindrique, court et trempé) côté commissural (ligne d'union) (Rzedowski & Rzedowski, 1923). (Figure 39, 40).

Figure 39. Représentation de *V. litoralis*



Figure 40. Illustration botanique *V. litoralis*



Source : internet

7.4.5. Distribution géographique

V. litoralis, est une espèce de plante phanérogame appartenant à la famille des Verbenaceae. Elle est originaire des Amériques. Elle est présente dans le monde entier en tant qu'espèce introduite et dans certaines régions, il est considéré comme une mauvaise herbe nuisible (Figure 41) (Tropicos, 2020).

Figure 41. Distribution géographique de *Verbena litoralis* Tropicos®



7.4.6. Propriétés et usages thérapeutiques

V. litoralis est couramment utilisé traditionnellement en Amérique centrale et du Sud contre la diarrhée, la fièvre, les troubles gastro-intestinaux et certaines maladies sexuellement transmissibles. Un tableau récapitulatif est présenté ci-dessous, avec les études effectués sur cette plante médicinale et les potentielles activités biologiques (Tableau 10).

Tableau 10. Propriétés et usages thérapeutiques de *V. litoralis*

| Indication | Partie de la plante | Références |
|--|---------------------|--|
| Hépatoprotecteur | Fleurs, feuilles | (Vestena et al., 2019) |
| Problèmes d'estomac, de foie et de vésicule biliaire, et comme anti-inflammatoire et anthelminthique | Parties aériennes | (Ayman et al., 2012); (R. de Lima et al., 2020) |
| Potentiel antibactérien, anti-inflammatoires, anti-nociceptives, anti céphalique, analgésique. | Parties aériennes | (Castro & Herrera, 1990) ; (Braga et al., 2012) |
| Activité neuronale | Parties aériennes | (Li et al., 2003) |
| Grippe, la toux, douleurs corporelles | Branches | (Hilgert, 2001); (Carrillo-Rosario & Moreno, 2006); (Scarpa, 2004) |

Au Paraguay la vente sur les marchés s'effectue dans cette présentation (Figure 42)

Figure 42. Présentation de la plante au marché (frais et sec). *V. litoralis*

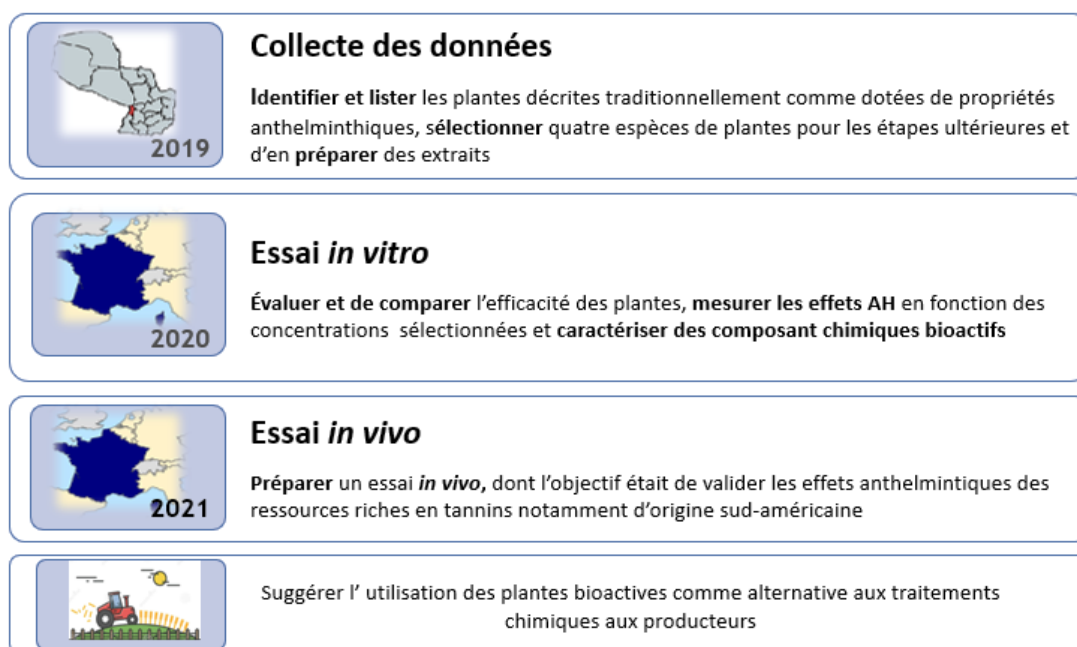


II. OBJECTIFS

L'objectif général de notre thèse est de « Déterminer le potentiel anthelminthique de 4 plantes, utilisées en médecine traditionnelle (MT) et d'évaluer leurs effets vis-à-vis des nématodes gastro-intestinaux (NGI) chez les petits ruminants, à partir d'études *in vitro et in vivo*, afin de suggérer ces plantes comme alternative aux traitements chimiques ».

Pour la réalisation de ce projet général, nous avons défini **trois étapes** à réaliser au cours des 3 ans de travail, chaque étape correspondant à des objectifs spécifiques pour le développement du projet (Figure43).

Figure 43. Stratégie de travail et objectifs de la thèse



Dans une première étape réalisée au Paraguay, les informations ont été collectées grâce à une enquête ethno-vétérinaire et ethnobotanique afin de faire un point sur la situation de la médecine traditionnelle et l'utilisation des connaissances des plantes par la population étudiée (**Article1**). Les objectifs spécifiques de cette étape étaient d'**identifier et lister** les plantes décrites traditionnellement comme dotées de propriétés anthelminthiques, ensuite de **sélectionner** quatre espèces de plantes pour les étapes ultérieures et d'en **préparer** des extraits pour les tester *in vitro*.

Le deuxième objectif de notre travail était d'**évaluer et de comparer** l'efficacité des plantes sélectionnées sur deux espèces de nématodes gastrointestinaux (NGI)

hautement prévalente chez les petits ruminants. Pour ce faire, deux tests *in vitro* (test d'inhibition de dégagement larvaire (LEIA) ; test d'inhibition d'éclosion des œuf (EHA)) ont été appliqués (**Article 2,3**). Ces 2 essais portent sur 2 stades, étapes clef du cycle biologique des vers et vise à **mesurer les effets AH** en fonction des concentrations (*i.e.* hypothèse de réponse de type dose – réponse). Un autre but de cette deuxième étape était de préciser le rôle des polyphénols dans leurs effets AH en utilisant un inhibiteur chimique. Enfin, en complément de cette question, **une caractérisation des composant chimiques bioactifs a été engagée** en utilisant une approche de phytochimie quantitative, fondée sur des méthodes de chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (*i.e.* UPHLC-MS).

Un troisième objectif était de confirmer par la mise en place **d'un essai *in vivo*** au Paraguay pour valider chez des ovins les effets anthelminthiques d'une ou deux plantes prometteuses sélectionnées à la suite des 2 étapes précédentes et notamment des résultats *in vitro* obtenus.

Toutefois, les conditions sanitaires mondiales particulières rencontrées dès mars 2020 (pandémie de Covid19) ont conduit à promouvoir en lieu et place un essai *in vivo* visant à évaluer les effets AH de ressources riches en tannins condensés notamment d'origine tropicale. Pour se faire, une première étape a consisté en une revue bibliographique (**Article 4**) de diverses ressources exploitables afin de préparer l'essai *in vivo* réalisé sur des brebis (**Article 5**).

III. TRAVAIL PERSONNEL

Ce mémoire de thèse a été préparé et organisé sous forme d'articles publiés, soumis ou prêts pour soumission, regroupés par chapitre. Chacun d'entre eux correspond à des objectifs et des approches méthodologiques spécifiques.

- Le chapitre I correspond à l'enquête ethno botanique/vétérinaire présentée dans le seul **Article 1**.
- Le chapitre II correspond aux résultats obtenus par les tests *in vitro* LEIA/EHA, associés à des études de phytochimie. (**Article 2 et 3**)
- Le chapitre III correspond aux résultats d'une recherche bibliographique sur les différents Co Produits Agro Industriels riches en tannins proposées en médecine vétérinaire comme alternative dans la maîtrise des NGI (**Article 4**) afin de préparer la mise en place d'un essai *in vivo*. **Article 5**.

CHAPITRE I

Identifier des plantes d'intérêt = Collecte des données

Chapitre I

Dans ce chapitre, nous parlerons du processus de collecte de données qui comprenait la préparation des enquêtes et des questionnaires, la sélection des plantes retenues pour la suite de la thèse.

L'objectif principal de l'enquête était d'identifier une liste de plantes à propriétés anthelminthiques d'usage traditionnel. Cette enquête a également été développée pour connaître la situation de l'utilisation des plantes en médecine humaine (ethno médecine), et vétérinaire (ethno vétérinaire).

Au cours de cette enquête, des informations ont été obtenues pour répondre aux 3 questions essentielles : *Qui utilise les plantes ? Comment les plantes sont-elles utilisées ? et, comment se transmet ce savoir traditionnel ?*

Grâce à cette enquête, nous avons obtenu des informations telles que : I) Données démographiques générales ; II) Mode d'utilisation des plantes dans la vie quotidienne ; III) Origine et transmission des connaissances empiriques ou acquises sur les anthelmintiques.

Les résultats de cette première étape ont conduit à la sélection de quatre plantes médicinales pour la suite de notre travail de thèse : *Kyllinga odorata* Valh. (Cyperaceae), *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Verbena litoralis* Kunth. (Verbénacées).

Les données obtenues ont été présentées dans trois conférences et webinaires sur les thèmes de la médecine traditionnelle. Des résultats ethnobotaniques détaillés ont été publiés dans l'**Article 1**. (Cf. Liste de communication et publications page :280).

Résumé 1

Les infections par les nématodes gastro-intestinaux NGI communément appelés *vers*, affectent à la fois les humains et les animaux. En médecine vétérinaire, la recherche d'alternatives pour contrôler le NGI est désormais considérée comme une priorité en raison des résistances croissantes aux anthelminthiques commerciaux de synthèse. L'utilisation de plantes bioactives et de leur métabolites secondaires associés est l'une de ces alternatives. Cette étude visait à collecter des données sur l'utilisation des plantes médicinales (PM) chez l'homme et pour les animaux pratiques et à lister les espèces végétales ayant des propriétés anthelminthiques potentielles afin in fine, de sélectionner certaines espèces pour des études ultérieures selon trois critères (*disponibilité, originalité et popularité*). Une enquête transversale a été menée auprès d'un total de 384 participants, à l'aide d'entretiens en face à face semi-structurés et d'une liste libre. Pour évaluer les données quantitatives des PM, deux indices ethnobotaniques ont été calculés, l'indice de salience (SI) et la valeur d'usage (UV). L'importance et l'utilisation des PM dans la population étudiée étaient élevées, 98% (372/383) des participants ont déclaré utiliser des PM et 86% (321/384) ont mentionné la connaissance des PM utilisées contre les NGI. La transmission des connaissances traditionnelles ne se limite pas au milieu familial, il comprit aussi la vie sociale, l'éducation. Seize espèces végétales ont été répertoriées appartenant à 10 familles botaniques. Les Asteraceae étaient la famille botanique la plus populaire. Six espèces de plantes ont été indiquées pour un usage vétérinaire contre les vers (*C. ambrosioides, A. australe, A. absinthium, T. parthenium, M. spicata and A. indica*). Les quatre PM sélectionnés pour des études complémentaires étaient : *Kyllinga odorata* Valh. (Cyperaceae), *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Verbena litoralis* Kunth. (Verbenacées). L'évaluation de ces PM sur la base de tests *in vitro* et *in vivo* est prévue pour valider les savoirs traditionnels locaux de ces 4 plantes.

Mots-clés : Anthelminthique, Lutte alternative, Ethno-vétérinaire, Ethnomédecine, Savoirs locaux, Plantes médicinales, Paraguay.

ARTICLE 1

Ethnobotanical and ethnoveterinary survey in Paraguay: Medicinal plants used for deworming.

Keywords: Anthelmintic, Alternative control, Ethnoveterinary, Ethnomedicine, Local knowledge, Medicinal plants, Paraguay.

Authors: Meza Ocampos, G^{1,2*} & Torres Ñumbay M¹ & Alvarenga, N³ & Pereira Sühsner C,⁴ & Delmás, G⁵, Hoste, H^{1*}

¹ Mixed Unit of Research, Host Pathogens Interactions 1225, National Institute for Agriculture, Food and Environment, National Veterinary School of Toulouse (UMR IHAP 1225 INRAE , ENVT). 23 Chemin des Capelles. PO BOX 31076 Toulouse, France. mezagriselda@hotmail.com; griselda.mezaocampos@envt.fr; herve.hoste@envt.fr (*)

² Department of Animal Physiology. Faculty of Veterinary Sciences, National University of Asuncion (FCV. UNA) Campus Universitario Km 9,5 PO BOX 1061 San Lorenzo, Paraguay. mtorres@vet.una.py

³ Department of Phytochemistry. Faculty of Chemical Sciences, National University of Asuncion (FCQ, UNA). Campus Universitario Km 9,5. PO BOX 1055 San Lorenzo, Paraguay. nelson@qui.una.py

⁴ Laboratory of Analysis and Plant Resources. Department of Biology. Faculty of Exact and Natural Sciences, National University of Asuncion (FACEN, UNA). Campus Universitario Km 9,5. PO BOX 1039 San Lorenzo, Paraguay. claudinha_7@hotmail.com

⁵ Department of Botany. Direction of Research. Faculty of Chemical Sciences, National University of Asuncion (FCQ, UNA). Campus Universitario Km 9,5. PO BOX 1061 San Lorenzo, Paraguay. gloriadelmas@hotmail.com

Abstract

Gastrointestinal nematodes (GIN) infections, commonly called “worms”, affect both humans and animals. In veterinary medicine, the search for alternatives to control GIN is now considered a priority because of increasing resistances to commercial anthelmintics. The use of bioactive plants and related secondary metabolites is one of these alternatives. This study aimed to collect data on the use of medicinal plants (MPs) for humans and veterinary practices and at listing plant species with potential anthelmintic properties to select some plant species for further studies following three criteria (availability, originality and popularity). A cross sectional survey was conducted with a total of 384 participants, using semi-structured face-to-face interviews and a free list. To evaluate quantitative data of MPs, two ethnobotanical indices were calculated, the Saliency index (SI) and the Use Value (UV). The importance and use of MPs in the population of study was high, 98% (372/383) of participants reported use MPs, and 86% (321/384) mentioned knowledge of MPs used against GIN. The transmission of knowledge is not limited to the family environment. Sixteen plant species were listed belonging to 10 botanical families. The Asteraceae was the most popular botanical family. Six plant species were indicated for veterinary use. The four MPs selected for further studies were, namely: *Kyllinga odorata* Valh. (Cyperaceae), *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Verbena litoralis* Kunth. (Verbenaceae). Evaluation of those MPs based on *in vitro* and *in vivo* assays are planned to validate the traditional local knowledge of these 4 plants.

Introduction

Gastrointestinal nematodes (GIN) infections, commonly called “worms”, affect both humans and animals. In the tropics, GIN are considered part of neglected diseases in humans, although they affect at least two billion people in the world¹. In veterinary medicine, GIN are considered by FAO as main parasitological infections, because being responsible for major economic losses, clinical signs and even death in a range of livestock species. In small ruminants, the mentioned losses are estimated in millions of dollars per year mainly due to reduced low production².

The term medicinal plant (MPs) refers to a variety of plant species that have medicinal properties³. MPs have been used for centuries in healthcare worldwide. In the past centuries, humans depended on plant resources to treat infections, parasitic diseases, to heal wounds and injuries. Also, the same plant species were often applied to farm animals⁴. Therefore, the therapeutic uses of plants and their related active metabolites in human and veterinary medicine show a remarkable similarity. Some studies noted that at least 60% of the plants used in traditional veterinary practices are also used in traditional human medicine^{5 6}.

After the 1960s, this traditional use of plants was put aside because of the discovery of synthetic drugs which shift the fight against GIN⁷. However, over decades, this control practice relying exclusively on synthetic AH molecules has become insufficient due to the emergence of anthelmintic resistances (AR) and the increasing concerns over chemical residues on the environment and food chain⁸. Therefore, there is a clear need to explore more sustainable approach in order to limit the widespread development and diffusion of AR in worm population. A combination of conventional (*i.e.* synthetic drugs) and alternative treatments (*i.e.* new substances with anthelmintic properties) has been suggested, under the concept of “integrated control”⁹.

Alternative treatments relying on plants have been identified as a valuable option and has been increasingly explored since the early 2000’s. Part of this approach is based on ethnobotanical knowledge and ethnoveterinary practices and could provide information on bioactive plant species of interest for further studies to suggest sustainable treatment of GIN in small ruminants based on local uses and availability of resources. Despite remarkable growth of ethnobiology and ethnopharmacology

research in the last decades^{10 11}, ethnoveterinary studies still are scarce, especially in Paraguay. Additionally, a lack of ethnobotanical studies in urban areas and in non-traditional populations was noted worldwide^{12 13 14}.

Therefore, this combined ethnobotanical and ethnoveterinary survey was carried out in 2019 in Paraguay. The first objective was to collect data on the use of medicinal plants (MPs) in humans and veterinary practices and at listing plant species with anthelmintic properties in a predominant urban environment. The data collected was aimed **i)** to identify the mode of use of these plants and also **ii)** to characterize the population (by gender and age), who has this traditional knowledge.

The final objective was to select a few plant species based on three pre – established criteria (availability, originality and popularity) for further *in vitro* and *in vivo* studies to validate their claimed anti-GIN activity.

Materials and Methods

Study area

The study area, namely Central Department region in Paraguay is divided into 19 districts. It is located between the parallels 25° 07 'and 26° 00' and the meridians 57° 45 'and 57° 10'. Central Department comprises two types of area: (a) urban area (82%) and (b) rural area (18%).

Study population and sample

Population data was based on results of the census of population¹⁵. The total of population was composed of 2.082.023 inhabitants of the Central Department. The target population was calculated based on the main criteria ≥ 30 years old, this includes 982.399 inhabitants. The age being considered to take into account the economical active population and the average age of population. The sample size was 384 participants, being determined following the formula showed in *Data analysis* [Eq1]. To minimize selection bias and increase precision, interviews were conducted covering a fair quota (ratio) per district.

Survey methodology

The research participants were informed of the subject, and verbal consents were requested in accordance with the Declaration of Helsinki¹⁶. The form did not include personal, recognisable, sensitive and/or confidential data.

The cross-sectional survey was conducted from January to July 2019 with 384 participants, using a semi – structured face to face interviews and free list. Forms were written in Spanish and translated in Guarani (*i.e.* both official languages in Paraguay).

A combination of snowballing and intentional sampling methods based on main selection criteria (*i.e.* individuals ≥ 30 years old) was used to select participants, who were randomly approached in different places (*i.e.* squares, fields, streets, markets, houses).

In a first stage, a pilot survey form was carried out with 10 inhabitants randomly chosen, respecting the parity of men / women. Afterwards, the final survey form was adjusted and validated in order to know the theoretical and practical knowledge on MPs of the studied population.

Survey form and questions

The survey form included simple questions, multiple choice and free list. The form was divided into four sections: **A.** Demographic data (*i.e.*, age, gender) to describe the study population; **B.** Uses of MPs in daily life (*i.e.*, purpose of use, frequency of use, mode of consumption and source) to evaluate use of MPs in the studied population. **C.** MPs used against GIN (*i.e.*, common names, plant part used as medicine, uses in human or veterinary practices, internal or external use) to list MPs mentioned with anti-GIN activity. **D.** Ethnobotanical knowledge (EK): Origin and transmission of knowledge, to evaluate EK the number of participants able to mention name of plants (*i.e.*, theoretical knowledge), preparation and part of plant used in traditional medicine (*i.e.*, practical knowledge) were noted and compared by age and gender. The relation between Practical and Theoretical knowledge was calculated following the formula showed in *Data analysis* [Eq4]. Additionally, to know the origin and how is the transmission of EK in the study population, the participants were asked: *Where do you learn about MPs?* those answers were analyzed by range of age and gender.

Data collection and MPs quoted against GIN "worms"

The present study focused to identify the MPs used by the local population to treat helminthiasis. Parasitic diseases caused by helminths are grouped under the term "worms" and the treatments used are indicated as "against worms".

Information obtained from the participants was treated according to the principle of triangulation: **a)** repetition (at least two people had referred to an identical medicinal use of the same plant in two different interviews); **b)** direct observation (using the blind test as a criterion: a sample of each cited plant was purchased to verify whether they matched the common name and the plant marketed as such); and **c)** informal confirmation by random vendors and collectors^{17 18}.

Afterwards, the MPs cited by the participants were summarized in a list. The common names from each mentioned MPs was associated with the botanical family, English and scientific name, using the Plant List database (<http://www.theplantlist.org>) and Tropicos database (<http://www.tropicos.com>). All cited MPs were evaluated in Availability, Originality and Popularity and these three variables were considered as criterion for selection of MPs for further studies.

The availability was considered as the main criterion of selection. Since as alternatives to control GIN, these plant species must be easy to find and cultivate by local people. To evaluate availability a number was assigned to each plant on the basis of different characteristics of each plant species (Na). The Na for evaluating the accessibility of MPs ranged from 1 to 3. The number assigned to the most accessible was 3, while 1 for the inaccessible ones. Where note 3 "*accessible*": perennial and easy to find; note 2 "*intermediaries*": difficult to find according to season; note 1 is "*inaccessible*": hard to find or cultivate.

The number of scientific publications was considered as Originality criteria. MPs with fewer scientific studies in the area of interest were privileged. The cited plant species were subjected to bibliographic research using the Web of Science (WSC) all data base from 1980 to 2019. The keywords used were the Latin and the English name of each plant species, in combination with the following keywords: "anthelmintic *"; "gastrointestinal nematode*"; and "small ruminants".

The popularity was considered a criterion to validate local knowledge. Each cited plant species was assessed on the basis of the number of times it was cited by the participants.

Additionally, to evaluate uses and cultural importance of MPs in the study population, two ethnobotanical indexes, namely: Use Value (UV) and Smith Saliency Index (SI) were calculated for each plant species, using formula showed in *Data analysis* [Eq2] and [Eq3] respectively.

Procedures of selection of MPs for furthers studies

Among the list of MPs cited by the population and the relation between those three pre-established criteria, four MPs were selected for furthers studies to evaluate and validate their claimed anti GIN – activity in *in vitro* and *in vivo* studies.

Plant collection and identification

Following the recommendations on ethnopharmacological surveys, only those species of interest were collected¹⁹. The international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights were followed.

The selected plant species were collected and taxonomically identified. Botanical specimens were deposited at the Herbarium of the National University of Asunción (UNA), San Lorenzo – Paraguay. Faculty of Chemical Sciences (FCQ) and Faculty of Exact

and Natural Sciences (FACEN). A voucher number was assigned for the selected plant species *Kyllinga odorata* Valh (Cyperaceae) (FACEN4719); *Cassia occidentalis* L (Fabaceae) G01 (FCQ); *Artemisia absinthium* L (Asteraceae) (FACEN4720); *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae) G02 (FCQ).

Data analyses

Descriptive methods were used to summarize data using Tables and Figures with Microsoft EXCEL®

The sample size formula was determined by the Equation 1 (Eq1)

$$\text{(Eq1)} \quad n = \frac{N \times Z\alpha^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z\alpha^2 \times p \times q}$$

Where, n = sample size, N = population size; Z = confidence level (95% = 1.96); p = expected frequency (50%); q = (1 - p), d = maximum accepted error (5%)^{20 21}.

The Use Value (UV) was calculated using formula in Equation 2 (Eq2). UV determine the relative importance (*i.e.* preference) of a particular species with respect to others species.

$$\text{(Eq2)} \quad UV = \frac{\sum U}{N}$$

Where, U=number of use reports for a given species, N=total number of informants

High values of UV indicates that the plant is very important, while the low values approaching zero suggest a relatively less importance with respect to other species^{22 23}.

The Smith Saliency Index (SI) was calculated using formula of Equation 3 (Eq3). SI determined the importance of a particular species in a free list. The aim is to combine the average position and citation frequency of each item to determine the relative importance of the mentioned plants for the study population.

$$\text{(Eq3)} \quad SI = \frac{((L - R + 1)/L)}{N}$$

Where L is the size list of the species, R is the range of occurrence of the ethno species and N is the total number of informants²⁴. The SI was normalized to vary between 1 and 0. The SI of the most prominent ideal term has the number 1 and when the term is not mentioned at all, the value is 0. Negative items were also noted.

The relation between practical and theoretical knowledge was calculated by comparing the number of answers of those participants who could are able to explain the parts and the mode of use (*i.e.*, practical knowledge) between whose are able to cite

the plants names (*i.e.*, theoretical knowledge), and. Those answers were presented by percentage (%) **(Eq4)**.

$$\text{(Eq4) Relation (\%)} = \frac{PK}{PT} \times 100$$

Where, PK represent the number of participants with practical knowledge, and PT represent the number of participants with theoretical knowledge.

Results

Demographic data - The studied population (N= 384)

A total of 384 participants (127 men and 257 women) were interviewed and grouped into four age ranges: **1)** 30 and 40 years old, with 45.8% of participants; **2)** 41-50 years old, with 22.1% participants; **3)** 51-60 years old, with 20.8% participants; **4)** > 61-year-old, with 11.2% participants. Demographic data by gender were summarized in (Fig.1).

Use of medicinal plants in daily life (N= 372)

Ninety-six percent (372/384) of the participants recognized using MPs in daily life. The results were summarized in (Table 1).

The most cited purposes of use were refreshing 77% (*e.g.*, taste, flavors, habits) and preventive 42% (*e.g.*, for health maintenance or illness preventions).

Regarding mode of consumption, Tereré (*i.e.* maceration of herbs in cold water) was mentioned by 72% of participants and Mate by 20% (*i.e.* decoction of herbs).

Concerning the frequency of use 46% of participants admitted using a least one MPs every day. About the source of MPs for consumption, 79% mentioned the market as the main source.

Medicinal plants used against GIN (N= 321)

Eighty-six percent of participants mentioned know the MPs used against GIN (321/372) among them, 68.54% were women and 31.46% men (Fig.2).

The list of plants cited by participants was summarized in (Table 2) and include botanical name, english and common name of each species. Sixteen plant species were listed belonging to 10 botanical families. The most mentioned botanical family was Asteraceae. Fourteen plant species were reported for internal use. The parts of plants most used in traditional medicine were leaves (62.5%). Only six plant species were pointed out for veterinary use, namely *Acanthospermum australe* Loefl. (Asteraceae), *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Tanacetum parthenium* L. Sch. Bip. (Asteraceae), *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) and *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae).

According to number availability (Na), eight plant species were considered “accessible”, six “intermediate”. The “inaccessible” plant species were two:

Aspidosperma quebracho Schltd. (Apocynaceae) and *Commelina nudiflora* L. (Commelinaceae).

From the data base analysis on Webofscience®, the number of studies in some plants exceeds 1000 publications. However, others plant species were considered relatively innovative such as *A. australe* Loefl, *C. nudiflora* L., *Verbena litoralis* Kunth. (Verbenaceae), *Aloysia polystachya* Griseb. Moldenke. (Verbenaceae), with less than 40 scientific publications that report on their anthelmintic activity. The plant species mentioned with anthelmintic properties by the study population and that does not have studies on this claimed activity was *Kyllinga odorata* Valh, (Cyperaceae).

Taking into account the number of citations (n) and the two ethnobotanical indices (SI and UV). The most popular plant species considered with high cultural importance were, namely: *A. indica* A. Juss (270, SI 0.838; UV 0.88), *C. ambrosioides* L. (238, SI 0.735; UV 0.74), *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) (218, SI 0.67; UV 0.68) and *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae) (170, SI 0.517; UV 0.58). The lowest indexes were for *A. polystachya* Griseb Moldenke. (3, SI -0.039 UV 0.01), *C. nudiflora* L. (6, SI -0.028 UV 0.02) and *A. quebracho* Schltd. (10, SI -0.012; UV 0.3) (Table3).

Ethnobotanical knowledge - Origin and transmission - (N= 321)

A total of 321 people were able to cite the names of plants used against GIN (theoretical knowledge), among them, 183 were able to explain the mode of preparation and parts of plants used in traditional medicine (practical knowledge). The difference between practical and theoretical knowledge decreases as the age range increases (Fig.2).

Concerning the transmission of ethnobotanical knowledge by range of age at least 70% of participants > 50-year-old reported to have learned about MPs in the familiar environment, while 72% of participants between 30- to 40-year-old mentioned obtained information about MPs through daily life and not in familiar environment (Fig.3).

Selection of four plant species for furthers studies

Based on the three criteria mentioned of selection the four selected plants were *Kyllinga odorata* Valh. (Cyperaceae), *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) and *Verbena litoralis* Kunth. (Verbenaceae).

Discussion

This survey aimed at providing answers to the following questions: 1. What is the percentage of people who use MPs and their habits in daily life (*e.g.*, purpose, mode de consumption, frequency)? 2. What is the percentage of people who know the properties of used MPs against GIN? 3. Which are the MPs used against GIN in both humans and veterinary practices? 4. How is ethnobotanical knowledge transmitted?

The studied population was comprised by 68% of participants ≤ 50 years old. The participation of female was predominant in all age ranges. However, when the age range increased, a net difference was observed. These distributions of data reflect the general distribution in the population. According to FAO, Paraguay has the youngest population in countries of Latin America and also with the highest percentage of female. In the urban area, the female population has maintained its supremacy steadily since 1950²⁵.

The results of (Table1) showed a high percentage of people using MPs. The use as preventive and refreshing were the most mentioned purposes and the daily use concerned nearly 50 % of participants. Tereré and Mate were cited for more than 80% of total of responses. Due to the use of Yerba mate (*i.e.*, *Ilex paraguariensis*) in Tereré and Mate their potential interactions with MPs should be evaluated. There is a folks belief that natural products has no consequences, but some studies worldwide warned on the possible consequences for health due to short, medium and long term consumption of MPs in daily life ^{26 27}.

Information such as where do people get or buy MPs for consumption, were significantly useful to know the source of information about its properties, uses, and for the conservation of plant species. Since the main source to obtain MPs is the local market, this information perhaps explained why the information between the knowledge on plant species and their uses did not vary much between the participants.

The collection from spontaneous plant species from the natural environment was mentioned by 60 participants of 372. This practice is quite common, but has serious consequences, such as the danger of species disappearance due to its over use and not sustainable management. This situation is especially danger in so-called "trendy" plants.

Results of (Fig.2) showed that more than 68% of participants who cited MPs used as treatment against GIN were women. The relationships between knowledge and gender have been largely studied. In fact, several studies reported women have a deeply

knowledge about MPs than men, probably due to cultural aspects (e.g. household responsibilities, food preparation, childcare) ^{28 29}.

The results of (Table 2) showed those MPs used against GIN cited by the studied population. The Asteraceae was the most popular botanical family, which include 1600 genera and more than 23.000 species. The majority of MPs belonging to this family have potential therapeutic applications ^{30 31 32}.

The mode of preparation most mentioned was infusion. The most used parts in traditional medicine were the leaves. The use of leaves is a eco - friendly approach since allows to avoid the destruction of plant species, reducing the danger of extinction ³³. *A. indica* and *A. australe* were cited for both internal and external use, the rest of plant species in the list were mentioned for internal use.

Six of mentioned MPs are used for both animals and humans in traditional medicine. In particular, their anthelmintic activity was reported for different animal species, such pets and farm animals. However, the use of those mentioned plant species in small ruminants was not reported by the studied population.

The Na of MPs was considered as a main criterion. As mentioned before, the plant species must be easy to find and cultivate. Among the MPs accessible eight were mentioned, namely: *C. ambrosioides* L, *A. absinthium* L, *K. odorata* Valh, *C. occidentalis* L, *Mentha. Piperita* L, *A. indica* A. Juss, *V. litoralis* Kunth and *A. polystachya* Griseb. Moldenke.

The popularity could be due to its effectiveness, to the information on the plant species, or to its availability by locals. We expect a trend between the number of times that the plants were cited in the survey and the number of scientific publications available. However, this relation was not always confirmed, such is the case of *K. odorata* Valh, that, despite being very popular, is not mentioned by any scientific studies as a plant with anthelmintic properties.

The cultural importance of the plants was evaluated with the ethnobotanical indices: Saliency index (SI) and Use Value (UV) in (Table3). Those indexes are important quantitative indicators for evaluated the pharmacological potential of plant species ³⁴. The significantly higher SI values show the importance that the interviewees attribute to each plant³⁵. The first plant species that was mentioned by the interviewed person was considered the most important for him, as preferred in comparison with others.

The plant species with lower indices may be due to the fact that these plants are not cultivated in the area and information on their uses and properties are not well known by the non-specialized population. This situation may be due, to the urban environment, the ease access to veterinary services for the study population and the lack of information on uses of plants on veterinary practices.

The popularity and ethnobotanicals indices are considered pointers of cultural and social importance for plant species with pharmacological interest.

The relation between the age of participants and their practical and theoretical knowledge shows a remarkable difference between ranges of age (Fig.2). Young people are able to cite plant species but, the ability to describe parts of use and mode of preparation was lower if compared to the one of older categories. Some previous studies on the transmission of ethnobotanical knowledge, suggested that most of the ethnobotanical nomenclature (*i.e.* theoretical knowledge) is acquired in adolescence, but practical skills (*i.e.* practical knowledge) are acquired mainly in adulthood ³⁶.

Concerning the transmission of knowledge in urban environment context, the comparison between transmission by range of age, showed contrasting results, probably due to the fact of generation gap (Fig.3). The transmission of knowledge on plants in the past (*i.e.* older generations) probably came from family members and traditions (*i.e.* information passed through generations) but nowadays, comes also from experienced in daily life, school or media (*i.e.* younger participants). According to Hurrell, urban knowledge is influenced by the media, educational programs. Moreover, it co-existing in different groups of people (*i.e.* urban and rural), leading to a more dynamic and complex cycle of transmission of knowledge ³⁷.

Four plants were selected taking into account the three criteria of selection. In particular, the note of availability of plants for the local population, the hypothesis was "*if the plants are easy to find, cultivate and are known to the local population, their incorporation into an alternative control system is more feasible*".

As previously mentioned, those four plant species are abundant in the study area, easy to grow, and low maintenance. As results, *K. odorata* Valh and *V. litoralis* Kunth were selected because of low number of scientific publications, *A. absinthium* L was the only plant species cited in veterinary practices and *C. occidentalis* L was retained because of popularity indexes.

Conclusion

The results presented in this study correspond to the survey directed to the general public with a participatory approach. The importance and use of MPs in the population of study based in consume, use, and knowledge it high.

To build credibility for the use of plants in conventional medicine, the empirical arguments should be converted into evidence-based arguments. The selected plants were cited for their potential anti – GIN activity, evaluation of those activity is planned to validate the traditional local knowledge.

The perspectives for the future are to verify the AH properties of those four selected plant species to examine whether those plant species can represent an alternative control to reduce the use of AH synthetic in veterinary medicine by using local resources.

Acknowledgements

This work was carried out thanks to the financing of the Carlos Antonio López Scholarships, BECAL - Paraguay, Self-managed Call 04.

We would like to thank all participants who took the survey.

Thank to Ing. Celso Cubilla for support the collect of plants, thanks to Lic. Ynes Bazan for statistical assistance and a special thanks to Marta Oliveira for the suggestions during the manuscript preparation.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest associated with this study or its results.

Author contributions

GMO: design the study, writing, data collection, statistics, analysis and references, HH: design the study, writing, critical reading, data analysis, article format and references, MTÑ: design the study, survey process, form, pilot validation, data collection, critical reading, NA: validation, critical reading, CPS and GD: botanical identification of plant species, prepared herbarium samples and critical reading.

All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Engels D & Zhou XN, Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities, *Infect Dis Poverty*, 9 (1) 2020 9.
2. Charlier J, Thamsborg SM, Bartley DJ, Skuce PJ, Kenyon F, et al., Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs, *Transbound Emerg Dis*, 65 2018.
3. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, & Amini-Khoei H, Medicinal plants: Past history and future perspective, *J HerbMed Pharmacol*, 7 (1) 2018 1–7.
4. Corley TAB & Godley A, The veterinary medicine industry in Britain in the twentieth century, *Econ Hist Rev*, 64 (3) 2011.
5. Scarpa GF, Plants employed in traditional veterinary medicine by the crollos of the Northwestern Argentine Chaco, *Darwiniana*, 38 (3–4) 2000 253–265.
6. Martínez GJ & Luján MC, Medicinal plants used for traditional veterinary in the Sierras de Córdoba (Argentina): An ethnobotanical comparison with human medicinal uses, *J Ethnobiol Ethnomed*, 7 2011 7–23.
7. Sissay MM, Asefa A, Uggla A, & Waller PJ, Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy, *Vet Parasitol*, 135 (3–4) 2006 337–346.
8. McKellar QA, Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds, *Vet Parasitol*, 72 (3–4) 1997 413–435.
9. Hoste H & Torres-Acosta JFJ, Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world, *Vet Parasitol*, 180 (1–2) 2011 144–154.
10. Çakılcıoğlu U, An ethnobotanical field study; traditional foods production and medicinal utilization of *Gundelia* l. Species in Tunceli (Turkey), *Indian J Tradit Knowl*, 19 (4) 2020 714–718.
11. Polat R, Cakilcioglu U, & Satil F, Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl - Turkey), *J Ethnopharmacol*, 148 (3) 2013 951–963.
12. Balick MJ, Kronenberg F, Ososki AL, Reiff M, Fugh-Berman A, et al., Medicinal plants used by Latino healers for women's health conditions in New York City, *Econ Bot*, 54 (3) 2000 344–357.
13. Reyes-García V, Vadez V, Huanca T, Leonard W, & Wilkie D, Knowledge and Consumption of Wild Plants: A comparative study in two Tsimane' villages in the Bolivian Amazon, *Ethnobot Res Appl*, 3 2005 201–207.
14. Alqethami A, Hawkins JA, & Teixidor-Toneu I, Medicinal plants used by women in Mecca: Urban, Muslim and gendered knowledge, *J Ethnobiol Ethnomed*, 13 (1) 2017 62.
15. DGEEC, Dirección General de Estadística, Encuestas y Censos, (<https://www.dgeec.gov.py/>), 2002.
16. WMA, WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects – WMA – The World Medical Association, WMA Declar Helsinki – Ethical Princ Med Res Involv Hum Subj, 2018.
17. Benavides MO & Gómez-Restrepo C, Methods in Qualitative Research: Triangulation, *Rev Colomb Psiquiatr*, 34 (1) 2005 118–124.
18. Rodríguez Sabiote C, Pozo Llorente T, & Gutiérrez Pérez J, La triangulación analítica como recurso para la validación de estudios de encuesta recurrentes e

- investigaciones de réplica en Educación Superior, *Reli - Rev Electrónica Investig y Evaluación Educ*, 12 (2) 2014 289–305.
19. TRAMIL, Encuestas TRAMIL, (<http://www.tramil.net/es/content/encuestas-tramil>).
 20. Metcalfe C, *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, *Stat Med*, 20 (2) 2001 324–326.
 21. Herrera M, *Formula para cálculo de la muestra poblaciones finitas*, 2011.
 22. Musa MS, Abdelrasool FE, Elsheikh EA, Ahmed LAMN, Mahmoud ALE, et al., *Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, South-eastern Sudan*, *J Med Plants Res*, 5 (17) 2011 4287–4297.
 23. Thakur S, Tashi N, Singh B, Dutt HC, & Singh B, *Ethnobotanical plants used for gastrointestinal ailments by the inhabitants of Kishtwar Plateau in Northwestern Himalaya, India*, *Indian J Tradit Knowl*, 19 (2) 2020 288–298.
 24. Smith JJ & Borgatti SP, *Saliency Counts And So Does Accuracy: Correcting and Updating a Measure for Free-List-Item Saliency*, *J Linguist Anthropol*, 7 (2) 1997 208–209.
 25. Benavides MCF, *Situación de las mujeres rurales en Paraguay*, 2008.
 26. Genovés JS, Palop Larrea V, Rubio Gomis E, & Martínez-Mir I, *Consumo de hierbas medicinales y medicamentos, Atención primaria*, 28 2001 311–314.
 27. Carballo MA, Cortada CM, & Gadano AB, *Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales medicinal herbs: risks and benefits in their uses*, *Theoria*, 14 (2) 2005 95–108.
 28. Coe FG & Anderson GJ, *Screening of medicinal plants used by the Garífuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds*, *J Ethnopharmacol*, 53 (1) 1996 29–50.
 29. Voeks RA, *Are women reservoirs of traditional plant knowledge? Gender, ethnobotany and globalization in northeast Brazil*, *Singap J Trop Geogr*, 28 (1) 2007 7–20.
 30. Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, et al., *Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts*, *Food Chem*, 161 2014 79–86.
 31. Achika J, Arthur DE, Gerald I, & Adedayo A, *A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family*, *IOSR J Appl Chem*, 7 (8) 2014 01–08.
 32. Kawarty Amama, Behçet L, & Çakılcıoğlu U, *An ethnobotanical survey of medicinal plants in ballakayati (Erbil, north Iraq)*, *Turk J Botany*, 44 (3) 2020 345–357.
 33. Moshi MJ, Otieno DF, & Weisheit A, *Ethnomedicine of the Kagera Region, north western Tanzania. Part 3: plants used in traditional medicine in Kikuku village, Muleba District*, *J Ethnobiol Ethnomed*, 8 (1) 2012 14.
 34. Leitão F, Leitão SG, De Almeida MZ, Cantos J, Coelho T, et al., *Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents*, *J Ethnopharmacol*, 149 (2) 2013 513–521.
 35. Chaves L da S, do Nascimento ALB, & Albuquerque UP, *What matters in free listing? A probabilistic interpretation of the saliency index*, *Acta Bot Brasilica*, 33 (2) 2019 360–369.

36. Reyes-García V, Martí N, McDade T, Tanner S, & Vadez V, Concepts and methods in studies measuring individual ethnobotanical knowledge, *J Ethnobiol*, 27 (2) 2007 182–203.
37. Hurrell JA, Urban Ethnobotany in Argentina: Theoretical advances and methodological strategies, *Ethnobiol Conserv*, 3 (2014) 2014.

Table 1. Use of medicinal plants in daily life (N= 372)

| | Category | % | n |
|-------------------------------|-------------------------|-------|-----|
| Purpose of use | Refreshing recreational | 77.41 | 288 |
| | Medicinal curative | 42.20 | 157 |
| | Medicinal preventive | 49.73 | 185 |
| Mode of consumption | Tereré | 71.8 | 267 |
| | Mate | 20.1 | 74 |
| | Herbal infusion/teas | 17.0 | 65 |
| Frequency of use | Every day/daily | 46.8 | 174 |
| | ≥ 2 times a week | 17.5 | 65 |
| | ≤2 times a week | 35.8 | 133 |
| Source of MPs for consumption | Market | 79.8 | 297 |
| | Natural environment | 16.0 | 60 |
| | Cultivate | 4.0 | 15 |

PS: variables were multiple choice with more than one answer considered into data.

TABLE 2. MEDICINAL PLANT SPECIES USED AGAINST GIN IN CENTRAL DEPARTMENT, PARAGUAY (N= 321)

| Scientific name and Botanical family | English name | Common name | Part (s) of plant used | Mode of use | Use | Na | N° publications | Citation (n) |
|--|----------------------|------------------|------------------------|--------------------------|------------|----|-----------------|--------------|
| Amaranthaceae | | | | | | | | |
| <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. | Wormseed | Ka'are | Leaves, stems | Infusion | H, A, I | 3 | 1337 | 238 |
| Apiaceae | | | | | | | | |
| <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. | Fennel | Hinojo | Seeds | Infusion | H, I | 2 | 484 | 48 |
| Apocynaceae | | | | | | | | |
| <i>Aspidosperma quebracho</i> Schlttd. | White Quebracho | Quebracho blanco | Bark | Decoction | H, I | 1 | 143 | 10 |
| Asteraceae | | | | | | | | |
| <i>Acanthospermum australe</i> Loefl. Kuntze | Paraguayan starbur | Tapekue | Whole plant | Poultice, bath, infusion | H, A, E, I | 2 | 33 | 80 |
| <i>Artemisia absinthium</i> L. | Wormwood | Ajenjo | Leaves, stems | Infusion | H, A, I | 3 | 1634 | 71 |
| <i>Baccharis trimera</i> Less. DC. | Carqueja | Yagua rete ka'a | Leaves, stems | Infusion | H, I | 2 | 206 | 35 |
| <i>Tagetes minuta</i> L. | Mexican marigold | Suico | Leaves, stems | Infusion | H, I | 1 | 332 | 218 |
| <i>Tanacetum parthenium</i> L. Sch. Bip | Feverfew | Altamisa | Leaves | Infusion | H, A, I | 2 | 682 | 16 |
| Commelinaceae | | | | | | | | |
| <i>Commelina nudiflora</i> L. | Creeping Dayflower | Santa Lucia | Whole plant | Infusion | H, I | 1 | 24 | 6 |
| Cyperaceae | | | | | | | | |
| <i>Kyllinga odorata</i> Vahl. | Fragrant spike sedge | Kapi' i Kati | Roots | Decoction | H, I | 3 | 0 | 154 |
| Fabaceae | | | | | | | | |
| <i>Cassia occidentalis</i> L. | Coffee senna | Taperyva hũ | Roots | Decoction | H, I | 3 | 487 | 170 |
| Lamiaceae | | | | | | | | |
| <i>Mentha piperita</i> L. | Pepper mint | Menta'i | Leaves | Infusion | H, I | 3 | 4452 | 83 |
| <i>Mentha spicata</i> L. | Spear mint | Yerba buena | Leaves | Infusion | H, A, I | 2 | 1201 | 77 |
| Meliaceae | | | | | | | | |
| <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. | Neem | Hoja de Paraíso | Leaves, stems | Bath, infusion | H, A, E | 3 | 5935 | 270 |
| Verbenaceae | | | | | | | | |
| <i>Verbena litoralis</i> Kunth. | Vervain | Verbena'i | Leaves, flowers, stems | Infusion | H, I | 3 | 16 | 42 |
| <i>Aloysia polystachya</i> Griseb. Moldenke | Oysterleaf | Burrito | Leaves | Infusion | H, I | 3 | 39 | 3 |

The plants summarized in **Table 2**, included Botanical families; English and Local common names, plant part used, if use in human or animal medicine, internal or external use, (H: Human, A: Animal I: Internal use, E: External use), Na: note accessibility, Number of Publication in Web of science (WSC) *scientific name* **OR** *english name* **AND** "keywords", citation.

Table 3. Ethnobotanical indices: smith salience (SI) and use value (UV)

| Rank | Scientific name | SI | UV |
|-------------|---|-----------|-----------|
| 1 | <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. | 0.838 | 0.84 |
| 2 | <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. | 0.735 | 0.74 |
| 3 | <i>Tagetes minuta</i> L. | 0.670 | 0.68 |
| 4 | <i>Cassia occidentalis</i> L. | 0.517 | 0.53 |
| 5 | <i>Kyllinga odorata</i> Vahl. | 0.464 | 0.48 |
| 6 | <i>Mentha piperita</i> L. | 0.240 | 0.26 |
| 7 | <i>Acanthospermum australe</i> Loefl Kuntze | 0.227 | 0.25 |
| 8 | <i>Mentha spicata</i> L. | 0.215 | 0.24 |
| 9 | <i>Artemisia absinthium</i> L. | 0.193 | 0.22 |
| 10 | <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. | 0.118 | 0.15 |
| 11 | <i>Verbena litoralis</i> Kunth. | 0.097 | 0.13 |
| 12 | <i>Baccharis trimera</i> Less. DC. | 0.072 | 0.11 |
| 13 | <i>Tanacetum parthenium</i> L Sch. Bip | 0.010 | 0.05 |
| 14 | <i>Aspidosperma quebracho</i> Schltd. | 0.012 | 0.03 |
| 15 | <i>Commelina nudiflora</i> L. | -0.028 | 0.02 |
| 16 | <i>Aloysia polystachya</i> Griseb. Moldenke | -0.039 | 0.01 |

Fig. 1. Demographic data of total participants by range of age and gender (n=384).

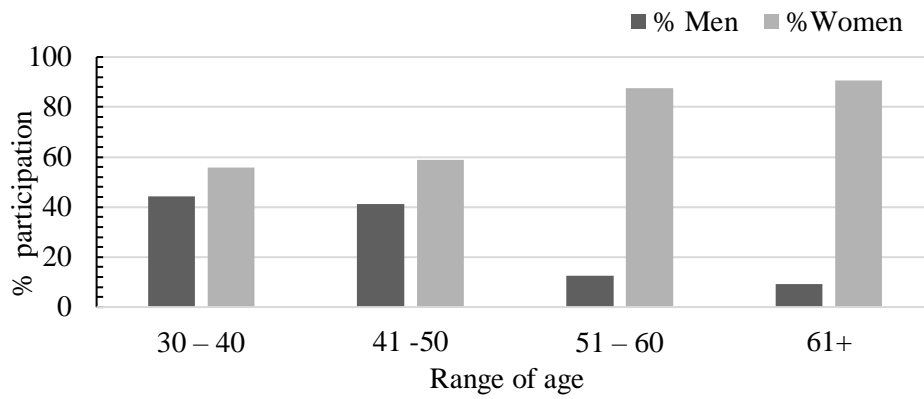


Fig. 2. Relation into practical and theoretical knowledge according to the range of age by gender (n= 321)

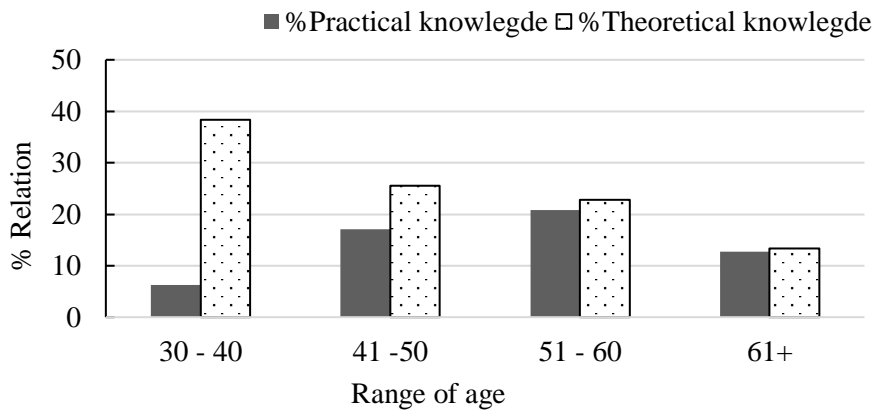
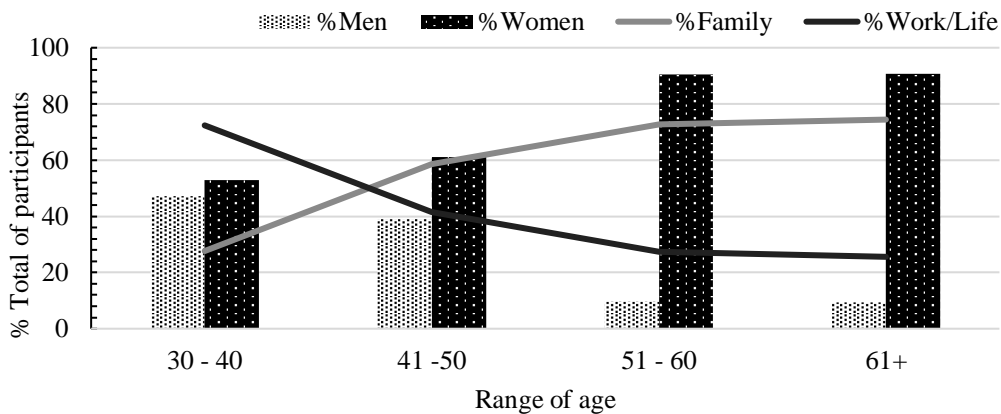


Fig. 3. Ethnobotanical knowledge and transmission of knowledge by range of age and by gender (n=321)



CHAPITRE II

*Valider les informations =
Essais in vitro et analyses phytochimiques*

Chapitre II

Ce chapitre correspond aux 3 sous-objectifs décrits en pag99 :

- I. L'évaluation des plantes sélectionnées sur deux espèces majeures de nématodes gastrointestinaux (NGI) *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis* respectivement parasites de l'abomasum et de l'intestin grêle des ovins et caprins, sur la base de 2 test *in vitro* appliqués sur 2 stades clefs du cycle biologique des NGI : les œufs et les larves 3 infestantes (L3)
- II. La détermination du rôle des polyphénols dans leurs effets AH en utilisant un inhibiteur chimique des polyphénols, le PVPP ;
- III. A la suite de l'étape 2 et l'application du PVPP, une première étape bio guidée de caractérisation des molécules phytochimiques bioactives en utilisant une approche fondée sur des méthodes de chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (*i.e.* UPHLCMS).

Les informations présentées dans ce chapitre correspondent à celles collectées entre 2019 et 2020. Elles sont incluses dans les **Article 2,3**.

Résumé 2

Depuis des décennies, le contrôle des nématodes gastro-intestinaux NGI chez les petits ruminants repose sur l'utilisation systématique d'anthelminthiques de synthèse (AH). Cependant, leur efficacité a progressivement diminué en raison de l'augmentation et de la diffusion des résistances aux anthelminthiques. La recherche d'alternatives aux AH efficaces, durables et respectueuses de l'environnement est aujourd'hui une priorité. La recherche sur les espèces végétales et leurs métabolites secondaires est l'une des options les plus explorées. Dans cette étude, quatre plantes : *Kyllinga odorata* Valh., *Cassia occidentalis* L., *Artemisia absinthium* L. et *Verbena litoralis* Kunth., ont été sélectionnées sur la base de critères ethnobotaniques. Les objectifs de notre étude étaient i) d'évaluer l'activité anthelminthique d'extraits de ces plantes médicinales en utilisant le test de dégagement larvaire sur deux modèles d'espèces de NGI, à savoir *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis* ; ii) d'explorer le rôle des tanins et des polyphénols dans l'activité AH en comparant les effets sur le dégagement larvaire avec ou sans Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et ; iii) de caractériser la composition phytochimique des plantes les plus actives en utilisant la chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-HRMS). Les concentrations efficaces 50 % (EC50) ont été calculées pour les 4 plantes et les deux espèces de NGI à l'aide d'une analyse Probit. Les résultats des extraits avec et sans PVPP ont été comparés par UHPLC-HRMS pour identifier les molécules actives. Les valeurs EC50 les plus faibles (extraits les plus actifs) ont été trouvées pour *C. occidentalis* ; suivi par *A. absinthium* et *K. odorata*. *V. litoralis* n'a pas présenté d'activité AH sur les larves. Les résultats comparés sur les extraits avec ou sans PVPP suggèrent que les polyphénols ne sont pas seuls responsables des effets. Après UHPLC-HRMS, la présence de coumarines, de composés de flavanol a été notée. D'autres études sont prévues pour confirmer l'intérêt de certaines plantes dans la maîtrise des NGI.

ARTICLE 2

***In vitro* evaluation of the anthelmintic activity of four medicinal plants against gastrointestinal nematodes and their chemical composition**

Meza Ocampos Griselda^{1,2*}, Torres Ñumbay Miguel², Haddad Mohamed³, Messi Ambassa Lin Marcellin^{3,4,5}, Alvarenga Nelson⁶, Hoste Hervé^{1*}

1. Mixed Unit of Research, Host Pathogens Interactions 1225, National Institute for Agriculture, Food and Environment, National Veterinary School of Toulouse (UMR IHAP 1225 INRAE, ENVT). 23 Chemin des Capelles. PO BOX 31076. Toulouse, France.
2. Department of Animal Physiology. Faculty of Veterinary Sciences, National University of Asuncion (FCV, UNA) Campus Universitario Km 9,5 PO BOX 1061. San Lorenzo, Paraguay.
3. UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France
4. Laboratory of Pharmacochimistry of Natural Substances, Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé, PO 812 Yaoundé, Cameroon.
5. Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), BP 2067 Yaoundé, Cameroon.
6. Department of Phytochemistry. Faculty of Chemical Sciences, National University of Asuncion (FCQ, UNA). Campus Universitario Km 9,5. PO BOX 1055 San Lorenzo, Paraguay.

***Corresponding authors:** Hervé Hoste and Griselda Meza

23, Chemin de Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

Tel +33 5 61 19 38 75,

E-mail: herve.hoste@envt.fr ; mezagriselda@hotmail.com

Abstract

For decades, the control of gastrointestinal nematodes (GIN) in small ruminants has been based on the systematic use of synthetic anthelmintics. However, its efficacy gradually decreased due to the increase and spread of anthelmintic resistance (AR). Today, the search for alternatives to control GINs that are effective, sustainable, and eco-friendly is a priority. Research on plant species and their secondary metabolites is one of the most explored options. In this study, four plants namely *Kyllinga odorata* Valh., *Cassia occidentalis* L., *Artemisia absinthium* L. and *Verbena litoralis* Kunth, were selected based on ethnobotanical criteria by a survey in Paraguay. The objectives of our study were **i)** to evaluate the anthelmintic (AH) activity of extracts of medicinal plants by using Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA) on two GIN species, *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* **ii)** to explore the potential role of polyphenols in the AH activity by comparing the effects on LEIA with and without Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and **iii)** to characterize the phytochemical composition of the most active plants by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The half-maximal effective concentration (EC₅₀) was calculated for both species using Probit analysis. Chemical profiles before and after PVPP treatment were compared by UHPLC-HRMS analysis. *C. occidentalis* exhibited the highest EC₅₀ values; followed by *A. absinthium* and *K. odorata*. *V. litoralis* did not exhibit any AH activity on larvae. The results in LEIA with PVPP have suggested that polyphenols are not solely responsible for AH activity. However, after analysis the identification of 9 phenolic compounds were uncovered. Further bioassay-guided fractionation will be necessary to confirm the AH activities of those compounds, including synergistic potential between tannins, coumarin, and flavonoids found in those extracts.

Keywords: Ethnoveterinary, *H. contortus*, Secondary metabolites, Small ruminants, *T. colubriformis*, Infective larva.

1. Introduction

Gastrointestinal nematodes (GINs) represent the main prevalent parasitic diseases affecting small ruminants in outdoor breeding systems. The GINs are considered responsible for economic losses in livestock by affecting their health, welfare, and productivity. The cost attributed to GIN infections in the European ruminant livestock industry is estimated at € 1.8 billion a year (Rose Vineer et al., 2020). The most prevalent GINs species affecting small ruminants are *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, and *Teladorsagia spp.* (Suarez et al., 2017).

Since the end of the 1950s, the control of GINs has mainly relied on the regular administration of synthetic anthelmintics (AHs) (Kaplan, 2020). The intensive and quasi-exclusive use of AHs to control GINs has led to the appearance, development, and diffusion of anthelmintic resistance (AR) (Kaplan, 2004). AR is not limited to certain specific chemical families. Indeed, multiple resistances to several AHs families are increasingly reported (Sissay et al., 2006, Kaplan and Vidyashankar, 2012, Charlier et al., 2018). Another issue associated with the use of AHs in outdoors ruminants breeding is related to their residues. Their potential presence in products of animal origin has led to strict rules in regulation to protect consumers (Geary et al., 2012). Additionally, the presence of residues of some AH families in different environmental compartments, including soil, surface, and groundwater are considered (Cooper et al., 2012), (Mooney et al. 2021).

To control GIN, multiples options, based on several alternative approaches have been suggested (Torres-Acosta and Hoste, 2008). The use of bioactive plants with AH properties is one of these options. Interest in this approach has increased in recent decades, using biological tests to validate (AH) activity in extracts of plants under *in vivo* and *in vitro* conditions (Jackson and Hoste, 2010). A bulk of results obtained with bioactive plants have been attributed to the presence of polyphenols such as tannins and derivates (Githiori et al., 2006, Oliveira et al., 2011, Hogade et al., 2014, André et al., 2018).

Several *in vitro* methods have been developed to evaluate the AH properties of plants extracts using *in vitro* studies targeting the stage of larvae (*e.g.* mobility: larval migration inhibition assay(LMIA), mortality: larval mortality test (LMIT),

exsheathed: larval exsheathment Inhibition assay (LEIA) (Jackson and Hoste, 2010). LEIA is considered a sensitive test for screening purposes (Alonso-Díaz et al., 2011) and has been selected in this study. This test has been developed to measure the ability of plant extracts to delay or inhibit an artificially induced exsheathment process in infective larvae (Bahuaud et al., 2006).

For *in vitro* evaluation purposes, lyophilized methanolic extracts of *Kyllinga odorata* (Cyperaceae); *Cassia occidentalis* (Fabaceae); *Artemisia absinthium* (Asteraceae), and *Verbena litoralis* (Verbenaceae) were used. These plant species were selected as a result of an ethnobotanical survey carried out in 2019 and will be mentioned further as medicinal plants (MP) (Meza Ocampos et al., 2020).

This study aimed **i)** to evaluate the AH activity of four extracts of MP by using LEIA on two models of GIN species, one abomasal namely *Haemonchus contortus*, and one intestinal species, *Trichostrongylus colubriformis*; **ii)** to explore the role of polyphenols in the AH activity by comparing the effects on LEIA with and without Polyvinylpyrrolidone (PVPP) and **iii)** to characterize the phytochemical composition of the most active plants by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS).

2. Materials and Methods

2.1. Plant materials

The plant species were collected in Central Department, Paraguay, and were identified by botanists from the Faculty of Exact and Natural Sciences (FACEN) and the Faculty of Chemistry (FCQ) belonging to the National University of Asuncion (UNA). A voucher number was assigned respectively to *Kyllinga odorata* Valh (Cyperaceae) (FACEN4719), *Artemisia absinthium* L (Asteraceae) (FACEN4720), *Cassia occidentalis* L (Fabaceae) (FCQ G01), *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae) (FCQ G02).

The collected plant material was thoroughly washed with water, divided into leaves, stems, and roots. Only the part mentioned as medicinally were used on assays, as followed: *K. odorata* (rhizome), *C. occidentalis* (roots), *A. absinthium* (aerial parts), and *V. litoralis* (aerial parts). The parts of plants were dried at room temperature for about 15 days and grounded into powder using a laboratory grinder.

2.2. Preparation of plant extracts

Two hundred grams of grounded powder of each plant species were mixed and soaked for twelve hours in proportion 1:4 (w/v) in organic solvent (in the first step with hexanes and then, in a second step with methanol) The product was sonicated in a water bath for 30 minutes (three times with 15 minutes between each cycle). The product was filtered on Whatman paper N°1. The solvent was evaporated on a rotary evaporator at 40 °C to obtain the crude extracts. The resulting crude extracts were labeled, weighted, and then stored in an amber vial at 4°C until used. Finally, the crude methanolic extracts were lyophilized and used on trials.

2.3. UHPLC-HRMS profiling

Metabolite profiles of lyophilized extracts of *K. odorata*, *C. occidentalis*, *A. absinthium* (1 mg/ml) were acquired using a UHPLC-DAD-CAD-LTQ Orbitrap XL instrument (Thermo Fisher Scientific) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The UHPLC system consisted of an Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific) equipped with an Acquity BEH C18 column (50×2.1 mm i.d., 1.7 µm; Waters). The mobile phase was composed of solvent A (0.1% formic acid-water) and solvent B (0.1% formic acid-acetonitrile) with a gradient elution (0-0.5 min, 95% A; 0.5- 12 min, 95-5% A; 12-15 min, 5% A; 15-15.5 min, 5-95% A; 15.5-19 min, 95% A). The flow rate of the mobile phase was 0.45 ml/min.

The injection volume was 4 μL and the column temperature was maintained at 40°C. ESI was applied in negative ion (NI) and positive ion (PI) mode under the following conditions: capillary voltage at 3.0 and 4.2 kV for NI and PI, respectively, and the capillary temperature at 300°C. The UV detection was performed by a diode array detector from 210 to 400 nm.

Full mass spectra were recorded between 100 and 1500 Da. Collision-induced dissociation mass spectra were obtained using the following parameters: 35% normalized collision energy, isolation width 2 Da, and activation Q 0.250. External mass calibration was accomplished before starting the experiment (Chassagne et al., 2018).

2.4. Peak Analysis

The UHPLC/HR-MS raw data were processed with MS-DIAL version 2.70. Automatic feature detection was performed between 0.3 and 13 min for mass signal extraction between 100 and 1500 Da in positive and negative mode. MS1 and MS2 tolerance were set to 0.01 and 0.4 Da, respectively, in centroid mode. The resulting peak list was then exported to Microsoft Excel. Peaks were retained in the sample if appeared in at least 4 out of 6 replicates (Triastuti et al., 2021).

2.5. Significant Features Identification

The molecular formula and structure of significant features were calculated with MS-FINDER-RIKEN PRiMe version 2.28. A score was attributed to each putative compound considering bond dissociation energies, mass accuracies, fragment linkages, and nine hydrogen rearrangement rules (Tsugawa et al., 2016). Various parameters were used to reduce the number of potential candidates, such as the element selection exclusively including C, H, O; mass tolerance fixed to 10 ppm and the isotopic ratio tolerance set to 20%. All components were searched against the home database using SMILES input from the Dictionary of Natural product (CRC Press v26: 2), SciFinder, and also a built-in database in MS-FINDER system: Natural Products Database (UNPD), KNApSACK, CheBI (Chemical Entities of Biological Interest), STOFF, T3DB (the toxin and toxin target database), NANPDB (Northern African Natural Products Database), DrugBank, FooDB, and PlantCyc. The compound molecular formula was retained for identified features with a score above 7 and only the structures with a score above 5 were retained for thorough analysis.

2.6. Parasitological procedures

The third-stage larvae (L3) of either *H. contortus* or *T. colubriformis* were obtained from feces of donor goats kept indoors and infected mono specifically with AH susceptible strains. The third stage infective larvae L3 were recovered from the feces using the Baerman technique and stored at 4°C in a horizontally vented stoppered flask at a concentration of 800-1200 larvae/ml. The age of the larvae used in the *in vitro*, assay averaged about 2 months.

2.7. *In vitro* assay

2.7.1. Larval Exsheathment Inhibition Assay - LEIA

The extracts were evaluated using the *in vitro* Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA) (Bahuaud et al., 2006). The assay was applied successively on *H. contortus* and *T. colubriformis*. The L3 larvae (L3 ~ 1000/ml) were incubated in decreasing concentrations of extracts. Based on a stock solution at 2400µg/ml in phosphate-buffered saline (PBS) BioMerieux (Lyon, France), a range of concentrations were obtained at 1200, 600, 300, 150, and 75 µg/ml in 15 ml tubes for 3 h at 22 °C with regular shaking (Jackson and Hoste, 2010). They were compared to negative control (PBS). After incubation, the larvae were washed and centrifuged with PBS, three times. Then, the process of L3 exsheathment was artificially induced by contact with a solution Milton[®] (Inibsa laboratories, Barcelona, Spain) diluted at 1:550. The assay was performed in four replicates. The percentages of larval exsheathment process were monitored at times 0, 20, 40, and 60 min (T0, T20, T40, T60) by observation under a microscope (40x) after stopping the exsheathment process. Finally, the numbers of ensheathed and exsheathed larvae were recorded and the percentages were calculated as undermentioned in the data section **(2.8.1)**.

Furthermore, to evaluate the specificity of the inhibitory effects in the exsheathment process of infective L3, each GIN species was contacted with epigallocatechin gallate (EGCG) (Sigma-Aldrich (Gillingham, UK) at 150 µg / ml diluted in PBS.

2.7.2. Preparation of extracts with PVPP

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Sigma–Aldrich (Gillingham, U.K.) is a chemical compound with inhibitory properties against polyphenols including tannins. For each

plant species, the extracts at 1200 µg/ ml were mixed in a ratio of 1:50 with PVPP. They were incubated for two hours under regular shaking and then centrifuged at 3000 rpm for 3 min at 21 ° C. After centrifugation, the supernatants were collected and used for another LEIA as described in **2.5.1** including negative control (PBS), non-depleted extracts at 1200 µg/ ml and the depleted extracts. The results were compared with and without PVPP (Bahuaud et al., 2006 ; (Chan-Pérez et al., 2016).

2.8. Analysis of data

Data was organized, edited, and analyzed using XLSTAT®.

2.8.1. Calculation of percentage

The percentage of ensheathed larvae (%Ensh) considered as an inhibitory effect, was determined by **Formula1** $\text{Ensh} = (\text{L3 ensh}) / \text{L3t} \times 100$, and the percentage of exsheathed larvae (%Exsh) was determined by the **Formula2**. $\text{Exsh} = 100 - \text{L3ensh} / \text{L3t} \times 100$. *Where:* L3t = total number of larvae (ensh + exsh); L3ensh = number of ensheathed larvae; L3exsh = number of exsheathed larvae.

The mean of each extract of MP was calculated and the results were expressed as mean ± standard deviation (SD) based on the 4 replicates at time 60 minutes (T60) (Jackson and Hoste, 2010).

2.8.2. Statistical analyses

% Ensh was analyzed with ANOVA using the Tukey HSD multiple comparison test. Data were considered significant if the p-value was less than 0.05 ($p < 0.05$). To determine the effective concentration required to inhibit 50% of larval exsheathment (EC50) with the respective 95% confidence intervals (95% IC), the results at T60 were analyzed using the PoloPlus 1.0 software (LeOra Software, 2002). The PBS control (Dose: 0) and a natural margin of error (2%) were taken into account in the model. The differences between the EC50 were determined by comparison to the respective 95% IC. A result was considered significant when no overlap is observed between the 95% confidence limits of the EC50 values (Jeske et al., 2009), (Roditakis et al., 2005).

Results of %Ensh with and without PVPP were analyzed using Mann–Whitney U-test, differences were considered significant ($p < 0.05$).

2.9. Ethical considerations

The international, national, and institutional rules concerning biodiversity rights were followed for the collection of plant species. The *in vitro* study was carried out in compliance with the national animal welfare regulations. The facilities hosting the met French ethical and welfare rules (agreement C 31 555 27 of August 19, 2010).

3. Results

3.1. Evaluation of the AH activity using LEIA

3.1.1. Inhibitory effect of exsheathment process (%Ensh)

The results were presented as a mean of %Ensh per extract and by concentration on the two GIN species (**Fig.1**). In the negative control, 100% of larvae were exsheathed at T60 minutes in both species.

K. odorata, *C. occidentalis*, and *A. absinthium* have revealed AH activity in both species. *V. littoralis* did not show AH activity on *H. contortus* and AH activity has not been significant even at the maximum dose on *T. colubriformis*.

[Fig.1]

The use of EGCG showed that 100% of larvae were ensheathed on *H. contortus* and 85% were ensheathed on *T. colubriformis* at time 60 minutes.

3.1.2. Calculation of effective concentration (EC50)

The results of EC50 for each extract in both species were presented in (**Table1**). The most active plants in order of activity were: *C. occidentalis*; *A. absinthium*, and *K. odorata*.

[Table1]

3.2. Evaluation of the potential role of polyphenols in the AH activity

3.2.1. The mean of % Ensh with and without the addition of PVPP on *K. odorata*, *C. occidentalis*, *A. absinthium* at 1200 µg/ml were presented in (**Fig.2**). The addition of PVPP induced a decrease in the AH activity, especially in *C. occidentalis*.

[Fig.2]

3.2.2. Metabolite profiling of the two *K. Odorata* Valh; *C. occidentalis* and *A. absinthium* samples without PVPP and with PVPP metabolite profiling was acquired in positive and negative ionization mode (**Fig. 3, 4, 5**). From these two samples, the qualitative analysis by LC-HRMS allowed to identify putatively 9 compounds found in either or both samples, through HRMS and MS/MS fragmentation patterns using MS-finder and DNP database. Nine compounds were found. In *K. Odorata* 2, *A. absinthium* 1 and 6 in *C. occidentalis* in both samples. The MS-Finder dereplication method allowed to annotate these major peaks. These results are summarized in **Table 2**.

[Fig.3,4,5]

3.2.3. Putative identified features ($m/z \times RT$ pairs) using HRMS and MS/MS fragmentation patterns using MzMine, MS-finder, and DNP database are presented in (Table 2) with a focus on the peaks that have been impacted by the PVPP treatment.

[Table2]

4. Discussion

In this study, the AH activity found in three methanolic extracts of plant species used in traditional medicine was promising. Given the plethora of *in vitro* AH evaluation studies of plant extracts that currently exist using similar protocols, the search for originality becomes a gap in phytochemical and biological investigations. However, it is logical and necessary to continue generating data on conceivable alternatives for the control of GIN in small ruminants established in local resources.

In the present *in vitro* trial, the methanolic extracts of medicinal plants *K. odorata*, *C. occidentalis*, and *A. absinthium* revealed a dose-effect according to concentration and exhibited good results in both GIN species. Regarding the specificity of the AH activity between species, a better response was noted on *T. colubriformis*.

Disclosing results on **Fig 1 and Table 1**. *K. odorata* has shown an inhibitory effect of 73% on *H. contortus* and 90% on *T. colubriformis* at 1200 μ g/ml ($p < 0.05$), and similar efficacy in both species with an EC₅₀ (<650 μ g / ml). *K. odorata* belonging to the Cyperaceae family, in base on ethnobotanical studies, multiple biological properties are attributed to this plant, including anthelmintics (González et al., 2009), (Lima Bezerra et al., 2019), (Meza-Ocampos et al., 2020). This plant species is considered a novelty in this field since data on its use as an anthelmintic is scarce and there are no data available to compare te results *in vitro* in the search of AH activity against GIN in small ruminants. The potential AH activity could be due to the chemical composition. Tucker et al., (2006) mentioned that the composition of the essential oil of this plant contains 0.3% terpenes and sesquiterpenes, citric and malic acids, resins, flavones, triterpenoids, tannins. Therefore, flavones and tannins would be responsible for the diuretic, antispasmodic, anti-diarrheal, and astringent activity attributed to *K. odorata* (Lima Bezerra et al., 2019). Following results **Fig. 1 and Table 1**, the values of *C. occidentalis* extract have presented the most efficient results, in both species (99% and EC₅₀ 250.42 μ g/ml, on *H. contortus*, and 98%, EC₅₀ 41.80 μ g/ml on *T. colubriformis* ($p < 0.05$). The roots of this plant are known for the treatment of helminths in livestock including GIN from small ruminants, poultry, and also in the treatment of gastric disorders in humans (Kateregga et al., 2014), (Nsereko et al., 2019), (Calderón et al., 2006). The AH activity of *C. occidentalis* was evaluated on the larva of *H. contortus* using a larval development assay with strong inhibition effects (>86%, 96.36%) (Suleiman et al., 2014), (Eguale et al., 2011),

respectively. *C. occidentalis* belonging to the Fabaceae family contains as main phytochemicals: saponins, flavonoids, terpenes, sterols, alkaloids, anthraquinones, and tannins (Yadav et al., 2010), (Kateregga et al., 2014). The AH activity of *C. occidentalis* is linked to the chemical composition of its family, which has been highly studied for its anthelmintic properties (Oliveira Santos et al., 2019). The inhibitory effect of extract of *A. absinthium* presented a strong activity (>90%) in both species of GINs at 1200 µg/ml ($p < 0.05$). The EC₅₀ values were >700 µg/ml on *H. contortus* and 277 µg/ml on *T. colubriformis* (**Table 1**). *A. absinthium* belongs to the Asteraceae family, is a medicinal plant and its aerial parts are used in traditional medicine worldwide. Multiple biological activities such as deworming, insecticide, antispasmodic and antiseptic were attributed to this plant (Szopa et al., 2020), (Soria et al., 2020). The AH activity of extracts of *A. absinthium* against GINs using *in vitro* studies in larvae was evaluated using other tests (e.g., the larval motility test) Tariq et al. (2009) and Váradyová et al., (2018) have shown a better *in vitro* larvicidal activity inhibition of ethanolic and methanolic extract compared to aqueous extracts against *H. contortus*. The phytochemical composition of *A. absinthium* reported phenolic acids and flavonoids in higher concentrations which may also suggest an AH activity (Mravčáková et al., 2020).

The *V. litoralis* extract did not show AH activity in *H. contortus* and only 20.52% inhibition was observed in *T. colubriformis* ($p > 0.05$) (**Fig 1**). Additionally, EC₅₀ results were not possible due to lack of activity. Therefore, *V. litoralis* was excluded from the chemical analysis. *V. litoralis* belongs to the Verbenaceae family is used in folk medicine for diarrhea, gastrointestinal disorders, and fevers. Also, its potential AH activity was mentioned on ethnobotanical surveys. The *V. litoralis* extracts contain as main components flavonoids, cardioactives, anthracenes, hemolytic saponins, catechin tannins (Castro and Herrera, 1990), (de Lima et al., 2020).

The presented results in **Fig 1 and Table 1**, could be explained by the pharmacokinetics of the bioactive compounds responsible for the AH activity such as polyphenols, tannins (Hoste et al., 2015).

Condensed tannin (CT) are polymers of flavan-3-ol units with a wide range of structural variations depending on the monomeric units and the degree of polymerization. The effects on larval exsheathment were generally more significant with prodelphinidin monomers (gallocatechin, epigallocatechin) than with procyanidin

monomers (catechin, epicatechin) and with flavan-3-ol gallates compared to flavan-3-ols (Brunet and Hoste, 2006). To verify specificity for CT, the two GIN species in this study were compared using the polyphenol EGCG as control of effect with CT (100% *H. contortus* and 85% *T. colubriformis*). The action of CT in the larval exsheathment process was reported as variable according to the species of nematode which might be related to the protein composition of sheaths, or the binding of the enzymes secreted by worms (Kahn and Diaz-Hernandez, 1999; Min et al., 2003; Molan et al., 2003; Hoste et al., 2006).

As mentioned before, a higher susceptibility of *T. colubriformis* in comparison to *H. contortus* was observed with the four methanolic extracts tested. These results are consistent with those of Brunet et al.,(2006), where they indicated that the effects on larval exsheathment process were generally more pronounced on the intestinal larvae compared to the abomasal ones.

In this research, the second objective was to explore the role of polyphenols in the AH activity present in these extracts of medicinal plants. To identify if those effects are a consequence of the rich content of polyphenols, especially tannins and condensed tannins, following the standard protocols using polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Chan-Pérez et al., 2017), (Mengistu et al., 2017), (Manolaraki et al., 2010). The PVPP is an inexpensive and excellent absorbent of polyphenols (Doner et al., 1993) that can be used to adsorb these secondary metabolites from plants to study their influence on biological activity, particularly the AH activity.

The results of another set of LEIA at 1200 µg/ml exhibited a reduction in AH activity after the addition of PVPP (**Fig 2**). The remnant of AH activity suggests that polyphenols are not the only ones responsible for this AH activity. In an attempt to elucidate the possible metabolites involved, we have performed a comparative analysis of the samples before and after treatment with PVPP. From these two samples, the qualitative analysis by LC-HRMS allowed to identify putatively 9 compounds. These results are summarized in **Table 2**.

Inhibitory effects with *K. odorata* were 89% and 86% without PVPP and 52%, 59% with PVPP on *H. contortus* and *T. colubriformis*, respectively (**Fig 2**). Those results showed a very slight difference between species. The two chemical compounds identified have been characterized as coumarin compounds: Luvangetin and 7-

ethoxycoumarin (**Fig3**). The AH activity of coumarins compound (Cc) was mentioned against *Dactylogyrus intermedius* (Liu et al., 2016) and on free life stages of *C. punctata*. Additionally, those authors mentioned that Cc is a suitable candidate as a marker for anthelmintic-like activity in bioactive forages (Escareño-Díaz et al., 2019). Concerning the role of polyphenols on *C. occidentalis*, the decrease in the AH activity after the addition of PVPP on (**Fig 2**) has been considered significant ($p < 0.05$) in both species. The compounds characterized were flavonoids, coumestans, flavonols, flavones (**Table2**). Analysis of two profiles of *C. occidentalis* extract profiles shows that PVPP complexed several molecules (**Fig4**) allowed us to annotate the following compounds: aromadendrene or DHK dihydrokämpferol; kampféride; 3-O-methyl quercetin; apigenin. These compounds were evaluated on the *C. elegans* looking for anthelmintic activity relating to their chemical structure (Yoon et al., 2006). Derivatives of flavanone become interesting in the search for new molecules with AH activity, recently a flavanone with antitrypanosomal action has been isolated, and tested against two helminths *Trichinella spiralis* and *Caenorhabditis elegans*, showing various degrees of biological activity (Siheri et al., 2019). The compounds in the positive-ion mode correspond to the group of flavonoids and coumestans: Isokaempferide, 3-methoxyapigenin is a natural flavonoid compound; Coumesterol is a phytoestrogène. Coumesterol inhibited the motility of *P. scribneri* at 5–25 µg/ml (Rich et al., 1977). Although the remaining compounds may have contributed to AH activity, the main effects were canceled. Further studies on this species are required to fully understand its bioactive compounds and related anthelmintic properties. *A. absinthium* profiles (positive-ion mode) (**Fig5**) allowed us to detect one important pic that has been complexed by PVPP. The results corresponded to natural products: artemetin. The mentioned compound is an f and previously was isolated from *A. annua*. Plants of the genus *Artemisia* are a rich source of bioactive sesquiterpene lactones and have a long history of parasite control (Hashimi et al., 2019). This compound flavonoid artemetin was also isolated and evaluated against adult *Schistosoma mansoni* worms in 2016 by (De Almeida et al., 2016).

After analysis, the remaining compounds were identified as polyphenols (Table2). Phenolic compounds including condensed tannins and flavonoids possess important AH activities (Molan et al., 2003) and the synergistic effects of a combination of condensed tannins and flavonoids were demonstrated by (Klongsiriwet et al., 2015).

It is thought that PVPP can interact with polyphenols not only via **H** bonds between their **CO-N** linkages and phenol groups (Pierpoint, 2004) but also by forming complexes with polyphenol aglycones (Laborde et al., 2006). Therefore, PVPP can complex tannins and some other compounds like flavonoids. Verza et al. (2008) demonstrated that after the addition of 150.0 and 300.0 mg of PVPP to *Psidium guajava* extract, all flavonoids and polyphenolics were bound to PVPP to a large extent, with a noteworthy exception of gallic acid. They showed that PVPP was able to bind the test polyphenolics as catechin, tannic acid, pyrogallol, and, to a minor extent, gallic acid and demonstrated that there was evidence of a lack of specificity when some of the compounds were mixed with rutin (flavonoid).

As a consequence of this study, some questions arise for future studies, the quantity was insufficient to absorb them? did a saturation occur? Regarding results on chemical profiles, there could also exist an antagonism between compounds, that once complexed by PVPP is or are capable of expressing their activity. More research on the use of PVPP and a more complete chemical composition review of the extracts are planned.

5. Conclusion

Medicinal plants, in particular species with high disponibility and easy access, may represent an alternative to control GINs and could be a reservoir of anthelmintic compounds. The findings of the present study will surely contribute to the field of plant anthelmintics and could contribute to affirming these previous *in vitro* results on *C. occidentalis* and *A. absinthium* by adding information on AH effects on infected larvae (L3). Concerning *K. odorata* and *V. litoralis*, there is no available data to compare the studied results looking for AH activity against the GIN of small ruminants.

K. odorata, *C. occidentalis* and *A. absinthium* could represent a promising option as a source to create allelochemicals or new marketable anthelmintics for affordable and sustainable control of parasitic infections. On other hand, *V. litoralis* has no significant inhibiting action in the larval exsheatment process, but more studies, have been planned on different stages of the life cycle of GINs and to deny out or justify its use as medicinal plants against worms.

6. Acknowledgements

We thank Unit UMR 1225 INRAE / ENVT for their valuable help and contribution to the development of this work. Thanks to the Team INMD, especially to SETHA Ketavong, for technical support. Thanks to the Department of Botany of the Faculty of Chemical Sciences FCQ and Faculty of Sciences Naturals and Exacts FACEN, from UNA for their collaboration in the taxonomic identification. A special thanks to UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Université de Toulouse for the collaboration to freeze-dry our crude extracts for *in-vitro* assays.

7. Formating of funding sources

This work was supported by the National program of postgraduate scholarships abroad to strengthen research, innovation, and education Becas Carlos Antonio Lopez (BECAL04).

8. Statement of interest

All authors mentioned that there are no known conflicts of interest.

9. Authors contribution:

All authors contributed to the conception, data acquisition, statistical analysis, and interpretation of this study. All authors approved the final version of the manuscript.

10. Availability of data and material

All data is contained on paper. Additional data will be provided by the corresponding author upon reasonable request.

11. References

- Alonso-Díaz, M., Torres-Acosta, J., Sandoval-Castro, C., Hoste, H., 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.052>
- André, W.P.P., Ribeiro, W.L.C., De Oliveira, L.M.B., Macedo, I.T.F., Rondon, F.C.M.E., Bevilaqua, C.M.L., 2018. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Sci. Vet.* 46. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81804>
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132. <https://doi.org/10.1017/S0031182005009509>
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf0610007>
- Calderón, Á.I., Vázquez, Y., Solís, P.N., Caballero-George, C., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Correa, M., Gupta, M.P., 2006. Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. *Pharm. Biol.* 44. <https://doi.org/10.1080/13880200600592285>
- Castro, O., Herrera, E., 1990. Potencial Biológico y Químico de *Verbena Littorallis*, Una Planta Medicinal Usada en Costa Rica como Agente Antidiarreico. *Quim. Nova* 13, 310–311.
- Chan-Pérez, J., Torres-Acosta, J., Sandoval-Castro, C., Castañeda-Ramírez, G., Hoste, H., Vilarem, G., Mathieu, C., 2017. Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae. *Vet. Parasitol.* 240. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.023>
- Chan-Pérez, J.I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G.S., Vilarem, G., Mathieu, C., 2016. *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Vet. Parasitol.* 217, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.001>
- Charlier, J., Thamsborg, S.M., Bartley, D.J., Skuce, P.J., Kenyon, F., Geurden, T., Hoste, H., Williams, A.R., Sotiraki, S., Höglund, J., Chartier, C., Geldhof, P., van Dijk, J., Rinaldi, L., Morgan, E.R., von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2018. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 65. <https://doi.org/10.1111/tbed.12707>
- Chassagne, F., Haddad, M., Amiel, A., Phakeovilay, C., Manithip, C., Bourdy, G., Deharo, E., Marti, G., 2018. A metabolomic approach to identify anti-hepatocarcinogenic compounds from plants used traditionally in the treatment of liver diseases. *Fitoterapia* 127, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.021>
- Cooper, K.M., Whelan, M., Kennedy, D.G., Trigueros, G., Cannavan, A., Boon, P.E., Wapperom, D., Danaher, M., 2012. Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk*

- Assess. 29, 746–760. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.653696>
- De Almeida, L.M.S., Carvalho, L.S.A. De, Gazolla, M.C., Silva Pinto, P.L., Silva, M.P.N. Da, De Moraes, J., Da Silva Filho, A.A., 2016. Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2016, 9. <https://doi.org/10.1155/2016/9521349>
- de Lima, R., Brondani, J.C., Dornelles, R.C., Lhamas, C.L., Faccin, H., Silva, C.V., Dalmora, S.L., Manfron, M.P., 2020. Anti-inflammatory activity and identification of the *Verbena litoralis* kunth crude extract constituents. Brazilian J. Pharm. Sci. 56, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S2175-97902019000417419>
- Doner, L.W., Bécard, G., Irwin, P.L., 1993. Binding of Flavonoids by Polyvinylpolypyrrolidone. J. Agric. Food Chem. 41, 753–757.
- Egualé, T., Tadesse, D., Giday, M., 2011. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. J. Ethnopharmacol. 137. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.063>
- Escareño-Díaz, S., Alonso-Díaz, M.A., Mendoza de Gives, P., Castillo-Gallegos, E., von Son-de Fernex, E., 2019. Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. Vet. Parasitol. 274. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.003>
- Geary, T.G., Hosking, B.C., Skuce, P.J., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Pomroy, W., Vercruyse, J., 2012. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. Vet. Parasitol. 190, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.004>
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. Vet. Parasitol. 139. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>
- González, Yenny; Mercado, María; Arrua, Rosa; Ponessa, G., 2009. Morphoanatomy and ethnobotany of rhizome, stem and scape of “Kapi’i Kati” *Kyllinga odorata* (Cyperaceae) and its substituents in and around Asuncion del Paraguay. Lillioa 46, 58–67.
- Hashimi, A., Siraj, M.B., Ahmed, Y., Siddiqui, A., Jahangir, U., 2019. One for All - *Artemisia absinthium* (Afsanteen) “ A Potent Unani Drug .” Tang [Humanitas Med. 9, 1–9. <https://doi.org/10.5667/tang.2019.0020>
- Hogade, M.G., Jalalpure, S.S., Bhinge, S.D., Kuthar, S., Kosgi, S.S., 2014. *In vitro* anthelmintic activity of bark of *Azadirachta indica* against *Ascardi galli* and *Eudrilus eugeniae*. J. Nat. Remedies 14. <https://doi.org/10.18311/jnr/2014/88>
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol. 22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.004>
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. Vet. Parasitol. 212, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.026>
- Jackson, F., Hoste, H., 2010. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes, in: *In Vitro*

- Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3297-3_3
- Jeske, D.R., Xu, H.K., Blessinger, T., Jensen, P., Trumble, J., 2009. Testing for the equality of EC50 values in the presence of unequal slopes with application to toxicity of selenium types. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 14. <https://doi.org/10.1198/jabes.2009.07088>
- Kahn, L.P., Diaz-Hernandez, A., 1999. Tannins with anthelmintic properties, in: *Tannins in Livestock and Human Nutrition*.
- Kaplan, R.M., 2020. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001>
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends Parasitol.* 20. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>
- Kateregga, J., Nabayunga, M., Vudriko, P., Ndukui, J., 2014. Anthelmintic activity of *Cassia occidentalis* L. methanolic leaf extract on *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinarum* and its acute toxicity. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* 3, 114. <https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp20140213>
- Klongsiriwet, C., Mueller-Harvey, I., Quijada, J., Hoste, H., Williams, A., Williamson, E., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.001>
- Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D., Monti, J.P., 2006. PVPP-polyphenol complexes: A molecular approach. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4383–4389. <https://doi.org/10.1021/jf060427a>
- LeOra Software, 2002. Polo Plus. Probit and Logit Analyses.
- Lima Bezerra, J.J., Gomes do Nascimento, T., Umeko Kamiya, R., Paula, do N.P., Muniz de Medeiros, P., Silva, A.S. da, Nascimento de Mendonça, C.S., 2019. Phytochemical screening, chromatographic profile and evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of three species of the Cyperaceae Juss. Family. *J. Med. Plants Res.* 13, 312–320. <https://doi.org/10.5897/jmpr2019.6796>
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685–696. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991399>
- Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J.P., Hendriks, W.H., Pellikaan, W.F., 2017. The *in vitro* anthelmintic properties of browse plant species against *Haemonchus contortus* is determined by the polyphenol content and composition. *Vet. Parasitol.* 237. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.020>
- Meza-Ocampos G., Torres - Ñumbay M., Alvarenga N., Pereira Sühsner C., H.H., 2020. Traditional medicine in Paraguay: A cross-sectional ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of the gastro-intestinal nematodes (GIN) in humans and animals, in: *Webinar on Traditional Medicine 2020*. Osaka, Japan.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A

- review. Anim. Feed Sci. Technol. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. Int. J. Parasitol. 33. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00207-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00207-8)
- Mooney, D., Richards, K.G., Danaher, M., Grant, J., Gill, L., Mellander, P.E., Coxon, C.E., 2021. An analysis of the spatio-temporal occurrence of anthelmintic veterinary drug residues in groundwater. Sci. Total Environ. 769, 144804. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144804>
- Mravčáková, D., Komáromyová, M., Babják, M., Dolinská, M.U., Königová, A., Petrič, D., Čobanová, K., Ślusarczyk, S., Cieslak, A., Várady, M., Váradyová, Z., 2020. Anthelmintic activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and mallow (*Malva sylvestris* L.) against *Haemonchus contortus* in sheep. Animals 10, 219. <https://doi.org/10.3390/ani10020219>
- Nsereko, G., Emudong, P., Omujal, J., Acai, J., Kungu, J.M., Kabi, F., Mugerwa, S., Bugeza, J., 2019. Comparison of the efficacy of crude methanolic extracts of *Cassia occidentalis* and *Euphorbia hirta* with levamisole-HCL against gastrointestinal nematodes of economic importance to goat production in Uganda. Trop. Anim. Health Prod. 51, 2269–2278. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01939-6>
- Oliveira, L.M.B. de, Bevilaqua, C.M.L., Macedo, I.T.F., Morais, S.M. de, Monteiro, M.V.B., Campello, C.C., Ribeiro, W.L.C., Batista, E.K.F., 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 20. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000200011>
- Oliveira Santos, F., Ponce Morais Cerqueira, A., Branco, A., José Moreira Batatinha, M., Borges Botura, M., 2019. Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: A review. Parasitology. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000672>
- Pierpoint, W.S., 2004. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. Methods Mol. Biol. 244, 65–74. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-X:65>
- Rich, J.R., Keen, N.T., Thomason, I.J., 1977. Association of coumestans with tee hypersensitivity of *Lima bean* roots to *Pratylenchus scribneri*. Physiol. Plant Pathol. 10, 105–116. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(77\)90014-5](https://doi.org/10.1016/0048-4059(77)90014-5)
- Roditakis, E., Roditakis, N.E., Tsagkarakou, A., 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. Pest Manag. Sci. 61. <https://doi.org/10.1002/ps.1029>
- Rose Vineer, H., Morgan, E.R., Hertzberg, H., Bartley, D.J., Bosco, A., Charlier, J., Chartier, C., Claerebout, E., De Waal, T., Hendrickx, G., Hinney, B., Höglund, J., Jez Ek, J.I., Kašný, M., Keane, O.M., Martínez-Valladares, M., Mateus, T.L., McIntyre, J., Mickiewicz, M., Munoz, A.M., Phythian, C.J., Ploeger, H.W., Rataj, A.V., Skuce, P.J., Simin, S., Sotiraki, S., Spinu, M., Stuen, S., Thamsborg, S.M., Vadlejch, J., Varady, M., Von Samson-Himmelstjerna, G., Rinaldi, L., 2020. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. Parasite 27. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020062>
- Siheri, W., Ebiloma, G.U., Igoli, J.O., Gray, A.I., Biddau, M., Akrachanont, P., Alenezi, S., Alwashih, M.A., Edrada-Ebel, R.A., Muller, S., Lawrence, C.E., Fearnley, J., Watson,

- D.G., De Koning, H.P., 2019. Isolation of a novel flavanonol and an alkylresorcinol with highly potent anti-trypanosomal activity from libyan propolis. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24061041>
- Sissay, M.M., Asefa, A., Uggla, A., Waller, P.J., 2006. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. *Vet. Parasitol.* 135, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.005>
- Soria, N., Ramos, P., Viveros, G., Estigarribia, G., Ríos, P., Ortíz, A., 2020. Etnobotánica y uso de plantas medicinales en unidades familiares de salud de Caaguazú, Paraguay. *Caldasia* 42. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v42n2.76907>
- Suarez, Victor H, Martínez, G.M., Viñabal, A.E., Alfaro, J.R., Suarez, V., Suarez, V H, Alfaro, A.E.&, 2017. Epidemiology and effect of gastrointestinal nematodes on dairy goats in Argentina. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 84, 1240. <https://doi.org/10.4102/ojvr>
- Suleiman, M.M., Mamman, M., Sidiama, A., Ighoja, E.J., Tauheed, M., Talba, A.M., 2014. Evaluation of anthelmintic activity of Nigerian ethnoveterinary plants; *Cassia occidentalis* and *Guiera senegalensis*. *Vet. World* 7, 536–541. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.536-541>
- Szopa, A., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Elansary, H.O., Al-Mana, F.A., Mattar, M.A., Ekiert, H., 2020. *Artemisia absinthium* L.—importance in the history of medicine, the latest advances in phytochemistry and therapeutical, cosmetological and culinary uses. *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants9091063>
- Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S., 2009. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Vet. Parasitol.* 160, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.084>
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 77. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.03.009>
- Triastuti, A., Haddad, M., Barakat, F., Mejia, K., Rabouille, G., Fabre, N., Amasifuen, C., Jargeat, P., Vansteelandt, M., 2021. Dynamics of Chemical Diversity during Co-Cultures: An Integrative Time-Scale Metabolomics Study of Fungal Endophytes *Cophinforma mamane* and *Fusarium solani*. *Chem. Biodivers.* 18, e2000672. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000672>
- Tsugawa, H., Kind, T., Nakabayashi, R., Yukihira, D., Tanaka, W., Cajka, T., Saito, K., Fiehn, O., Arita, M., 2016. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. *Anal. Chem.* 88, 7946–7958. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00770>
- Tucker, A.O., Maciarelo, M.J., Bryson, C.T., 2006. The Essential Oil of *Kyllinga odorata* Vahl (Cyperaceae) from Mississippi. *J. Essent. Oil Res.* 18, 381–382. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699120>
- Váradyová, Z., Pisarčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, A., Vadlejch, J., Várady, M., 2018. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 195. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.009>
- Verza, S.G., Pavei, C., Ortega, G.G., 2008. Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* 19, 1627–1633. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000800025>
- Yadav, J.P., Arya, V., Yadav, S., Panghal, M., Kumar, S., Dhankhar, S., 2010. *Cassia*

occidentalis L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Fitoterapia* 81, 223–230. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2009.09.008>
Yoon, Y.-A., Kim, H., Lira, Y., Shim, Y.-H., 2006. Relationships Between the Larval Growth Inhibition of *Caenorhab-ditis elegans* by Apigenin Derivatives and Their Structures, *Arch Pharm Res*.

Fig 44. Inhibitory effect (%Ensh) at T60 by concentrations for both species of GIN. The letter "a" above bars indicates a significant difference with negative control ($p < 0.05$).

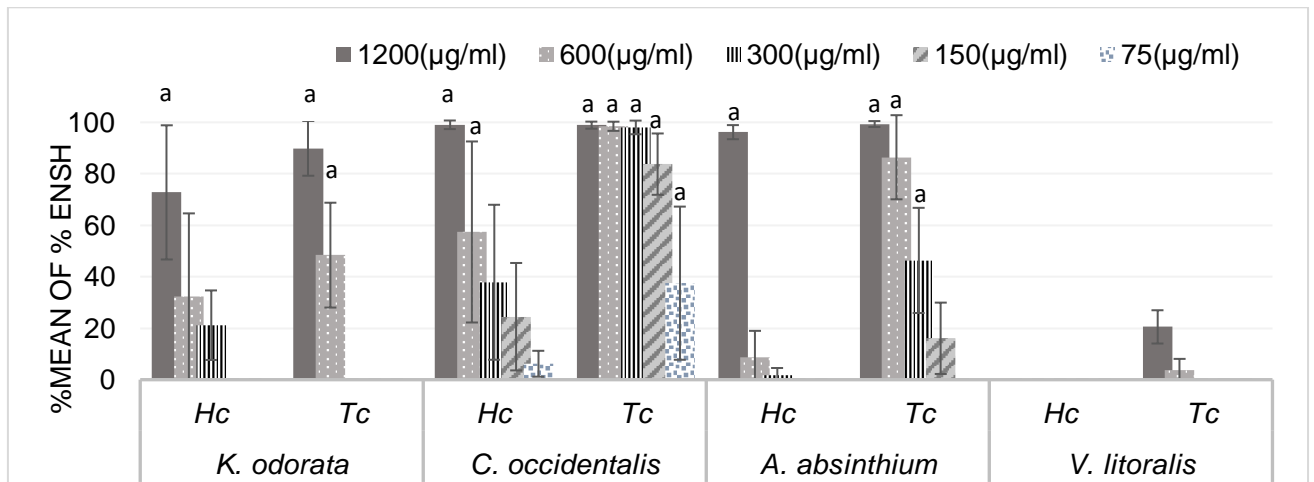


Fig 2. Inhibitory effect (%Ensh) at T60, without and with the addition of PVPP in *K. odorata*, *C. occidentalis*, and *A. absinthium* for both species of GIN. The * above bars indicate differences in treatments ($p < 0.05$).

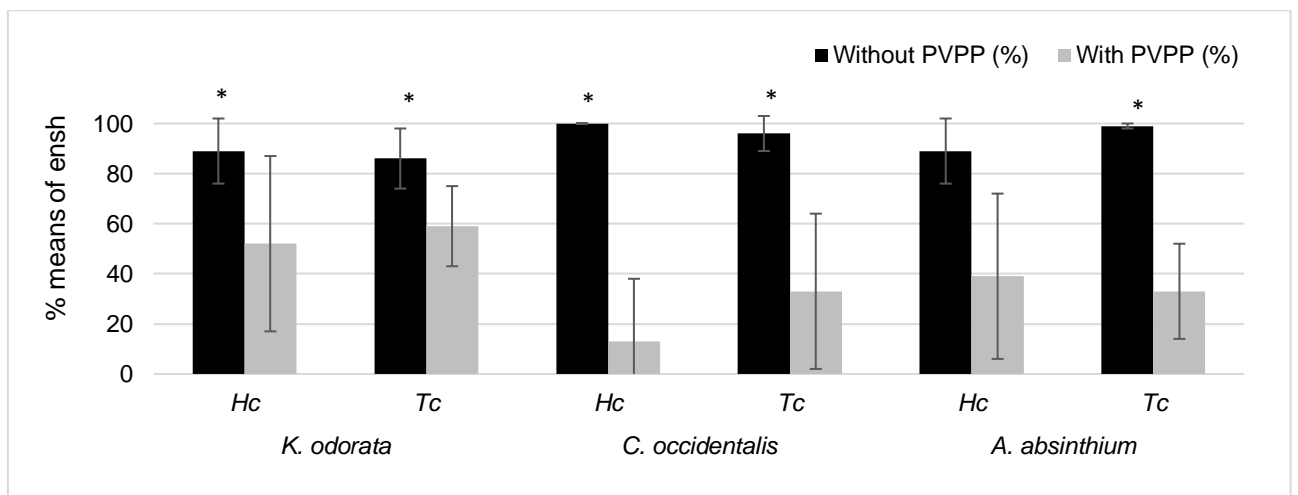


Fig 3. Base peak chromatograms in negative ion mode were obtained for the root extract of *K. odorata* Valh, with PVPP (red)

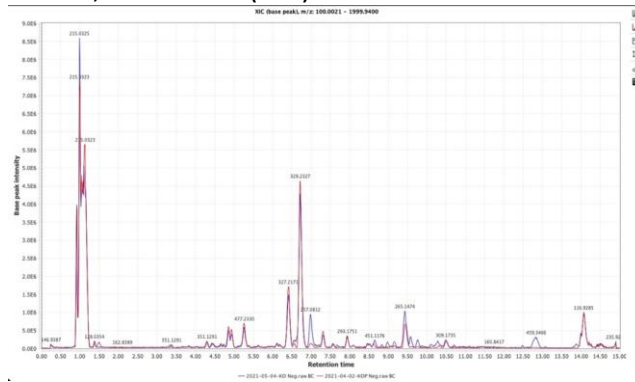


Fig.4. Base peak chromatograms in negative ion mode were obtained for the root extract of *C. occidentalis*, with PVPP (red)

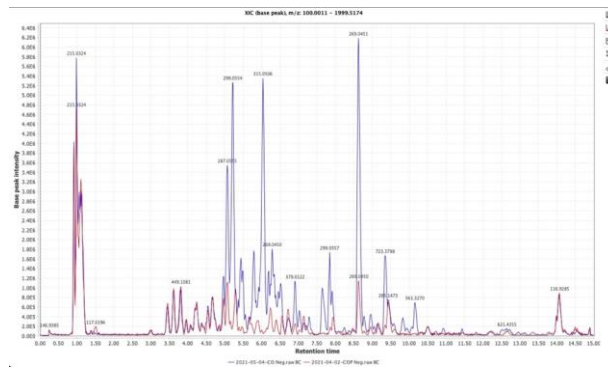


Fig 5 Base peak chromatograms in negative ion mode were obtained for the root extract of *A. absinthium*, with PVPP (red)

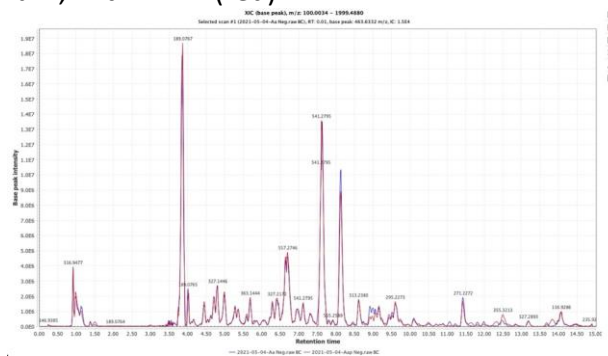


Table 1. Effective concentration and confidence intervals (EC50 and IC95%)

| Extracts | <i>H. contortus</i> | <i>T. colubriformis</i> |
|------------------------|--|---|
| <i>K. odorata</i> | 565.06 (µg/ml) [261.24 - 833.11] ^{ab} | 610.61 (µg/ml) [524.69 - 710.94] ^c |
| <i>C. occidentalis</i> | 250.42 (µg/ml) [201.69 - 314.48] ^c | 41.80 (µg/ml) [2.75 - 88.44] ^a |
| <i>A. absinthium</i> | 706.49 (µg/ml) [567.19 - 839.89] ^{ba} | 277.09 (µg/ml) [211.71 - 345.96] ^b |

Different letter are considered (p >0.05)

Table 2. Putative identified features (m/z×RT pairs) using HRMS and MS/MS fragmentation patterns using MzMine, MS-finder, and DNP database

| | RT (min) | m/z | Formula finder | Δ Da | Putative ID | Ontology | Scoring |
|-------------------------------|----------|---------------------------------|----------------|-------------|---------------------|---------------------------|---------|
| <i>K. Odorata</i> | | | | | | | |
| 1 | 6.98 | 257.0812 [M-H] ⁻ | C15H14O4 | + 0.0007325 | Luvangetin | Coumarins | 7.57 |
| 2 | 10.10 | 191.0703 [M+H] ⁺ | C11H10O3 | - 0.0000294 | 7-ethoxycoumarin | Coumarins | 8.04 |
| <i>A. absinthium</i> | | | | | | | |
| 3 | 8.26 | 389.1229 [M+H] ⁺ | C20H20O8 | + 0.0001941 | Artemetin | 7-O-methylated flavonoids | 7.67 |
| <i>C. Occidentalis</i> | | | | | | | |
| 4 | 5.20 | 301.0708 [M+H] ⁺ | C16H12O6 | -0.0001354 | Kaempferide | 3-O-methylated flavonoids | 8.60 |
| 5 | 7.82 | 269.0442 [M+H] ⁺ | C15H8O5 | + 0.0000502 | Coumesterol | Coumestans | 7.68 |
| 6 | 6.02 | 317.0658 [M+H] ⁺ | C16H12O7 | -0.0002208 | 3-O-methylquercetin | Flavonols | 8.58 |
| 7 | 5.21 | 299.0554 [M-H] ⁻ | C16H12O6 | 0.0004117 | Kaempferide | 3-O-methylated flavonoids | 8.71 |
| 8 | 4.54 | 287.00555 [M-H] ⁻ | C15H12O6 | 0.00006117 | Dihydrokaemferol | Flavonols | 8.82 |
| 9 | 6.29 | 269.0450 [M-H] ⁻ | C15H10O5 | 0.000547 | Apigenin | Flavones | 8.45 |

Résumé 3

Les systèmes de production en pâturage des petits ruminants ont un ennemi commun : les infestations à nématodes gastro-intestinaux (NGI) qui représentent une menace majeure qui entrave leur productivité et leur santé. *Haemonchus contortus* (Hc) et *Trichostrongylus colubriformis* (Tc) sont les espèces les plus prévalentes. Au cours des dernières décades, de nombreuses études ont été proposées à la recherche d'alternatives soutenables pour le contrôle du GIN en plantes ou dans leurs composés bioactifs. *Kyllinga odorata*, *Cassia occidentalis*, *Artemisia absinthium* et *Verbena littoralis* ont été sélectionnées parmi une enquête ethnobotanique pour évaluer l'activité anthelminthique (AH) sur les larves et sur les œufs. Cette étude visait (1) à évaluer AH sur les œufs en utilisant le test d'éclosion des œufs (EHA) ; (2) d'explorer le rôle potentiel des polyphénols en utilisant un absorbant chimique appelé polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). L'inhibition de l'éclosion des œufs (%EHI) a été évaluée en: activité ovicide (%OE) et échec de l'éclosion des larves (%LFE) et les concentrations efficaces à 50 % (EC50) ont été calculées. Un effet inhibiteur sur le développement des œufs des 4 extraits a été noté. Les principaux effets consistaient à bloquer la formation de larves (% OE plus élevé) chez *H. contortus* et à bloquer l'émergence des larves L1 (% LFE plus élevé) pour *T. colubriformis*. L'activité AH sur les larves infestantes a été évaluée dans un travail précédent. Le résultat remarquable est la mise en évidence de l'activité AH de *V. littoralis* sur les œufs. L'utilisation de PVPP suggère que les polyphénols ne sont pas les seuls responsables de l'activité AH.

ARTICLE 3

***In vitro* evaluation of the anthelmintic activity of four medicinal plants againsts eggs of *T. colubriformis* and *H. contortus* using the eggs hatch assay**

Meza Ocampos Griselda^{1,2*}, Torres Ñumbay Miguel², Haddad Mohamed³, Hoste Hervé^{1*}

1. Mixed Unit of Research, Host Pathogens Interactions 1225, National Institute for Agriculture, Food and Environment, National Veterinary School of Toulouse, (UMR IHAP 1225 INRAE / ENVT)). 23 Chemin des Capelles. PO BOX 31076 Toulouse, France.
2. Department of Physiological Sciences. Faculty of Veterinary Sciences of the National University of Asunción, (FCV, UNA). Campus Universitario Km 9.5 PO BOX 1061 San Lorenzo, Paraguay.
3. UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France.

Corresponding authors: Hervé, Hoste

23 Chemin de Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France.

Téléphone : 05 61 19 38 75 Fax 05 61 19 39 44

e-mail: herve.hoste@envt.fr

Meza Ocampos, Griselda: mezagriselda@hotmail.com

Torres Ñumbay, Miguel: mtorres@vet.una.py

Haddad, Mohamed: mohamed.haddad@ird.fr;

Hoste, Hervé: herve.hoste@envt.fr

Abstract

Small ruminant grazing production systems have a common enemy: gastrointestinal nematode infections (GIN), which represent a major threat that hampers their productivity and health. *Haemonchus contortus* (Hc) and *Trichostrongylus colubriformis* (Tc) are considered the most prevalent species. In the last decades, numerous studies have been proposed looking for sustainable alternatives for control GIN using plants or their bioactive compounds. *Kyllinga odorata*, *Cassia occidentalis*, *Artemisia absinthium* and *Verbena litoralis* were selected by an ethnobotanical survey to evaluate anthelmintic activity (AH) on larvae and on eggs. This study aimed (1) to evaluate the AH activity on eggs using the egg hatch assay (EHA); (2) to explore the potential role of polyphenols by using a polyphenol binder called polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The egg hatch inhibition (%EHI) was evaluated on: ovicidal activity (%OE) and larvae failing of eclosion (%LFE) and the 50% effective concentrations (EC50) was calculated. An inhibitory effect on the development of eggs of the 4 extracts was noted. The main effects consisted of blocking the formation of larvae (% higher OE) in *H. contortus* and blocking the emergence of L1 larvae (% higher LFE) for *T. colubriformis*. The AH activity on infective larvae was evaluated in a previous work. The outstanding result is the evidence of AH activity of *V. litoralis* on eggs. The use of PVPP suggested that polyphenols are not the sole responsible for the AH activity.

Keywords: Alternative control to anthelmintic, Phytotherapy, Secondary compounds, polyphenols, PVPP.

Introduction

Small ruminant grazing production systems have a major threat: gastrointestinal nematode infections (GIN). They represent a major threat that hampers their productivity and health. *Haemonchus contortus* (Hc) and *Trichostrongylus colubriformis* (Tc) have been reported to be the most prevalent parasites in small ruminants [34], [13]. The economic impact of GIN infections is estimated at billions year [30].

The control of GIN has mainly relied on the use of conventional treatment namely, synthetic drugs. This has been a solid instrument for almost 40 years [39]. Nevertheless, with the years has become less effective because, the worm populations have become resistant to drugs. This phenomena is named anthelmintic resistance (AR) [8]. AR has been reported as single (*i.e.*, one family) or multiple (*i.e.*, multiple families) [41]. Nowadays, almost all the commercial synthetic drugs on the market to treat GIN has revealed AR [10].

In the last decades, as a consequence to AR, numerous studies have been proposed looking for sustainable alternatives for the control of GIN (*i.e.* nutraceuticals, mineral supplementation, genetic selection, nutrition, vaccination, biological control) [32], [16]. Among those suggested alternatives, the use of plants and their bioactive compounds have been studied.

The multiple bioactive compounds present in plants could explain into multiple mechanisms to kill parasites or interfering with development - metamorphosis, reducing female fertility and causing repellency [5]. The presence of bioactive compounds such as condensed tannins, flavonoids, steroids, terpenoids, alkaloids and saponins has been associated to the AH activity on plant species [37].

Phytotherapy have been used for centuries in different cultures to treat parasites in both humans and animals. The use of plants and their compounds can be proposed as: i) curative, the bioactive compounds could serve as a model for the synthesis of new drugs to treat GIN [24] and, ii) preventive-nutritional, the use of plants that combine positive effects for both nutrition and animal health (*i.e.* nutraceuticals) could serve as an approach to reduce the use of AH drugs and the selection pressure in worm population [17].

Looking for an alternative to control GIN, a survey with an ethnopharmacological approach was carried out in Paraguay, looking for plant species with potential AH

activity based on traditional knowledge. Four plant species were selected to evaluate AH activity on larvae and on eggs. The plant species selected were, namely: *Kyllinga odorata* (Cyperaceae), *Cassia occidentalis* (Fabaceae), *Artemisia absinthium* (Asteraceae) and *Verbena litoralis* (Verbenaceae). In a previous study, their AH activity on the infective larvae were validated through the larval exsheathment inhibition test (LEIA). Additionally, a chemical evaluation was carried out on the extracts at maximum dose with and without PVPP to characterize the bioactive compounds potentially responsible for AH activity [26].

This currently study aimed to completing this evaluation of the AH activity of four MP from Paraguay. The objectives were: 1) to evaluate (AH) activity of extracts of four MP on eggs of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* using egg hatch assay (EHA); 2) to identify the potential role of polyphenols in AH activity of the four extracts with and without polyvinylpolypyrrolidone (PVPP); 3) to evaluate the action of the chemical compounds characterized in the previous study [26].

Materials and Methods

Plant material and preparation of plants extracts

The procedures of selection were explained on ethnobotanical survey [25] and the procedures of preparation of extracts were explained on *in vitro* test LEIA [26].

Briefly, the plant species were collected in Central Department, Paraguay and identified by botanists from Faculty of Exacts and Natural Sciences (FACEN) and Faculty of Chemistry (FCQ) belonging to the National University of Asuncion (UNA). A voucher number was assigned respectively to: *Kyllinga odorata* Valh (Cyperaceae) (FACEN4719), *Artemisia absinthium* L (Asteraceae) (FACEN4720), *Cassia occidentalis* L (Fabaceae) (FCQ G01), *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae) (FCQ G02). The material vegetal collected was thoroughly washed with water, divided into leaves, stems, roots. Only the part mentioned as medicinally used was used on assays. *K. odorata* (rhizome), *C. occidentalis* (roots), *A. absinthium* (aerial parts) and *V. litoralis* (aerial parts).

Two hundred grams of grounded powder of each plant species were mixed and soaked for 12 hours in proportion 1:4 (w/v) in organic solvents (in a first step with hexanes and then, in a second step with methanol). The product was sonicated in water bath for 30 minutes (three times with 15 minutes between cycles). The product was filtered on Whatman paper N°1. The solvent was evaporated on a rotary evaporator at 40 – 50 °C

to obtain extract. The resulting extracts were labeled, weighted and then stored in an amber vial. Finally, the extracts were lyophilized.

In vitro test

The egg hatch assay (EHA) was conducted following the procedure suggested by [9], [18]. Faeces were collected from donors with monospecific infection using clean plastic pot and were processed within 3 h after collection. The facilities hosting the animals and trial performance met French ethical and welfare rules (agreement C 31 555 27 of August 19, 2010).

The stock solution (2400 µg / ml) of the 4 extracts was prepared in Phosphate buffered saline (PBS) from bioMerieux (Lyon, France) and decreasing concentration of 1200, 600, 300 at 150 µg / ml were prepared for each one. For positive control, a stock solution of 1000 µg / ml was prepared with Thiabendazole (TBZ) and distilled water. For negative control, a solution of eggs with PBS was used.

Forty-eight multi-well plates were used. The final volume of each well was 250 µl, the ratio was 50/50 (v/v). This volume represented 125 µl of extract + 125 µl egg suspension in PBS. Approximately 100 eggs / ml was added to each well. All the concentrations and control wells (positive and negative) were tested with four replicates. The same protocol was used for both GIN species.

The multi-well plates were incubated at 27 °C for 48 hours for *H. contortus* and 72 hours for *T. colubriformis* and sealed with paper film. After incubation, the eggs were counted using an inverted microscope a 40X. The analysis included only those plates with a hatching rate of ≥70% in negative control wells [6].

In a first step, the Larvae (L1) and unhatched eggs (UnE) were counted. The percentage egg hatching inhibition (EHI%) was calculated using Formula1 [4].

$$\text{EHI (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Number of larvae}}{\text{Number of larvae and eggs}}\right)$$

In a second step, the eggs were discriminated into: eggs containing larva (LFE) and morulated eggs (OE) by concentration. To determine the ovicidal activity and the percentage of larvae that fail to hatch, the number of eggs was divided I) eggs with larvae that could not complete their eclosion (LFE) and II) the morulated eggs or eggs that failed to form larvae (OE) using the Formula 2 and 3 [37]. (Figure A)

$$\%LFE = \frac{\text{Number of eggs containing a larva}}{\text{Number of total eggs} + \text{number of larvae}} \times 100$$

$$\%OE = \frac{\text{Number of morulated eggs}}{\text{Number of total eggs} + \text{number of larvae}} \times 100$$

Preparation of extract with PVPP

To determine the influence of polyphenols in AH activity of EHA, a second set of extracts was incubated with polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The extract solutions at concentrations of 1200 µg / ml were mixed in a ratio of 1:50 with PVPP. They were incubated for 2 h with regular shaking, centrifuged at 3000 rpm for 3 min at 21 ° C, the supernatant was used for testing in the same method as described before in *in vitro* test.

Statistical analysis

To determine the concentration required to inhibit 50% larval exsheathment (EC₅₀) with the respective 95% confidence intervals (95% IC). The results of EHI at T60 were analyzed with Probit analyses, using PoloPlus [22]. The differences between the EC₅₀ were determined by comparing the respective 95% IC. A result was considered significant when there was no overlap between the 95% confidence limits of the EC₅₀ values [29], [19].

Descriptive analysis was carried out to demonstrate extract effects and the results of percentages were expressed as mean ± standard deviation (SD). ANOVA one way test with post-hoc **Tukey** HSD (Honestly Significant Difference) was used for comparing multiple treatments with Control PBS= Dose 0, where (p <0.05) was considered significant. To compare results with and without addition of PVPP, data obtained from incubations at T60 for the 4 replicates were analyzed with GLM, where (p <0.05) was considered a significant difference between treatments. All tests were made by XLSTAT® in Excell.

Results

1. To evaluate AH activity using EHA, results of egg hatching inhibition EHI, ovicidal activity OE and percentage of larvae LFE that fail to hatch by concentration of four extracts on *H. contortus* and *T. colubriformis* were presented as mean of percentage EHI \pm standard deviation (SD) (Figure1) and (Figure2).

As shown in Figure 1 and 2, compared to the negative controls, the four extracts at the maximal concentration of 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were able to strongly inhibit the development of goats GIN eggs ($p < 0.05$), causing a reduction in egg hatching of $\geq 80\%$. Among the four extracts, only *V. litoralis* showed a different anthelmintic activity per species, being significantly lower ($p < 0.05$) in *H. contortus* (Figure 1, D).

On *H. contortus*: the extract obtained from *K. odorata*, *C. occidentalis* stopped larvae formation within eggs (OE) from 1200 to 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS respectively ($p < 0.05$) (Figure1, A, B); extract obtained from *A. absinthium* stopped larvae formation within eggs (OE) until 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$) (Figure 1, C). However, *V. litoralis* showed the same AH effect only at the highest concentration (1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($p < 0.05$). On *T. colubriformis*: the four extracts showed efficacy from 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$).

2. The effective concentration required for 50% hatch inhibition (EC_{50}) values and the 95% confidence limits (Table1).

The extracts of *K. odorata*, *C. occidentalis* and *A. absinthium* exhibited EC_{50} between 86 and 177 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In general, the extracts were more effective on *T. colubriformis* eggs than on *H. contortus*, except *A. absinthium*.

3. Effect of the addition of PVPP on %EHI at a concentration of 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with PBS. The four extracts were presented on mean of %EHI+ standard deviation SD (Table 2).

The addition of PVPP to the different tested plant extracts showed 3 different results: First, the extracts in which polyphenols were responsible for most of the AH effect were *C. occidentalis* (significant in both species) and *V. litoralis* (significant in *T. colubriformis*). Secondly, in the extract of *K. odorata*, it has two responses I) in *H. contortus*, the difference with and without PVPP was minimal and, II) in *T. colubriformis* resulted in a increase in the AH effect compared to the extracts without PVPP. Third, the addition of

PVPP in *A. absinthium* resulted in a significant increase in the AH effect in both nematode species, being significant in *H. contortus*.

Discussion

The EHA has been described as an *in vitro* technique useful for the detection of AR to benzimidazoles (BZs) in GIN of domestic animals (Coles et al., 2006). However, this test has been used to screen the potential anthelmintic of plant extracts [18]. In the current study we carried the EHA with eggs of *H. contortus* and *T. colubriformis* the two most prevalent gastrointestinal nematode in tropical and subtropical regions.

This study aimed to evaluate AH activity of four medicinal plant species, namely: *K. odorata*, *C. occidentalis*, *A. absinthium* and *V. litoralis*. In the scientific literature, several studies have reported *in vitro* and *in vivo* therapeutic and pharmacological properties of *A. absinthium* and *C. occidentalis* [36], [33], [12]. Concerning, *K. odorata* and *V. litoralis* as far as we know no data were disponible on AH activity of GIN.

We observed inhibitory effects of egg hatching in all extracts tested in the present study. In Vercruyssen, [38] the authors claimed that an anthelmintic product was considered effective if the antiparasitic action was greater than 90%. Considering this criterion mentioned before, the results on *K. odorata*, *C. occidentalis* and *A. absinthium* were considered effective (Figure 1 and Figure 2). The results showed that extracts of *K. odorata*, *C. occidentalis*, *A. absinthium* and *V. litoralis* can disrupt the life cycle of *H. contortus* and *T. colubriformis* by preventing the eggs from hatching (*i.e.*, inhibition) and or by preventing the L1 larvae developing, which corroborates the traditional use of those plant species as an antiparasitic plant.

The ovicidal effect represented by %OE was the main effect in *K. odorata* and *A. absinthium*, meanwhile the blocking the L1 larvae from hatching represented as the %LFE was the main effect in *C. occidentalis* and *V. litoralis*.

H. contortus and *T. colubriformis* are two different species of GIN. The structure and composition of membrane are different. That could be explain why some extracts are better in one species than another [40]. The %OE was dominant against *H. contortus* and %LFE against *T. colubriformis* (Figure 1 and Figure 2). The physiological mechanism that causes OE of these plant extracts is currently unknown. The control OE for this study was observed with the commercial drug Thiabendazole (Coles et al., 1992). Results were 100% on *H. contortus* and 98% on *T. colubriformis*.

There are many criteria on *when* to consider effective or potentially active an herbal product. In 2006, Adamu et al., [1] mentioned a criterion based on the results of

EC₅₀, it suggested that a result of EC₅₀ <6 mg / ml was considered as a parameter to suggest a plants or extract of plants as a potential candidate with AH activity. In view of this mentioned criteria, our results on four extracts of MP have a potential AH activity. Then, another parameter to study effectiveness according to results of EC₅₀ is based on the dose. The lowest doses are considered to be the most effective [29]. In consideration of this parameter, the lowest EC₅₀ was for *A. absinthium*, and *C. occidentalis* on *H. contortus* and the inverse on *T. colubriformis* (Table1).

The results of (Table1) were analyzed between the EC₅₀ value and the IC95% interval. The efficacy of extracts of *K. odorata*, *C. occidentalis* and *A. absinthium* were considered equivalent. In *T. colubriformis* all the extracts were equivalent (*i.e.* neither less nor more effective).

In EHA, the four MP were positive to inhibition of hatching (Figure1, 2). These results encouraged us to investigate which secondary compounds might be responsible for this AH activity. To specify the contribution of some bioactive compounds associated with AH activity, PVPP was added to each extract at 1200µg/ml and another EHA was performed. PVPP complexes with tannins and polyphenols and therefore blocks their potential biological activity[11].

The AH activity of herbal product have been ascribed to different groups of secondary metabolites such as alkaloids, which can interfere with DNA synthesis in parasites[20], flavonoids [21] or polyphenols. The tannins are the one of the most studied metabolites secondaries. Tanins have been shown a relationship between tanniferous plants and anthelmintic effects in these two species of GIN [15], [2], [3].

Bibliography research suggests that addition of PVPP on extracts could have three scenarios: I) negative interactions with other metabolites that reduce the AH effect on egg hatching, II) positive interactions with other metabolites that increase the AH effect on egg hatching, III) null action, where a competition or an association between compounds could nullify the effect [37], [7], [28].

Addition of PVPP, to extract at 1200µg/ml suggested a negative interaction with *C. occidentalis* and *V. litoralis* where, the EHI was reduced in both species of GIN. A positive interaction with *A. absinthium*. On the other hand, with *K. odorata* this action was different by species on *H. contortus* it was minimal and on *T. colubformis* with PVPP EHI it was increased (Table2).

The egg hatching processes are initiated as a result of an environmental stimulus that promotes a protein / enzyme mediated process [31]. Certain authors mentioned that compound-protein interactions (extracts / fractions) can cause important structural changes that affect membrane permeability, oxygen exchange and the release of substances and enzymes that promote the degradation of the eggshell to eventually promote the release of larvae [27] .

The different results on (Table 2) could be due to the composition of the mentioned plants. Each one belongs to a different botanical family and these chemical compounds were mentioned in our previous study [26]. *C. occidentalis*, it is a plant rich in polyphenols (tannins). The AH activity of this plant was suggested to the presence of these secondary metabolites and results before complexation with PVPP explain the reduction on EHI, and confirm a main role of polyphenols on AH activity [12]. *A. absinthium* has showed a main compound after PVPP, the artemisin, the mentioned compound is a flavonoid, studied for its anthelmintic effects [35]. *K. odorata*, showed the presence of Luvategin a coumarin compound, and makes it interesting for further studies with anthelmintic potentials [14], [23]. The *V. litoralis* extract was not chemically examined due to its low activity.

Conclusion

The use of extracts of *K. odorata*, *C. occidentalis*, *A. absinthium* and *V. litoralis* can be useful for the control of gastrointestinal nematodes in livestock production. This AH activity against the hatching of eggs of *H. contortus* and *T. colubriformis* could be attributed in part to other secondary compounds. More research is needed to better characterize and understand the nature of the secondary metabolites responsible for the AH effect and to analyze their mode of action on GIN.

K. odorata and *V. litoralis* were evaluated for AH activity on eggs, our results showed >75% EHI against both species of GIN. Those results support the claimed traditional use as AH and motivated more studies on these plant species. We suggested an additional structural and chemical studies to clarify the mode of action of each extract on GIN species.

Acknowledgements

We thank to the Unit UMR 1225 INRAE / ENVY team INMD for their valuable help and contribution to the development of this work, specially a Seta Ketavong and Bruno Dallago.

Thanks to Prof, Dr. Nelson Alvarenga from Faculty of Chemical Sciences (FCQ) and to the Department of Chemistry and Botany of the FCQ and FACEN for their valuable collaboration and the taxonomic identification.

To the Laboratory PHARMADEV at the Toulouse Paul Sabatier III, for the lyophilized product and collaboration.

Financial support

This work was supported by National program of postgraduate scholarships abroad to strengthen research, innovation and education Becas Carlos Antonio Lopez (BECAL). Autogestionada04.

Conflict of interest declaration

All authors mentioned that there are no known conflicts of interest

Fig. 1. Effect of different concentrations of extracts of (A) *K. odorata*, (B) *C. occidentalis*, (C) *A. absinthium*, (D) *V. litoralis* on *H. contortus* (Hc) * ($p < 0.05$).

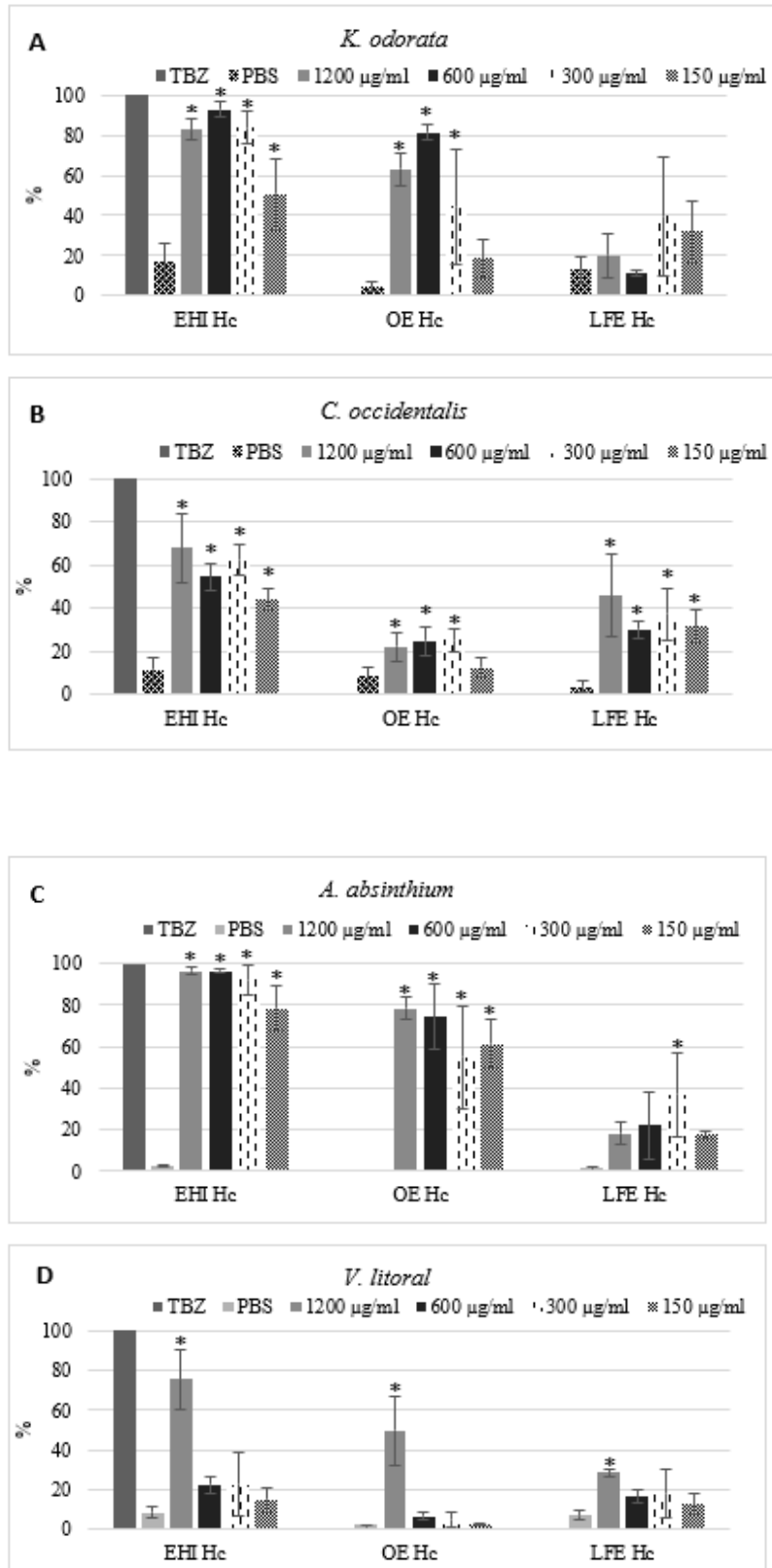


Fig. 2. Effect of different concentrations of extracts of (A) *K. odorata*, (B) *C. occidentalis*, (C) *A. absinthium*, (D) *V. litoralis* on *T. colubriformis* (Tc) egg hatching inhibition. * ($p < 0.05$).

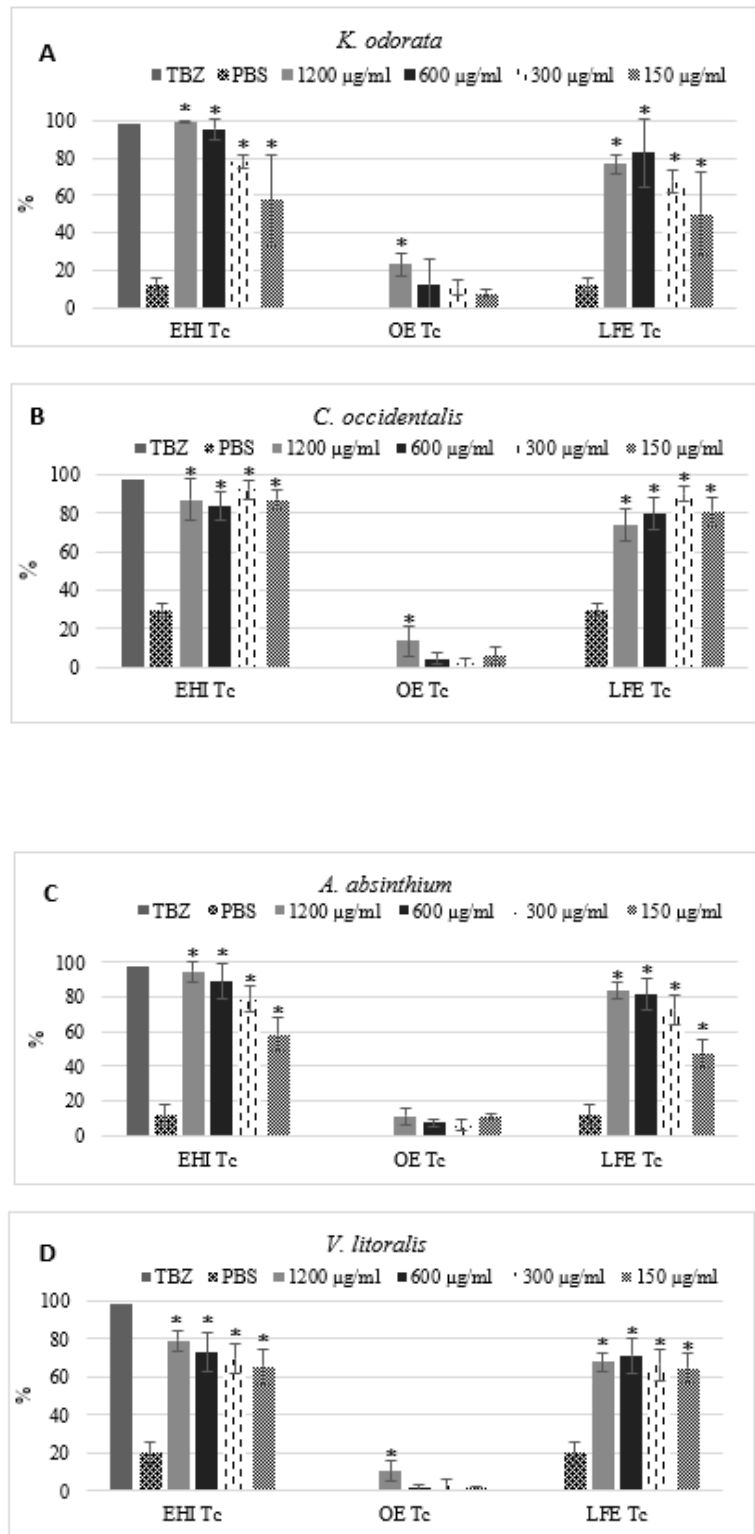


Fig. 1 and 2. Effect of different concentrations of extracts of (A) *K. odorata*, (B) *C. occidentalis*, (C) *A. absinthium*, (D) *V. litoralis* first on *H. contortus* (Hc) and then on *T. colubriformis* (Tc) egg hatching inhibition. Inhibition of egg hatching (EHI) with five concentrations of extracts of *K. odorata* (A); *C. occidentalis* (B); *A. absinthium* (C); *V. litoralis* (D) and Thiabendazole (TBZ). Compared to PBS control, the inhibitory effects were significant ($p < 0.05$). Each columns represent mean and the bar represent SD. $p < 0.05$ when compared with PBS follow by Turkey's Test. SD= standard deviation; PBS = phosphate buffered saline. Four replicas were used.

Table 1. The effective concentration required for 50% hatch inhibition (EC_{50}) values and the 95% confidence limits Results with * are considered significant ($p < 0.05$).

Significantly different to others for the same worm species.

| Extract | <i>H. contortus</i> | <i>T. colubriformis</i> |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>K. odorata</i> | 177 (35 – 316) | 144 (66 – 209) |
| <i>C. occidentalis</i> | 359 (140 – 745) | 86 (17 - 164) |
| <i>A. absinthium</i> | 122 (94 – 169) | 137 (59 - 210) |
| <i>V. litoralis</i> | 866 (797 - 930) * | 130 (9 - 331) |

Table 2. Effect of the addition of PVPP on %EHI at a concentration of 1200 µg/ml with PBS. The four extracts were presented on mean of %EHI+ SD. Results with * are considered significant (p < 0.05). Significantly different compared to the extract with and without PVPP.

| Plant Extract | <i>H. contortus</i> | | | <i>T. colubriformis</i> | | |
|-------------------------------|---------------------|---|----|-------------------------|---|----|
| <i>K. odorata</i> | 22 | ± | 9 | 56 | ± | 21 |
| <i>K. odorata</i> + PVPP | 23 | ± | 7 | 75 | ± | 9 |
| <i>C. occidentalis</i> | 59* | ± | 7 | 75* | ± | 11 |
| <i>C. occidentalis</i> + PVPP | 38 | ± | 13 | 34 | ± | 6 |
| <i>A. absinthium</i> | 55 | ± | 23 | 61 | ± | 11 |
| <i>A. absinthium</i> + PVPP | 89* | ± | 4 | 73 | ± | 7 |
| <i>V. litoralis</i> | 40 | ± | 21 | 79* | ± | 6 |
| <i>V. litoralis</i> + PVPP | 22 | ± | 7 | 61 | ± | 15 |

Figure A. Anthelmintic effect EHA, OE, LFE and Larvae



References

1. Adamu M, Naidoo V, Eloff JN. 2013. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. BMC Veterinary Research 2013 9:1, 9, 1–9.
2. 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. Veterinary Parasitology, 127.
3. Bahuaud D, Martinez-Ortiz De Montellano C, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, Hoste H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. Parasitology, 132.
4. Bizimenyera ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE. 2006. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. Veterinary Parasitology, 142.
5. Chagas ACS. 2015. Medicinal plant extracts and nematode control. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 10.
6. Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Castañeda-Ramírez GS, Vilarem G, Mathieu C. 2016. *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. Veterinary Parasitology, 217, 53–60.
7. Chan-Pérez J, Torres-Acosta J, Sandoval-Castro C, Castañeda-Ramírez G, Hoste H, Vilarem G, Mathieu C. 2017. Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae. Veterinary Parasitology, 240.
8. Charlier J, Thamsborg SM, Bartley DJ, Skuce PJ, Kenyon F, Geurden T, Hoste H, Williams AR, Sotiraki S, Höglund J, Chartier C, Geldhof P, Dijk J van, Rinaldi L, Morgan ER, Samson-Himmelstjerna G von, Vercruyse J, Claerebout E. 2018. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. Transboundary and Emerging Diseases, 65.
9. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. 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. Veterinary Parasitology, 44.
10. Dey AR, Begum N, Anisuzzaman, Alim MA, Alam MZ. 2020. Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh. Parasitology International, 77, 102105.
11. Doner LW, Bécard G, Irwin PL. 1993. Binding of Flavonoids by Polyvinylpyrrolidone. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 753–757.
12. Eguale T, Tadesse D, Giday M. 2011. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. Journal of Ethnopharmacology, 137.
13. Emery DL, Hunt PW, Jambre LF Le. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? International Journal for Parasitology, 46, 755–769.
14. Escareño-Díaz S, Alonso-Díaz MA, Mendoza de Gives P, Castillo-Gallegos E, Sonde Fernex E von. 2019. Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their

interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. *Veterinary Parasitology*, 274.

15. Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186, 18–27.

16. Hoste H, Torres-Acosta JFJ. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, 180, 144–154.

17. Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Mueller-Harvey I, Sotiraki S, Louvandini H, Thamsborg SM, Terrill TH. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212, 5–17.

18. Jackson F, Hoste H. 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: Vercoe P., Makkar H., Schlink A. (eds) *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3297-3_3.

19. Jeske DR, Xu HK, Blessinger T, Jensen P, Trumble J. 2009. Testing for the equality of EC50 values in the presence of unequal slopes with application to toxicity of selenium types. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 14.

20. Kakar MUH, Maqbool A, Khan UJ, Kakar A, Khan MS, Lateef M. 2013. Comparative efficacy of various indigenous and allopathic drugs against ovine fasciolosis. *Pakistan Journal of Zoology*, 45, 1170–1172.

21. Klongsiriwet C, Mueller-Harvey I, Quijada J, Hoste H, Williams A, Williamson E. 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5.

22. LeOra Software. 2002. Polo Plus. Probit and Logit Analyses. .

23. Liu GL, Hu Y, Chen XH, Wang GX, Ling F. 2016. Synthesis and anthelmintic activity of coumarin–imidazole hybrid derivatives against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 5039–5043.

24. Liu M, Panda SK, Luyten W. 2020. Plant-based natural products for the discovery and development of novel anthelmintics against nematodes. *Biomolecules*, 10.

25. Meza Ocampos, G.; Torres Ñumbay M.; Alvarenga, N.; Pereira Sühsner C.; Delmás, G.; Hoste H. 2021. Ethnobotanical and ethnoveterinary survey in Paraguay: Medicinal plants used for deworming. *Indian Journal of Traditional Knowledge*.(in press)

26. Meza Ocampos G, Torres Ñumbay M, Haddad M, Messi Ambassa LM, Alvarenga N, Hoste H. 2021. *In vitro* evaluation of the anthelmintic activity of four medicinal plants against gastrointestinal nematodes and their quimical composition. *Veterinary Parasitology* (submitted)

27. Molan AL, Faraj AM. 2010. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (nematoda: *Trichostrongylidae*). *Folia Parasitologica*, 57, 62–68.

28. Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M. 2015. Screening anthelmintic resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep by means of an egg hatch assay. *BMC Veterinary Research*, 11, 1–5.

29. Roidakis E, Roidakis NE, Tsagkarakou A. 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*) populations from Crete. *Pest Management Science*, 61.
30. RoseVineer M, Morgan ER, Hertzberg H, Bartley DJ, Bosco A, Charlier J, Chartier C, Claerebout E, Waal T De, Hendrickx G, Hinney B, Höglund J, Jez Ek JI, Kašný M, Keane OM, Martínez-Valladares M, Mateus TL, McIntyre J, Mickiewicz M, Munoz AM, Phythian CJ, Ploeger HW, Rataj AV, Skuce PJ, Simin S, Sotiraki S, Spinu M, Stuen S, Thamsborg SM, Vadlejch J, Varady M, Samson-Himmelstjerna G Von, Rinaldi L. 2020. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, 27.
31. Sommerville RI, Rogers WP. 1987. The Nature and Action of Host Signals. *Advances in Parasitology*, 26, 239–293.
32. Stear MJ, Doligalska M, Donskow-Schmelter K. 2007. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology*, 134, 139–151.
33. Suleiman MM, Mamman M, Sidiama A, Ighoja EJ, Tauheed M, Talba AM. 2014. Evaluation of anthelmintic activity of Nigerian ethnoveterinary plants; *Cassia occidentalis* and *Guiera senegalensis*. *Veterinary World*, 7, 536–541.
34. Tan TK, Panchadcharam C, Low VL, Lee SC, Ngui R, Sharma RSK, Lim YAL. 2014. Co-infection of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus spp.* among livestock in Malaysia as revealed by amplification and sequencing of the internal transcribed spacer II DNA region. *BMC Veterinary Research*, 10.
35. Tariq KAA, Chishti MZZ, Ahmad F, Shawl ASS. 2009. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*, 160, 83–88.
36. Váradyová Z, Písarčíková J, Babják M, Hodges A, Mravčáková D, Kišidayová S, Königová A, Vadlejch J, Várady M. 2018. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 195.
37. Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Chan-Pérez JI. 2014. Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*, 206.
38. Vercruysse J, Holdsworth P, Letonja T, Barth D, Conder G, Hamamoto K, Okano K. 2001. International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines. *Veterinary Parasitology*, 96, 171–193.
39. Waller PJ. 2006. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology*, 139.
40. Waller PJ. 1971. Structural differences in the egg envelopes of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda Trichostrongylidae). *Parasitology*, 62, 157–160.
41. Waller PJ. 1997. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 72, 391–412.

CHAPITRE III

Confirmer les résultats in vitro = essai in vivo chez des ovins

Chapitre III

Comme mentionné dans la description des objectifs de cette thèse (page 99), ce dernier chapitre a été consacré à la mise en place d'un essai *in vivo* pour confirmer l'intérêt de ressources naturelles riches en métabolites secondaires bioactifs (notamment les tannins) sur la base d'un essai majeur *in vivo*.

Pour les raisons déjà exposées en ce mémoire, cet essai *in vivo* a été mis en place en France et non au Paraguay.

Ce chapitre III inclus,

- I. Une revue sur les sous-produits agro-industriels (AIBP, Agro industrial By Products selon les termes anglais). L'objectif était de présenter un aperçu critique de l'application potentielle des divers AIBP en se focalisant sur les ressources riches en tannins avec des activités AH potentielles contre les GIN des ruminants. Cette revue inclut divers co-produits issus de bois et d'écorces produits dans les régions tropicales et subtropicales dont les études ont été mentionnées (**Article 4**)
- II. Un essai *in vivo*, dont l'objectif était de valider les effets anthelmintiques des ressources riches en tannins notamment d'origine sud-américaine pour compléter les informations présentées dans les chapitres I et II au cours de 2020 – 2021. Les données sont incluses dans l' **Article 5**

Résumé 4

Plusieurs études antérieures ont illustré le fait que des Légumineuses bioactives contenant des tannins condensés peuvent représenter une des alternatives à intégrer avec d'autres options pour une maîtrise durable des nématodes gastro-intestinaux en réponse au développement constant et à l'expansion continue à l'échelle mondiale des résistances aux anthelminthiques de synthèse. Des recherches plus récentes se sont intéressées au potentiel d'application de ressources moins conventionnelles que représentent des co produits agro industriels (CPAI). Cette revue vise à présenter des résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus avec une gamme de CPAI d'origines géographique et botanique diversifiées (co produits de l'industrie des noix, du bois (en régions tempérée et tropicales), du caroubier, du café et du cacao). Ces résultats ont confirmé la preuve de concept pour les effets antiparasitaires, et aussi pour d'autres volets de la production des ruminants dans un contexte agro écologique de l'élevage. Par ailleurs, les aspects socio-économiques d'exploitation de ces ressources, considérées jusqu'à présent comme des déchets, dans un modèle de circuits courts sont aussi évoqués. Les avantages et inconvénients des différentes modalités d'exploitation des CPAI sont aussi discutés dans le cadre d'une analyse SWOT.

Mot clés : Métabolites secondaires des plantes, Métabolites spécialisés des plantes, tannins, anthelminthique, résistances aux anthelminthiques, nématodes gastro intestinaux, économie circulaire.

Parasite

Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants.

--Manuscript Draft--

| | |
|------------------------------|--|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. |
| Article Type: | Review Article |
| Order of Authors: | Hervé Hoste Griselda Meza OCampos Smaragda SOTIRAKI Katerina SARATSI Stig THAMSBORG Andrew WILLIAMS Spiridoula ATHANASIADOU Heidi ENEMARK Felipe TORRES ACOSTA Carlos SANDOVAL Gabriella Mancilla-Montelongo Livio COSTA JUNIOR Helder LOUVANDINI Juha-Pekka SALMINEN Maarit KARONEN Marica ENGSTROM Vincent NIDERKORN Johannes CHARLIER Eric MORGAN |
| Corresponding Author: | Hervé Hoste INRA |

| | |
|------------------|---|
| Keywords: | Plant Secondary Metabolites; Plant specialised metabolites; tannins Anthelmintic; Anthelmintic resistance; Gastrointestinal Nematodes; Circular economy |
| Abstract: | <p>Previous studies have illustrated that different bioactive legume fodders containing condensed tannins might represent one of the options for integrated sustainable control of gastrointestinal nematodes in ruminants, which may help address the worldwide development of resistance to synthetic anthelmintics (AH). More recently, an impetus has been given to assess the potential antiparasitic activity of less conventional resources, represented by different agroindustrial by-products (AIBPs). This review presents <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> results obtained with a range of tannin containing AIBP of various geographical and botanical origins (namely: AIBP of nuts, temperate and tropical barks, carob, coffee and cocoa). They tend to confirm the "proof of concept" for their antiparasitic effects and also for other aspects of ruminant production in an agro-ecological context. Socioeconomic aspects of the exploitation of such non-conventional resources are also evoked as potential models of circular economy, by using wastes. The different modes of use of these resources are presented in this review, as well as a SWOT analyses to illustrate the advantages and</p> |

ARTICLE 4

Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastro intestinal nematodes in ruminants.

Hervé Hoste¹, Griselda Meza Ocampos¹, Sarah Marchand ¹Smaragda Sotiraki ², Katerina Sarasti ², Berit M. Blomstrand ³, Andrew R. Williams ³, Stig M. Thamsborg ³ Spiridoula Athanasiadou⁴ Heidi Enemark⁵, Juan Felipe Torres Acosta⁶, Gabriella Mancilla-Montelongo⁶, Carlos Sandoval Castro⁶, Livio M. Costa-Junior⁷, Helder Louvandini ⁸, Dauana Mesquita Sousa ⁹, Juha Pekka Salminen¹⁰, Johannes Charlier¹¹, Eric Morgan ¹², Vincent Niderkorn ¹³

1. Université de Toulouse, UMR 1225 IHAP NRAE/ENVT Toulouse, France.
2. HAO/DEMETER, Thessaloniki, Greece.
3. Norwegian Centre for Organic Agriculture, Tingvoll, Norway
4. University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.
5. Scotland's Rural College (SRUC), Easter Bush, EH25 9RG, United Kingdom
6. Norwegian Veterinary Institute, Ås, Norway.
7. CONACYT- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, km 15.5 carretera Mérida a 17 Xmatkuil, Mérida, Yucatán, 97000, México.
8. Laboratório de Controle de Parasitos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, Brazil.
9. Laboratório de Nutrição Animal, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 21 Brazil
10. Natural Chemistry Research Group, University of Turku, Turku, Finland.
11. Kreavet, Hendrik Mertensstraat 17, 9150 Kruibeke, Belgium.
12. Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genes Champanelle, France.
13. School of Biological Sciences, Queens University, Belfast, Belfast, Northern Ireland.

SUMMARY

Previous studies have illustrated that different bioactive legume fodders containing condensed tannins might represent one of the alternative options to integrate for a more sustainable control of gastrointestinal nematodes in ruminants considered as solution to the constant worldwide development of resistances to synthetic anthelmintics (AHs). More recently, an impetus has been given to assess the potential antiparasitic activity of less conventional resources, represented by a different agro industrial by-products (AIBPs). This review aims at presenting *in vitro* and *in vivo* results obtained with a range of tannin-containing AIBP of various geographical and botanical origins (namely: BP of nuts, temperate and tropical barks, carob, coffee and cocoa). They tend to confirm the “proof of concept” for their antiparasitic effects and also for other aspects of ruminant production in an agro ecological context. Socio economic aspects of the exploitation of such non-conventional resources are also evoked as potential models of circular economy, by using wastes. The different modes of use of these resources are presented as well as a SWOT analyses to illustrate the pros and cons for on farm use.

KEY WORDS (4–6 keywords)

Plant Secondary Metabolite, tannins Anthelmintic, Anthelmintic resistance, Gastro intestinal Nematodes, Circular economy

GENERAL CONTEXT

Worldwide, infection of the gastro intestinal tract of ruminants with parasitic nematodes remain a main pathology associated with outdoors breeding. This is because of the consequences on animal health and welfare of these helminth infections and also because of main impact on production and on the economy of farms [21], [20]. According to FAO, these parasitic diseases are considered as one of the main pathological challenges in ruminants' production. To address the question of the efficient control of these infections is essential to improve the livestock health and production and consequently for human welfare.

For several decades, the control of these parasitic infections has mainly relied on the repeated use of chemical anthelmintics (AHs) provided by the main pharmaceutical companies. However, the constant development of resistance to AHs in worm populations and the extent of the phenomenon including the rise of multi resistant isolates has been reported worldwide [94] see also STAR IDAZ website <https://www.star-idaz.net/priority-topic/helminths-including-anthelmintic-resistance/> and the website of the COST action COMBAR <https://www.combar-ca.eu/>). Moreover, resistances to AH and other chemical drugs appear as an inevitable process [110]. These different facts underline the need for a change in the mode to control GINs, instead of an exclusive reliance on synthetic AH drugs.

The general objective is nowadays to promote a more integrated approach, based on a combination of options which correspond to different principles and modes of action [104]. This more sustainable approach which was foreseen even more than 20 years ago [103], received nowadays a general agreement between [20], [70].

Within the « basket of options » to control GINs [48], resources issued of bioactive plants with AH properties have received a strong impetus since the end of the 1990s. These antiparasitic activities have been associated with the presence of a diversity of plant secondary metabolites (PSMs) which are present in a high diversity of botanical families. For example, the potential use of chicory (*Cichorium intybus*) for AH properties has been related to the presence of sesquiterpene lactones [84] or to proteinases in several tropical plants [101].

Moreover, some main fodder species of the Legume family (Fabacea) containing condensed tannins (CTs) (e.g. sulla (*Hedysarum coronarium*), big and birdfoot trefoil

(*Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*), sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) and sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) has been one main model to explore the AH effects of bioactive plants in relation with an identified class of PSMs [37]. The data have relied first on a diversity of *in vitro* assays completed by studies performed either in controlled experimental conditions or in controlled systemic studies. A last step is to confirm the possible application by studies based on on-farm conditions [39].

Within the frame of anthelmintic properties, the main conclusions, hypotheses on the mode of action and current identified issues /bottlenecks /hurdles obtained from the different experimental studies on the different models of CT containing Legumes are summarised herein : **i)** the presence of CT containing forages in the ruminant diet can affect the dynamics of GIN infections by disturbing the biology of different key stages of the GIN life cycle; **ii)** the antiparasitic activity has been associated with the presence of CTs and also other related polyphenols (flavonoids) = metabolic precursors of CTS); **iii)** in regard of the potential application of such bioactive resources in farming conditions, the results have led to propose the concept of “nutraceuticals “ These are resources combining nutritional and health values for ruminants [39]. In contrast to synthetic AH drugs, nutraceutical fodders are not imposed (administered by force) but proposed to the animals, Therefore the AH effects of such CT containing resources used as nutraceuticals depend first on the voluntary feed intake (VFI) (by sheep, goats or cattle. Torres Acosta and his group have proposed criteria to define nutraceuticals with antiparasitic activity [15]; **iv)** based on the “direct” hypothesis, relying on pharmacological-like effects of CT on the different key stage of GINs [37], data have been obtained to suggest that the *in vivo* AH effects depend on a sufficient time of distribution of the bioactive resources as far as a sufficient level of polyphenols in the ruminants’ diet to expose worms to the bioactive compounds in the different digestive organs.

The identification of a main role of CTs and related polyphenols in the AH activity of legumes forages has permitted to identify and further explore the potential activity of other resources [104]. In particular, the worldwide co-existence of GINs in livestock and of polyphenols containing legumes explained first the trend to examine the value of a range of tropical plants especially of the Fabacea family under a wide range of environment and conditions of ruminant breeding. In a second step, the presence of

polyphenolic compounds occurring in a wide range of agro industrial by products (AIBP) has stimulated the interest for the potential antiparasitic activity of these resources.

The first reasons explaining the impetus to exploit different AIBP have concerned their potential nutritional values (e.g. by products of the wine industry, of citrus pulps, oil cakes etc). This first valorisation has been identified since the 1960's and has led to a long-term use of AIBP as feeding resources in different livestock species, including ruminants. More recently, because of the presence of a wide range of plant secondary metabolites (PSM), there has been a renewed interest to exploit these AIBP because the presence of such bioactive PSMs can help at addressing several novel objectives related to the concept of agroecology in order to achieve a more sustainable management of agriculture and livestock breeding according to different criteria in an holistic frame as illustrated by Figure1.

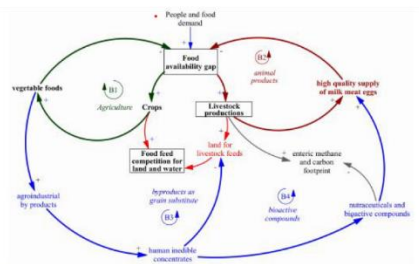


Figure 4. Causal loop diagram of the beneficial role of the use of agro-industrial byproducts in the food chain. Arrows indicates causality, whereas polarity signs, + and -, indicate positive and negative correlation, respectively. B indicates balancing system loops.

Figure 1 Beneficial role of the use of AIBP in animal production A framework to develop circular economy, including the potential effects on animal health (nutraceuticals) [23].

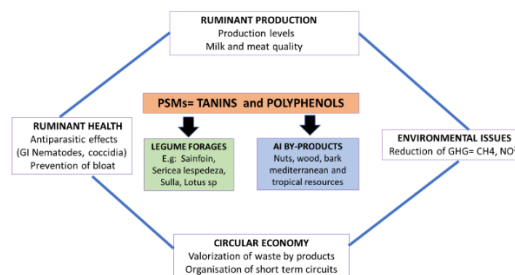


Figure 2: A summarized scheme of the various potential benefits of tannin containing forages (e.g. Sainfoin or *Sericea lespedeza*) and/ or by products in ruminants production in the context of agro ecological production

The general objective of this review is to present a critical overview of the potential application of AIBP by focusing on tannin containing resources and on their combined nutritional and sanitary values as nutraceuticals with potential AH activities against GINS of ruminants.

This review does not aim at being exhaustive. It will focus on a few numbers of selected models of AIBP obtained from different agro industries, in order to illustrate the diversity of AIBPS which can be exploited because of their bioactivity within a wide range of environmental conditions. Also it will be used as an example of a model of circular economy to exploit industrial wastes, including both economical and social issues [23]. For each example of selected AIBP, data will be provided to illustrate

- i) a summary of information on the geographical, historical and economical context for each type of production,
- ii) a summary of data illustrating the potential AH activity as well as some results on other antiparasitic effects (*e.g.* other helminths or protozoan infection)
- iii) to provide a critical evaluation on the on the phytochemical compounds whose role is suspected in the AH effects,
- iv) to illustrate the different modes of exploitation of these AIBP.

The conclusion will be dedicated to present besides the antiparasitic effects, some other interests to exploit the bioactivity of AIBP in an agroecological context especially by evoking their potential values in regard of ruminant production, nutrition and /or digestive physiology. We will also evoke possible further exploitations in other host livestock species (pigs, horses, poultry, rabbits) against other parasitic agents A general SWOT analysis will be provided based on a wide range of criteria (*e.g.* availability, cost, competition with other industries, other possible use in animal health) based on relevant information obtained/ discussed for each AIBP selected for this review.

THE DIFFERENT EXAMPLES of AIBP

1. AIBP of temperate nuts: chestnut and hazel nuts

Nuts are fruits composed of an edible seed (called « almonds ») and of hard shells which are non edible and which correspond to the pericarps composed of 3 separate layers
Hazel nuts (*Corylus avellana* L Betulaceae) and chestnuts (*Castanea sativa* Fagaceae) are two industries in southern Europe, China and Central Asia, USA (for hazel nut) and South

America (for Chestnut). In both cases, the the almonds are of high value for human consumption. However, the hard shell which is composed of the endocarp-meso and exocarps are usually considered as wastes although they might represent almost 15 to 20 % of the whole weight of the fruit (*e.g.* for chestnut). BP of hazel nuts whose activities will be described herein concern only the endocarps, for Chestnuts, the BPS have been usually a mixture of endocarps and mesocarps.

The presence of tannins in the barks of different trees (*e.g.* oak trees , chetsnut trees) of the family (Fabaceae) have been empirically exploited in Europe since the early ancient times in tanneries for leather production.

In addition, a study based on different *in vitro* assays [80] have confirmed the potential AH effects of extracts of leaves of hazel nut (HZN) and oak (*Quercus robur*) on the 3 main GIN genera of ruminants. These early results combined with the presence of condensed tannins in both hazel nuts' and chestnut peels explained the towards the bioactivity of BP of nuts' peels for potential related antiparasitic effects.

For both BPs of hazel nut and chestnut, several *in vitro* studies have reinforced the interest to include these resources in ruminants' feed for future use as nutraceuticals [39]. Different *in vitro* assays have been performed, *Haemonchus contortus* being usually the main model of GIN species [58] [10], although some studies have also included the intestinal species *T colubriformis* as a second nematode model [7], [26]. Moreover, the hypothesis of a suspected major role of tannins and polyphenols in these antiparasitic effects was confirmed by use of inhibitors such as PEG or PVPP [80], [7], [58].

In few of these *in vitro* studies, sainfoin extract s were included in the experimental design, allowing thus a comparison of values of Inhibitory Concentration fifty percent (IC 50) with hazel nut [10], [90] and chestnut extracts. Overall, lower EC50 values for the BP of nuts were obtained suggesting a higher AH activity than sainfoin used as a reference of a tanniferous Legume [40]. For example, the EC50 obtained with aqueous extracts defined on the larval exsheathment inhibition ranged from 47 to 104 µg/ml for HZN and 99 to 399 µg/ml for sainfoin [10]. Similar values of EC50 were obtained with Chestnut extracts (31 to 96 µg/ml) [26]. These *in vitro* studies have also allowed to explore the variability in AH efficacy for both HZN and CHN depending on a range of factors, namely the environmental conditions of production (*e.g.*, chestnuts

grown in France or in Chile), genetic factors (cultivars) and in the case of chestnuts, different technological processes applied to isolate the almonds (fruits/ seeds).

For both types of by products, confirmation of these AH properties have then been obtained *in vivo*. When HZN peels were distributed to goats experimentally infected with *H. contortus* and *T. colubriformis* a significant reduction > 50 % in FEC was observed which was related to a decrease in the fertility of female *Haemonchus*. In addition, a non-significant reduction by 45 % in *T. colubriformis* population was also found [27]. In a second step, the distribution of HZN peels in goats targeting the early phase of infection lead to decreases by 48 % and 42 % in the establishment of third stage larvae for each species. One of the information of the study was the ability of goats to ingest directly the HZN peels up to 350 g per day following a period of adaptation. According to the same design, similar results (decrease by 40 % in FEC) were obtained in lambs with a consumption of peels limited to 140 g.

The interest to add HZN peels in lambs diets infected with *H. contortus*, was confirmed in another study indicating that the addition of HZN peels to sainfoin pellets permitted to obtain significant decreases by 50 to 60 % in egg excretion but without any difference in worm numbers [32]. However, other studies [90], examining the AH consequences of prolonged distribution of HZ peels to infected lambs did not provoke any significant changes in the egg excretion for *Haemonchus* and only some significant decrease in egg excretion and female fertility for *T. colubriformis*.

The interest to combine tannins of 2 different resource was again illustrated in a recent study examining the AH effects when incorporating the chestnut (CHN) peels in sainfoin pellets in the diets of lambs infected with both abomasal and intestinal species [60]. With the sole tannins of CHN, the effects on egg excretion were non significant. However, the combination between sainfoin and CHN by products was associated with some significant effects and some favourable consequences on the host resilience (lower anemia).

The availability of CT of AIBP of CHN and HZN tannin has also been useful for some basic studies. It has permitted to better understand the mode of action of tannins on different GIN stages and/or species, in particular by comparison with data obtained with CT containing Legume (*e.g.* sainfoin). The hypothesis of a direct mode of action of tannins against nematodes has been confirmed by results of several *in vitro* studies,

completed by examination of structural changes based on observation with scanning and transmission electron microscopy [41]. The results showed that changes occurred in the cuticle of adult worms when compared to the consequences after exposure to sainfoin extracts [61] [62].

Several studies have provided information not only on the quantity of tannins and polyphenols contents but also on the qualitative characterization of both CHN and HZN peels, namely the Prodelphinidins/Procyanidin ratio, the mean degree of polymerization (mdp) and the cis/ trans ratio [90]. Because some of these studies have also included data on sainfoin, and other CT containing fodders, in relation with an evaluation of the AH effects, the results helped at addressing the basic questions of the structure-AH activities relationship and at analysing the factors modulating the antiparasitic effects [71]. Last, the comparison between a fodder (sainfoin) and HZN peel has also been performed to examine the distribution and fate of the 2 sorts of tannins in the different segments of the sheep' digestive tract [89].

An UPLC-MS/MS phytochemical analysis have been performed to characterise a variety of chestnut BP from different geographical origins and obtained by applying different technological processes (heat vs micro wave). **To summarize, the main** results show the main presence of both CTs and both ellagic and gallic acids, evoking the co presence of some hydrolysable tannins. The characterisation of CT on 8 samples suggest usually a higher % of Prodelphinidins (PD) compared to % of procyanidins (PC), the PD % ranging from 46% to 84% compared to 54 % to 16%. The mean degree of polymerisation (mDP) was evaluated at 14,76 and the content ranging from 1,01 to 4,01 g per 100 g DM. (JP Salminen personal communication)

For Hazel nut peels, the main PSMs have been identified as being oligomeric and polymeric condensed tannins.

Based on a method of thiolytic degradation coupled with HPLC, the content of tannins in hazel peels was evaluated at values of 6,27 g of proanthocyanindin per 100 g DM (for comparative values of 1,71 in sainfoin). The CT of hazel nuts peels were characterised as a majority of Prodelphinidins (the PC / PD Ratio being estimated at approx 72/ 28 respectively) with a mean degree of polymerisation (mdp) estimated at

13,3 [89]. Moreover, the CT of hazel nuts endocarps were also characterised by a high level of galloyated flavonoids.

By comparison to the bulk of results obtained with tannin containing Legume fodders like sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) or sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*), the results obtained with AIBP of both HZN and CHN remained limited. However; they have led to confirm the interest of CT containing resources in the control of GINS and have also illustrated the proof of concept to exploit tannin containing AIBP of nuts. The early results with chestnut and hazel nut has led to further studies with BP of other nuts industry like shea nut (*Vitellaria paradoxa*, Fam Sapotaceae) [92] peanut (*Arachis hypogaea*; Fam, Fabaceae) [55] or wall nut (*Juglans sp*, Fam Juglandaceae).

2. AIBP of mediterranean areas: AH effects of carob pods by products (BP(CaBP))

Carob (*Ceratonia siliqua*) is a leguminous tree that is traditionally found in the Mediterranean area. Spain is the main producer and exporter followed by Italy, Morocco, Portugal, Greece, Turkey and Cyprus. However spread occurs in areas with similar climate like South-East US, Australia, South Africa [8]. Carob fruit is a brown pod whose main raw material used in industry consists of the pulp (90% of pod weight) and the seeds. Carob pulp has a high content of sugar (48–56%) and a relatively low content of fats (0.4–0.8%) and protein (3–4%) [59] [8].

Carob trees have been considered for centuries as a cheap source for both human and animal nutrition. Since they are mostly cultivated in dry areas with low rainfall, they don't require any significant attention and they live up to 150 years [36], [91], [59]. Nowadays, carobs are used in either food, pharmaceutical or cosmetic industries [47] [105] and represent a fast-growing industry since carob products have recently receive attention due to important nutritional and medicinal properties for humans [99]. BP of carob (CaBP) described herein concern the seedless carob fruit called "pulp", which is crashed and is traditionnally added in animal feed.

Carob tree parts (pod, seeds, germ, leaves and tree barks) are significant sources of polyphenolic compounds such as gallic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechingallate, (-)-epigallocatechin, (-)- epigallocatechingallate, myricetin, quercetin and their derivatives, and other tannin compounds.

Carob pod contains a higher amount of polyphenols in comparison to seeds or germ [99]. Although a higher level of condensed than hydrolyzable tannins is present, their reported concentration varies [11] [8] have reported concentrations of 16–20% w/w DM CTs in ripe carob pods. This has been debated by Priolo et al. (2000, 2002) [87] [88] who claimed that the pods have low content of CTs, but with exceptionally high biological activity. Silanikove et al. (2006) [98] have demonstrated that the yield of CTs is considerably affected by the extraction method applied (from 5.0% with acidic methanol to 17.2% with urea-buffer solution), suggesting that carob pods are a rich source of CTs. Similarly, Saratsi et al., (2020) [96] reported 5.84 g CT/100 g DW with acetone-HCl/butanol method and 7.20 g CT/100 g DW based on the thiolysis methodology.

There is only one *in-vitro* study testing the anthelmintic efficacy of carob pods. In this study the Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA) was used to test the anthelmintic effect of CaBP against *H. contortus* and *T. colubriformis* larvae. The results showed no effect against *H. contortus* however a noteworthy effect against *T. colubriformis*. Specifically, when larvae were exposed to an extract concentration of 1200 µg/mL, only 40.57 % of L3 of *T. colubriformis* were exsheathed having an estimated EC50-value of 1163.85 µg/mL [95].

Confirmation of AH properties of CaBP have then been obtained *in vivo*. CaBP meal was incorporated in the ration of sheep experimentally infected with *H. contortus* and *T. colubriformis* a significant reduction > 39 % in FEC was observed which was related mainly to a decrease in fertility of female and to a lower degree in the number of adult *parasites*. Moreover, the hypothesis of a suspected major role of tannins and polyphenols in these antiparasitic effects was confirmed by use of inhibitors such as PEG [96]. Particularly for *H. contortus*, it appears that fecundity is only affected when the worms are exposed to CTs during maturation and not when they are already mature adults. On the other hand, when CaBP was consumed for two weeks by animals in which adult worm populations were already established and patent, the main finding was a significant decrease in *H. contortus* worm counts. Overall, the current study adds further support to the observation that most of the CT effect is related to abomasal parasite – and not so much to the small intestinal parasites [96]. In one of the above-mentioned trials, a combination in the feed of a fodder (sainfoin) and a BP (CaBP) was offered to

the animals to investigate if different tannin sources can act synergistically. No synergistic effect was recorded [96].

The main tannins of Carob are Condensed Tannins whose PC/PD Ratio has been to approximate 3.3/96.7 and a mean degree of polymerisation (mdp) 31.2 associated with a % galloylation close to 41.1.

3. AIBP Products from trees from temperate areas against parasites/GIN

The tree industry is large in Northern European countries within the temperate climate zone. In Norway, Sweden and Finland, large amounts of coniferous trees (mainly Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Norway spruce (*Picea abies*)) and smaller amounts of downy birch (*Betula pubescens*) are harvested annually, mainly for use as building material and pulp for paper production. This results in large amounts of bark as an unexploited by-product of which a major part (60%) is used for bioenergy. In 2019, Norway alone had an estimated production of 0.22 mio. t of wet bark from pine and spruce (Prosess21, 2020). Denmark also utilises various fast-growing deciduous trees (e.g. willow (*Salix spp.*), hazel tree (*Corylus spp.*), and poplar (*Populus spp.*) for bioenergy, and leaves and branches of these species have been used for centuries as winter-feeding of livestock (Larsen et al., 2021) [50].

Seen in a historical perspective, several tree species have been used as medicine in temperate Europe. Willow bark, various concoctions of pine (bark, needles, and buds) and birch leaves were used for treating urinary tract infections, upper respiratory infections, or mild rheumatism [93]. Similarly, helminth infections of humans or livestock, mainly horses, were traditionally treated with bark or other products of various tree species, e.g. *P. abies*, *P. sylvestris*, juniper (*Juniperus communis*), *Salix spp.*, and *B. pubescens* [111]

The bark of several coniferous species and some deciduous trees growing in the temperate climate zone is rich in CT, predominantly procyanidins (PC) of short-medium degree of polymerisation (mDP). For example, extracts of *P. sylvestris* were reported to contain 3-8% CT comprised of 100% PC with an mDP of 6-7, and *P. abies* contained 1-7% CT comprised of 80-100% PC and 7-8 mDP [9]. Similarly, extracts of willow bark contained 14.6% CT with 100% PC and 4.6 mDP (Ropiak et al., 2016). Other studies have indicated a higher proportion of PD (up to 50%) in extracts of various parts of deciduous trees (e.g. hazel, birch, walnut, and catkins) and twigs of [27].

In general, high levels of anti-parasitic effects *in vitro* from acetone-water extracts of plants have been associated with both a high proportion of PD and a high mDP of the CT within the extract [90] [27]. Similarly, other biological activities of CT, such as *in vitro* immune-modulating activity, is stronger in molecules with an mDP >6 compared to CT with lower mDP [112]. However, several extracts from tree species with high PC levels still had marked anti-parasitic effects [27]. This offers large potential also for the woody species. Consistent with this, *in vitro* activity against ruminant nematodes has been demonstrated for extracts of different parts of a range tree species, including *Betula*, *Castanea*, *Corylus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix* and *Tilia* spp. [80] [68] [90] [27] [38]. More recently, it was demonstrated that acetone-water-extracted bark from *P. abies*, *P. sylvestris*, and *B. pubescens* inhibited egg hatching of *Teladorsagia circumcincta* by 85-100% (Athanasiadou et al., 2021).

Promising *in vivo* results have been obtained in trials with *Salix* spp. in infected sheep either fed chopped willow branches (up to 5 mm thick) with leaves [72] or browsing on young willow shoots up to 1 m tall [29] [73] resulting in a high daily intake of CT. Reduced dag scores (*i.e.* less soiling of hindquarters) have been found consistently while reductions in FEC have been observed, although moderate and variable. Examinations of worm burdens post-mortem have shown reduced levels of abomasal nematodes, particularly *H. contortus*, and *Cooperia* spp. [72] or of small intestinal nematodes only [29].

However, in order to utilize a highly accessible by-product, the use of bark of coniferous species is likely to be increasingly relevant. Min et al. (2015) [64] found that feeding pine bark powder in the diet (3.2% CT in diet DM) to goats experimentally infected with *H. contortus* reduced worm burdens by 68% and FEC up to 30%, without negative impacts on body weight or condition. Furthermore, Wright (2015) [113] found that *H. contortus* infected goats had a lower FEC and worm burden when fed a CT-rich diet consisting of a mixture of loblolly pine (*P. taeda*; native to the Southern USA) bark powder and *Lespedeza cuneata* pellets, both compared to the separate pine bark and *L. cuneata* diets, and a control group fed diets lacking in CT. These results suggest a synergistic effect between components in *P. taeda* bark and *L. cuneata* when fed in a mixed diet. Moreover, CT in the diet enhanced the immune functions of the host.

Bark extracts have also shown activity against other parasites than nematodes. Teichmann et al. (2016) [102] found that bark extracts from *Salix spp.* inhibited *Cryptosporidium parvum* in cell cultures. More recently, it has been shown that acetone extracts of pine bark (*P. sylvestris*) may inhibit *C. parvum* growth in cell culture with IC50 of 25.4 µg CT/mL [9], thus supporting an earlier trial finding reductions in the faecal oocyst counts of *C. parvum* infected mice offered a commercial pine bark (*P. pinaster*) product [45]. Further, a water extract of *P. radiata* inhibited the sporulation of *Eimeria* coccidia by up to 84% [69]. Anti-cestodal effects of pine bark have also been demonstrated, as Dhakal et al. (2015) [28] found inhibition of *Hymenolepis diminuta* cysticercoïd excystation in the same dose dependent manner as the registered pharmaceutical drug praziquantel. They concluded that PC inhibited excystation more effectively than PD tannins, which is partially supported by the above for nematodes.

In brief, it seems likely that there is scope for development of anti-parasitic products from the readily available bark of coniferous trees. Despite the current paradigm of PD-rich extracts being the most efficacious anti-nematodal compounds, extracts rich in PC may still hold promise. In other parasitic infections, PC-rich extracts may even prove to be superior. However, as bark from the wood industry, particularly conifers, will in most cases have low digestibility and not be practical directly as livestock feed, extraction is necessary in order to get a usable product. Extraction with organic solvents, as applied in most experimental studies, is impractical and expensive. Water extraction is most likely the only way forward, as already practiced in commercial production of CT from *Acacia spp.* in the tropics [75].

This will probably result in a different composition of CT as well as substantially lower yields. Contamination of bark products with soil and sand is also a major challenge [100]. It is important that future research will address these important issues in order to make bark-products a viable option for parasite prevention in livestock.

4. By-products from bark and wood industry in tropical and subtropical regions

Global harvest and the production of wood products, mainly wood-panels, sawn wood, paper, and paperboard, have risen markedly in the last six decades, and the projections show that this trend will continue to increase in the next years [44]. Tannins are some of the main by products derived of wood production which can led to significant added values. They became a relatively newer industry used in leather, oil,

wine, beer, ceramic production, preparation of plastics and adhesives, water, wastewater treatment and other applications [86] [49].

Condensed tannin is the main chemical group produced with 90% of the global tannin output, and annual production reaches up to 200,000 tons. The production of tree and consequently related tannins from its barks or woods have regional characteristics, being black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin mainly manufactured in Brazil, South Africa, India, and other tropical countries, and Quebracho (*Schinopsis spp.*) tannin mainly manufactured in Argentina [30].

Species of Acacia are responsible for 9.7% of the tropical and subtropical tree plantations. Black wattle (*A. mearnsii*) is the main species grown commercially on an international scale [108] [19]. Wattle tannin is commercially produced by extracting *A. mearnsii* bark with hot water, with condensed tannin as the major component [75]. This aspect makes *A. mearnsii* bark extract an excellent source of condensed tannins to control gastrointestinal nematodes in livestock, including ruminants.

Extract of *A. mearnsii* bark has been shown *in vitro* effective against *H. contortus*, *Trichostrongylus vitrinus*, and *Teladorsagia circumcincta* using the feeding larvae inhibition assay [67]. Despite published, the *in vitro* effect of extract of *A. mearnsii* bark on egg hatch and larvae migration is low, with IC50 of 2.8 and 12.4 mg/mL, respectively [114]. However, *H. contortus* adult cuticle's ultrastructural changes had been shown after exposure to tannins [115].

The feed intake of *A. mearnsii* bark by sheep and goats reduced the animals' feces' gastrointestinal nematode egg count [16], [65],[24]. Also, it reduced the egg viability and consequently the quantity of L3 from eggs collected of animals fed with *A. mearnsii* bark extract [66]. These results open the perspective to the impact of feed intake of such tannins in reducing infective larvae on the pasture and, consequently, animal reinfection. Also, the *T. colubriformis* and *Cooperia* sp. adults were reduced in sheep that received *A. mearnsii* bark extracts ([16] but did not reduce *H. contortus*, *T. colubriformis*, and *Oesophagostomum columbianum* adult worms in goats [24]. It has also been shown that the use of *A. mearnsii* bark did not alter the blood parameters and carcass measurements of sheep and goats naturally or experimentally infected with nematodes [16], [65],[24], [66].

Condensed tannin of *A. mearnsii* intake had been shown to reduce methane emission in cows and sheep [3], [2]. However, this reduction was not observed in sheep infected with gastrointestinal nematodes *T. colubriformis* and *H. contortus* [53]. *A. mearnsii* supplementation also affected the structure of the ruminal microbial community and modulates important microbes groups affected by gastrointestinal nematodes infection in lambs [22]. This bioactivity increase the beneficial effects of feed intake of *A. mearnsii* in animal production.

Quebracho (is one of the most important species in the tannin industry, mainly in Latin America, where it comes from barks of different trees of the genus *Schinopsis spp.* [43]. The condensed tannin concentration ranges from 35 to 73% depending on quebracho extracts [54],[4],[6]. The CT of quebracho are usually described as profenitidins. The high production and concentration of CTs make the quebracho extracts an excellent candidate to use in the field as a nutraceutical to ruminants.

Quebracho extracts have shown activity against *H. contortus*, *T. circumcincta*, and *T. vitrinus* using the larval migration and the larval development assays [76], [4]. The *in vivo* results showed the efficacy of quebracho extract in sheep infected by *H. contortus*, *T. colubriformis*, and *Nematodirus battus*. However, they are contradictory in the mechanism of action, with the reduction of egg output being the more substantial result [63], [4], [5]. In goats, the effect of administration of quebracho extracts on *T. colubriformis* and *T. circumcincta* egg excretion was shown, but not on *H. contortus* [79], [82], [81].

On the other way, quebracho supplementation has reduced the excretion of *Eimeria* oocyst of lambs and goat kids but not reduce clinical signs of coccidiosis [1]. These results showed the importance of more studies with other parasites as potential targets of condensed tannin. To evaluate the possible impact on specific and non-specific immunological responses are worth to be examined.

Tropical regions. The tannin from these species has been shown of potential use to control gastrointestinal nematodes in ruminants and should be used as a nutraceutical to improve livestock production.

It is essential to highlight several factors as dosage, nematode, and host species. The cost of condensed tannin source in the region should be observed before planning the

use of this compound as a nutraceutical in livestock. The use of by-products with a high concentration of tannin makes the livestock more sustainable with low residues in meat and milk production and low environmental impact

5. AIBP from other (non bark) tropical resources

Several polyphenol rich materials from temperate origin have been proposed aiming to achieve an added value for some of those materials that are currently considered a waste that needs to be discarded in a way that does not affect the environment. A similar approach has been proposed for tropical regions. However, this search has also been prompted by a recent discovery: a *H. contortus* isolate from México showing lower susceptibility to polyphenol rich acetone:water extracts produced from leaves of plants commonly ingested by local sheep or goats [13], [106], [18]. These authors proposed that the *H. contortus* isolate obtained from animals browsing the tropical forest of México show some level of adaptation to plant polyphenols, possibly due to the constant exposure of the local gastrointestinal nematodes to the polyphenol rich vegetation consumed by the hosts browsing the tropical forest.

The latter stimulated the quest for polyphenol rich plant materials that can be used as ruminant feeds, but which are not included in the normal diet of grazing ruminants. That search commenced by testing polyphenol rich plant materials which are not part of the normal diet of ruminants, such as mangrove leaves and locally available AIBP as the *Coffea arabica* spent coffee grounds (SCG) or *Theobroma cacao* pod husks and leaves.

These materials were confronted with a second criterion: the chemical composition of the tested AIBP should be suitable for ruminant nutrition. A third criterion consisted in the acceptable consumption of the respective AIBP by ruminants. These three criteria were met both for the SCG and the *T. cacao* leaves [51], [78], [57].

Evidence of anthelmintic activity of Spent Coffee Grounds.

The *in vitro* evidence of AH activity against *H. contortus* eggs and L3 larvae of different SCG varieties is shown in Table X1. Different tests showed activity using the EHT, with promising results [51], although poor results were also found for eggs [106]. The larvae exsheathment inhibition test (LEIT) showed variation in the activity against L3 when using acetone:water extracts obtained from different SCG varieties from

México. The *in vitro* activity also varied when using different *H. contortus* isolates, with stronger activity observed for parasites of French origin, and lower activity for parasites from Yucatán, México [107]. The latter was expected, the *H. contortus* isolates obtained from animals raised in the tropical forest of México showed lower susceptibility to polyphenol rich extracts compared to European isolates as explained before.

The *in vivo* evidence of AH activity against *H. contortus* or natural GIN infections in sheep and goats consuming different quantities of SCG is shown in Table X2. From the first attempt, it was possible to confirm that sheep and goats are able to consume a considerable quantity of SCG mixed in the concentrate feed used by these animals (from 10% to 40% of the concentrate feed). Addition of SCG was easier in goats as it was possible to reach up to 40% of the concentrate feed. Meanwhile, the studies with sheep could only include 10% of diet.

The latter is consistent with recent studies showing a greater ability of adult goats to eat more polyphenol rich materials compared to adult sheep [35], [109] and the same was recently found for weaned animals [42]. The study with naturally infected goats showed non-significant EPG reductions (25-27% compared to the control diet) after three weeks of ingestion of a feed containing SCG [51]. The second study by Palomo-Couoh et al. (2012) showed that *H. contortus* infected goat kids consuming SCG for 4 weeks reduced EPG by 69%, and the worm female fecundity by 51% compared to kids consuming the control diet.

One study with sheep reported a significant reduction of EPG and worm fecundity [25] but in a second study, no AH activity was found although the same quantity of SCG was applied as in the first sheep trial [77]. The difference in the results between both studies could be associated with the *H. contortus* isolate used. The first study used the FESC-UNAM isolate, which is susceptible to polyphenols, and the second study used the Paraiso isolate which is a polyphenol resistant isolate [17].

Evidence of AH activity of T. cacao leaves and pod husks.

An early study reported that extracts obtained from *T. cacao* pod husks and seed husks (seed peels) displayed a limited ovicidal activity (eggs remaining as morula) against *H. contortus* eggs from a dose of 600 µg/mL or 2400 µg/mL, respectively. However, that same study also showed that the main activity against eggs consisted in blocking the hatching of larvae formed within eggs. Such activity was described as larvae failing [106].

A second study evaluated the *in vitro* AH activity against *H. contortus* eggs using respective acetone:water extracts obtained from the leaves and pod husks of three *T. cacao* Mexican varieties. The AH activity against eggs was more evident for the FESC *H. contortus* isolate, with EC50 values < 442 µg/mL for husk and leaf extracts. Meanwhile, the activity against eggs for the Paraiso isolate ranged from 2172 to 700.2 µg/mL in the husk extracts, and from 1115.5 to 684.8 µg/mL for the leaf extracts [57]. The use of PVPP showed that the activity of the *T. cacao* extracts against eggs was not associated to the polyphenols contained in extracts. Thus, secondary compounds responsible for the activity against eggs are yet to be elucidated.

The same pod husk and leaf extracts from different *T. cacao* varieties were also used to evaluate their exsheathment inhibition activity against *H. contortus* L3 [57]. The EC50 values of husk extracts ranged from 630.5 to 554.0 µg/mL in the FESC isolate, and from 1068.3 to 472.7 µg/mL in the Paraiso isolate. Meanwhile, the EC50 values of leaf extracts ranged from 333.7 to 264.2 µg/mL in the FESC isolate, and from 250.2 to 192.9 µg/mL in the Paraiso isolate. These results clearly show that the *T. cacao* extracts have stronger exsheathment inhibition activity compared to the activity against eggs of *H. contortus*. Besides, the use of PVPP suggested that the exsheathment inhibition was not associated with polyphenols for pod husk extracts of Azteca and Calabacillo varieties.

The first *in vitro* evidence of AH activity against *Trichostrongylus colubriformis* was recently obtained using acetone:water *T. cacao* leaf extracts [56]. The Calabacillo and Azteca extracts showed similar activities (EC50=335.8 µg/mL, CI95% 309-362.6 and EC50=387.3 µg/mL, CI95% 352.5-422.2, respectively). Meanwhile, the Ceylan extract showed the best exsheathment inhibition activity (EC50=185.6 µg/mL, CI95% 165.8-205.4). This study confirmed that the *T. cacao* leaf extracts showed good AH activity against *T. colubriformis*. Variation in activity suggests that some *T. cacao* varieties could provide better activity than others, and that should be considered when testing under *in vivo* conditions.

A recent study determined the *in vivo* nutraceutical value of *T. cacao* leaves against natural gastrointestinal nematodes (GIN) infections of goats [31]. The *T. cacao* leaves (Criollo variety) were harvested and dried indoors at room temperature. The experimental goats consumed the dry *T. cacao* leaves (TCG) for 9 days and a control group (CG) consumed a conventional diet.

The animals consuming the *T. cacao* leaves were purposely hosting a larger natural GIN infection (mean of 2228 ± 28 EPG), while the CG hosted a milder GIN infection (mean of 709 ± 9 EPG). The inclusion of *T. cacao* leaves did not affect the productivity of goats which were able to consume >300 g DM of leaves /day. Such high consumption displayed by TCG goats did not affect PCV or LW, but reduced EPG by 78% compared to CG goats ($P > 0.05$). Thus, *T. cacao* leaves were confirmed as a nutraceutical candidate against natural GIN infections in goats.

Table 1. *In vitro* anthelmintic activity of different varieties of spent coffee ground acetone:water extracts against *H. contortus* eggs and L3 of different origins.

The condensed tannin content of each extract (Catechin equivalent) is also included as well as the confirmation of the role of polyphenols in the *in vitro* activity using polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).

| Varieties of Mexican <i>Coffea arabica</i> | <i>In vitro</i> test | <i>Haemonchus contortus</i> Isolate | Condensed tannin content | AH activity (%) | Effective concentration 50% (95% confidence interval) in µg/mL | Confirmed role of polyphenols | Reference |
|--|----------------------|--|--|--|--|-------------------------------|-----------|
| Tazza® Veracruz Tazza® Oaxaca Tazza® Chiapas Garat® Garat® Décaf Inter® Décaf Starbucks® SG Starbucks® CS | EHT at 2400 µg/mL | CENID-INIFAP | 5.58 6.33 5.89 2.02 6.20 1.00 2.66 2.28 | 91.6 <u>53.7</u> <u>91.6</u> 92.8 94.9 87.3 92.4 57.7 | | No | [51] |
| Garat® | EHT | CENID-INIFAP | 2.02 | No activity | | PVPP | [106] |
| Garat® | LEIT at 1200 µg/mL | FESC-UNAM CENID-INIFAP Poxila INRA Sheep France | 2.02 | 93.9 98.0 86.0 100.0 100.0 | | PVPP | [107] |
| Starbucks® CS Starbucks® SG | LEIT | FESC-UNAM | 2.28 2.66 | | 266.56 (221.86 - 309.91) 176.1 (108.55 - 239.99) | PVPP | [25] |
| Starbucks® CS Starbucks® SG | LEIT | Paraiso | 2.28 2.66 | | 699.28 (571.31 - 871.04) 746.11 (471.35 - 879.44) | PVPP | [77] |

Table 2. *In vivo* anthelmintic activity against gastrointestinal nematode infections using different types of spent coffee ground mixed within the feed of goats and sheep. The condensed tannin content of each extract (catechin equivalent) is also included as well as the confirmation of the role of polyphenols in the *in vivo* activity using polyethylene glycol (PEG). * Significant at P < 0.05

| Varieties of Mexican Coffea arabica | Animal species | Gastrointestinal nematode infection | Condensed tannin content of SCG | Inclusion level of SCG | Activity | Confirmed role of polyphenols | Reference |
|--------------------------------------|----------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---|-------------------------------|-----------|
| Garat® | Goats | Natural mixed infection | 2.69% | 15% 30% of Concentrate | 25% EPG reduction 27 % EPG reduction (Non-significant) | No | [51] |
| Garat® | Goats | FMVZ-UADY | 5.84% | 40% of concentrate | 69% EPG reduction* 51% fecundity reduction | PEG | [78] |
| Starbucks® CS Starbucks® SG | Sheep | FESC-UNAM | 19.6% | 10% of diet | 25% EPG reduction* 26% fecundity reduction* | PEG | [25] |
| Starbucks® CS Starbucks® SG | Sheep | Paraiso | 19.6% | 10% of diet | No EPG reduction | PEG | [85] |

The different modes of exploitation of AIBP of tropical origins

The idea behind the use of AIBP obtained from *T. cacao* and *C. arabica* may follow very different paths. We propose using the leaves and pod husks that are produced by the *T. cacao* farmers, which could represent an added value for these two AIBP of *T. cacao*. Thus, the proposal built around the AIBP of the *T. cacao* should directly link cocoa farmers with ruminant farmers. On the other hand, our proposal around the *C. arabica* refers to the use of the SCG, which is the by product that results from the brewing of grounded coffee at the smallest scale (home brewing), at coffee shops worldwide, or even the possibility of using that material at an industrial scale where instant coffee is produced. The *C. arabica* SCG approach could be applicable also for small-scale farmers who may use their own coffee waste brewed at home, or may involve linking the AIBP of coffee shops of industries with a large sheep or goat farm, or with groups of small to medium size farmers that could share the product in a more standardized manner.

CONCLUSIONS / SUMMARY

The selection of the different AIBP for this review aimed first at illustrating the worldwide of tannin containing by products corresponding to the worldwide distribution of GINs in ruminants. Besides this first objective, the different selected examples also aimed at illustrating the diversity of mode of applications of these resources as nutraceuticals depending whether they have some nutritional value and on the voluntary feed intake by sheep, goats or cattle. These various options are namely

- i) direct consumption of the AIBPs as potential nutraceuticals
- ii) combination of the AIBP with a matrix of fodders (tannin containing or tannin free pellets) and/or
- iii) extraction of pure tannins from the AIBP.

To these different options correspond different pros and cons for each AIBP. This will be briefly summarized in the following general SWOT analysis which is proposed based on the previous specific contributions, a general SWOT analysis can be proposed to summarize the general pros and cons of AIBP depending on the various mode of use and according to both basic and applied researches.

- *STRENGTHS:*

As illustrated in this review, the proof of concept of AIBP has been applied worldwide. This is associated with the worldwide concomitant distribution of both GINs and tannins containing resources.

Overall, AIBPs represent potential low cost, locally available resources containing bioactive tannins which can be proposed to ruminants and can be used directly by farmers. One of the main advantages of AIBPs for any potential AH activity is to offer the opportunity to characterise them by measuring CTs and to evaluate their bioactivity (eg potential AH activity simple in vitro assays) before use. In case of direct use as nutraceuticals, an evaluation of the nutritional values is also feasible (e.g for carob, cocoa)

One of the main obvious advantages for the agro industries generating the by-products is to add values to resources which are usually considered as waste and otherwise represent a cost for those industries.

In some circumstances (e.g. coffee, cocoa or carob) AIBP offer options for organisation of short circuits of use and/or commercialisation implying or not local SMEs. To this respect, the potential use of AIBP in ruminant (or other livestock) production correspond to an example of circular economy in a context promoting an agroecological approach of animal production with lower reliance on chemical inputs. In the case of tropical resources, the manures of sheep and goats can represent a source of fertilizers for the coffee and cocoa

In regard of further basic researches, the diversity of AIBP represent a wide range of tannins and related compounds, with a diversity of structure. This should allow to better understand the mode of actions of these polyphenols against worms including potential synergistic interactions [46] as well as their possible effects on the host digestive physiology, including the microbiote and the local immunity (Williams et al

- *WEAKNESSES*

In the hypothesis of being used as nutraceuticals either directly or by incorporation in some other vegetal matrix (eg pellets of fodders to ensure an appropriate nutritional level), one of the main threat for the future use of AIBP relates to their acceptability by the different ruminant species. Palatability of the resources is

the first criteria to fulfil before being able to consider any sanitary effects. In the case of incorporation of AIBP in a matrix, the addition of flavours to stimulate VFI is an option. In the case of local use by farmers of non traditional resources; one weakness could be related to the reluctance to adapt to this novel exploitation. This could require some early involvement of technicians to explain the aim and to illustrate the potential benefits of incorporating AIBP in animal feed.

In the case of involvement of some industrial companies (SMEs or else), one weakness is the need to evaluate the sustainability of the economical market and also the possible hurdles to organise the collection, preparation, storage and distribution of the AIBP at different scales, which might suppose some investments and an evaluation of the risk/benefits.

The technological processes applied to prepare the different mode of use of AIBP will have to preserve the bioactive compounds. In addition, to ensure a constant quality and stability of the resources will also be one main issue to protect the health of animal but also consumers. For example, as illustrated with chestnuts byproducts, it has been shown that the mode of obtainment of the AIBP by technological processes involving or not water has main influences on the BP' s quality and on the future storage, conservation by avoiding or not contamination with fungi, moulds and potential mycotoxins. In the case of coffee and cocoa BP, potential contamination with soil and sand has also to be considered. Last, in the hypothesis of AIBP being considered as resources to extract purified tannins, the nature of the applied solvents can also represent a risk to evaluate.

- *OPPORTUNITIES*

The possible use of natural bioactive compounds to control main parasitic infections in grazing ruminants correspond to a general public demand to reduce the use of synthetic chemicals in agriculture and also to a general promotion of Organic Farming systems, especially in EU., aside the possible effects of CT containing forages to disturb the GINs biology, the various CT containing Legumes have also been associated with other beneficial impacts within the agro ecological context of livestock production [71]. Namely: **i)** some other sanitary effects in particular in regard of the health of the digestive tract: e.g., prevention of bloats in ruminants and also some anticoccidial

effects in both ruminants [12], [97] and or other species like rabbits for which the incorporation of chestnut BP combined with tannins of quebracho, have been associated with some anti coccidian effects in rabbits [83] confirming some previous results obtained with sainfoin [52]. In pigs, the incorporation of chesnut BP has also been associated with a regulation/prevention of diarrhoea [34]. ; **ii**) to limit the environmental consequences of ruminant production by limiting GHG emission, including CH₄ and NO². For example, the incorporation of HZN BP in basal feed of lambs was compared to sainfoin. With both resources, the results showed lower rumen fermentability and that CT decreased CH₄ production and protein degradability [74]; **iii**) on the quality of products (meat) [33], [88]. The effects of feeding HZN peels on dairy ewes performances and milk quality were recently examined [14] suggesting some favourable effects on the milk composition for human health.

- *THREATS*

Three main threats can be identified which challenge the potential use of tannin containing AIBP for the nutrition, health and production of livestock, in particular ruminants.

For the moment, most of the current studies on these bioactive resources rich in natural PSMs have focused on the efficacy against the gastro intestinal parasites (nematodes and/or coccidia). However, there is a lack of studies on the fate of residues in animal products. The issue of the regulation rules and of the qualification of these resources (additive, complementary feed, veterinary medicinal drugs (see EMA) can strongly affect the future development of such AIBP.

There is a general trend to identify polyphenols with anti oxidant properties. By essence, the described AIBP are derived from a first use for human use. However, some competition with a secondary use of AIBP for the cosmetic industry can also be foreseen.

Last, as evoked previously in the section on coffee and cocoa, the question of the possible development of resistance by GINs to tannins and polyphenols is pending. It has received yet some insights as previously mentioned, considering the long standing interactions between host/GINs and PSM in an evolution perspective. On the other hand, a current hypothesis on the mode of action of tannins and polyphenols on the different key stages (Egg, L3 and adult worms) of GINs seems pleiomorphic based on tannins-protein interactions [37]. This can limit the risks of development of resistance

to polyphenols in the worm populations. However this hypothesis needs to be challenged and confirmed by further basic studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This review is based upon work from COST Action COMBAR CA16230, supported by COST (European Cooperation in Science and 656 Technology). This is also part to the LIFE project MICLIFEED (LIFE20 CCM/GR/001703)

In addition and more specifically, the co-authors of France and Finland wish to thank the financial help of the COMBITAN F2E project. The co authors of Greece wish to thanks the financial help of Agro4Crete and SmartWaste project. The co authors of Denmark , Norway and Scotland wish to thank the financial help of the BarkCure project, funded by the Norwegian Research Council through the Bionær programme, grant number 268264. The co-authors of Mexico wish to thanks the financial help of Cátedras CONACYT (project 692). The co-authors of Brazil were financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, and the co-authors of Brazil and France wish to thanks the financial help of PROJECT France-Afrique Bresil. ERM acknowledges the support of UK Research and Innovation grant BB/S014748/1.

CONFLICT OF INTEREST

The authors claim that they do not have any conflict of interest

REFERENCES

1. Acharya M, Burke JM, Miller JE, Terrill TH, Wood EL, Muir JP. 2020. Quebracho tannins aid in the control of *Eimeria spp.* and gastrointestinal nematodes in lambs and goat kids. *Veterinary Parasitology*, 288.
2. Adejoro FA, Hassen A., Akanmu AM. 2019. Effect of lipid-encapsulated acacia tannin extract on feed intake, nutrient digestibility and methane emission in sheep. *Animals*, 863; <https://doi.org/10.3390/ani9110863>
3. Alves TP, Dall-Orsoletta AC, Ribeiro-Filho HMN. 2017. The effects of supplementing Acacia mearnsii tannin extract on dairy cow dry matter intake, milk production, and methane emission in a tropical pasture. *Tropical Animal Health and Production*, 49, 1663–1668.
4. Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001a. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *In vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99, 205–219.
5. Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001b. 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.
6. Athanasiadou S, Almvik M, Hellström J, Madland E, Simic N, Steinshamn H. 2021. Chemical analysis and anthelmintic activity against *Teladorsagia circumcincta* of Nordic bark extracts *in vitro*. *Parasitology*, (in press)
7. Auad P, Spier F, Gutterres M. 2020. Vegetable tannin composition and its association with the leather tanning effect. *Chemical Engineering Communications*, 207, 722–732. DOI: <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1618843>.
8. Bahuaud D., Martinez-Ortiz De Montellano C., Chauveau S., Prevot F., Torres Acosta JFJ, Fouraste I., Hoste H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.
9. Batlle, I., Tous, J., 1997. Carob tree (*Ceratonia siliqua* L): Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 17, Institute of plant genetics and crop plant research, Gatersleben/International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy 23pp.
10. Blomstrand BM, Enemark HL, Øines Ø, Steinshamn H, Aasen IM, Mahnert KC, Sørheim KM, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Woolsey ID. 2021. Extracts of pine bark (*Pinus sylvestris*) inhibit *Cryptosporidium parvum* growth in cell culture. *Parasitology Research*. Doi: 10.1007/s00436-021-07220-w.
11. Boudot C. 2014 Etude *in vitro* de l'activité anthelminthique de co-produits agro industriels riches en tanins et flavonoids. Report for the grade of Pharmacia Faculty of Pharmacy Université Paul Sabatier Toulouse 3.
12. Bravo L., Grades N., Saura-Calixto F. 1994. Composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida* L.): Comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Science Food Agriculture*. 65, 303–306. doi:10.1002/jsfa.2740650307
13. Burke JM., Miller JE., Terril TH., Orlik ST., Acharya M., Garza JJ., Mosjidis JA. 2013. Sericea lespedeza as an aid in the control of *Eimeria spp.* in lambs. *Veterinary Parasitology*, 193, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.046>

14. Calderón-Quintal JA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Alonso MA, Hoste H, Aguilar-Caballero AJ. 2010. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Archivos Medicina Veterinaria*, 42, 165- 171.
15. Campione A., Natalello A., Valenti, B., Luciano, G., Rufino-Moya PJ., Avondo M., Morbidini L., Pomente C., Krol B., Wilk M., Migdal P., Pauselli M. 2020. Effect of feeding hazelnut skin on animal performance, milk quality, and rumen fatty acids in lactating ewes *Animals* 10, DOI: 58810.3390/ani10040588.
16. Cenci FB, Louvandini H, McManus CM, Dell'Porto A, Costa DM, Araújo SC, Minho AP, Abdalla AL. 2007. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminths. *Veterinary Parasitology*, 144, 132–137. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.09.021.
17. Chan JM, Day P, Feely J, Thompson R, Little KM, Norris CH. 2015. *Acacia mearnsii* industry overview: current status, key research and development issues. *Southern Forests*, 77, 19-30. DOI: <https://doi.org/10.2989/20702620.2015.1006907>
18. Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Castañeda-Ramírez GS, Mathieu C, Vilarem G. 2016. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology* 217, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.001>
19. Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Castañeda-Ramírez GS, Vilarem G, Mathieu C, Hoste H. 2017. Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae. *Veterinary Parasitology* 240, 11–16.
20. Charlier J, Thamsborg SM, Bartley DJ, Skuce PJ, Kenyon F, Geurden T, Hoste H, Williams AR, Sotiraki S, Höglund J, Chartier C, Geldhof P, van Dijk J, Rinaldi L, Morgan ER, von Samson-Himmelstjerna G, Vercruysse J, Claerebout E. 2017. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transboundary and Emerging Disease*, 65, 217-234.
21. Charlier J., van der Voort M., Kenyon F., Skuce P., Vercruysse, J. 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology*, 30(7), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.009>
22. Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., Bali BE., Lachkar, M. 2011. Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 321-324.
23. Corrêa PS, Mendes LW, Lemos LN, Crouzoulon P, Niderkorn V, Hoste H, Costa-Júnior LM, Tsai SM, Faciola AP, Abdalla AL, Louvandini H. 2020. Tannin supplementation modulates the composition and function of ruminal microbiome in lambs infected with gastrointestinal nematodes. *FEMS Microbiology Ecology*, 96 DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa024>.
24. Correddu F, Lunesu MF, Buffa G, Atzori AS, Nudda A, Battacone G, Pulina G. 2020. Can agro-industrial by-products rich in polyphenols be advantageously used in the feeding and nutrition of dairy small ruminants? *Animals*. 10:131. doi:10.3390/ani10010131.
25. Costa-Júnior LM, Costa JS, Lôbo ÍCPD, Soares AMS, Abdala AL, Chaves DP, Batista Louvandini H. 2014. Long-term effects of drenches with condensed tannins from *Acacia mearnsii* on goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 205, 725–729. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.07.024.

26. Covarrubias-Cárdenas AG. 2013. Evaluación del efecto antihelmíntico de un subproducto de *Coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* susceptible a taninos. MSc Thesis. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
27. Covarrubias-Cárdenas AG, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. 2013. *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia pennatula* and *Coffea arabica* extracts on *Haemonchus contortus* sensitive to tannins. In: Proceedings of the 7th Novel Approaches Meeting with a session of the CA- PARA COST ACTION "Goat parasite interaction: from knowledge to control". Toulouse, France.
28. Dahal J., Ketavong S., Pardo E., Barbier E., Gay M., Jean H., Niderkorn V., Hoste H. 2018. *In vitro* screening of the anthelmintic effects of by-products from the chestnut industry against parasitic nematodes of sheep and goats EAAP 69th Conference 27th-30th August Dubrovnik Croatia.
29. Das AK, Islam N, Faruk O, Ashduzzaman M, Dungani R, Rosamah E, Hartati S, Rumidatul A. 2020. Hardwood tannin: sources, utilizations, and prospects in Tann. - Struct. Prop. Biol. Prop. Curr. Knowl., Aires A, Editor. IntechOpen. p. 1854–1858. DOI: 10.5772/intechopen.86003
30. Desrues O, Fryganas C, Ropiak HM, Mueller-Harvey I, Enemark HL, Thamsborg SM. 2016. Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on *in vitro* anthelmintic activity against bovine nematodes. *Parasitology*, 143, 444–454.
31. Desrues O, Vargas-Magana J., Girard M., Manolaraki F., Pardo E., Mathieu C., Vilarem G., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval Castro C.A., Jean H., Hoste H. 2012 Can hazelnut peels be used to control gastrointestinal nematodes in goats ? 11th International Goat Association (IGA) Conference. 4th CAPARA Conference Las Canarias Sept 2012 Book of abstract p 44.
32. Dhakal, S. Meyling NV, Williams AR, Mueller-Harvey I, Fryganas C, Kapel CMO, Fredensborg BL. 2015. Efficacy of condensed tannins against larval *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) *in vitro* and in the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera) *in vivo*. *Veterinary Parasitology*, 207, 49–55. Doi: 10.1016/j.vetpar.2014.11.006.
33. Diaz Lira CM, Barry TN, Pomroy WE, McWilliam EL, López-Villalobos N. 2008. Willow (*Salix spp.*) fodder blocks for growth and sustainable management of internal parasites in grazing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 141, 61–81.
34. García-Ceballos et al., 2019. García-Ceballos CA, Ventura-Cordero J, Mendoza-López GF, González-Pech PG, Mancilla-Montelongo MG, Castañeda- Ramírez GS, Capetillo-Leal CM, Torres- Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA. 2018. Evaluación de la inclusión de hojas de *Theobroma cacao* en la dieta de cabras. Ponencia. V Seminario Internacional y VI Nacional de Investigadores en Salud y Producción Animal SENISPA. Tunja, Boyacá, Colombia.
35. Girard M., Dohme-Meier F., Silacci P., Kragten SA., Kreutzer M., Bee G. 2016. Forage legumes rich in condensed tannins may increase n-3 fatty acid levels and sensory quality of lamb meat. *Journal Science Food Agriculture*, 96, 6, 1923-1933. DOI 10.1002/jfsa.7298
36. Girard M., Thanner S., Pradervand T., Hu D., Ollagnier C., Bee G. 2018. Hydrolysable chestnut tannins for reduction of postweaning diarrhea: Efficacy on an experimental ETEC F4 model. *Plos ONE* 13(5): e0197878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197878>

37. Girard M., Gaid S., Mathieu C., Vilarem G., Gerfault V., Routier M., Gombault P., Pardo E., Manolaraki F., Hoste H. 2013. Effects of different proportions of sainfoin pellets combined with hazel nut peels on infected lambs. 64th EAAP Conference, Nantes, 26th -30th August 2013. Book of abstract p 506.
38. González-Pech PG, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Tun-Garrido J. 2015. Feeding behavior of sheep and goats in a deciduous tropical forest during the dry season: the same menu consumed differently. *Small Ruminant Research* 133, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.08.020>.
39. Hajaji H. E., Lachkar N., Alaoui, K., Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., Bali BE., Lachkar M. 2011. Antioxydant activity, phytochemical screening and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 321-324.
40. Hernández-Orduño G, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Reyes-Ramírez R., Hoste H, Calderón-Quintal JA. 2008. *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gauderi*, *Havardia albicans* and quebracho tannin extracts on a mexican strain of *Haemonchus contortus* L3 larvae. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8, 191–197.
41. Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg Sm., Hoskin So. 2006. The effects of tannin rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* 32, 253-261.
42. Hoste H., Torres-Acosta Jf., Alonso-Díaz Ma., Brunet S. Sandoval-Castro C., Houzangbe Adote S. 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastro intestinal nematodes in small ruminants. *Tropical Biomedicine* 25, 56-72.
43. Hoste H., Martínez Ortiz-De-Montellano C., Manolaraki F., Brunet S., Ojeda-Robertos N., Fourquaux I., Torres-Acosta JFJ., Sandoval-Castro C. 2012. Direct and indirect effects of bioactive legume forages against parasitic infections: experiences with tropical and temperate forages. *Veterinary Parasitology*, 186, 18-27.
44. Hoste H., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Mueller-Harvey I., S. Sotiraki S., Louvandini H., Thamsborg S.M., Terrill T.H..2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212, 5-17
45. Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Quijada, J., Chan-Perez, I., Dakheel, M.M., Kommuru, D.S., Mueller-Harvey, I., Terrill, T.H., 2016. Interactions between Nutrition and Infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in Small Ruminants. In: Gasser, R.B., von Samson-Himmelstjerna, G. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends, *Advances in Parasitology*, 93 pp. 239–351 Academic Press.
46. Jaimez-Rodríguez PR, González-Pech PG, Ventura-Cordero J, Brito DRB, Costa-Júnior LM, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ. 2019. The worm burden of tracer kids and lambs browsing heterogeneous vegetation is influenced by strata harvested and not total dry matter intake or plant life form. *Tropical Animal Health and Production* 51, 2243-2251. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01928-9>.
47. Janis DC. 1945. Production of Industrial Quebracho. *Economic Geography*, 21, 145.
48. Johnston CMT, Radeloff VC. 2019. Global mitigation potential of carbon stored in harvested wood products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 116, 14526–14531. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1904231116>

49. Kim HC, Healey JM. 2001. Effects of pine bark extract administered to immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *American Journal Chinese medicine*, 29, 469–475.

50. Kotrotsios, N., Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2012). Dietary carob pods on growth performance and meat quality of fattening pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 880-885.

51. Krecek RS., Waller PJ. 2006. Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. *Veterinary Parasitology*. 119, 270-282.

52. Larsen, Jørgen Bo; Emborg, Jens; Kristensen, Katrine Hahn: Dyrkede skove i Naturen i Danmark på lex.dk. Hentet 1. november 2021. https://naturenidanmark.lex.dk/Dyrkede_skove

53. LeCasble C. 2012. 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. Thèse Doctorat Vétérinaire. École Nationale Vétérinaire Alfort. France. DOI :<http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=1549>.

54. Legendre H., Saratsi, K., Voutzourakis N., Saratsis N., Stefanakis A., Gombault P., Hoste H. Gidenne T., Sotiraki S. 2018. Coccidiostatic effects of tannin rich diets in rabbit production. *Parasitology Research*. 117, 3705-3713 <https://doi.org/10.1007/s0043601860692>

55. Lima PMT, Crouzoulon P, Sanches TP, Zabré G, Kabore A, Niderkorn V, Hoste H, Amarante AFT, Costa-Júnior LM, Abdalla AL, Louvandini H. 2019. Effects of *Acacia mearnsii* supplementation on nutrition, parasitological, blood parameters and methane emissions in Santa Inês sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 207, 107777. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107777>.

56. Long R. 1991. Quebracho Based Polyphenols for Use in Wood Panel Adhesive System. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 49, 485–487.

57. Mackown Ct., Brown M.A., Walker El. 2011. Tannin rich peanut skins lack anthelmintic properties. *Small Ruminant Research* 96, 195-200.

58. Mancilla-Montelongo M, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA. 2020. *In vitro* evaluation of *Theobroma cacao* leaf extracts against *Trichostrongylus colubriformis* larvae. Congreso SENISPA

59. Mancilla-Montelongo MG, Gaudin-Barbier E, Castañeda-Ramírez GS, Canul-Velasco ML, Chan-Pérez JI, De-La-Cruz-Cortazar A, Mathieu C, Fourquaux I, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Ventura-Cordero J, González-Pech PG, Torres-Acosta JFJ. 2021. *In vitro* evaluation of the nutraceutical potential of *Theobroma cacao* pod husk and leaf extracts for small ruminants. *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00354-y>

60. Manolaraki F, Sotiraki S, Skampardonis V, Volanis M, Stefanakis A, Hoste H. 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 686-695

61. Marakis S., 1996. Carob bean in food and feed: current status and future potentials—a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 33, 365-383.

62. Marchand, S., Ketavong, S., Barbier, E., Gay, M., Jean, H., Nidekorn, V., Stergiadis, S., Salminen, J. P. and Hoste, H. (2019) *In vivo* assessment of the anthelmintic effects of by-products (peels) from the chestnut industry. In: 70th Annual Meeting of the European Association of Animal Production, 26-30 Aug 2019, Ghent, Belgium, p. 272. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-890-2>
63. Martínez-Ortíz De Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich extracts under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology* 133; 281-286.
64. Martínez-Ortíz-De-Montellano C., Torres-Acosta JFJ., Fourquaux I., Sandoval-Castro CA., Hoste H. 2019. Ultrastructural studies of adult *Haemonchus contortus* exposed to polyphenol-rich materials under *in vivo* conditions in goats. *Parasite* 26, 65. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019065>
65. Max RA, Wakelin D, Dawson JM, Kimambo AE, Kassuku AA, Mtenga LA, Craigon J, Buttery PJ. 2005. Effect of quebracho tannin on faecal egg counts and worm burdens of temperate sheep with challenge nematode infections. *Journal of Agricultural Science*, 143, 519–527.
66. Minho AP, Bueno ICDS, Gennari SM, Jackson F, Abdalla AL. 2008. In vitro effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17, 144–148.
67. Minho AP, Filippesen LF, Amarante AFT, do Abdalla AL. 2010a. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Ciencia Rural*, 40, 1360–1365.
68. Minho AP, Gennari SM, Amarante AFT, Abdalla AL. 2010b. Anthelmintic effects of condensed tannins on *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected sheep. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 1009–1016. DOI:10.5433/1679-0359.2010V31N4P1009.
69. Min BR, Wilson EA, Solaiman S, Miller J. 2015. Effects of condensed tannin-rich pine bark diet on experimentally infected with *Haemonchus contortus* in meat goats. *International Journal Veterinary Health Science Research*, 3, 49–57. DOI: 10.19070/2332-2748-1500013.
70. Molan AL. 2014. Effect of purified condensed tannins from pine bark on larval motility, egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitologica*, 61, 371–376.
71. Molan AL, Liu Z, De S. 2009. Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of *Coccidian oocysts*. *Folia Parasitologica*, 56, 1–5.
72. Morgan ER, Aziz NA, Blanchard A, Charlier J, Charvet C, Claerebout E, Geldhof P, Greer AW, Hertzberg H, Hodgkinson J, Höglund J, Hoste H, Kaplan RM, Martínez-Valladares M, Mitchell S, Ploeger HW, Rinaldi L, von Samson-Himmelstjerna G, Sotiraki S, Schnyder M, Skuce P, Bartley D, Kenyon F, Thamsborg SM, Vineer HR, de Waal T, Williams AR, van Wyk JA, Vercruyse J. 2019. 100 Questions in Livestock Helminthology Research. *Trends in Parasitology*, 35, 52-71
73. Mueller-Harvey I., G. Bee, F. Dohme-Meier, H. Hoste, M. Karonen, R. Kölliker, A. Lüscher, V. Niderkorn, W. F. Pellikaan, J.P. Salminen, L. Skøt, L. M.J. Smith, S. M. Thamsborg, P. Totterdell, I. Wilkinson, A. R. Williams, B. N. Azuhwi, N. Baert, A. Grosse Brinkhaus, G. Copani, O. Desrues, C. Drake, M. Engström, C. Fryganas, M. Girard, N. T.

- Huyen, K. Kempf, C. Malisch, M. Mora-Ortiz, J. Quijada, A. Ramsay, H. M. Ropiak, G. C. Waghorn 2018. Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition *Crop Sciences* 58, doi: 10.2135/cropsci2017.06.0369
74. Mupeyo B, Barry TN, Pomroy WE, Ramírez-Restrepo CA, López-Villalobos N, Pernthaner A. 2011. Effects of feeding willow (*Salix spp.*) upon death of established parasites and parasite fecundity. *Animal Feed Science and Technology*, 164, 8–20.
75. Musonda K, Barry TN, McWilliam EL, López-Villalobos N, Pomroy WE. 2009. Grazing willow (*Salix spp.*) fodder blocks for increased reproductive rates and internal parasite control in mated hoggets. *Animal Feed Science and Technology*, 150, 46–61.
76. Niderkorn V., Barbier E., Macheboeuf D., Torrent A., Mueller-Harvey I., Hoste H. 2020. *In vitro* rumen fermentation of diets with different types of condensed tannins derived from sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) pellets and hazelnut (*Corylus avellana* L.) pericarps *Animal Feed Science and Technology* 259; 114357DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2019.114357
77. Ogawa S, Yazaki Y. 2018. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin determination and biological activities. *Molecules*, 23, 1–18.
78. Ortíz-Ocampo G, Chan-Pérez JI, Covarrubias-Cárdenas AG, Santos-Ricalde RH, Sandoval- Castro CA, Hoste H, Capetillo-Leal CM, Torres-Acosta JFJ. 2016. Efecto antihelmíntico *in vitro* e *in vivo* de residuos de *Coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* con baja susceptibilidad a taninos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 19, 41-50.
79. Palomo-Couoh JG, Aguilar-Caballero AJ, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal CM. 2012. Reduction of gastrointestinal nematode egg output in goats fed tannin rich fodder (*Acacia penatulla*) or coffee waste (*Coffea arabica*). XI International Conference on Goats 23-27 September 2012. Las Palmas de Gran Canaria, Spain. DOI: 10.13140/RG.2.2.18655.61608.
80. Paolini V., Bergeaud J.P., Durantón-Grisez C., Prevot F., Dorchie Ph., Hoste H. 2003a. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 113, 253-261.
81. Paolini V., Frayssines A, De La Farge F., Dorchie Ph., Hoste H. 2003b. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research*. 34, 331-339.
82. Paolini V., Fouraste I., Hoste H. 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on two parasitic stage of three parasitic nematode species. *Parasitology*, 129, 69 –77.
83. Paolini V., Prevot F., Dorchie Ph., Hoste H. 2005. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Journal*. 170, 260-263. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.05.001
84. Parisi F., Mancini S., Mazzei M., Forzan M., Turchi B., Perrucci S., Poli A. Paci G. 2018. Effect of dietary supplementation of a mix of chestnut and quebracho tannins on intestinal morphology, bacterial load, *Eimeria spp.* oocyst excretion and immune response after vaccination in rabbits. *American Journal Animal Veterinary Sciences*- DOI: 10.3844/ajavsp.2018.94.103.

85. Pena Espinoza M, Valente A, Thamsborg SM, Simonsen HT, Boas U, Einemark HL, Lopez-Munoz R, Williams AR. 2018. Anti-parasitic activity of chicory (*Cichorium intybus*) and the role of its natural bioactive compounds: a review. *Parasite & Vectors* 2018, 11, 475
86. Pizzi A. 2019. Tannins: Prospectives and actual industrial applications. *Biomolecules* 9(8), 344. DOI : <https://doi.org/10.3390/biom9080344>
87. Priolo, A., Waghorn, G.C., Lanza, M., Biondi L., Pennisi P., 2000. Polyethylene glycol as a means to reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: effect on lamb growth and meat quality. *Journal of Animal Science*, 78, 810-816.
88. Priolo A., Lanza, M., Bella, M., Pennisi P., Fasone V., Biondi, L., 2002. Reducing the impact of condensed tannins in a diet based on carob pulp using two levels of polyethylene glycol: lamb growth, digestion and meat quality. *Animal Research*. 51, 305–313. <https://doi.org/10.1051/animres>
89. Prosess21. 2020. Ekspertgrupperapport: Biobasert Prosessindustri [Bio-based process industry]. Report (summary in English). Drammen: Nærings- og Fiskeridepartementet. 1-35.
90. Quijada J., Frygas C., Ropiak H. M., Ramsay A, Mueller-Harvey I, Hoste H. 2015 Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by different structural features of condensed tannins. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 63, 6346-6354.
91. Quijada J., Drake C., Gaudin E., El-Korso R., Hoste H., Mueller-Harvey I. 2018. Condensed tannins changes along the digestive tract in lambs fed with sainfoin pellets or hazelnut skins. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 66, 2136-2142
92. Ramón-Laca, L., Mabberley, D.J., 2004. The ecological status of the carob-tree (*Ceratonia siliqua*, Leguminosae) in the Mediterranean. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 144, 431–436. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2003.00254.x>
93. Ramsay, A. R. Williams A., Quijada J., Hoste H., Thamsborg S.M., Mueller-Harvey I. 2015. Anthelmintic activity of galloylated proanthocyanidins from shea meal (*Vitellaria paradoxa*) *Planta Medica* 81 – page 16. DOI: 10.1055/s-0035-1565681
94. Ropiak HM, Ramsay A, Mueller-Harvey I. 2016. Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 121, 225–231.
95. Rose Vineer H, Morgan ER, Hertzberg H, Bartley DJ, Bosco A, Charlier J, Chartier C, Claerebout E, de Waal T, Hendrickx G, Hinney B, Höglund J, Ježek J, Kašný M, Keane OM, Martínez-Valladares MM, Mateus TL, McIntyre J, Mickiewicz M, Munoz AM, Phythian CJ, Ploeger HW, Aleksandra Vergles Rataj A, Skuce PJ, Simin S, Sotiraki S, Spinu M, Stuen S, Thamsborg SM, Vadlejch J, Varady M, von Samson-Himmelstjerna G, Rinaldi L 2020. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite* (Special issue COMBAR)
96. Saratsi K., Hoste H., Voutzourakis N., Tzanidakis N., Stefanakis A., Thamsborg SM., Mueller-Harvey I., Hadjigeorgiou I., Sotiraki S. 2020 Feeding of carob (*Ceratonia siliqua*) to sheep infected with gastrointestinal nematodes reduces faecal egg counts and worm fecundity. *Veterinary Parasitology*. (Accepted for publication)
97. Saratsi, K. 2021. The contribution of Mediterranean flora against gastrointestinal nematodes in small ruminants. Phd thesis. Agricultural University of Athens, Athens. <http://hdl.handle.net/10442/hedi/50128>

98. Saratsis A., Regos I., Tzanidakis N., Voutzourakis N., Stefanakis A., Treuter D., Joachim A., Sotiraki S. 2012 In vivo and in vitro efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Eimeria spp.* in lambs. *Veterinary Parasitology*, 188, 1-9. DOI:10.1016/j.vetpar.2012.03.014.
99. Silanikove, N., Landau, S., Or, D., Kababya, D., Bruckental, I., Nitsan, Z., 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science*. 99, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.05.018>
100. Stavrou I.J., Christou A., Kapnissi-Christodoulou C.P., 2018. Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chem.* 269, 355–374. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.152>
101. Steinshamn H. 2014. Bark in feed – for improved feed utilization and animal health. *Bioforsk Fokus* 10(summary in English). 1-53. DOI: <http://hdl.handle.net/11250/2444067>.
102. Stepek G, Behnke JM, Buttle DJ, Duce IR. 2004 Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics?. *Trends in Parasitology*, 20, 322-327
103. Thamsborg SM, Roepstorff A, Larsen M. 1999. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Veterinary Parasitology* 84, 169-186.
104. Teichmann, K, Kuliberda M, Schatzmayr G, Pacher T, Zitterl-Eglseer K, Joachim A, Hadacek F. 2016. *In vitro* inhibitory effects of plant-derived by-products against *Cryptosporidium parvum*. *Parasite*, 23, 1-8. Doi: 10.1051/parasite/2016050.
105. Torres-Acosta JFJ., Hoste H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing / browsing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 77, 159-173.
106. Torres–Acosta J.F.J., Hoste H., Sandoval-Castro C.A., Torres-Fajardo Ac R.A., Ventura-Cordero J, Gonzalez Pech P.G., Mancilla-Montelongo M.G., Ojeda-Robertos N.F., Martinez Ortiz De Montellano C. 2019. The “art of war” against gastro intestinal nematodes in sheep and goat herds of the tropics. *Rev. Acad. Ciencia An.* 17 (suppl 1) 39-46
107. Tous J., Romero A., Hermoso JF., Ninot A., Plana J., Batlle I., 2009. Agronomic and commercial performance of four Spanish carob cultivars. *Horttechnology* 19, 465–470. <https://doi.org/10.21273/hortsci.19.2.465>
108. Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval Castro CA, Hoste H, Perez JI 2014. Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology* 206, 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.008>
109. Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Vilarem G, Mathieu C, Chan-Pérez JI. 2012. Comparación de la sensibilidad de tres ensayos *in vitro* para evaluar el efecto antihelmíntico de materiales ricos en taninos contra *Haemonchus contortus*. VII Seminario Internacional de Parasitología Animal. Querétaro, Querétaro, México. 10-12 Octubre 2012. Pp. 764-771.

110. Varmola MI, Carle JB. 2002. The importance of hardwood plantations in the tropics and sub-tropics. *International Forestry Review*, 4, 110–121. DOI: <https://doi.org/10.1505/IFOR.4.2.110.17439>
111. Ventura-Cordero J, González-Pech PG, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Tun-Garrido J. 2017. Sheep and goat browsing a tropical deciduous forest during the rainy season: why does similar plant species consumption result in different nutrient intake?. *Animal Production Science* 59, 66–72. <https://doi.org/10.1071/AN16512>
112. Waller PJ. 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology* 139, 1–14.
113. Waller PJ, Bernes G, Thamsborg SM, Sukura A, Richter SH, Ingebrigtsen K, Höglund J. 2001. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42, 31–44.
114. Williams AR, Krych L, Ahmad HF, Nejsum P, Skovgaard K, Nielsen DS, Thamsborg SM. 2017. A polyphenol-enriched diet and *Ascaris suum* infection modulate mucosal immune responses and gut microbiota composition in pigs. *PLoS One*, 1–21.
115. Wright C. 2015. The effects of phytochemical tannin-containing diets on animal performance and internal parasite control in meat goats. College of Agriculture, Environment and Nutrition Sciences Graduate Theses and Dissertations, Paper 4.
116. Yoshihara E, Minho AP, Cardim ST, Tabacow VBD, Yamamura MH. 2014. In vitro ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). *Semina Ciencias Agrarias*, 35, 3173–3180. DOI: [10.5433/1679-0359.2014v35n6p3173](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p3173).
117. Yoshihara E, Minho AP, Tabacow VBD, Cardim ST, Yamamura MH. 2015. Ultrastructural changes in the *Haemonchus contortus* cuticle exposed to *Acacia mearnsii* extract. *Semina Ciencias Agrarias*, 36, 3763–3768. DOI: [10.5433/1679-0359.2015v36n6p3763](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6p3763).
118. Zhou X, Du G. 2020. Applications of tannin resin adhesives in the wood industry, in Tann. - Struct. Prop. Biol. Prop. Curr. Knowl., Aires A, Editor. IntechOpen. p. 1854–1858. DOI: [10.5772/intechopen.86](https://doi.org/10.5772/intechopen.86)

Résumé 5

Les nématodes gastro-intestinaux (NGI) restent une contrainte sanitaire majeure chez les petits ruminants en élevage à l'herbe. Les programmes de contrôle des NGI sont principalement basés sur l'utilisation d'anthelminthiques de synthèse (AH). L'utilisation intensive des AHs pour le traitement et la maîtrise des NGI, en particulier dans les élevages de petits ruminants, a conduit au développement généralisé de résistances aux anthelminthiques (AR).

Pour aider à une meilleure maîtrise des NGI, de nombreuses options ont émergé, parmi lesquelles l'utilisation de ressources naturelles issues de plantes bioactives. Les plantes bioactives et les huiles essentielles sont des options prometteuses dans la recherche d'alternatives pour le contrôle des NGI chez les ruminants au pâturage. La présente étude visait à effectuer un essai *in vivo* pour confirmer les effets AH sur les infestations par des NGI et la résilience de l'hôte. Celle-ci a reposé sur une supplémentation alimentaire en granulés déshydratés bioactifs (GDB) à base de ressources tempérées et tropicales riches en tanins complétées par des extraits végétaux. Les effets *in vivo* d'une supplémentation alimentaire ont été évalués sur le statut parasitologique en mesurant l'excrétion des œufs de NGI (OPG) ; et d'évaluer les conséquences sur la résilience de l'hôte au travers de paramètres pathophysiologiques (hématocrite = HT) et de production (gain de poids moyen (GMQ) ou note d'état corporel (NEC)). Cinquante-huit (n = 58) brebis d'un âge moyen de 3 ans ont fait partie de l'étude. Chaque brebis a reçu un régime à base de pâturage et de 70 g de concentré/jour. Les animaux ont été divisés en deux groupes T1 Témoin (n = 29) et T2 traités avec les GDP (n = 29). La période expérimentale était de 21 jours. Les variables OPG, HT, GMQ, NEC ont été mesurées par prélèvements individuels à 3 périodes (J0, J13, J21) pour chaque groupe (T1 - T2). Les résultats obtenus ont montré que la supplémentation alimentaire en GDP dans le lot T2 a un effet négatif sur les OPG proche de la signification ($P < 0.08$) sur les excrétions d'OPG et a conduit à une amélioration du GMQ (0,050 (T1) vs 0,114 kg (T2)). Les genres *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* et *Oesophagostomum spp.* ont été identifiés après coproculture. D'autres études sont recommandées sur ces GDB pour compléter ces premiers résultats.

ARTICLE 5

Prepared for submission to Small Ruminant-Research as an original research article

In vivo effects of complementary feeds with bioactive pellets in ewes naturally infected with gastrointestinal nematodes.

Meza Ocampos Griselda¹, Berlus, Osmite¹, Bordes, Léa¹, Ketavong, Setha¹, Goyenette Margaux², Gautier D²., Hoste Hervé¹

1. Mixed Unit of Research, Host Pathogens Interactions 1225, National Institute for Agriculture, Food and Environment, National Veterinary School of Toulouse (UMR, IHAP 1225 INRAE, ENVT). 23 Chemin des Capelles. PO BOX 31076. Toulouse, France.
2. Department of Animal Physiology. Faculty of Veterinary Sciences, National University of Asuncion (FCV, UNA) Campus Universitario Km 9.5 PO BOX 1061. San Lorenzo, Paraguay.
3. L'Institut de l'Elevage (Idele), CIIPRO. St Priest Ligoure 87800.

***Corresponding author** : Hervé Hoste

23, Chemin de Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

Tel +33 5 61 19 38 75,

E-mail: herve.hoste@envt.fr

Abstract

Gastrointestinal nematodes (GIN) remain a major constraint in small ruminants in livestock. The GIN control programs are primarily based on the use of synthetic anthelmintics (AH). The intensive use of AH for the treatment and control of GINs, especially in sheep farms, has led to the widespread development of anthelmintic resistance (AR). For help better control of GINs numerous options have emerged, among them, the use of natural resources from bioactive plants. The bioactive plants and essential oils are promising options in the search for alternatives for the control of GIN in livestock. This study aimed to perform an *in vivo* test to confirm the AH effects on GIN infections and the host resilience. This relied on diet supplementation with dehydrated pellets (Bioactive pellets = BP) based on temperate and tropical resources rich in tannins and bioactive plant extracts. The *in vivo* effects of a diet supplementation were evaluated on the parasitological status by measuring egg excretion (EPG); and to evaluate the benefits on host resilience physiological and production parameters such as Packed Cells volume (PCV), Bodyweight (BW) and body condition score (BCs). Fifty-eight (n = 58) ewes with an average age of 3 years, were part of this study. Each ewe was fed a basal diet composed of pasture and 70 g of BP / day. The animals were divided into two groups T1 Control (n = 29) and T2 treated with BP (n = 29). The experimental period was 21 days. The variables EPG, PCV, BW, BC were organized by sampling/day (D0, D13, D21) and by Group (T1 - T2). The results obtained showed that dietary supplementation with BP by measuring egg excretions is positive, an improvement in PCV and BW was noted on T2. The estimation on weight measure/daily was (0,050 (T1) vs 0,114 kg (T2)). The genus *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* et *Oesophagostomum* spp. were identified after culture. Further studies are recommended on BP to provides a more multidisciplinary view without underestimating the partial results.

Keywords: *Trichostrongylus* spp., *Teladorsagia* spp., *Oesophagostomum* spp., alternatives to control GIN, pellets.

1. Introduction

Gastrointestinal nematodes (GIN) remain a major constraint in small ruminants and livestock when bred outdoors. The GIN control programs were primarily based on a combination of animal handling practices, pasture management, and the main use of chemical anthelmintics (AH) (Torres-Acosta and Hoste, 2008). The intensive use of commercial AH for the treatment and control of GINs, especially in sheep farms, has led to the widespread development of anthelmintic resistance (AR) to one or more classes of AH drugs at the same time (*i.e.*, multidrug resistance) (Kaplan and Vidyashankar, 2012), (Geurden et al., 2014). This phenomenon of AR and multidrug resistance has a major global impact (reports were seen in Australia, New Zealand, South Africa, and many Latin American countries) (Cezar et al., 2010), (Molento et al., 2011), (Mphahlele et al., 2020), (Morgan et al., 2019). Since the first reports of AR in 1980, numerous options have emerged for a more sustainable control of GINs (*i.e.*, vaccination, agronomic measures, biological control and the search for bioactive compounds on natural resources) (Hovi et al., 2004), (Hoste et al., 2009), (Roeber et al., 2013), (Hoste and Torres-Acosta, 2011).

Within these alternative options, the use of natural resources especially bioactive plants with AH properties have received increased attention. These AH activities have been associated with the presence of a variety of plant secondary metabolites (PSM) that are present in a wide variety of botanical families (Bruneton, 2002) (Girard et al., 2016), (Castillo-Mitre et al., 2017), (Hoste and Niderkorn, 2020).

The tanins, especially the condensed tanins (CT) showed to have a beneficial effect on ruminant production and parasite load (Min et al., 2003), (Paolini et al., 2003), (Lima et al., 2019). Diets rich in CT have many benefits such as reducing bloat, improving farm profitability, controlling pests and reducing greenhouse gas and ammonia emissions, antiparasitic effects (anticoccidial/ anthelmintic) (Kingston-Smith et al., 2010), (Legendre et al., 2018). The tanins have become the object of extensive studies in the 90's and still represent an important model to explore the concept of nutraceutical plants (Sandoval-Castro et al., 2012), (Pizzi, 2019). In veterinary science, a nutraceutical can be defined as a livestock feed that combines nutritional values with beneficial effects for animal health and environment. The mode of exploitation of nutraceutical are

varieties (grazing, browsed, conserved forms or even agro industrial by-products)(Hoste et al., 2015).

Interest in developing and exploring pellets products containing tannins has grown over the decades (Gujja et al., 2013), (Vargas-Magaña et al., 2014), (Fraga-Corral et al., 2021) (Hoste et al., 2021) and with it the need to facilitate the conservation and stability of forages rich in tannins (Hoste et al., 2015), (Gaudin et al., 2017). Additionally, an increase interest to study combined tannins of different resource was widely mentioned (Mancilla-Montelongo et al., 2021). Some studies performed with bioactive plants, such as: sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) (Gaudin, 2017), hazelnut skins (*Corylus avellana*) (Girard et al., 2013), carob (*Ceratonia siliqua*) (Arroyo-Lopez et al., 2014), chestnut (*Castanea sativa* Mill.) with Quebracho (*Schinopsis spp.*) wood (Parisi et al., 2018) were reported with promising results.

In the present study, ewes natural infected with GINs were feed with a diet supplementation based on dehydrated pellets containing two sources of CT (sainfoin and quebracho) and plant extracts and essential oils. In the composition of this bioactive pellets were also added others compound such as: Thyme, Goosefoot, Absinthe, Elecampane and Garlic. Those compounds aimed to strengthen in the actions of the tannins of sainfoin and quebracho. This study aimed to perform an *in vivo* test to confirm the AH effects on GIN infections and the host resilience. This relied on diet supplementation with dehydrated pellets **Bioactive pellets = BP**.

2. Materials and Methods

2.1. Study location

The experiment was carried out in the experimental station of Mourier, France, located at 45°39'42.0"N 1°17'33.9"E. The location used was the Breeding Institute, headquarters of CIIRPO - Interregional Center for Information and Research in Sheep Production. The manipulations were carried out in July 2021.

2.2. Experimental design

A 21-days feeding trial (D21) was completed with 58 ewes. A control egg count was carried out 7 days before the experiment (D-7) to identify the level of GIN infections and equilibrated by groups. The ewes were reared indoors under conditions that excluded additional nematode infection. The ewes were then stratified by group (n = 29) according to body weight (BW), packed cell volume (PCV) and eggs per gramme (EPG).

- Control group (T1) : 55.3 kg \pm 4.41 kg ; 26.6 % \pm 2.6 % ; 180.36 \pm 233, 18

- Treated group (T2) : 55.4 kg \pm 4.27 kg; 26.7 % \pm 2.84 % 238.45 \pm 374.23

In addition, the two groups received hay *ad libitum* each day and had free access to water. Animals in the control group T1 received feed per day and per animal (distributed by group). Animals in the Treated group T2 received 70 g (pellets) of bioactive pellets per day and per animal (distributed by group). The diets were made iso proteic. A seven-days adjustment period was made on D0. The refusal was noted. The groups were controlled at D0, D13 and D21 (Figure2).

2.3. Methods

2.3.1. Parasitological monitoring

Individual fecal samples were collected on D0, D13, D21 and stored at 4 °C until laboratory examination. The feces were recovered directly from the rectum using gloves and a plastic pot for each animal. A macroscopic examination of the fecal samples was performed using modified DISCO score (Index Diahree = ID). A microscopic examination of the fecal samples was performed by coproscopy, using the method of Mc Master (Raynaud, 1970). Data were expressed as eggs per gram of feces (EPG).

After analysis, the fecal samples were gathered, according to experimental group, to incubate for 10 days at 23°C. Then L3 larvae were recovered according to a Baermann technique (Baermann, 1917) and 100 larvae were counted in order to identify the percentage of each nematode's genus. The diagnosis of species was made by observing several criteria as mentioned by (van Wyk and Mayhew, 2013).

2.3.2. Patho-physiological and production measurements

Individual blood samples were taken fortnightly (D0, D13, D21) during the trial. Blood was taken by venipuncture of the jugular vein and collected in tubes with heparin. The samples were used to measure Packed Cell Volume (PCV) according to the microhematocrit method. At the same time, body condition score (BCs) was noted.

The animals were weighted at the start and at the end of the experiment, the body weight (BW) help to calculated the weight measure/day = (Final measure (BW) - Initial measure (BW))/21 days. Where 21 days = number of days between the initial and final evaluation.

2.4. Data analysis

All the statistical analysis were carried out with the XLStat® software. The results were subjected to descriptive analysis (mean, standard deviation) and presented in tables and figures. The normality of the variables was verified. The distribution of EPG was normalized with log transformation (log transformation) $X = \text{Log}(\text{EPG} + 1)$. The PCV, BW and BC distributions follow a normal distribution.

- i. To assess the effectiveness of the treatment, infections were monitored according to Group.

The quantitative variables EPG, PCV, BW, and BCs were organized by sampling by date (D0, D13, D21) and by Group (Control: T1; Treated: T2) and by ANOVA repeated measures.

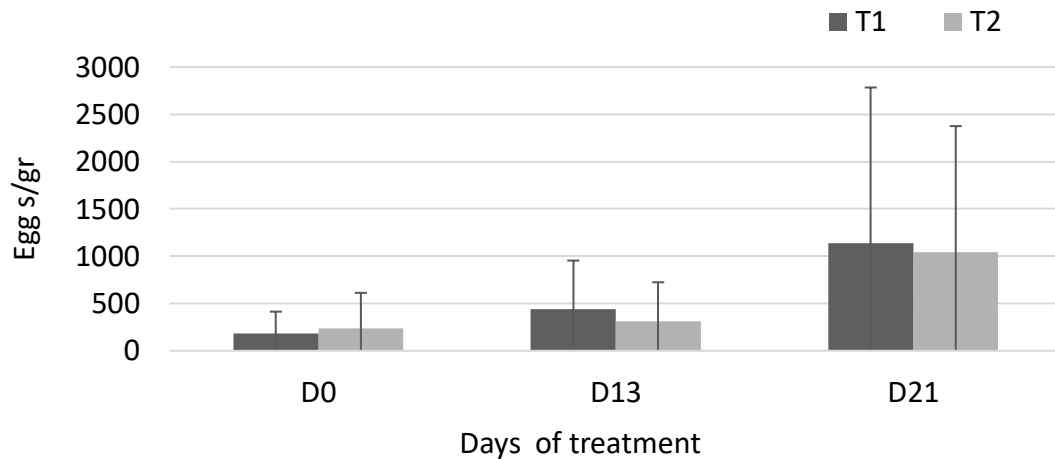
- ii. To evaluate a correlation between variables, values of EPG, the BW, ID, PCV were evaluated using Spearman's correlation. Correlations significant at $p < 0.05$ have been marked with an (*).

3. Results

3.1. Parasitological parameters

3.1.1. The results of EPG in group T1 and T2 expressed as mean and standard deviation (SD) are presented on Figure 3.

Figure3. Results of EPG as mean and SD by date and Group T1 and T2



Data were noted on D0, D13 and D21. Analyses of the egg excretion values based on the Analysis of Variance on Repeated Measures did not shown differences ($P > 0.05$) between the 2 groups (Figure 3). However, after distribution of BP the values of EPG in the T2 were regularly lower compared to those of the T1 group-.

The identification of the genre of infective Larva (L3) on pool culture (% larvae genre/ total of L3 larvae by group) showed the presence of *Trichostrongylus spp.*, *Teladorsagia spp.* and *Oesophagostomum spp.* A tendency to decrease the number of worms was observed on both groups comparing D0 to D21 specially on *Teladorsagia spp.* and *Oesophagostomum spp.* (Table2).

3.1.2. The percentage of infective Larva (L3) of *Trichostrongylus spp.*; *Teladorsagia spp.* and *Oesophagostomum spp.* (% larvae of the species / total of L3 larvae) in both groups are presented on Table1.

Table1. Results of identification of Larve (L3) by groups, expressed as %

| Group | Genus | Date | | |
|-------|------------------------------|------|-----|-----|
| | | D0 | D13 | D21 |
| T1 | <i>Trichostrongylus spp.</i> | 33 | 18 | 69 |
| | <i>Teladorsagia spp.</i> | 36 | 10 | 25 |
| | <i>Oesophagostomum spp.</i> | 31 | 72 | 6 |
| T2 | <i>Trichostrongylus spp.</i> | 36 | 46 | 78 |
| | <i>Teladorsagia spp.</i> | 12 | 13 | 5 |
| | <i>Oesophagostomum spp.</i> | 52 | 41 | 17 |

3.2. Pathophysiological parameters

3.2.1. The results of EPG, ID and PCV variables expressed as mean, standard deviation (SD) and correlation of Rho Spearman (ρ) were presented in Table2.

Table2. Results of ID and PCV presented as mean, standard deviation (SD) and Rho Spearman (ρ) (ddl2).

| Group | n | EPG | ID | PCV | ρ EPG - ID | ρ EPG - PCV |
|-------|----|-----------------|------------|------------|--------------------|------------------------|
| T1D0 | 29 | 180.86±233.18 | 2.89±0.77 | 26.55±2.69 | -0.152 | -0.302 |
| T1D13 | 29 | 437.06±516.97 | 2.34±0.81 | 26.39±3.37 | 0.050 | -0.378* |
| T1D21 | 29 | 1140.64±1472.84 | 2.39±0.78 | 24.31±2.84 | -0.250 | -0.019 |
| T2D0 | 29 | 238.45±374.23 | 2.76±0.64 | 26.66±2.84 | -0.011 | -0.216 |
| T2D13 | 29 | 312.07±412.29 | 2.14±0.79 | 23.65±2.67 | -0.160 | -0.141 |
| T2D21 | 29 | 1043.34±1329.90 | 1.48±0.68* | 23.65 2.67 | -0.106 | 0.009 |

*= ($p < 0.05$)

EPG results on D13 and D21 (n = 29) showed a diminution in egg in the group T2. The addition in ration has not showed a significative effect by group (T1/T2) ($p > 0.05$). The relationship of EPG, ID and PCV was inversely proportional.

3.3. Production measurements

3.3.1. The results on the variables BW and BC expressed as mean, standard deviation and Rho Spearman (ρ) were presented in Table3.

Table3. Results of BW and BC presented as mean, standard deviation (SD) and Rho Spearman ddl 2 (ρ).

| Group | n | BW | BCs | ρ |
|-------|----|--------------|------------|--------|
| T1D0 | 29 | 55.34±4.41 | 2.41±0.51 | 0.458* |
| T1D21 | 29 | 56.52±4.79 | 2.5± 0. 46 | 0.420* |
| T2D0 | 29 | 55.39±4.23 | 2.50±0.53 | 0.476* |
| T2D21 | 29 | 57.79± 4. 81 | 2.65 0. 51 | 0.483* |

*= ($p < 0.05$)

The daily gain for groups was 0,05 kg on T1 and 0,114 kg T2. According to Spearman's correlation Weight and BW have a positive and significant correlation ($p < 0.05$) in both groups.

References

1. Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., & Coop, R. L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *In vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, *99*(3). [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00467-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00467-8)
2. Bahuau, D., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., & Hoste, H. (2006). Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, *132*(4). <https://doi.org/10.1017/S0031182005009509>
3. Cala, A. C., Ferreira, J. F. S., Chagas, A. C. S., Gonzalez, J. M., Rodrigues, R. A. F., Foglio, M. A., Oliveira, M. C. S., Sousa, I. M. O., Magalhães, P. M., & Barioni, W. (2014). Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts *in vitro* and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Parasitology Research*, *113*(6), 2345–2353. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3891-z>
4. Caprarulo, V., Giromini, C., & Rossi, L. (2021). Review: Chestnut and quebracho tannins in pig nutrition: the effects on performance and intestinal health. In *Animal* (Vol. 15, Issue 1, p. 100064). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100064>
5. Chartier, Christophe ; Itard, Jacques; Morel, Pierre-Claude, Troncy, P.-M. . (1981). *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. <https://www.eyrolles.com/Sciences/Livre/precis-de-parasitologie-veterinaire-tropicale-9782743003302/>
6. Coe, F. G., & Anderson, G. J. (1996). Screening of medicinal plants used by the Garífuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *53*(1), 29–50. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01424-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01424-9)
7. Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (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. *Veterinary Parasitology*, *44*(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)
8. Elodie Gaudin, M., Hervé, M., Mme, H., Ginane, C., Christine Duvaux-Ponter, M., Chartier, A. M. C., Nle, E., De Nantes -Oniris, V., Chartier, M. C., Bastianelli, P. M. D., & Montpellier, C. (2017). Le sainfoin déshydraté: un modèle de nutriment dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants. L'Université de Toulouse.
9. Embeya, V. O. (2013). Activité anthelminthique de la poudre d'écorce de racine de *Vitex thomasi* De Wild (*Verbenaceae*) sur *Haemonchus contortus* chez la chèvre. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00799960>
10. Hasan, M. M. I., Begum, S., Islam, S., Rahman, M. M., Belal, S. A., Hossain, M. A., Akanda, M. R., Pal, N. C., & Howlader, M. M. R. (2015). Effects of garlic supplementation on parasitic infestation, live weight, and hematological parameters in Black Bengal goat. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *2*(3), 326–331. <https://doi.org/10.5455/javar.2015.b102>
11. Hoste, H., Gaillard, L., & Le Frileux, Y. (2005). Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and

- milk production in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 59(2-3 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.011>
12. Hoste, H., Le Frileux, Y., & Pommaret, A. (2001). Distribution and repeatability of faecal egg counts and blood parameters in dairy goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Research in Veterinary Science*, 70(1). <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0442>
 13. Hoste, Hervé, Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., & Hoskin, S. O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. In *Trends in Parasitology* (Vol. 22, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.004>
 14. Ives, C. da S., Pedro, M. de M., Ilza, M. de O. S., Mary, A. F., Eduardo, L., Sérgio, N. E., & Ana, C. de S. C. (2017). Anthelmintic activity of *Artemisia annua* in sheep-model. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(7), 137–143. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6318>
 15. Jacquet, P. (1997). Les strongles digestifs des ruminants. *Point Veterinaire (Parasitologie Des Ruminants)*, 20-22.
 16. Juhnke, J., Miller, J., Hall, J. O., Provenza, F. D., & Villalba, J. J. (2012). Preference for condensed tannins by sheep in response to challenge infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), 104–114. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.02.015>
 17. Kingston-Smith, A. H., Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., & Abberton, M. (2010). Plant-based strategies towards minimising livestock's long shadow. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(4), 613–620. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001953>
 18. Labre, P. (2012). Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval -tome 2. <https://www.unitheque.com/phytotherapie-aromatherapie-chez-les-ruminants-cheval-tome/elevage-autrement/femenvet/Livre/103987>
 19. Marie-Magdeleine, C., Ceriac, S., Barde, D. J., Minatchy, N., Periacarpin, F., Pommier, F., Calif, B., Philibert, L., Bambou, J. C., & Archimède, H. (2020). Evaluation of nutraceutical properties of *Leucaena leucocephala* leaf pellets fed to goat kids infected with *Haemonchus contortus*. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02471-8>
 20. Meza-Ocampos G., Torres - Ñumbay M., Alvarenga N., Pereira Sühsner C., H. Hoste (2020). Traditional medicine in Paraguay: A cross-sectional ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of the gastro-intestinal nematodes (GIN) in humans and animals. *Webinar on Traditional Medicine 2020*. DOI: <https://www.iomcworld.org/abstract/traditional-medicine-in-paraguay-a-crosssectional-ethnobotanical-survey-of-medicinal-plants-used-for-the-treatment-of-th-57475.html>
 21. Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., & McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 106, Issues 1–4). [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)
 22. Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W. F., Salminen, J. P., Skøt, L., Smith, L. M., Thamsborg, S. M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A. R., Azuhwi, B. N., Baert, N., Brinkhaus, A. G., Waghorn, G. C. (2019). Benefits of condensed tannins

- in forage legumes fed to ruminants: Importance of structure, concentration, and diet composition. In *Crop Science* (Vol. 59, Issue 3, pp. 861–885). <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0369>
23. Paolini, V. (2004). Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre [Université de Perpignan, Perpignan]. <http://www.theses.fr/2004PERP0524>
 24. Ragot, J. (2019). Mesures aberrantes : détection, localisation, suppression, acceptation et robustesse. In *8ème Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation* (p. 18).
 25. Raynaud, J. P. (1970). Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 45(3). <https://doi.org/10.1051/parasite/1970453321>
 26. Torgerson, P. R., Paul, M., & Furrer, R. (2014). Evaluating faecal egg count reduction using a specifically designed package “eggCounts” in R and a user friendly web interface. *International Journal for Parasitology*, 44(5), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.005>
 27. Torres-Acosta, J. F. J., & Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.03.009>
 28. Venter, P. B., Sisa, M., Van Der Merwe, M. J., Bonnet, S. L., & Van Der Westhuizen, J. H. (2012). Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 1: The chemical composition of Quebracho (*Schinopsis lorentzii* and *Schinopsis balansae*) heartwood extract. *Phytochemistry*, 73, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.10.006>
 29. Wang, C., Torgerson, P. R., Kaplan, R. M., George, M. M., & Furrer, R. (2018). Modelling anthelmintic resistance by extending eggCounts package to allow individual efficacy. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(3), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.07.003>
 30. Zhong, R., Xiang, H., Cheng, L., Zhao, C., Wang, F., Zhao, X., & Fang, Y. (2019). Effects of feeding garlic powder on growth performance, rumen fermentation, and the health status of lambs infected by gastrointestinal nematodes. *Animals*, 9(3), 102. <https://doi.org/10.3390/ani9030102>

4. Discussion

This controlled experiment was carried out indoors with the aim of eliminating main confusing factors, in particular the immune status of the animal, possible differences in the protein level of the diets, the differences in activity against the parasites at different stages of life cycle, the variability of feed intake. Our objective was to confirm the AH effects on GIN infections and the host resilience of tannin rich resources. This relied on a diet supplementation with dehydrated pellets described as **Bioactive pellets (= BP)** based one temperate (sainfoin) and one tropical (Quebracho) resources rich in tannins and bioactive plant extracts. Several studies have been dedicated to the sainfoin use under various form (*e.g.*, silage or dehydrated pellets (Paolini et al 2003, Gaudin 2017). Early studies have also investigated the effects of administration of quebracho in sheep and/or goats Investigations suggesting that quebracho tannin can either mitigate the effects of parasitism or decrease egg excretion by reducing female fertility or even by reducing worm numbers (Athanasiadou et al., 2001), (Paolini et al., 2003) (Paolini, 2004). However, the combination of both resources and types of CT have rarely been observed. Egg excretion (EPG) was the main parasitological measurement performed in the two groups. Previous studies have illustrated on many occasions that one of the main effects in sheep or goats related to the consumption of a variety of tannin-rich legume forages was a decrease in the production of nematode eggs (Paolini et al., 2003), (Arroyo-Lopez et al., 2014) (Hoste et al, 2015). The results on D13 and D21 showed a diminution of EPG in group T2 (Figure3). These limited reductions compared to control values (namely – 29% on D13 and – 9 % on D21) were non-significant.

These weak effects could be due to the insufficient amount of complement in the diet for each animal (70g/day) or to some heterogeneity in feed distribution and access to the feed. Overall, the refusals were measured twice during the assay and have shown no refusals for both diets indicating that the **experimental diet** was widely accepted by the animals.. However, this pellets were given per groups and some ewes may have exceeded the expected dose and while others receive a lower quantity . Some authors have mentioned previously that differences in palatability can result in different levels of intake when the food offered is very tasty (Colucci and Grovum, 1993), (Hoste et al., 2015).

Another factor to explain differences with previous data could be related to the short duration of the trial (21 days). Previous *In vivo* assays based on the distribution and consumption of bioactive resources usually lasted longer, namely from 50 to 70 days and for example in a study performed by (Mravčáková et al., 2019) significant reduction in egg excretion in the groups receiving the supplementation were shown only after 44 days.

This experiment was carried out with naturally infected sheep. After stool culture per group, 3 genera were identified (Table1). Variations were observed in the composition of GIN population with time, in particular a decrease in the % of *Oesophagostomum* sp. In contrast, no differences were found between the 2 groups.

The effects of the experimental pellets on the host resilience have been measured through a range of parameters like the PCV, the body weight, BCS and index of diarrhea. The distribution of several tannins containing Legume used as nutraceuticals has regularly been associated with an improved resilience measure for example by a reduced anemia or rate of mortality (Paolini, 2004, (Paolini et al., 2005) Hoste et al, 2015) Positive effects of the consumption of CT on animal resilience, action of Quebracho (Athanasiadou et al., 2001), Sainfoin (Paolini et al, 2005 Hoste et al., 2005), *Artemisia annua* (Ives et al., 2017) a

In our study, the results and differences were usually in favor of the experimental group (see Table 2 and 3) but remain limited and non-significant. A decrease in the ID was noted between days of treatment in both groups. This response can be explained by a dependence on the routine diet and an adaptation to the new supplementation or stress (Marai et al., 2007).

Regarding daily weight gain, in our study, the supplemented group had an overall weight gain of 2.4 kg compared to 1,2 kg in the control group . It is known that the characteristics inherent to the basal diet can strongly influence the effectiveness of diet of tannins (Makkar et al, 2003), (Valenti et al., 2019), (Coop and Kyriazakis, 1999). However as mentioned previously, the animals of both groups in this *in vivo* assay were fed isoprotein diets. Therefore, it is assumed that this factor did not interfere with the measurement of parameters related to the ewes 'resilience.

In conclusion, the results obtained in this study show that the *in vivo* anthelmintic activity of BP by measuring egg excretions is favorable but of limited level.

According to our result, the benefits of this supplement can be due some limited anthelmintic effects and nutritional value as reflected by the improved body weight gain in animals of the treated group. Further studies are recommended on BP to provides a more complex view and to allow final conclusions

5. Acknowledgements

We thanks to all the collaborators.

6. Formatting of funding sources

This work was supported by Project XXX.

7. Statement of interest

All authors mentioned that there are no known conflicts of interest.

8. Authors contribution:

All authors contributed to the conception, data acquisition, statistical analysis, and interpretation of this study. All authors approved the final version of the manuscript.

9. Availability of data and material

All data is contained on paper. Additional data will be provided by the corresponding author upon reasonable request.

IV. DISCUSSION GENERALE

Ce projet de thèse s'inscrit dans un contexte général de recherche d'alternatives à l'utilisation d'anthelminthiques de synthèse (AH) pour ralentir le développement de résistances au sein des populations de nématodes gastro-intestinaux (NGI) chez les petits ruminants. Dans ce cadre l'utilisation des plantes ou de ressources naturelles est une des options envisagées (Torres-Acosta and Hoste, 2008).

L'objectif général de cette thèse était de déterminer le potentiel anthelminthique de 4 plantes, utilisées en médecine traditionnelle (MT) et d'évaluer leurs effets vis-à-vis des nématodes gastro-intestinaux (NGI) des petits ruminants, à partir d'études *in vitro et in vivo*. Le but final était de suggérer et confirmer ou non l'intérêt de ces plantes comme alternatives aux traitements chimiques de synthèse

La démarche utilisée dans cette thèse était fondée sur une approche ethno pharmacologique comme évoqué par Krief (2003). Il s'agit d'une stratégie qui combine les informations recueillies auprès des populations qui utilisent les plantes médicinales pour, par la suite, confirmer leurs effets avec des études biologiques en laboratoires associées à des analyses phytochimiques (Hoste et al 2008).

Dans cette discussion générale, nous essayerons de présenter une synthèse des principaux résultats en lien avec les divers objectifs de la thèse couplée à une vision critique des approches méthodologiques et des résultats acquis avant de proposer des perspectives.

Objectif 1 : Article 1

Dans l'article 1, nous avons discuté du processus de collecte des données qui inclut la préparation de l'enquête et la sélection des plantes qui ont fourni des informations de base pour les chapitres suivants.

Bien qu'acquises dans une région particulière d'Amérique du Sud, les données recueillies dans cette enquête paraissent d'une certaine portée générique. D'une part car notre enquête a suivi un schéma et une méthode similaire à ceux décrits et appliqués dans différentes parties du monde (Payne-Jackson and Alleyne, 2004 ; Zucchi et al., 2013; Chagas, 2015). La recherche d'informations de base au sein d'une population ciblée afin d'identifier des plantes bioactives est une partie initiale cruciale

pour toute investigation fondée sur les connaissances traditionnelles. L'enquête ethno botanique ou ethno vétérinaire a pour fonction de collecter des données, de répertorier les plantes, de noter les pratiques à des fins de validations scientifiques futures (Genovés et al., 2001; Hammond et al., 1998; Saltos et al., 2016).

Nos travaux ont permis de dresser une liste de 16 plantes d'intérêt pour un usage en santé humaine et santé animale comme présenté, en particulier celles ayant une activité anthelminthique potentielle selon la recherche bibliographique après l'analyse de données.

La famille botanique la plus citée était celles Asteraceae (*Acanthospermum australe* Loefl. Kuntze; *Artemisia absinthium* L. ; *Baccharis trimera* Less. DC, *Tagetes minuta* L., *Tanacetum parthenium* L. Sch. Bip). Suivie par celle des Lamiaceae (*Mentha piperita* L., *Mentha spicata* L.) et les Verbenaceae (*Verbena litoralis* Kunth., *Aloysia polystachya* Griseb.). De nombreuses enquêtes ethnobotaniques mentionnent ces familles comme les plus utilisées (Santos et al., 2015). Les Astéracées est la famille de plantes terrestres la plus utilisée en médecine traditionnelle (Tariq et al., 2017). De leur côté, les Lamiacées et les Verbenaceae sont 2 familles de plantes aromatiques qui ont de nombreuses utilisations en médecine traditionnelle (Rahmatullah et al., 2011). Elles présentent l'avantage d'être facilement cultivées et propagées et sont principalement utilisées en régions tropicales en raison de leur capacité à survivre dans les climats chauds (Ali et al., 2020). Les parties les plus utilisées en médecine traditionnelle étaient les feuilles et le mode de préparation le plus cité était l'infusion comme dans des études précédentes (Ali et al., 2021).

Un résultat étonnant de notre enquête était que la famille des Fabacées, très étudiée pour ses propriétés anthelminthiques en zones tempérées et tropicales (Hoste et al., 2015 ; Molares and Ladio, 2012) n'a eu qu'un seul représentant identifiés dans la liste. *Cassia occidentalis* est considérée au Paraguay mais aussi dans la région géographique plus large comme une « mauvaise herbe » des pâturage. D'ailleurs, des mesures sont prises pour empêcher sa propagation afin d'éviter les problèmes d'empoisonnement chez les animaux (Calderón et al., 2006).

L'enquête ethnobotanique n'a pas distingué les objectifs des remèdes de médecine traditionnelle qu'ils soient à visée ethno médicale ou ethno vétérinaire ce qui est souvent le cas (Balick, 1994 ; Hurrell, 2014 ; Leitão et al., 2013). Dans la grande

majorité des réponses, les plantes citées étaient surtout utilisées chez l'homme (94 % des participants). Les usages thérapeutiques des plantes en médecine humaine et vétérinaire montrent une similitude remarquable, certaines études ont noté qu'au moins 60% des plantes utilisées dans les pratiques vétérinaires traditionnelles sont également utilisées en médecine humaine et vice versa (Scarpa, 2004 ; Scarpa, 2000 ; Souto et al., 2011 ; Martínez and Luján, 2011).

D'après nos résultats, l'utilisation des plantes médicinales chez les animaux est peu répandue. Les raisons peuvent être multiples telles que : échantillons issus de la société urbaine, accès usuel et facile aux produits vétérinaires antiparasitaires de faible coût et d'utilisation aisée. Par ailleurs, dans la plupart des pays d'Amérique latine, il existe peu de restrictions sur l'achat de médicaments, et les agriculteurs peuvent les acheter sans prescription vétérinaire (Molento, 2007). Tous ces facteurs poussent les producteurs ou les propriétaires à privilégier les produits antiparasitaires chimiques de synthèse et laisser de côté les pratiques ethno vétérinaires traditionnelles.

Par ailleurs, il y a probablement une méconnaissance ou une sous-estimation de la situation des résistances aux AHs en Amérique du Sud. En effet, la pratique généralisée et exclusive d'usage de molécules chimiques pour le traitement des NGIs parasites a laissé un nombre alarmant de résistances aux anthelminthiques dans divers pays (Argentine, Uruguay, Paraguay et Brésil)(Waller et al., 1996 ; Maciel et al., 1996 ; Molento et al., 2011).

Dans cette perspective, les solutions à base de phytothérapie sont demandées en tant qu'alternative prometteuse aux molécules de synthèse notamment dans la lutte antiparasitaire (Burke et al., 2009 ; Molento, 2009). Comme mentionné par Athanasiadou et al. (2007), les produits dérivés d'extraits de plantes sont un mélange de substances bioactives et devraient donc exercer une pression de sélection plus faible sur les populations de NGIs par rapport aux AH commerciaux.

Nos résultats en relation à l'utilisation des plantes sont différents à des enquêtes en divers pays africains, où les éleveurs ont souvent recours à des pratiques ethno vétérinaires à base de plantes pour gérer des conditions telles que les parasitoses ou les carences nutritionnelles entre autres (Suleiman et al., 2014 ; Dharani et al., 2015 ; McGaw et al., 2020).

A la fin de cette première étape de notre travail de thèse, 4 plantes médicinales ont été sélectionnées pour des validations par de futures études = *Kyllinga odorata* Valh. (Cyperaceae), *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Verbena litoralis* Kunth. (Verbenaceae). Chacune de ces espèces appartient à une famille botanique différente. Implicitement, cela laisse supposer qu'en terme de métabolites secondaires, la caractérisation de ces plantes sur la base de critères phytochimiques sera *a priori* très variée (Bruneton, 2009 ; García, 2004).

Par ailleurs, la sélection de ces quatre espèces végétales basée sur une enquête en zones subtropicale d'Amérique du Sud (Paraguay) a aussi une autre importance scientifique générale, car ces 4 plantes ont aussi une répartition mondiale, comme présenté dans l'introduction de la thèse (Yadav et al., 2010 ; Monti and Mandrile, 1998 ; Tucker et al., 2006 ; Castro and Herrera, 1990 ; Ahamad et al., 2019 ; Szopa et al., 2020).

C. occidentalis et *A. absinthium* ont déjà fait l'objet d'études antérieures pour évaluer leurs effets anthelminthiques contre les NGI chez les petits ruminants (Egualé et al., 2011 ; Suleiman et al., 2014 ; Nsereko et al., 2019 ; Váradyová et al., 2018 ; Tariq et al., 2009). Cependant, pour *V. litoralis* et surtout pour *K. odorata* les références sur les effets antiparasitaires sont bien moins nombreuses (de Lima et al., 2020). Les résultats de notre thèse sur *K. odorata* peuvent donc être considérés comme originaux dans ce domaine.

A la suite de la sélection de ces 4 plantes, des extraits ont été préparés : Pour la préparation nous avons utilisé du méthanol. Le méthanol est un compromis réfléchi pour essayer de trouver un solvant adapté afin d'assurer l'extraction optimale des divers composés bioactifs suspectés d'être présents dans les plantes représentant 4 familles botaniques (Altemimi et al., 2017)

Objectif 2 : Résultats comparés des deux essais *in vitro* (Articles 2 et 3)

Pour cet objectif de vérification des effets AH les quatre extraits de plantes ont été évalués à l'aide de 2 types d'essais contre les larves et les œufs appliqués sur deux espèces de nématodes *H. contortus* et de *T. colubriformis*, respectivement

Pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anthelmintique de ressources naturelles, une des recommandations principales est de cibler plusieurs stades parasitaires (a minima 2) afin d'obtenir une évaluation plus complète des effets sur les NGI (Marie-

Magdeleine, 2009). Et donc des conclusions plus généralisables en considérant que pour certaines plantes bioactives et les PSM associés, en l'occurrence les tannins condensés, des effets diversifiés ont été démontrés sur 3 stades clefs du cycle biologique des NGIs (Hoste et al, 2015 ; Paolini et al, 2004) ..

En examinant les références bibliographiques antérieures, des études *in vitro* basée sur les NGI de caprins et d'ovins ont été souvent menées en utilisant deux espèces, *Haemonchus contortus* (64,2 %) et *Trichostrongylus spp.* (35,7 %) (revue Oliveira Santos et al., 2019). Ce choix de tester les extraits de façon concomitante sur une espèce abomasale et une espèce intestinale de NGI se justifie en raison de résultats précédents suggérant des variations d'efficacité selon les espèces de vers mais aussi les conditions locales d'environnement influant sur l'exposition des vers aux métabolites bioactifs (Athanasiadou et al., 2001 ; Paolini et al., 2005 ; Hoste et al., 2006 ; Brunet, 2008, Quijada - Pinango, 2015, Quijada et al., 2018).

Dans le laboratoire d'accueil où s'est déroulé cette thèse, le modèle principal d'étude de plantes bioactives et des PSM associés est représenté par des légumineuses tempérées ou tropicales contenant des polyphénols, notamment des tannins. Pour commencer à tester l'hypothèse du rôle des polyphénols dans les propriétés AH, le PVPP a été utilisé à de nombreuses reprises (Hoste et al, 2012 ; Zabré et al., 2017 ; Zanguéu et al., 2018). Le PVPP est un composé chimique aux propriétés inhibitrices contre les polyphénols, en particulier les tanins (Laborde et al., 2006 ; Verza et al., 2008). Cette démarche a été ici confortée et étendue par une caractérisation des composés actifs en utilisant une approche de phytochimie quantitative par la chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse (*i.e.* UPHLCMS). Cet essai a été dans une certaine mesure de manière « bio guidée » puisque la comparaison a été faite par UPHLCMS avec ou sans PVPP puis par mesures comparées en parallèle des activités *in vitro* à la fois sur la base des essais LEIA et EHA.

L'essai pour les études *in vitro* de l'AH sur les larves était : le test d'inhibition développement larvaire (**LEIA**) ; et sur les œufs : l'essai d'inhibition d'éclosion des œufs (**EHA**). Ces essais ont été largement utilisés pour cribler l'activité AH des extraits de plantes (Jackson et Hoste, 2010 ; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2009 ; Birhan et al., 2020). Les tests LEIA et EHA ont été choisis parce qu'ils sont simples à appliquer, reproductibles et permettent le calcul de valeurs EC50 (Jeske et al., 2009). L'utilisation

de larves et d'œufs dans les premières étapes d'évaluation de ressources bioactives est souvent privilégiée car ces stades sont aisés à collecter à l'inverse d'essais décrits sur les vers adultes qui s'avèrent aussi moins sensibles et supposent de plus le sacrifice d'animaux (Kotze et al., 2009)

La gamme de concentrations appliquées dans les deux études/ articles était de 1200 à 150 µg /ml. Ces concentrations sont situées dans les limites usuelles mentionnées dans la littérature (Birhan et al., 2020 ;Vargas-Magaña et al., 2014). Appliquer une gamme de concentrations décroissantes permet de tester l'hypothèse d'une réponse de type concentration-dépendante et aussi le calcul de valeurs d'EC50. Respecter des concentrations proches de celles utilisées précédemment est important pour standardiser la technique et faciliter les comparaisons entre études. Par ailleurs, (Marie-Magdeleine, 2009) a mentionné que la dose de solution plus forte doit également être adaptées à un aspect pratique pour assurer la commodité de lecture du test en évitant une forte turbidité. Dans notre cas les 4 extraits étaient complètement dilués à 1200 µg/ml et les tests restaient faciles à lire.

L'intérêt de cette discussion générale pour le chapitre 2 est de pouvoir réaliser ici une synthèse des résultats obtenus avec les 2 essais et de comparer les résultats sur les 2 espèces de NGI, les 4 plantes et les 2 stades. Ce type de comparaison relative est facilité par le calcul de valeurs d' EC50.

Pour faciliter cette démarche de comparaisons, le tableau ci-dessous a été créé en combinant les résultats des 2 essais *in vitro* résumés par les valeurs EC50 (Table11).

Tableau 11. Résumé des valeurs d'EC 50 (unité = µg/ml) selon les 2 types d'essais appliqués

| Espèces botaniques | LEIA | | EHA | |
|------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| | <i>H. contortus</i> | <i>T. colubriformis</i> | <i>H. contortus</i> | <i>T. colubriformis</i> |
| <i>C. occidentalis</i> | 250 (µg/ml) | 42 (µg/ml) | 359 (µg/ml) | 86 (µg/ml) |
| <i>A. absinthium</i> | 706 (µg/ml) | 277 (µg/ml) | 122 (µg/ml) | 137 (µg/ml) |
| <i>K. odorata</i> | 565 (µg/ml) | 611 (µg/ml) | 177 (µg/ml) | 144 (µg/ml) |
| <i>V. littoralis</i> | > 2400 µg/ml | > 2400 µg/ml | 866 (µg/ml) | 130 (µg/ml) |

Trois éléments de comparaisons basées sur ces valeurs d'EC 50 méritent d'être commentés

- 1) La comparaison entre les 4 plantes retenues à la suite de l'enquête ethno vétérinaire (chapitre 1) peut se résumer comme suit : *V. litoralis* apparaît la plante la moins active sur la base des 2 essais ; à l'inverse *C. occidentalis* montre les valeurs d'EC 50 les plus faibles à l'exception de l'EHA pour *H. contortus* ; deux plantes *A. absinthium* et *K. odorata* avec des valeurs d'EC 50 proches à l'exception des résultats LEIA pour *T. colubriformis*. Ces points ont été discutés dans chacun des 2 articles séparés
- 2) De manière générale, les valeurs d'EC50 obtenues avec le LEAI sont plus importantes que pour celles calculées pour le test EHA. Ces résultats sont en opposition avec d'autres études antérieures car, en général, les résultats d'EC50 obtenus avec le LEIA sont fréquemment rapportés comme inférieurs à ceux pour l'EHA.
- 3) La comparaison des réponses aux 2 essais peut aussi s'opérer sur la base des 2 espèces de NGI impliquées. Dans ce cadre, 2 types de réponses peuvent être distingués : **a)** des situations pour lesquelles les valeurs d'EC 50 sont similaires entre *Haemonchus* et *Trichostrongylus* : c'est le cas pour *K. odorata* (tests EHA et LEIA) et pour *A. absinthium* (test EHA) et **b)** un groupe où les valeurs d'EC50 obtenues avec *T. colubriformis* sont plus faible que avec *H. contortus* : c'est le cas pour *C. occidentalis* pour les 2 essais mais aussi *A. absinthium* (LEIA) et *V. litoralis* (EHA). De telles différences d'effets AH avec une même ressources en fonction des espèces de parasites cibles et les stades de développement du cycle biologique ont déjà été mentionnées dans des travaux précédents (Brunet, 2008)

Compte tenu des conditions appliquées lors des tests *in vitro*, pour lesquels aucun facteur lié à l'hôte n'interfère, il paraît logique de supposer que les résultats reposent avant tout sur des interactions de type pharmacologiques. Toutefois, ces interactions dépendent de multiples facteurs en particulier ceux liés aux métabolites des ressources naturelles mais aussi au stade et à l'espèce de parasites servant de modèles

De manière générale, l'activité AH des MSP est de façon évidente affectée par la concentration des MSP mais aussi par la nature des composés bioactifs. Pour exemple,

les études sur les tannins condensés ont montré que la classe et la structure des composés bioactifs intervenaient (Athanasidou et al., 2001 ; Novobilský et al., 2013 ; Quijada et al., 2015). Des résultats similaires ont été aussi illustrés avec la chicorée et les sesquiterpènes lactones (Hoste and Niderkorn, 2020 ; Peña-Espinoza et al., 2018). De plus, ces études ont aussi montré que dans le cas de substances naturelles il y a multiplicité de molécules bioactives impliquées (André et al., 2018 ; Girard et al., 2016 ; Athanasidou et al., 2005). Par ailleurs, pour ajouter à la complexité des interactions entre molécules ont aussi été signalées (Klongsiriwet et al., 2015 ; Borges and Borges, 2016 ; Escareño-Díaz et al., 2019). Les différences d'efficacité peuvent aussi s'expliquer par des différences de composition biochimique des principales structures exposées aux PSM chez les 2 stades de NGI (larves³ et œufs) (Rogers and Sommerville, 1957 ; Rogers and Sommerville, 1963). Les mêmes considérations et phénomènes ont également été enregistrés avec des médicaments anthelminthiques conventionnels de synthèse (Mansfield et al., 1992 ; Hoste et al., 2015).

Lorsque des activités AH d'extraits ont été démontrées sur la base des 2 essais pour 3 des 4 plantes, une autre question a ensuite été abordée : ***si les extraits de plantes ont un effet AH in vitro, ces effets sont-ils dus ou non à des polyphénols ?*** Comme il a été mentionné dans l'introduction, les polyphénols sont un groupe de métabolites secondaires, incluant les tannins, largement répandus dans le Règne Végétal et qui ont fait l'objet de nombreuses études pour leurs propriétés zootechniques, en raison des effets sur la physiologie des ruminants et aussi en terme d'effets antiparasitaires potentiels (incluant les NGI mais aussi les coccidies) (Achika et al., 2014 ; Mueller-Harvey et al., 2019 ; Morgan et al., 2019). Pour les raisons précédemment exposées, à titre d'hypothèse, nous avons essayé de prouver le rôle de ce groupe de métabolites dans l'activité anthelmintique des 3 plantes retenues.

A cette fin, un inhibiteur des polyphénols le PVPP a été utilisé. La spécificité du PVPP vis-à-vis des tannins peut être discutée car elle ne paraît pas exclusive. En effet, ce sont des polymères arborant de nombreux atomes d'oxygène capables de former des liaisons avec tout groupement phénolique (Silanikove et al., 2001). En conséquence, le PVPP peut fixer les tannins mais aussi les flavonoïdes et les polyphénols en général (Doner et al., 1993 ; Verza et al., 2008).

Pour mieux illustrer ces résultats, comme dans la section précédente, un tableau visant à une synthèse des résultats des effets AH avec et sans PVPP pour les 2 essais (LEIA et EHA) afin de faciliter les comparaisons a été préparé (Table12).

Tableau 12.

Résumé des valeurs des pourcentages d'inhibition (%) avec et sans PVPP et le ratio de variabilité selon les 2 types d'essais appliqués

| Inhibition | 1200 µg / ml | LEIA | | | EHA | | |
|-------------------------|------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|-------------|
| | | Sans PVPP (%) | Avec PVPP (%) | Variabilité | Sans PVPP (%) | Avec PVPP (%) | Variabilité |
| <i>H. contortus</i> | <i>K. odorata</i> | 89 | 52 | 1.7 | 22 | 23 | 1.0 |
| | <i>C. occidentalis</i> | 100 | 13 | 7.7 | 59 | 38 | 1.6 |
| | <i>A. absinthium</i> | 89 | 39 | 2.3 | 55 | 89 | 0.6 |
| | <i>V. litoralis</i> | NA | NA | NA | 40 | 22 | 1.8 |
| <i>T. colubriformis</i> | <i>K. odorata</i> | 86 | 59 | 1.5 | 56 | 76 | 0.7 |
| | <i>C. occidentalis</i> | 96 | 33 | 2.9 | 75 | 34 | 2.2 |
| | <i>A. absinthium</i> | 99 | 33 | 3 | 61 | 73 | 0.8 |
| | <i>V. litoralis</i> | NA | NA | NA | 79 | 61 | 1.3 |

Les données de variabilité reflètent le rapport entre les traitements (sans PVPP / avec PVPP). Les valeurs inférieures à 1 montrent une inhibition et les valeurs inférieures à 0 une augmentation de l'effet AH.

Pour présenter une synthèse résumant l'essentiel des résultats de ce tableau12, **deux grandes catégories** de résultats peuvent être distinguées sur la base de la diversité d'essais conduit en fonction des modèles de NGIs et de plantes pour lesquels l'addition de PVPP a été conduit

- **En bleu**, une majorité de résultats indiquant des réductions d'inhibition modérées ou majeures (ex *C. occidentalis* LEAI pour *H. contortus* a présenté un rapport 7.7 plus sans PVPP) des EC50. Ces résultats laissent supposer un rôle partiel ou majeur des polyphénols, y compris les tannins, dans les effets AH mesurés. Ce cas regroupe tous les résultats liés au test LEIA.
- **En rose** trois situations liés à des résultats d EHA pour lesquelles l'addition de PVPP soit I) n'a eu aucun effet soit II) a provoqué une augmentation d'effets AH. Pour ce groupe, les conclusions vont à l'opposé de l'hypothèse initiale (rôle majeur des polyphénols dans les propriétés AH des 4 plantes retenues à la suite de l'enquête ethno vétérinaire)

Les résultats de diminution de l'effet AH après addition de PVPP étaient plus évidents pour le LEIA plutôt que pour le test EHA, mais aucun des résultats avec ces extraits n'ont montré un retour total aux valeurs témoins. Ces résultats suggèrent donc que d'autres métabolites bioactifs, seuls ou en synergie, peuvent être présents dans tous les extraits testés et expliquer leur bioactivité.

Les résultats obtenus avec l'extrait de *C. occidentalis*, qui appartient à la famille botanique des Fabacées, présentaient la diminution plus significative en terme de LEIA et EHA après l'addition du PVPP. Cependant, ce déclin n'était pas complet jusqu'à un retour vers des valeurs initiales de restauration totale à des valeurs témoins.

A la suite de cette deuxième étape visant à une analyse préparatoire pour identifier certains groupes majeurs de MSP sur la base des hypothèses exposées (rôle majeur des polyphénols), une question s'est posée : ***existe-t-il d'autres métabolites bioactifs présents dans les extraits qui sont capables d'expliquer l'activité AH contre les larves infestantes et les œufs ? ET comment mieux identifier d'autres métabolites actifs ?***

Pour répondre à cette question, des profils UHPLC-HRMS ont été réalisés sur les extraits des 3 plantes les plus efficaces avec et sans PVPP. Des analyses LCSM ont été réalisés et le pic de métabolites par HPLC a été noté et des analyses comparatives de données a été réalisée. Sur cette base comparative, certains métabolites ont été identifiés comme présumés responsables de l'action AH. Les discussions spécifiques sur ces aspects ont été présentés dans la discussion de l'article 2

Objectif 3 : Essai *in vivo* (Articles 4 et 5)

Avant de passer à la dernière étape, il convient de rappeler que dans l'étude des ressources naturelles pour proposer des alternatives à la maîtrise des NGI chez les petits ruminants, trois principaux modes d'exploitation des plantes et de leurs métabolites secondaires sont envisagés: Chaque option présente des avantages et des inconvénients. Les plantes bioactives, quelle que soit leur forme d'utilisation, représentent des ressources potentielles à faible coût et localement disponibles qui contiennent des substances bioactives pouvant être mises à disposition des animaux pour leur santé et leur bien-être .

1. Isolement et extraction de molécules bioactives purifiées pour le développement de nouveaux médicaments. Un exemple récent est celui de

l'artémisinine, un antipaludéen de nouvelles génération (*Artemisia annua*) (Bhowmik et al., 2010; Squires et al., 2011).

Chaque année, de nouvelles technologies émergent et l'automatisation rend la caractérisation des métabolites secondaires de plus en plus routinière dans la recherche des plantes (Jorge et al., 2016; Altemimi et al., 2017; Castañeda-Ramírez et al., 2019).

2. Préparation et application de remèdes de phytothérapie, à base d'extraits de plantes concentrés ou d'aromathérapie (à base d'huiles essentielles)
3. Consommation directe des plantes bioactives comme alicament vétérinaire, ce qui suppose une qualité nutritionnelle et une bonne palatabilité. L'avantage est que les ressources naturelles sont généralement adaptées au milieu dans lequel elles sont utilisées (disponibilité des plantes, facilité de culture, adaptation au climat et au sol). Un des inconvénients est que, pour qu'un alicament soit efficace, cela suppose le besoin d'atteindre une concentration suffisante en molécules bioactives dans la ration par exemple pour obtenir les effets antiparasitaires attendus (Hoste et al., 2015). Pour répondre à cette problématique, une option commence à être explorée qui est fondée sur la combinaison de différentes ressources présentant une diversité de métabolites actifs. Il s'agit souvent de formes conservées notamment des granulés déshydratés, associant deux fourrages ou avec ajout de co produits agro industriels de faible coût et riche en MSP.

Après les résultats obtenus dans les études *in vitro*, la prochaine étape initialement prévue dans le cadre de cette thèse était la réalisation d'un essai *in vivo* chez des petits ruminants afin de confirmer le potentiel bioactif d'une ou plusieurs plantes du Paraguay.

Cependant, en raison de conditions sanitaires mondiales particulières rencontrées dès mars 2020 (pandémie de Covid19), cet essai *in vivo* prévu au Paraguay n'a pu être réalisé. En conséquence, un essai visant à évaluer les effets AH de ressources riches en tannins condensés, notamment d'origine tropicale (Quebracho) a été mis en place en France par l'équipe INMD afin d'atteindre les objectifs prévus dès le début du projet et aller jusqu'au bout de la démarche engagée (enquête ethnobotanique /essai *in vitro* /essai *in vivo*). Pour se faire, une première étape a consisté à participer à une

revue bibliographique (**Article 4**) de diverses ressources riches en tannins exploitables afin de préparer l'essai *in vivo* réalisés sur des brebis (**Article 5**).

Cette revue présentée dans l'article 4 a eu pour objectif de présenter une description critique des application possibles de co - produits agro industriels (CPAI) en se concentrant sur les ressources contenant des tanins, leurs valeurs nutritionnelles et sanitaires combinées, notamment en lien avec des activités AH potentielles contre les NGI chez les ruminants. Dans cette revue, différentes CPAI d'intérêt ont été classées en 5 catégories avec une gamme de CPAI contenant des tanins d'origines géographiques et botaniques diverses. Ces 5 catégories sont résumées ci-dessous.

Tableau 13. Les modèles plus représentatifs des CPAI

| CPAI | Modèles les plus représentatifs | References |
|---|--|---|
| CPAI de noix tempérées | Noisettes (<i>Corylus avellana</i> L. Betulaceae) et châtaignes (<i>Castanea sativa</i> Fagaceae) | (Paolini, Fouraste, and Koste 2004), (Hoste et al. 2015) (Manolaraki et al., 2010), (Paolini, et al, 2004), (Bahuaud et al., 2006), (Manolaraki et al., 2010), (Desrues et al., 2016) (Niderkorn et al., 2020) |
| CPAI des zones méditerranéennes | effets AH des cosses de caroube sous-produits (BP CaBP) - Caroubier (<i>Ceratonia siliqua</i>) | (Hajaji et al., 2011), (Ramón-Laca and Maberley, 2004), (Marakis, 1996) . (Kotrotsios et al., 2012) (Tous et al., 2009) (Silanikove et al., 2006) (Saratsi et al., 2020) |
| CPAI des arbres tempérés (écorce) | Pin sylvestre (<i>Pinus sylvestris</i>) et Épinette de Norvège (<i>Picea abies</i>), Bouleau pubescent (<i>Betula pubescens</i>) | (Larsen, et al., 2021). (Ropiak, Ramsay, and Mueller-Harvey 2016 (Waller et al., 2001) (Quijada et al., 2015) (Desrues et al., 2016). (Williams et al., 2017) (Desrues et al., 2016). (Mupeyo et al., 2011) (Musonda et al., 2009) |
| CPAI de l'industrie du bois dans les régions tropicales et subtropicales | Acacia noir (<i>Acacia mearnsii</i>) et quebracho (<i>Schinopsis spp.</i>) | (Ogawa and Yazaki, 2018). (Steinshamn, 2014). (Varmola and Carle, 2002) (Chan et al., 2015) (Ogawa and Yazaki, 2018) (Minho et al., 2008) (Yoshihara et al., 2014) (Cenci et al., 2007), (Minho et al., 2010), (Costa-Júnior et al., 2014) (Costa-Júnior et al., 2014). (Lima et al., 2019) |
| CPAI provenant d'autres ressources tropicales (hors écorce) | Café moulu <i>Coffea arabica</i> (SCG) ou <i>Theobroma cacao</i> (cosses et feuilles de cabosse) | (Vargas-Magaña et al., 2014) (Vargas-Magaña et al., 2012). (González-Pech et al., 2015), (Ventura-Cordero et al., 2019) (Lecasble, 2012) (Covarrubias-Cárdenas, 2013) (Chan-Pérez et al., 2016). |

L'un des principaux objectifs pour les agro-industries qui génèrent des sous-produits est d'ajouter de la valeur aux ressources qui sont généralement considérées comme des déchets (Correddu et al., 2020 ; Mancilla-Montelongo et al., 2021). Il y a un autre intérêt à mentionner, celui de pouvoir aider à résoudre le problème de la variabilité inhérente de la teneur en PSM dans les plantes nutraceutiques et donc la variabilité observée des effets antiparasitaires associés. Le recours à de tels co produits permet d'ajuster au mieux la quantité des PSM sous réserve de conserver la palatabilité (Hoste 2015 ; Charlier et al., 2020).

Essai *in vivo* (Article 5)

Depuis quelques années, certains industriels en nutrition des animaux d'élevage se sont intéressés à des produits combinant valeur nutritionnelle et sanitaire pour répondre aux demandes sociétales et réglementaires afin de limiter l'usage des antibiotiques ou antiparasitaires de synthèse et offrir des solutions face au développement des résistances aux antibiotiques et aux antiparasitaires. Les formes déshydratées de produits naturels présentent plusieurs avantages dont la possibilité de vérifier la qualité et la teneur en terme de MSPs des composés végétaux avant utilisation et de faciliter leur distribution dans les élevages. Les conséquences de divers procédés de déshydratation sur la préservation des composés actifs ont été examinés (Gaudin,2017).

Les produits commerciaux du type *alicament* représentent une option exploitable pour les producteurs d'aujourd'hui. Des études menées avec des granulés deshydratés de Sainfoin (Hoste et al., 2015; Gaudin et al., 2017), Sulla (Athanasiadou et al., 2005), *Sericea lespedeza* (Gujja et al., 2013), *Leucaena leucocephala* (Marie-Magdeleine et al., 2020), Quebracho (Juhnke et al., 2012), des mélanges des plantes bioactives, de sous-produits agro - industriels dans la rations des animaux ont été associés à des résultats prometteurs, affectant la dynamique des infestations par des NGI (Vargas-Magaña et al., 2014; Parisi et al., 2018; Marchand et al, 2019; Fraga-Corral et al., 2021; Hoste et al., 2021).

Pour cette étude *in vivo*, des brebis parasitées ont été nourries en conditions contrôlées avec ou non une supplémentation en granulés déshydratés contenant des tannins d'origine diverse. (Sainfoin et Quebracho)

Pour résumer les principaux résultats obtenus dans cet essai *in vivo*, il a été constaté : 1) en terme d'excrétion des œufs de NGI, une activité AH des BP conduisant à une réduction modérée des OPG proche de la signification ($P < 0,08$); 2) aucun effet sur les valeurs d'hématocrite et 3) un gain de poids quasi doublé chez les brebis recevant le granules BP sans différence significative

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les extraits de Sainfoin et Quebracho ont un effet contre différentes espèces de GIN de manière dose-dépendante (Coe and Anderson, 1996; Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2004; Hoste et al., 2006; Manolaraki, 2011; Juhnke et al., 2012). De plus, les valeurs de réduction des excréments d'œufs de parasites mentionnés ont été parfois importantes et significatives, dépassant les 50 % de baisse (Manolaraki et al, 2010, Paolini et al 2003 ; Gaudin et al, 2016). *En comparaison, les résultats de notre étude s'avèrent décevants.*

Plusieurs explications peuvent être évoquées.

- *Un problème d'appétence* Les aliments en pellets sont plus faciles à manipuler, plus agréables au goût et donnent généralement de meilleurs résultats d'alimentation et de production (Colucci and Grovum, 1993). De plus, dans notre essai, les refus des granulés ont été évalués, montrant une consommation totale des BP largement acceptés par les animaux.
- Ce résultat pourrait être dû à une quantité insuffisante de complément offert aboutissant à niveau insuffisant de métabolites bioactifs dans la ration de chaque animal mais il a été décidé de respecter les recommandations du fabricant (70g/jour)
- Enfin, les effets moyens pourraient s'expliquer par une hétérogénéité de consommation chez les animaux lié à la distribution de supplément par groupe et non en cage individuelle.

Un autre facteur évoqué dans l'Article 5 pourrait être dû à la durée de l'essai (D21).

La mesure de l'hématocrite a été la principale mesure physiopathologique réalisée pour évaluer l'impact de la distribution des granulés bioactifs sur la résilience de l'hôte à quoi s'ajoutent divers paramètres zootechniques. Nos résultats sur les valeurs physiopathologiques et productives suggèrent des effets positifs de la consommation de CT sur la résilience des brebis, mais ils sont en général non significatifs et très limités.

Au vu de la comparaison avec les résultats de la littérature, nous considérons que de nouveaux essais *in vivo* sont à envisager avec les mêmes ressources mais en augmentant les quantités et sur une durée plus longue (exemple deux ou trois cycles de vie des NGI).

V. CONCLUSION

A ce stade, cette thèse peut être considérée comme une étude préliminaire des quatre plantes retenues. Nous concluons que *C. occidentalis* paraît la plante avec le potentiel AH le plus clair sur la base des résultats des 2 essais *in vitro* sur les œufs et les larves infestantes. Un effet plus modéré concerne *K. odorata* et *A. absinthium*. Quant à *V. litoralis*, seule une action sur les œufs a été notée et avec des valeurs d'EC50 plus élevée que les 3 autres plantes. De manière générale, *H. contortus* s'est avéré moins sensible (valeurs de EC50 supérieures) aux effets des différents extraits que *T. colubriformis*.

Pour les raisons exposées dans la discussion générale, il n'a pas été possible de réaliser, comme initialement prévu, des essais *in vivo* au Paraguay avec quelques-unes des plantes sélectionnées. Cependant, l'essai *in vivo* mis en place a malgré tout permis d'évaluer des granulés déshydratés qui présentent un double intérêt : 1) leur teneur en quebracho qui est une ressource locale d'Amérique du Sud ; 2) la formulation choisie puisque ce type de granulés offrent des possibilités d'exportation et aussi des facilités de conservation et de stockage. Même si globalement, les résultats obtenus sont décevants, ils ouvrent la voie pour de futurs travaux.

Un dernier aspect dans la mise en place d'alternatives aux AH de synthèse pour lutter contre les NGIs n'a pas été abordé dans cette thèse mais devra être considéré. Il s'agit de l'adoption par les éleveurs d'innovations et de pratiques peu usuelles. Comme souligné par Mahieu (2014), cette étape nécessite de passer à un encadrement technique repensé, afin d'expliquer aux éleveurs « comment choisir parmi la palette d'options possibles dans, celles qui seront adaptées à sa situation particulière, à son contexte épidémiologique local en considérant les contraintes économiques et organisationnelles aussi bien que les bénéfices en termes de santé animale et de production ».

En conclusion générale : la comparaison directe avec des médicaments anthelminthiques devra attendre que les MSP bioactifs soient identifiés et purifiés à partir d'extraits de plantes. Cependant, des différences sont déjà évidentes : alors que les anthelminthiques commerciaux sont conçus pour tuer 100 % d'une population de vers chez un animal après administration unique, les objectifs de l'exploitation de

plantes bioactives sont très différents. Il suppose un changement complet de paradigme. Nous recherchons des produits bioactifs qui offrent un certain degré d'effet anthelminthique lorsqu'ils sont ingérés par un animal sur une période de temps longue, sans s'attendre à ce qu'ils tuent ou empêchent l'établissement de tous les vers. Les mécanismes d'action pourraient être multiples et probablement pleiomorphiques ce qui *a priori* devrait freiner le développement de résistances. Le but est de ralentir l'apparition de la résistance aux anthelminthiques de synthèse et de proposer des alternatives durables dans une gestion intégrée du parasitisme en élevage.

VI. PERSPECTIVES

Trois axes pour de futures études ou travaux peuvent être dégagés à partir de ce travail de thèse

- ***D'un point de vue scientifique***
- Il serait intéressant pour compléter des études pour l'essentiel fonctionnelles d'évaluer les dommages structurels chez les larves, les œufs ou les vers adultes que pourraient provoquer le contact avec des extraits, ceci au des moyens méthodologique d'imagerie de tels que la microscopie électronique, la microscopie de contraste et des méthodes d'histochimie.
- -Une évaluation des métabolites secondaires responsables des effets AH selon un processus bio-guidé combinant mesure d'activité biologique et isolement de composés phytochimiques, est à envisager dans le cadre de collaborations multidisciplinaires.
- Enfin au-delà de mesures d'efficacité, il paraît nécessaire de ne pas oublier la possible toxicité des plantes et de certains PSMS, comme l'illustre la toxicité mentionnée de *Cassia occidentalis*. Pour cet objectif (évaluation toxicologique des extraits et composés bioactifs), des modèles de laboratoire peuvent être envisagés pour les projets futurs en complément des tests biologiques d'efficacité.

- ***D'un point de vue des futures de recherches appliquées et de développement en élevages***

Un des regrets de cette thèse est lié à l'impossibilité d'avoir mis en place des essais in vivo au Paraguay. La mise en place d'essais en conditions contrôlés est à court terme une des perspectives envisagées avec une ou deux des plantes étudiées. Si les données in vitro sont plutôt favorables au choix de *C. occidentalis*, *K. odorata* a été beaucoup moins étudié. Ces études d'efficacité chez les petits ruminants devront être couplées à une évaluation nutritionnelle de chaque plante retenue ainsi que d'examen de palatabilité pour déterminer leur contour comme alicament potentiel. A plus long terme et en fonction des résultats favorables ou non, des études en conditions d'élevage peuvent aussi être prévue pour préconiser une exploitation optimale en fonction des espèces parasites présentes et des conditions épidémiologiques

- ***D'un point de vue des politiques publiques de santé***

Les résultats de l'enquête ethno botanique ont souligné la nécessité de mise en place de politiques nationales / régionale voir internationale sur les plantes médicinales pour préserver la biodiversité, éviter la surexploitation et au minimum, favoriser une standardisation des procédures concernant l'utilisation, l'obtention et la vente des plantes médicinales.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, K. A., Taylor, P. M., & Stubbings, L. A. (2007). Sustainable worm control strategies for sheep. 2nd edition. A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisors. SCOPS ER, 1–48.
- Abdullahi, A. A. (2011). Trends and challenges of traditional medicine in Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5 SUPPL.), 115–123. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i5S.5>
- Achika, J., Arthur, D. E., Gerald, I., & Adedayo, A. (2014). A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 7(8), 01–08. <https://doi.org/10.9790/5736-07810108>
- Aerts, R. J., Barry, T. N., & McNabb, W. C. (1999). Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. In *Agriculture, Ecosystems and Environment* (Vol. 75, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00062-6)
- Aguerre, S. (2019). *Résistance génétique aux nématodes gastro-intestinaux chez les ovins : évaluation des stratégies de sélection et de leur impact à l'échelle de l'élevage*. <https://hal.inrae.fr/tel-02788136>
- Aguirre-Serrano, A. M., Ojeda-Robertos, N., González-Garduño, R., Peralta-Torres, J. A., Luna-Palomera, C., & Torres-Acosta, J. F. de J. (2020). Influence of lambing and litter size at birth or weaning on the proportion of pelibuey ewes treated with an anthelmintic in a targeted selective scheme in the humid tropics. *Small Ruminant Research*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106049>
- Ahamad, J., Mir, S. R., & Amin, S. (2019). A pharmacognostic review on *Artemisia absinthium*. *International Research Journal Of Pharmacy*, 10(1), 25–31. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.10015>
- Ali, R., Khan, S., Khan, M., Adnan, M., Ali, I., Khan, T. A., Haleem, S., Rooman, M., Norin, S., & Khan, S. N. (2020). A systematic review of medicinal plants used against *Echinococcus granulosus*. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240456>
- Ali, R., Rooman, M., Mussarat, S., Norin, S., Ali, S., Adnan, M., & Khan, S. N. (2021). A Systematic Review on Comparative Analysis, Toxicology, and Pharmacology of Medicinal Plants Against *Haemonchus contortus*. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Front Pharmacol. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.644027>
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., & Hoste, H. (2011). Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.052>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. In *Plants* (Vol. 6, Issue 4, p. 42). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Amaradasa, B. S., Lane, R. A., & Manage, A. (2010). Vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* pastures in response to climatic conditions. *Veterinary Parasitology*, 170(1–2), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.026>
- Amat, N., Upur, H., & Blažeković, B. (2010). *In vivo* hepatoprotective activity of the

- aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.023>
- Amor, E. C., Quánico, J. P., & Perez, G. G. (2009). Analgesic activity of extracts of *Kyllinga monocephala*. *Pharmaceutical Biology*, 47(7). <https://doi.org/10.1080/13880200902915614>
- Anderson, D. E., & Rings, D. M. (2009). Current Veterinary Therapy. In *Current Veterinary Therapy*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3591-6.X0135-2>
- André, W. P. P., Ribeiro, W. L. C., De Oliveira, L. M. B., Macedo, I. T. F., Rondon, F. C. M. E., & Bevilaqua, C. M. L. (2018). Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46(1), 14. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81804>
- ANSES. (2002). Autorisation de mise sur le marché (AMM) médicaments vétérinaires | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/autorisation-de-mise-sur-le-marché-amm-médicaments-vétérinaires>
- Anthony, J. P., Fyfe, L., & Smith, H. (2005). Plant active components - A resource for antiparasitic agents? In *Trends in Parasitology* (Vol. 21, Issue 10, pp. 462–468). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.004>
- Ariño, A. (1999). Variabilidad química en los aceites esenciales de *Artemisia absinthium* de la Península Ibérica [Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=213812&info=resumen&idioma=SPA>
- Arroyo-Lopez, C., Manolaraki, F., Saratsis, A., Saratsi, K., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Voutzourakis, N., Hoste, H., & Sotiraki, S. (2014). Anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed to lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasite*, 21(9), article 71 (9 p.). <https://doi.org/10.1051/parasite/2014074>
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., & Coop, R. L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *In vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99(3). [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00467-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00467-8)
- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., & Coop, R. L. (2005). Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology*, 127(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.031>
- Athanasiadou, Spiridoula, & Kyriazakis, I. (2004). Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(4), 631–639. <https://doi.org/10.1079/pns2004396>
- Athanasiadou, Spiridoula, Kyriazakis, I., Jackson, F., & Coop, R. L. (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(6), 697–706. <https://doi.org/10.1079/bjn2001468>
- Ayman, M., Adanić, M., MartínezRafael, B., Sekulić, A., Schmutzler, M., FerrerasZamora, J., Loza, A., Collareta, M., Hayden, P., Brohan, J., Lefort, M., ArenzanaSeisdedos, Á., ForesNovales, B., Gurau, V., Singh, R., Royle, A., Wernerman, J., Bland, M., Pierro,

- D., ... SanzGarcía, M. (2012). Mortality after surgery in Europe: A 7 day cohort study. *The Lancet*, 380(9847). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61148-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61148-9)
- Aymeric, F. (2011). Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance au lévamisole chez les strongles digestifs. Thèse d'Université François Rabelais de Tours.188
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., & Hoste, H. (2006). Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, 132(4). <https://doi.org/10.1017/S0031182005009509>
- Balick, M. J. (1990). Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. In *Ciba Foundation symposium* (Vol. 154). Ciba Found Symp. <https://doi.org/10.1002/9780470514009.ch3>
- Balick, M. J. (1994). Ethnobotany, drug development and biodiversity conservation--exploring the linkages. *Ciba Foundation Symposium*, 185. <https://doi.org/10.1002/9780470514634.ch2>
- Balick, Michael J., Kronenberg, F., Ososki, A. L., Reiff, M., Fugh-Berman, A., O'Connor, B., Roble, M., Lohr, P., & Atha, D. (2000). Medicinal plants used by Latino healers for women's health conditions in New York City. *Economic Botany*, 54(3), 344–357. <https://doi.org/10.1007/BF02864786>
- Bassetto, C. C., Almeida, F. A., Newlands, G. F. J., Smith, W. D., Castilhos, A. M., Fernandes, S., Siqueira, E. R., & Amarante, A. F. T. (2018). Trials with the *Haemonchus vaccine*, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. *Veterinary Parasitology*, 264, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.11.006>
- Bassirou, B. (1993). Epidémiologie des nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants de race Djallonké au Togo (*Région des plateaux*).
- Bate-Smith, E. C. (1973). Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry*, 12(7). [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80409-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80409-1)
- Batiha, G. E. S., Olatunde, A., El-mleeh, A., Hetta, H. F., Al-rejaie, S., Alghamdi, S., Zahoor, M., Beshbishy, A. M., Murata, T., Zaragoza-bastida, A., & Rivero-perez, N. (2020). Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of wormwood (*Artemisia absinthium*). In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060353>
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (Vol. 13, Issue 2). <https://doi.org/10.1177/154411130201300208>
- Bernhoft, A., Flaten, T. P., Holmsen, E., Langmark, F., Norum, K. R., Bal, B. S., Singh, R., Steinnes, E., & Aaseth, J. O. (2008). Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals. In *The Norwegian Academy of Science and Letters*. <http://www.dnva.no/geomed>
- Besier, B. (2007). New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology*, 23(1). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.11.004>
- Besier, R. B. (2012). Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.057>
- Bhowmik, D., Yadav, J., Tripathi, K. K., & Sampath Kumar, K. P. (2010). Herbal Remedies of *Azadirachta indica* and its Medicinal Application. *J. Chem. Pharm. Res*, 2(1), 62–

- Birhan, M., Gesses, T., Kenubih, A., Dejene, H., & Yayeh, M. (2020). Evaluation of Anthelmintic Activity of Tropical Taniferous Plant Extracts Against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Medicine: Research and Reports, Volume 11*, 109–117. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s225717>
- Bishop, S. C., & Morris, C. A. (2007). Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 70(1). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.01.006>
- Blackhall, W. J., Prichard, R. K., & Beech, R. N. (2003). Selection at a γ -aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 131(2), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00201-9)
- Bonnefont, M.; Canellas, A. (2014). Optimisation des outils de diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2010). Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(3), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.030>
- Borges, D. G. L., & Borges, F. de A. (2016). Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda*, 3(1), 0–0. <https://doi.org/10.4322/nematoda.00916>
- Bosc, C. (2016). Anthelminthiques et strongyloses digestives chez le cheval : résistances rencontrées et moyens de lutte. Enquête sur la gestion du parasitisme en Bretagne. Université de Rennes.
- Braga, V. F., Mendes, G. C., Oliveira, R. T. R., Soares, C. Q. G., Resende, C. F., Pinto, L. C., Santana, R. de, Viccini, L. F., Raposo, N. R. B., & Peixoto, P. H. P. (2012). Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 84(1), 139–148. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652012005000009>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. In *Nutrition Reviews* (Vol. 56, Issue 11). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brunet, S., & Hoste, H. (2006). Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20). <https://doi.org/10.1021/jf0610007>
- Brunet, S., (2008). Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.246
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie* (Tec & Doc). <https://www.lavoisier.fr/livre/genie-pharmaceutique/pharmacognosie-phytochimie-plantes-medicinales-5e-ed/bruneton/descriptif-9782743021658>
- Bussieras, J.; Chermette, R. (1995). *Abrégé de Parasitologie Vétérinaire, Fascicule III : Helminthologie Vétérinaire. Polycopié.*
- Bussiéras, J.; Chermette, R. (1988). *Abrégé de parasitologie vétérinaire, Fascicule III : Helminthologie.*
- Calderón,  . I., Vázquez, Y., Solís, P. N., Caballero-George, C., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Correa, M., & Gupta, M. P. (2006). Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. *Pharmaceutical Biology*, 44(2).

- <https://doi.org/10.1080/13880200600592285>
- Carrillo-Rosario, T., & Moreno, G. (2006). Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela. *Revista de la Facultad de Farmacia - Universidad de Los Andes.*, 48 (2)(2), 8. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/23889>
- Castañeda-Ramírez, G. S., Torres-Acosta, J. F. de J., Sandoval-Castro, C. A., Borges-Argáez, R., Cáceres-Farfán, M., Mancilla-Montelongo, G., & Mathieu, C. (2019). Bio-guided fractionation to identify *Senegalia gaumeri* leaf extract compounds with anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Veterinary Parasitology*, 270, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.05.001>
- Castañeda-Ramírez, G., Torres-Acosta, J., Sandoval-Castro, C., González-Pech, P., Parra-Tabla, V., & Mathieu, C. (2017). Is there a negative association between the content of condensed tannins, total phenols, and total tannins of tropical plant extracts and *in vitro* anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs? *Parasitology Research*, 116(12). <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5650-4>
- Castro, O., & Herrera, E. (1990). Potencial Biológico y Químico de *Verbena litoralis*, Una Planta Medicinal Usada en Costa Rica como Agente Antidiarreico. *Química Nova*, 13(4), 310–311.
- Cattadori, I. M., Pathak, A. K., & Ferrari, M. J. (2019). External disturbances impact helminth–host interactions by affecting dynamics of infection, parasite traits, and host immune responses. *Ecology and Evolution*, 9(23), 13495–13505. <https://doi.org/10.1002/ece3.5805>
- Cenci, F. B., Louvandini, H., McManus, C. M., Dell'Porto, A., Costa, D. M., Araújo, S. C., Minho, A. P., & Abdalla, A. L. (2007). Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Veterinary Parasitology*, 144(1–2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.021>
- Cerbelaud, R. (1910). *Manuel vétérinaire, ou Formulaire des médications rationnelles et des remèdes secrets (conforme au Codex 1908)*. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9612755j>
- Céspedes de Zárate, C.; I.; González Zalema, G.; Delmás de Rojas, G. (2011). Aclimatación de las especies de dos especies de Baccharis: *Baccharis trimera* (Lees.) (Jaguarete ka'a) DC. y *Baccharis crispa* Spreng. (Jaguarete ka'a). *Rojasiana*, 10(2), 63–79. <https://docplayer.es/97179615-Aclimatacion-de-las-especies-baccharis-crispa-spreng-jaguarete-ka-a-y-baccharis.html>
- Chagas, A. C. S. (2015). Medicinal plant extracts and nematode control. In *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* (Vol. 10). CABI International. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510008>
- Chan-Pérez, J. I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G. S., Vilarem, G., & Mathieu, C. (2016). *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology*, 217, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.001>
- Chan-Pérez, J., Torres-Acosta, J., Sandoval-Castro, C., Castañeda-Ramírez, G., Hoste, H., Vilarem, G., & Mathieu, C. (2017). Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae. *Veterinary Parasitology*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.023>

- Chan, J. M., Day, P., Feely, J., Thompson, R., Little, K. M., & Norris, C. H. (2015). *Acacia mearnsii* industry overview: current status, key research and development issues. *Southern Forests*, 77(1), 19–30. <https://doi.org/10.2989/20702620.2015.1006907>
- Charlier, J., Morgan, E. R., Rinaldi, L., Van Dijk, J., Demeler, J., Höglund, J., Hertzberg, H., Van Ranst, B., Hendrickx, G., Vercruyse, J., & Kenyon, F. (2014). Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Veterinary Record*, 175(10), 250–255. <https://doi.org/10.1136/vr.102512>
- Charlier, Johannes, Höglund, J., Morgan, E. R., Geldhof, P., Vercruyse, J., & Claerebout, E. (2020). Biology and Epidemiology of Gastrointestinal Nematodes in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.001>
- Chartier, C.; Itard, J.; Morel, P.C, Troncy, P.-M. . (1981). *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. <https://www.eyrolles.com/Sciences/Livre/precis-de-parasitologie-veterinaire-tropicale-9782743003302/>
- Chartier, C., & Hoste, H. (1994). Anthelmintic treatments against digestive-tract nematodes in grazing dairy goats with high or low levels of milk production. *Veterinary Research*, 25(5).
- Chartier, C., Lespine, A., Hoste, H. (2001). Les endectocides chez les caprins : pharmacologie, efficacité et conditions d'utilisation dans le contexte de la résistance aux anthelminthiques. *Rencontre Recherche Ruminant*, 8(1), 181–186.
- ChemSpider. (2021). *Closantel* | *C22H14Cl2I2N2O2* | <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.38827.html>
- ChemSpider. (2021). *Monepantel* | *C20H13F6N3O2S* | *ChemSpider*. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.23315674.html>
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (1996). Screening of medicinal plants used by the Garífuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(1), 29–50. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01424-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01424-9)
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (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. *Veterinary Parasitology*, 44(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)
- Colucci, P. E., & Grovum, W. L. (1993). Factors affecting the voluntary intake of food by sheep 6. The effect of monosodium glutamate on the palatability of straw diets by sham-fed and normal animals. *British Journal of Nutrition*, 69(1), 37–47. <https://doi.org/10.1079/bjn19930007>
- Coop, R. L., & Kyriazakis, I. (1999). Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 187–204. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00070-9)
- Corley, T. A. B., & Godley, A. (2011). The veterinary medicine industry in Britain in the twentieth century. *Economic History Review*, 64(3). <https://doi.org/10.1111/j.1468-0289.2010.00553.x>
- Correddu, F., Lunesu, M. F., Buffa, G., Atzori, A. S., Nudda, A., Battacone, G., & Pulina, G. (2020). Can agro-industrial by-products rich in polyphenols be advantageously used in the feeding and nutrition of dairy small ruminants? *Animals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010131>
- Costa-Júnior, L. M., Costa, J. S., Lôbo, Í. C. P. D., Soares, A. M. S., Abdala, A. L., Chaves,

- D. P., Batista, Z. S., & Louvandini, H. (2014). Long-term effects of drenches with condensed tannins from *Acacia mearnsii* on goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), 725–729. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.024>
- Covarrubias-Cárdenas, A. (2013). Evaluación del efecto antihelmíntico de un subproducto de *Coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* susceptible a taninos. MSc Thesis. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.
- Coyne, M. J., & Smith, G. (1992). The development and mortality of the free-living stages of *Haemonchus contortus* in laboratory culture. *International Journal for Parasitology*, 22(5). [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90013-B](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90013-B)
- Da Mota, C. (2003). *Saúde e povos indígenas: tradição e mudança*. www.neip.info
- Da Silva, G. D., de Lima, H. G., de Sousa, N. B., de Jesus Genipapeiro, I. L., Uzêda, R. S., Branco, A., Costa, S. L., Batatinha, M. J. M., & Botura, M. B. (2021). *In vitro* anthelmintic evaluation of three alkaloids against gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109505>
- Dao, V. T. (2008). Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques. *Thèse de doctorat*, 210. Vandoeuvre-Nancy, INPL. <http://www.theses.fr/2008INPL029N>
- de Lima, R., Brondani, J. C., Dornelles, R. C., Lhamas, C. L., Faccin, H., Silva, C. V., Dalmora, S. L., & Manfron, M. P. (2020). Anti-inflammatory activity and identification of the *Verbena litoralis* Kunth crude extract constituents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S2175-97902019000417419>
- Degen, R., Basualdo, I., Soria, N., Maytenus, F. 1, Foto, I., & Cañigueral, S. (2004). Comercialización y conservación de especies vegetales medicinales en Paraguay. In *Revista de Fitoterapia* (Vol. 4, Issue 2). www.fitoterapia.net
- Delannoy-Normand, A. (2010). Recherche de gènes impliqués dans l'installation du strongle *Haemonchus contortus* par une approche transcriptomique. Université Francois - Rabelais.
- Desrues, O., Frygas, C., Ropiak, H. M., Mueller-Harvey, I., Enemark, H. L., & Thamsborg, S. M. (2016). Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on *in vitro* anthelmintic activity against bovine nematodes. *Parasitology*, 143(4), 444–454. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001912>
- DGEEC. (2002). *Dirección General de Estadística, Encuestas y Censos*. <https://www.dgeec.gov.py/>
- Dharani, N., Yenesew, A., Aynekulu, E., Tuei, B., Jamnadass, R., & Dawson, I. K. (2015). Traditional ethnoveterinary medicine in East Africa: a manual on the use of medicinal plants (p. 199). www.cgiar.org/
- Doner, L. W., Bécard, G., & Irwin, P. L. (1993). Binding of Flavonoids by Polyvinylpyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 753–757. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Douch, P. G. C., Green, R. S., Morris, C. A., Mcewan, J. C., & Windon, R. G. (1996). Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *International Journal for Parasitology*, 26(8–9). [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)80062-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)80062-2)
- Dubois, O., Allanic, C., Charvet, C. L., Guégnard, F., Février, H., Théry-Koné, I., Cortet, J.,

- Koch, C., Bouvier, F., Fassier, T., Marcon, D., Magnin-Robert, J. B., Peineau, N., Courtot, E., Huau, C., Meynadier, A., Enguehard-Gueiffier, C., Neveu, C., Boudesocque-Delaye, L., & Sallé, G. (2019). Lupin (*Lupinus spp.*) seeds exert anthelmintic activity associated with their alkaloid content. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45654-6>
- Eguale, T., Tadesse, D., & Giday, M. (2011). *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, *137*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.063>
- Ehsan, M., Hu, R. S., Liang, Q. L., Hou, J. L., Song, X., Yan, R., Zhu, X. Q., & Li, X. (2020). Advances in the development of anti-*Haemonchus contortus* vaccines: Challenges, opportunities, and perspectives. *Vaccines*, *8*(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030555>
- Eichstadt, M. (2017). Évaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 157 p.
- Emami, S. A., Vahdati-Mashhadian, N., Vosough, R., & Iran, I. (2009). The Anticancer Activity of Five Species of *Artemisia* on Hep2 and HepG2 Cell Lines. In *Pharmacologyonline* (3); 227 -339.
- Epe, C., & Kaminsky, R. (2013). New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. In *Trends in Parasitology* (Vol. 29, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.001>
- Escareño-Díaz, S., Alonso-Díaz, M. A., Mendoza de Gives, P., Castillo-Gallegos, E., & von Son-de Fernex, E. (2019). Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. *Veterinary Parasitology*, *274*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.003>
- Euzeby, J. A. (1963). Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine.
- FAO. (2018). *Límites máximos de residuos (LMR) | CODEX ALIMENTARIUS FAO-WHO*. 2018. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- Floate, K. D., Wardhaugh, K. G., Boxall, A. B. A., & Sherratt, T. N. (2005). Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget effects in the pasture environment. In *Annual Review of Entomology* (50), 153–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130341>
- Fondraz, M. (2012). *Evaluation de la méthode FAMACHA dans le but de détecter une anémie clinique dans les élevages caprins du Nord-Ouest de l'Argentine*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 148 p.
- Fonseca, E. T. da. (2015). Plantas medicinales brasilenas. In *Plantas medicinales brasilenas*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.99904>
- Fourichon, C; Seegers, H; Beaudeau, F; Bareille, N. (1999). Fréquences et coûts de maîtrise des troubles de santé dans différents systèmes. Rencontre Autour Des Recherches Sur Les Ruminants (3R). <http://www.journees3r.fr/spip.php?article2453>
- Fournier, A. (2020). Etude de la résistance aux anthelminthiques des nématodes gastro-intestinaux chez le mouton en Wallonie. <http://hdl.handle.net/2268.2/9577>

- Fraga-Corral, M., Otero, P., Echave, J., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Jarboui, A., Nuñez-Estevez, B., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). By-products of agri-food industry as tannin-rich sources: A review of tannins' biological activities and their potential for valorization. In *Foods* (Vol. 10, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods10010137>
- Gaba, S., Ginot, V., & Cabaret, J. (2005). Modelling macroparasite aggregation using a nematode-sheep system: The Weibull distribution as an alternative to the Negative Binomial distribution? *Parasitology*, *131*(3). <https://doi.org/10.1017/S003118200500764X>
- Galindo, Juana; Delgado, Denia; Pedraza, R.; García, D. . (2005). Impacto de los árboles, los arbustos y otras leguminosas en la ecología ruminal de animales que consumen dietas fibrosas. *Pastos y Forrajes*, *28*(1), 59–68. <https://www.redalyc.org/pdf/2691/269121628005.pdf>
- Gamble, H. R., & Zajac, A. M. (1992). Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Veterinary Parasitology*, *41*(3–4). [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90081-J](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90081-J)
- García-Bustos, J. F., Sleebs, B. E., & Gasser, R. B. (2019). An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. In *Parasites and Vectors* (12; 1, 1–22). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3537-1>
- García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, *27*(1), 1–12. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=795>
- Gaudin, E. (2017). *Le sainfoin déshydraté - un modèle de nutriment dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants*. Thèse d'Université, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2017.
- Geary, T. G., Hosking, B. C., Skuce, P. J., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Pomroy, W., & Vercruyse, J. (2012). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Veterinary Parasitology*, *190*(1–2), 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.004>
- Genovés, J. S., Palop Larrea, V., Rubio Gomis, E., & Martínez-Mir, I. (2001). Consumo de hierbas medicinales y medicamentos. *Atención Primaria*, *28*, 311–314. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(01\)70381-2](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(01)70381-2)
- Geurden, T., Hodge, A., Noé, L., Winstanley, D., Bartley, D. J., Taylor, M., Morgan, C., Fraser, S. J., Maeder, S., & Bartram, D. (2012). The efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes of sheep in the UK. *Veterinary Parasitology*, *189*(2–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.008>
- Gilani, A. U. H., & Janbaz, K. H. (1995). Preventive and curative effects of Artemisia absinthium on acetaminophen and CCl4-induced hepatotoxicity. *General Pharmacology*, *26*(2), 309–315. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00194-R](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00194-R)
- Girard, M., Dohme-Meier, F., Silacci, P., Ampuero Kragten, S., Kreuzer, M., & Bee, G. (2016). Forage legumes rich in condensed tannins may increase n-3 fatty acid levels and sensory quality of lamb meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(6), 1923–1933. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7298>

- Githiori, J. B., Athanasiadou, S., & Thamsborg, S. M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139(4). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>
- Githiori, J. B., Höglund, J., & Waller, P. J. (2005). Ethnoveterinary plant preparations as livestock dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 91–103. <https://doi.org/10.1079/ahr2005099>
- González-Garduño, R., Arece-García, J., & Torres-Hernández, G. (2021). Physiological, immunological and genetic factors in the resistance and susceptibility to gastrointestinal nematodes of sheep in the peripartum period: A review. *Helminthologia (Poland)*, 58(2), 134–151. <https://doi.org/10.2478/helm-2021-0020>
- González-Pech, P. G., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., & Tun-Garrido, J. (2015). Feeding behavior of sheep and goats in a deciduous tropical forest during the dry season: The same menu consumed differently. *Small Ruminant Research*, 133, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.08.020>
- González, Y.; Mercado, M.; Arrua, R.; Ponessa, G. (2009). Morphoanatomy and ethnobotany of rhizome, stem and scape of “Kapi’i Kati” *Kyllinga odorata* (Cyperaceae) and its substituents in and around Asuncion del Paraguay. *Lillioa*, 46, 58–67. https://www.researchgate.net/publication/283018127_Morphoanatomy_and_ethnobotany_of_rhizome_stem_and_scape_of_kapi'i_kati_Kyllinga_odorata_Cyperaceae_and_its_substituents_in_and_around_Asuncion_del_Paraguay
- Gouÿ De Bellocq, J., Ferté, H., Depaquit, J., Justine, J. Lou, Tillier, A., & Durette-Desset, M. C. (2001). Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3). <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0925>
- Graber, Michel; Perrotin, C. (1983). *Helminthes et helminthoses des ruminants domestiques d’Afrique tropicale* (Maisons-Al).
- Grando, T. H., De Sá, M. F., Baldissera, M. D., Oliveira, C. B., De Souza, M. E., Raffin, R. P., Santos, R. C. V., Domingues, R., Minho, A. P., Leal, M. L. R., & Monteiro, S. G. (2016). *In vitro* activity of essential oils of free and nanostructured *Melaleuca alternifolia* and of terpinen-4-ol on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology*, 90(3), 377–382. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000401>
- Grosmond, G. (2012). *Santé animale et solutions alternatives*. Editions France Agricole.270
- Gujja, S., Terrill, T. H., Mosjidis, J. A., Miller, J. E., Mechineni, A., Kommuru, D. S., Shaik, S. A., Lambert, B. D., Cherry, N. M., & Burke, J. M. (2013). Effect of supplemental *Sericea lespedeza* leaf meal pellets on gastrointestinal nematode infection in grazing goats. *Veterinary Parasitology*, 191(1–2), 51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.013>
- Gutiérrez-Amézquita, R. A., Morales-Montor, J., Muñoz-Guzmán, M. A., Nava-Castro, K. E., Ramírez-Álvarez, H., Cuenca-Verde, C., Moreno-Mendoza, N. A., Cuéllar-Ordaz, J. A., & Alba-Hurtado, F. (2017). Progesterone inhibits the *in vitro* L3/L4 molting process in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 248, 48–53.

- <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.10.011>
- Haag, G., Marin, G. H., & Errecalde, J. (2016). Argentinean's Plants with Interest in Ethnomedicine as Wormers. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 5. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ijppe.5.1>
- Hadi, A., Hossein, N., Shirin, P., Najmeh, N., & Abolfazl, M. (2014). Anti-inflammatory and analgesic activities of *Artemisia absinthium* and chemical composition of its essential oil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 24(2), 237–244.
- Hafsi, F., China, B., & Ghalmi, F. (2012). Le monepantel, un nouvel anthelminthique efficace contre les nématodes gastro-intestinaux des ovins. *Annales de Medecine Veterinaire*, 156(1).
- Hajaji, H. El, Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., Bali, B. El, & Lachkar, M. (2011). Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(3), 321–324. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2010.06.053>
- Hammond, G. B., Fernández, I. D., Villegas, L. F., & Vaisberg, A. J. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 17–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00009-9)
- Häring, D. A., Scharenberg, A., Heckendorn, F., Dohme, F., Lüscher, A., Maurer, V., Suter, D., & Hertzberg, H. (2008). Tanniferous forage plants: Agronomic performance, palatability and efficacy against parasitic nematodes in sheep. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 23(1). <https://doi.org/10.1017/S1742170507002049>
- Hermann, H. (2017). Human nature. *Evolutionary Studies in Imaginative Culture*, 1(1), 85–87. <https://doi.org/10.26613/esic.1.1.16>
- Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., & Wanner, M. (2002). Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*, 125(1). <https://doi.org/10.1017/S0031182002001816>
- Hervás, G. (2001). *Protectores frente a la degradacion ruminal* [Universidad de León]. http://digital.csic.es/bitstream/10261/5114/1/Hervás_2001 (Tesis doctoral).pdf
- Hilgert, N. I. (2001). Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 11–34. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00190-8)
- Hördegen, P., Cabaret, J., Hertzberg, H., Langhans, W., & Maurer, V. (2006). *In vitro* screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.013>
- Hoste, H., Huby, F., Mallet, S. (1997). Strongyloses gastro-intestinales des ruminants: conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. 28, 53–59.
- Hoste, H., Manolaraki, F., Brunet, S., Arroyo, C., Martínez-Orti, C., Sotiraki, S., Torres, F. J. (2011). The anthelmintic properties of tannin-rich legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. *Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterranean Seminars*, 99(No.99), 295–304. <http://om.ciheam.org/om/pdf/a99/00801571.pdf>

- Hoste H, Meza Ocampos G, Marchand S ; Sotiraki S, Saratsi K , Torres Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C Blomstrand B . ; Thamsborg S.M., Williams A.R. , Einemark H. , Athanasiadou S., Costa Junior, L. ; Louvandini H. ; Salminen J.P Charlier J., M. E. (2021). Use of agro- industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastro intestinal nematodes in ruminants. *Parasite*.
- Hoste, H., Chartier, C., Lefrileux, Y., Goudeau, C., Broqua, C., Pors, I., Bergeaud, J. P., & Dorchies, P. (2002). Targeted application of anthelmintics to control trichostrongylosis in dairy goats: Result from a 2-year survey in farms. *Veterinary Parasitology*, *110*(1–2), 101–108. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00307-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00307-2)
- Hoste, H., Le Frileux, Y., & Pommaret, A. (2001). Distribution and repeatability of faecal egg counts and blood parameters in dairy goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Research in Veterinary Science*, *70*(1). <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0442>
- Hoste, H., Leveque, H., & Dorchies, P. (2001). Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: Relations with the feeding behaviour. *Veterinary Parasitology*, *101*(2). [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00510-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00510-6)
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., & Sandoval-Castro, C. A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, *186*(1–2), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>
- Hoste, H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2011). Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, *180*(1–2), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.035>
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., & Aguilar-Caballero, A. J. (2008). Nutrition-parasite interactions in goats: Is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunology*, *30*(2), 79–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00987.x>
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S. M., & Terrill, T. H. (2015a). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, *212*(1–2), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.026>
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S. M., & Terrill, T. H. (2015b). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, *212*(1–2), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.026>
- Hoste, Herve. (2018). Prévenir et guérir les maladies infectieuses dans le concept One Health. *Présentation Lycée Descartes, Tours*, 29.
- Hoste, Hervé, Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., & Hoskin, S. O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, *22*(6). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.004>
- Hoste, Herve, & Niderkorn, V. (2020). Le sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) et la chicorée (*Cichorium intybus*): deux modèles de plantes bioactives pour répondre aux défis agroécologiques en élevage de ruminants To cite this version : HAL Id : hal-

- 02629247 Cet article de la revue Fourrages. *Fourrages*, 238, 171–180. <https://hal.inrae.fr/hal-02629247>
- Hoste, Herve, Paolini, V., Paraud, C., & Chartier, C. (2004). Gestion non chimique du parasitisme par les nématodes chez les petits ruminants. *Bulletin Des G.T.V., Hors-série*, 131–135. https://www.researchgate.net/publication/28681479_Gestion_non_chimique_du_parasitisme_par_les_nematodes_chez_les_petits_ruminants
- Houicher, A., Hechachna, H., & Özogul, F. (2015). *In vitro* determination of the antifungal activity of *Artemisia campestris* essential oil from Algeria. *International Journal of Food Properties*, 19(8), 1749–1756. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1107734>
- Humphry, C. M., Clegg, M. S., Keen, C. L., & Grivetti, L. E. (1993). Food diversity and drought survival. The hausa example. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44(1), 1–16. <https://doi.org/10.3109/09637489309017417>
- Hurrell, J. A. (2014). Urban Ethnobotany in Argentina: Theoretical advances and methodological strategies. *Ethnobiology and Conservation*, 3(2014). <https://doi.org/10.15451/ec2014-6-3.3-1-11>
- Jackson, F., & Miller, J. (2006). Alternative approaches to control-Quo vadit? *Veterinary Parasitology*, 139(4). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.025>
- Jacquet, P., Fidelle, F., Lepetitcolin, E., Privat, S., Gaillac, C., Bergeaud, J.-P., & Hoste, H. (2014). Etat des lieux de la résistance aux anthelminthiques en France chez les ovins. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire - Elevages et Santé*, 7(29), 16–22.
- Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Medecine Veterinaire*, 149(10).
- Jeske, D. R., Xu, H. K., Blessinger, T., Jensen, P., & Trumble, J. (2009). Testing for the equality of EC50 values in the presence of unequal slopes with application to toxicity of selenium types. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 14(4). <https://doi.org/10.1198/jabes.2009.07088>
- Jorge, T. F., Mata, A. T., & Antnio, C. (2016). Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079). <https://doi.org/10.1098/RSTA.2015.0370>
- Judžentiene, A. (2016). Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 849–856). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00097-3>
- Juhnke, J., Miller, J., Hall, J. O., Provenza, F. D., & Villalba, J. J. (2012). Preference for condensed tannins by sheep in response to challenge infection with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), 104–114. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.02.015>
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S. S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., & Mäser, P. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452(7184), 176–180. <https://doi.org/10.1038/nature06722>
- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report. *Trends in Parasitology*, 20(10). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
- Kawas, J. R., Andrade-Montemayor, H., & Lu, C. D. (2010). Strategic nutrient

- supplementation of free-ranging goats. *Small Ruminant Research*, 89(2–3), 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.050>
- Kerboeuf, D. (2004). Apport des tests de laboratoire dans le diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ruminants et le choix des traitements. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 157(4), 17–23. <https://doi.org/10.4267/2042/47733>
- Khamesipour, F., Kheyri, P., Shojaat, S., Chelgerdi Dehkordi, B., Basirpour, B., Afzal, S. S., & Hejazi, S. H. (2021). A review of the effect of medicinal plant on helminthic infections. *Infectious Diseases and Herbal Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.4081/idhm.2021.127>
- Khidou, R. A. (2016). *Evaluation de la résistance aux strongles des chèvres Créole dans le cadre de la gestion intégrée du parasitisme*. 34. ffhal-01608095f.
- Kim, J. J., & Khan, W. I. (2013). Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. In *Pathogens* (2; 1), 55–70. <https://doi.org/10.3390/pathogens2010055>
- Kinsella, B., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., Furey, A., & Danaher, M. (2009). New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 196–207. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.10.072>
- Klongsiriwet, C., Mueller-Harvey, I., Quijada, J., Hoste, H., Williams, A., & Williamson, E. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.001>
- Klongsiriwet, Chaweewan, Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., & Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.001>
- Knox, M. R., Torres-Acosta, J. F. J., & Aguilar-Caballero, A. J. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 139(4). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.026>
- Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 31, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00131-X)
- Kotrotsios, N., Christaki, E., Bonos, E., & Florou-Paneri, P. (2012). Dietary carob pods on growth performance and meat quality of fattening pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(6), 880–885. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11521>
- Kotze, A. C., O'Grady, J., Emms, J., Toovey, A. F., Hughes, S., Jessop, P., Bennell, M., Vercoe, P. E., & Revell, D. K. (2009). Exploring the anthelmintic properties of Australian native shrubs with respect to their potential role in livestock grazing systems. *Parasitology*, 136(9), 1065–1080. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006386>
- Koyuncu, I. (2018). Cellular and Molecular Biology Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium L. Extract*. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.3.5>
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal:

- surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. *Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées*. Muséum National d'Histoire Naturelle.
- Kyriazakis, I., Anderson, D. H., Oldham, J. D., Coop, R. L., & Jackson, F. (1996). Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: Effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology*, 61(3–4). [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00824-1](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00824-1)
- Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D., & Monti, J. P. (2006). PVPP-polyphenol complexes: A molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4383–4389. <https://doi.org/10.1021/jf060427a>
- Labre, P. (2012). *Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval*. Editons Femenvet. 352
- Lacroux, C. (2006). Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines, *INRA 401 et Barbados Black Belly*. PhD, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2006.
- Lanusse, C. E., & Prichard, R. K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. In *Veterinary Parasitology* (49; 2–4), 123–158. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90115-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90115-4)
- Larsen, Jorgen Bo; Emborg, Jens; Kristensen, K. H. (2021). *Dyrkede skove*. Naturen i Danmark. https://naturenidanmark.lex.dk/Dyrkede_skove
- Larsen, J. W., Anderson, N., Vizard, A. L., Anderson, G. A., & Hoste, H. (1994). Diarrhoea in merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. *Australian Veterinary Journal*, 71(11). <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00930.x>
- Leathwick, D. M., & Atkinson, D. S. (1998). Influence of different proportions of *Lotus corniculatus* in the diet of lambs on dags, flystrike and animal performance. *International Journal of Sheep and Wool Science*, 46(4), 353–359.
- Lecasble, C. (2012). 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.
- Legarto, J., & Leclerc, M.-C. (2007). *Guide pour la conduite du pâturage caprin*. https://idele.fr/fileadmin/medias/Images/pdf_CR_040731017.pdf
- Leiber, F., Arnold, N., Heckendorn, F., & Werne, S. (2020). Assessing effects of tannin-rich sainfoin supplements for grazing dairy goats on feed protein efficiency. In *Journal of Dairy Research*, 87(4), 397–399. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000965>
- Leitão, F., Leitão, S. G., De Almeida, M. Z., Cantos, J., Coelho, T., & Da Silva, P. E. A. (2013). Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. In *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.009>
- Lejeau, C. (2002). Les résistances aux benzimidazoles chez les caprins enquête épidémiologique et essais de traitement sélectif. Thèse d'exercice Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse. 126
- Li, Y., Ishibashi, M., Chen, X., & Ohizumi, Y. (2003). Littorachalcone, a New Enhancer of NGF-Mediated Neurite Outgrowth from *Verbena littoralis*. In *ChemInform*, 34(49). <https://doi.org/10.1002/chin.200349226>
- Lima, H. G., Gomes, D. C., Santos, N. S., Dias, Ê. R., Botura, M. B., Batatinha, M. J. M., &

- Branco, A. (2017). *Prosopis juliflora* Pods Alkaloid-rich Fraction: In vitro Anthelmintic Activity on Goat Gastrointestinal Parasites and Its Cytotoxicity on Vero Cells. *Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 3), S684–S687. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29142433>
- Lima, P. de M. T., Cruzoulon, P., Sanches, T. P., Zabré, G., Kabore, A., Niderkorn, V., Hoste, H., Amarante, A. F. T. do, Costa-Júnior, L. M., Abdalla, A. L., & Louvandini, H. (2019). Effects of *Acacia mearnsii* supplementation on nutrition, parasitological, blood parameters and methane emissions in Santa Inês sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. In *Experimental Parasitology*, 207, 107777. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107777>
- Little, P. R., Hodge, A., Maeder, S. J., Watson, T. G., & Seed, J. A. (2010). Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. In *New Zealand Veterinary Journal*, 58(3). <https://doi.org/10.1080/00480169.2010.67513>
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* 233–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1>
- Lumaret, J.-P., & Errouissi, F. (2002). Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Veterinary Research*, 33(5). <https://doi.org/10.1051/vetres:2002038>
- Lützelshwab, C. M., Fiel, C. A., Pedonesse, S. I., Najle, R., Rodríguez, E., Steffan, P. E., Saumell, C., Fusé, L., & Iglesias, L. (2005). Arrested development of *Ostertagia ostertagi*: Effect of the exposure of infective larvae to natural spring conditions of the Humid Pampa (Argentina). *Veterinary Parasitology*, 127(3–4), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.006>
- Macadam, J. W., Brummer, J., & Shewmaker, G. (2013). *The Benefits of Tannin-Containing Forages What Are Tannins?*
- Maciel, S., Giménez, A. M., Gaona, C., Waller, P. J., & Hansen, J. W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Veterinary Parasitology*, 62(3–4), 207–212. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00907-8](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00907-8)
- Mahieu, M. (2014). Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide. In *Sciences Agronomiques*.
- Majumder, P. (2013). Investigation of anthelmintic activity of an ignored plant “*Kyllinga nemoralis*” tuber - A potential hope. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1).
- Mallet, S., & Lesage, M. C. (1987). Relationship between exsheathment and enzyme activity (alkaline phosphatase and leucine amino peptidase) during ageing of *Trichostrongylus colubriformis* infective larvae. *Annales de Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research*, 18(3).
- Mancilla-Montelongo, M. G., Castañeda-Ramírez, G. S., Gaudin-Barbier, E., Canul-Velasco, M. L., Chan-Pérez, J. I., De la Cruz-Cortazar, Á., Mathieu, C., Fourquaux, I., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Ventura-Cordero, J., González-Pech, P. G., & Torres-Acosta, J. F. de J. (2021). In vitro Evaluation of the Nutraceutical Potential of *Theobroma cacao* pod Husk and Leaf Extracts for Small Ruminants. *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00354-y>
- Manke, M. B., Dhawale, S. C., & Jamkhande, P. G. (2015). Helminthiasis and medicinal

- plants: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 175–180. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60648-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60648-4)
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., & Hoste, H. (2010). Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*, 137(4), 685–696. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991399>
- Manolaraki, Foteini. (2011). Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. In *Thèse de Doctorat*. 458.
- Mansfield, L. S., Gamble, H. R., & Fetterer, R. H. (1992). Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*-I. Structural components. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 103(3), 681–686. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90390-D](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90390-D)
- Marakis, S. (1996). Carob bean in food and feed: Current status and future potentials - A critical appraisal. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 33, Issue 5, pp. 365–383).
- Marchand, S., Ketavong, S., Barbier, E., Gay, M., Jean, H., Nidekorn, V., Stergiadis, S., Salminen, J. P. and Hoste, H. (2019). *In vivo* assessment of the anthelmintic effects of by-products (peels) from the chestnut industry. *70th Annual Meeting of the European Association of Animal Production*, 26–30.
- Marie-Magdeleine, C. (2009). *Etude de ressources végétales tropicales pour un usage anthelminthique en élevage de ruminants*. Université des Antilles. Guadeloupe.
- Martin, P. A. J., Davies, R. H., & Mayburry, C. J. (1993). Skin inflammation following triclabendazole treatment of dairy cows. *Veterinary Record*, 133(12). <https://doi.org/10.1136/vr.133.12.300>
- McClure, S. J., Emery, D. L., Bendixsen, T., & Davey, R. J. (1998). Attempts to generate immunity against *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* in young lambs by vaccination with viable parasites. *International Journal for Parasitology*, 28(5), 739–746. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00040-X)
- McCorkle, C. M. (1995). Back to the future: Lessons from ethnoveterinary RD&E for studying and applying local knowledge. *Agriculture and Human Values*, 12(2), 52–80. <https://doi.org/10.1007/BF02217297>
- McGaw, L. J., Famuyide, I. M., Khunoana, E. T., & Aremu, A. O. (2020). Ethnoveterinary botanical medicine in South Africa: A review of research from the last decade (2009 to 2019). In *Journal of Ethnopharmacology*.. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112864>
- McKellar, Q. A. (1997). Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, 72(3–4), 413–435. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00108-8)
- Mcrae, K. M., Stear, M. J., Good, B., & Keane, O. M. (2015). The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. In *Parasite Immunology* (Vol. 37, Issue 12, pp. 605–613). *Parasite Immunol.* <https://doi.org/10.1111/pim.12290>
- Mederos, A. E., Ramos, Z., & Banchemo, G. E. (2014). First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. In *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0598-z>
- Mekonnen, G. (2021). Citation: Mekonnen G (2021) A Review on Gastrointestinal Nematodes in Small Rumi-nants. In *Advances in Applied Science Research*, 12(7),

32.

- Meradi, S., Cabaret, J., & Bentounsi, B. (2016). Arrested development of abomasal trichostrongylid nematodes in lambs in a steppe environment (North-Eastern Algeria). In *Parasite*, 23. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016048>
- Meza-Ocampos, G., Hoste, H., Torres - Ñumbay, M.; Alvarenga, N. (2019). Social and economic importance of medicinal plants for the population of the Central department, Paraguay (in spanish). In B. C. I. U. UNICAN (Ed.), *Bienal Científica Internacional*. https://www.eventos.unican.edu.py/eventos/index.php/bienal_unican/bienal2019/paper/view/131.
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., & McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. In *Animal Feed Science and Technology* (106; 1–4). [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5)
- Min, B. R., Fernandez, J. M., Barry, T. N., McNabb, W. C., & Kemp, P. D. (2001). The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. *Animal Feed Science and Technology*, 92(3–4). [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00258-9)
- Minho, A. P., Filippesen, L. F., do Amarante, A. F. T., & Abdalla, A. L. (2010). Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. In *Ciencia Rural*, 40(6), 1360–1365. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782010005000088>
- Minho AP, Bueno ICDS, Gennari SM, Jackson F, A. AL. (2008). In vitro effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. In *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(1), 144–148. https://www.researchgate.net/publication/51441147_In_vitro_effect_of_condensed_tannin_extract_from_acacia_Acacia_mearnsii_on_gastrointestinal_nematodes_of_sheep
- Moacă, E.-A., Zinuca Pavel, I., Danciu, C., Crăiniceanu, Z., Minda, D., Ardelean, F., Antal, D. S., Ghiulai, R., Cioca, A., Derban, M., Simu, S., Chioibaș, R. C., Szuhaneck, C., & Dehelean, C.-A. (2019). Molecules Romanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.): Physicochemical and Nutraceutical Screening. In *Molecules*, 24, 21. <https://doi.org/10.3390/molecules24173087>
- Molares, S., & Ladio, A. (2012). The usefulness of edible and medicinal fabaceae in argentine and chilean patagonia: environmental availability and other sources of supply. In *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/901918>
- Molento, M. B. (2007). Parasite control strategies. In *Veterinary Record* (161; 8), 280. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1136/vr.161.8.280>
- Molento, M. B., Fortes, F. S., Pondelek, D. A. S., Borges, F. de A., Chagas, A. C. de S., Torres-Acosta, J. F. de J., & Geldhof, P. (2011). Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.033>
- Monti, C., & Mandrile, E. L. (1998). Anatomia y etnobotanica de las especies medicinales de monocotiledoneas de la estepa Pampeana de Argentina: Cyperaceae. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 17(1).
- Moreno-Romieux, C., Sallé, G., Jacquiet, P., Blanchard, A., Chylinski, C., Cabaret, J.,

- Francois, D., Saccareau, M., Astruc, J. M., Bambou, J. C., & Mandonnet, N. (2017). La résistance génétique aux infections par les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants: Un enjeu de durabilité pour les productions à l'herbe. *Productions Animales*, 30(1). <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2017.30.1.2231>
- Morgan, E. R., Aziz, N. A. A., Blanchard, A., Charlier, J., Charvet, C., Claerebout, E., Geldhof, P., Greer, A. W., Hertzberg, H., Hodgkinson, J., Höglund, J., Hoste, H., Kaplan, R. M., Martínez-Valladares, M., Mitchell, S., Ploeger, H. W., Rinaldi, L., von Samson-Himmelstjerna, G., Sotiraki, S., ... Vercruyse, J. (2019). 100 Questions in Livestock Helminthology Research. In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 1, pp. 52–71). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.10.006>
- Mounport, D., Gruner, L., & Lagacherie, M. (1989). Utilisation des garrigues par les ovins et risque parasitaire vis-à-vis des strongles gastro-intestinaux. *Ecologia Mediterranea*, 15(3), 145–159. <https://doi.org/10.3406/ecmed.1989.1644>
- Mphahlele, M., Molefe, N., Tsoetsi-Khambule, A., & Oriel, T. (2020). Anthelmintic Resistance in Livestock. In *Helminthiasis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87124>
- Mravčáková, D., Komáromyová, M., Babják, M., Dolinská, M. U., Königová, A., Petrič, D., Čobanová, K., Ślusarczyk, S., Cieslak, A., Várady, M., & Váradyová, Z. (2020). Anthelmintic activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and mallow (malva sylvestris L.) against *Haemonchus contortus* in sheep. In *Animals*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/ani10020219>
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. In *Animal Feed Science and Technology*, 91(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9)
- Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13). <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W. F., Salminen, J. P., Skøt, L., Smith, L. M. J., Thamsborg, S. M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A. R., Azuhwi, B. N., Baert, N., Brinkhaus, A. G., ... Waghorn, G. C. (2019). Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: Importance of structure, concentration, and diet composition. In *Crop Science* (59; 3), 861–885. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0369>
- Mupeyo, B., Barry, T. N., Pomroy, W. E., Ramírez-Restrepo, C. A., López-Villalobos, N., & Pernthaner, A. (2011). Effects of feeding willow (*Salix spp.*) upon death of established parasites and parasite fecundity. In *Animal Feed Science and Technology*, 164(1–2), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.11.015>
- Musonda, K., Barry, T. N., McWilliam, E. L., Lopez-Villalobos, N., & Pomroy, W. E. (2009). Grazing willow (*Salix spp.*) fodder blocks for increased reproductive rates and internal parasite control in mated hoggets. In *Animal Feed Science and Technology*, 150(1–2), 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.08.003>
- National Center for Biotechnology Information. (2017). *Levamisole* | C11H12N2S - PubChem. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26879>
- National Center for Biotechnology Information. (2021). *Benzimidazole* | C7H6N2 - PubChem. PubChem Compound Database.

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzimidazole>
National Center for Biotechnology Information. (2021). *Derquantel* | C28H37N3O4 - PubChem. PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Derquantel>
- National Center for Biotechnology Information. (2021). Ivermectin | C48H74O14 - PubChem. In *PubChem Compound Database*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ivermectin#section=Structures>
- Niderkorn, V., Barbier, E., Macheboeuf, D., Torrent, A., Mueller-Harvey, I., & Hoste, H. (2020). *In vitro* rumen fermentation of diets with different types of condensed tannins derived from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) pellets and hazelnut (*Corylus avellana* L.) pericarps. In *Animal Feed Science and Technology*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114357>
- Noelli, F. S. (1998). Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas. In *Dialogos*, 2(1), 177–199.
- Novilla, M. N. (2005). Book Review: Georgi's Parasitology for Veterinarians. *Veterinary Pathology*, 42(2). <https://doi.org/10.1354/vp.42-2-237>
- Nsereko, G., Emudong, P., Omujal, J., Acai, J., Kungu, J. M., Kabi, F., Mugerwa, S., & Bugeza, J. (2019). Comparison of the efficacy of crude methanolic extracts of *Cassia occidentalis* and *Euphorbia hirta* with levamisole-HCL against gastrointestinal nematodes of economic importance to goat production in Uganda. In *Tropical Animal Health and Production*, 51(8), 2269–2278. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01939-6>
- Nwude, N.; Parsons, L. E. (1977). Nigerian plants that may cause poisoning in livestock. In *Veterinary Bulletin*, 47, 811–817. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301252977>
- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major Trichostrongylid parasites of sheep. In *Veterinary Parasitology*, 142(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.035>
- O'Connor, S. E. (2010). Alkaloids. In *Comprehensive Natural Products II*, 977–1007. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00013-7>
- Ogawa, S., & Yazaki, Y. (2018). Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin determination and biological activities. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 4). *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23040837>
- Oliveira, A. F., Costa Junior, L. M., Lima, A. S., Silva, C. R., Ribeiro, M. N. S., Mesquista, J. W. C., Rocha, C. Q., Tangerina, M. M. P., & Vilegas, W. (2017). Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. In *Veterinary Parasitology*, 236, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.005>
- Oliveira, M., Lima, C. S., & Llorent-Martínez, E. J. (2021). Disclosing the Bioactive Metabolites Involved in the *in vitro* Anthelmintic Effects of Mediterranean Salt-Tolerant Plants: A Combined Approach Using PVPP and HPLC-ESI-MSn. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-602048/V1>
- Oliveira Santos, F., Ponce Morais Cerqueira, A., Branco, A., José Moreira Batatinha, M., & Borges Botura, M. (2019). Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: A review. In *Parasitology*, 146(10), 1233–1246. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000672>
- OPS. (2020). *Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores*. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-desatendidas-tropicales->

transmitidas-por-vectores

- Page, A. P., Stepek, G., Winter, A. D., & Pertab, D. (2014). Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? In *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* (Vol. 4, Issue 2, pp. 133–141). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.05.003>
- Paolini, V., Fouraste, I., & Koste, H. (2004). *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, 129(1), 69–77. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005268>
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., & Hoste, H. (2005). Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Journal*, 170(2), 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.001>
- Paolini, Virginie. (2004). *Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre*. Thèse d'Université de Perpignan. <http://www.theses.fr/2004PERP0524>.
- Paraud, C., Pors, I., & Chartier, C. (2004). Activity of *Duddingtonia flagrans* on *Trichostrongylus colubriformis* larvae in goat feces and interaction with a benzimidazole treatment. *Small Ruminant Research*, 55(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.12.005>
- Parisi, F., Mancini, S., Mazzei, M., Forzan, M., Turchi, B., Perrucci, S., Poli, A., & Paci, G. (2018). Effect of dietary supplementation of a mix of chestnut and quebracho tannins on intestinal morphology, bacterial load, *Eimeria spp.* oocyst excretion and immune response after vaccination in rabbits. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 13(3), 94–103. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2018.94.103>
- Parlement Européen et Conseil. (2019). Relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE. In *Journal officiel de l'Union européenne* (Vol. L4). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0006&qid=1552299700950&from=EN>
- Parsons, W. T., & Cuthbertson, E. G. (2001). *Noxious Weeds of Australia* 2nd Edition. In *CSIRO Publishing*. http://books.google.fr/books/about/Noxious_Weeds_of_Australia.html?hl=fr&id=sRCrNAQQrpwC&pgis=1
- Pathak, M A.; Daniels, F; Fitzpatrick, T. (1963). Presently known distribution of furocoumarins (Psoralens) in plants. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 183(3), 181. <https://doi.org/10.1001/jama.1963.03700030131122>
- Payne-Jackson, A., & Alleyne, M. C. (2004). *Jamaican Folk Medicine: A Source of Healing*. <https://www.worldcat.org/title/jamaican-folk-medicine-a-source-of-healing/oclc/646844099>
- Peña-Espinoza, M., Valente, A. H., Thamsborg, S. M., Simonsen, H. T., Boas, U., Enemark, H. L., López-Muñoz, R., & Williams, A. R. (2018). Antiparasitic activity of chicory (*Cichorium intybus*) and its natural bioactive compounds in livestock: A review. *Parasites and Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3012-4>
- Pérez-Torres, R. (2012). Mestizaje. In *The Routledge Companion to Latino/a Literature* (pp. 25–33). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203097199-9>
- Pérez Zamora, C. M., Torres, C. A., & Nuñez, M. B. (2018). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. In *Molecules*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>

- Peters, M. (2015). Etat des lieux des traitements anthelminthiques sur *Haemonchus contortus*, strongle gastro-intestinal des ovins. Evaluation chimique et biologique sur ce parasite de deux macromycètes : *Phellodon niger* et *Hydnellum ferrugineum*. <http://dune.univ-angers.fr/fichiers/20092394/2015PPHA5156/fichier/5156F.pdf>
- Pierpoint, W. S. (2004). The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 244, 65–74. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-X:65>
- Pimentel Barreto, S. (2020). Puesta a punto y validación de metodologías basadas en ADN para diagnóstico de nematodos gastrointestinales de ovinos, en Uruguay.
- Pinto de Oliveira, J. S., Morbeck Kleber, A., Fernandes, V., & Matias, R. (2017). Etnobôtanica E A Cultura Popular No Uso De Plantas Em Assentamentos Na Borda Sul Do Pantanal Sul-Mato-Grossense. In *Bioscience Journal*, 33(1), 193–203. <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n1a2017-33106>
- Plumlee, K. H., Johnson, B., & Galey, F. D. (1998). Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. In *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1177/104063879801000306>
- Pomroy, W. E. (2006). Anthelmintic resistance in New Zealand: A perspective on recent findings and options for the future. In *New Zealand Veterinary Journal*, 54(6). <https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36709>
- Poon, S., Banerjee, A., Mora, H., Lava, M., Bedoya, L., Cabrera, E., Melean, C., Salazar, F., & Villamizar Part, J. (2018). Review Articles on the Terpenoids and Steroids in the Journal of Chemical Research and Science Progress. In *Journal of Chemical Research*, 42(9), 494–496. <https://doi.org/10.3184/174751918x15361618048365>
- Prichard, R. K. (1973). The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. In *International Journal for Parasitology*, 3(3). [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(73\)90121-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(73)90121-5)
- Qamar, F., Begum, S., Raza, S. M., Wahab, A., & Siddiqui, B. S. (2005). Nematicidal natural products from the aerial parts of *Lantana camara* Linn. In *Natural Product Research*, 19(6), 609–613. <https://doi.org/10.1080/14786410512331330594>
- Quijada, J., Frygasas, C., Ropiak, H. M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., & Hoste, H. (2015). Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(28), 6346–6354. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00831>
- Quijada J. (2015). Relation structure/activité de Tanins Bioactifs contre les Nématodes Gastrointestinaux (*Haemonchus contortus*) Parasites des Petits Ruminants. Thèse d'Université Institut National Polytechnique de Toulouse. <https://oatao.univ-toulouse.fr/15130/1/quijada.pdf>
- Quijada J., Drake C., Gaudin E., El-Korso R., Hoste H., Mueller-Harvey I. (2018). Condensed tannins changes along the digestive tract in lambs fed with sainfoin pellets or hazelnut skins. *J. Agric. Food Chem.* 66, 2136-2142
- Rahmatullah, M., Jahan, R., Safiul Azam, F. M., Hossan, S., Mollik, M. A. H., & Rahman, T. (2011). Folk medicinal uses of verbenaceae family plants in Bangladesh. In *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5 SUPPL.), 53–65. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i5S.15>
- Ramezani, M., Fazli-Bazzaz, B. S., Saghafi-Khadem, F., & Dabaghian, A. (2004).

- Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Fitoterapia*, 75(2), 201–203. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2003.11.006>
- Ramírez-Restrepo, C. A., Barry, T. N., López-Villalobos, N., Kemp, P. D., & McNabb, W. C. (2004). Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase lamb and wool production under commercial dryland farming conditions without the use of anthelmintics. In *Animal Feed Science and Technology*, 117(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.05.005>
- Ramón-Laca, L., & Mabberley, D. J. (2004). The ecological status of the carob-tree (*Ceratonia siliqua*, Leguminosae) in the Mediterranean. In *Botanical Journal of the Linnean Society*, 144(4), 431–436. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2003.00254.x>
- Ratko, L. (2008). Identificación de las formas adultas de los nematodos gastrointestinales y pulmonares de los rumiantes en la República Argentina. <http://helminto.inta.gob.ar/Lukovich/luko1.htm>
- Ravinet, N., Chartier, C., Hoste, H., Mahieu, M., Duvauchelle-Wache, A., Merlin, A., Bareille, N., Jacquiet, P., & Chauvin, A. (2017). Enjeux et outils du traitement raisonné contre les strongles gastro-intestinaux chez les bovins et les petits ruminants. In *Productions Animales*, 30(1), 57–76. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2017.30.1.2233>
- Raynaud, J. P. (1970). Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. In *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 45(3). <https://doi.org/10.1051/parasite/1970453321>
- Reslova, N., Skorpikova, L., Kyrianova, I. A., Vadlejch, J., Höglund, J., Skuce, P., & Kasny, M. (2021). The identification and semi-quantitative assessment of gastrointestinal nematodes in faecal samples using multiplex real-time PCR assays. In *Parasites and Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04882-4>
- Rira, M. (2019). Les tanins hydrolysables et condensés : une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02861917>
- Rivera Ayala, R. E., & Flores Martínez, J. A. (2016). Sistematización del conocimiento etnobotánico del uso de la biodiversidad vegetal, en el cantón Las Pilas, municipio de San Ignacio, Chalatenango.
- Robinson, H. J., Stoerk, H. C., & Graessle, O. E. (1965). Studies on the toxicologic and pharmacologic properties of thiabendazole. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, 7(1). [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(65\)90074-8](https://doi.org/10.1016/0041-008X(65)90074-8)
- Rodríguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Díaz-Torres, L. A., Hernández Padrón, G., García-Contreras, R., & Millán-Chiu, B. E. (2019). *Artemisia absinthium*-based silver nanoparticles antifungal evaluation against three *Candida* species. In *Materials Research Express*, 6(8), 085408. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab1fba>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - An Australian perspective. In *Parasites and Vectors*, 6(1), 153. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-153>
- Rogers, W. P., & Sommerville, R. I. (1957). Physiology of exsheathment in nematodes and its relation to parasitism. In *Nature*, 179(4560), 619–621. <https://doi.org/10.1038/179619a0>

- Rogers, W. P., & Sommerville, R. I. (1963). The Infective Stage of Nematode Parasites and its Significance in Parasitism. In *Advances in Parasitology*, 1(C), 109–177. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60503-5](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60503-5)
- Romero Lara, C. E. (2000). Efecto del pastoreo con ovinos sobre la concentración de taninos condensados. In *Univeridad de la Colima*. <http://bvirtual.ucol.mx/consultaxcategoria.php?categoria=3&id=5250>
- Rose, H., Caminade, C., Bolajoko, M. B., Phelan, P., van Dijk, J., Baylis, M., Williams, D., & Morgan, E. R. (2016). Climate-driven changes to the spatio-temporal distribution of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, in sheep in Europe. In *Global Change Biology*, 22(3), 1271–1285. <https://doi.org/10.1111/gcb.13132>
- Rose Vineer, H., Morgan, E. R., Hertzberg, H., Bartley, D. J., Bosco, A., Charlier, J., Chartier, C., Claerebout, E., De Waal, T., Hendrickx, G., Hinney, B., Höglund, J., Jez Ek, J. I., Kašný, M., Keane, O. M., Martínez-Valladares, M., Mateus, T. L., McIntyre, J., Mickiewicz, M., ... Rinaldi, L. (2020). Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. In *Parasite*, 27. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020062>
- Rzedowski, J., & Rzedowski, G. De. (1923). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Trabajo*, 1187–1198. [http://www1.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora 78.pdf](http://www1.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2078.pdf)
- Sabater, F. (2012). Determination d'une dose efficace et d'une dose toxique de tanins condensés dans le contrôle des strongyloses digestives chez les caprins. <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
- Sales, N., & Love, S. (2016). Resistance of *Haemonchus spp.* to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. In *Veterinary Parasitology*, 228, 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.016>
- Salto, R. V. A., Vásquez, T. E. R., Alonso Lazo, J., Banguera, D. V., Guayasamín, P. D. R., Vargas, J. K. A., & Peñas, I. V. (2016). Uso de plantas medicinales por populações rurais da província de Pastaza, na Amazônia equatoriana. In *Acta Amazonica*, 46(4), 355–366. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600305>
- Santos, A. C. B., Nunes, T. S., Coutinho, T. S., & Silva, M. A. P. (2015). Uso popular de espécies medicinales da família Verbenaceae no Brasil. In *Revista Brasileira de Plantas Medicinales*, 17(4), 980–991. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_083
- Sanyal, P. K., Chauhan, J. B., & Mukhopadhyaya, P. N. (2004). Implications of fungicidal effects of benzimidazole compounds on duddingtonia flagrans in integrated nematode parasite management in livestock. In *Veterinary Research Communications*, 28(5). <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000034997.50332.77>
- Saratsi, K., Hoste, H., Voutzourakis, N., Tzanidakis, N., Stefanakis, A., Thamsborg, S. M., Mueller-Harvey, I., Hadjigeorgiou, I., & Sotiraki, S. (2020). Feeding of carob (*Ceratonia siliqua*) to sheep infected with gastrointestinal nematodes reduces faecal egg counts and worm fecundity. In *Veterinary Parasitology*, 284, 109200. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109200>
- Scarpa, G. F. (2004). Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. In *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 115–135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.003>
- Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. In *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 91, Issues 1–2).

- [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- Scott, I., Pomroy, W. E., Kenyon, P. R., Smith, G., Adlington, B., & Moss, A. (2013). Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. In *Veterinary Parasitology*, 198(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.037>
- Silanikove, N., Landau, S., Or, D., Kababya, D., Bruckental, I., & Nitsan, Z. (2006). Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. In *Livestock Science*, 99(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.05.018>
- Silverman, P. H., & Podger, K. R. (1964). In vitro exsheathment of some nematode infective larvae. In *Experimental Parasitology*, 15(4), 314–324. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(64\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(64)90026-8)
- Singh, R. N., & Sulston, J. E. (1978). Some Observations on Moulting in *Caenorhabditis elegans*. *Nematologica*, 24(1), 63–71. <https://doi.org/10.1163/187529278X00074>
- Singh, V. V., Jain, J., & Mishra, A. K. (2014). Determination of antipyretic and antioxidant activity of *Cassia occidentalis* linn methanolic seed extract. In *Pharmacognosy Journal*, 9(6), 913–916. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.6.143>
- Smith, M. C., & Sherman, D. M. (2009). Goat Medicine. In *Goat Medicine: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9780813818825>
- Smith, W. D. (1999). Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. In *International Journal for Parasitology*, 29(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00195-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00195-7)
- Squires, J. M., Ferreira, J. F. S., Lindsay, D. S., & Zajac, A. M. (2011). Effects of artemisinin and Artemisia extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). In *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.011>
- Steinshamn, H. (2014). Bark in feed – for improved feed utilization and animal health. In 54 (9; 10). Bioforsk. <https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/handle/11250/2444067>
- Stübing, G., & Peris, J. B. (1998). *Plantas Silvestres de la Comunidad Valenciana*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=130796>
- Sudipta, B., Kumar, D. S., Goutam, P., & Monalisha, D. (2012). Evaluation of antidiabetic activity and histological study of *Cyperus kyllinga* Endl. roots. In *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(3).
- Suleiman, M. M., Mamman, M., Sidiama, A., Ighoja, E. J., Tauheed, M., & Talba, A. M. (2014). Evaluation of anthelmintic activity of Nigerian ethnoveterinary plants; *Cassia occidentalis* and *Guiera senegalensis*. In *Veterinary World*, 7(7), 536–541. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.536-541>
- Sutherland, Ian; Scott, I. (2009). *Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control* (Wiley-Blac).
- Swami Handa, S., Singh Khanuja, S. P., Longo, G., & Dutt Rakesh, D. (2008). Extraction techniques of medicinal plants. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 1–10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526.37.S71.3>
- Swan, G. E. (1999). The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. In *Journal of the South African Veterinary Association* (70; 2). <https://doi.org/10.4102/jsava.v70i2.756>
- Szopa, A., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Elansary, H. O., Al-Mana, F. A., Mattar, M. A., &

- Ekiert, H. (2020). *Artemisia absinthium* L.—importance in the history of medicine, the latest advances in phytochemistry and therapeutical, cosmetological and culinary uses. In *Plants* (9; 9,) 1–33. <https://doi.org/10.3390/plants9091063>
- Tariq, K. A. A., Chishti, M. Z. Z., Ahmad, F., & Shawl, A. S. S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. In *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.084>
- Tariq, K. A., Chishti, M. Z., Ahmad, F., & Shawl, A. S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. In *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 83–88. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.10.084>
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). In *Veterinary parasitology*. Wiley-Blackwell.
- Tng, D. Y. P., Apgaua, D. M. G., Campbell, M. J., Cox, C. J., Crayn, D. M., Ishida, F. Y., Laidlaw, M. J., Liddell, M. J., Seager, M., & Laurance, S. G. W. (2016). Vegetation and floristics of a lowland tropical rainforest in northeast Australia. In *Biodiversity Data Journal*, 4(1), 7599. <https://doi.org/10.3897/BDJ.4.e7599>
- Tobyn, G., Denham, A., & Whitelegg, M. (2011). *Artemisia absinthium*, wormwood. In *Medical Herbs* (pp. 105–121). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-10344-5.00016-1>
- Torres-Acosta, J. F. J., & Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. In *Small Ruminant Research*, 77(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.03.009>
- Tous, J., Romero, A., Hermoso, J. F., Ninot, A., Plana, J., & Batlle, I. (2009). Agronomic and commercial performance of four Spanish carob cultivars. In *HortTechnology*, 19(2), 465–470. <https://doi.org/10.21273/hortsci.19.2.465>
- Tropicos. (2020). *Missouri Botanical Garden*. Missouri Botanical Garden.
- Tucker, A. O., Maciarelo, M. J., & Bryson, C. T. (2006). The Essential Oil of *Kyllinga odorata* Vahl (Cyperaceae) from Mississippi. In *Journal of Essential Oil Research*, 18(4), 381–382. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699120>
- Tzamaloukas, O. O. (2006). The use of bioactive forages towards organic/sustainable control of gastrointestinal parasites in sheep. The University of Edinburgh. <https://era.ed.ac.uk/handle/1842/27565>
- Umasa, E., & Castro, O. (1990). Chemical constituents of *Verbena litoralis*. In *Pharmaceutical Biology*, 28(3), 175–176. <https://doi.org/10.3109/13880209009082807>
- Van Wyk, J. A., & Bath, G. F. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. In *Veterinary Research*, 33(5). <https://doi.org/10.1051/vetres:2002036>
- van Wyk, J. A., & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), 14. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.539>
- Váradýová, Z., Pisarčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, A., Vadlejch, J., & Várady, M. (2018a). Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. In *Experimental Parasitology*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.009>
- Váradýová, Z., Pisarčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, A., Vadlejch, J., & Várady, M. (2018b). Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. In *Experimental*

- Parasitology*, 195, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.009>
- Vargas-Magaña, J. J., Torres-Acosta, J. F. J., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., & Chan-Pérez, J. I. (2014). Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. In *Veterinary Parasitology*, 206(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.008>
- Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Vilarem G, Mathieu C, C.-P. J. (2012). Comparación de la sensibilidad de tres ensayos *in vitro* para evaluar el efecto antihelmíntico de materiales ricos en taninos contra *Haemonchus contortus*. VII Seminario Internacional de Parasitología Animal. Querétaro, Querétaro, México. 10-12 Octubre.
- Varmola, M. I., & Carle, J. B. (2002). The importance of hardwood plantations in the tropics and sub-tropics. In *International Forestry Review*, 4(2), 110–121. <https://doi.org/10.1505/IFOR.4.2.110.17439>
- Vatta, A. F., Letty, B. A., Van Der Linde, M. J., Van Wijk, E. F., Hansen, J. W., & Krecek, R. C. (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. In *Veterinary Parasitology*, 99(1). [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00446-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00446-0)
- Vendruscolo, G. S., Rates, S. M. K., & Mentz, L. A. (2005). Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. In *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4). <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2005000400018>
- Ventura-Cordero, J., González-Pech, P. G., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., & Tun-Garrido, J. (2019). Sheep and goat browsing a tropical deciduous forest during the rainy season: Why does similar plant species consumption result in different nutrient intake? In *Animal Production Science*, 59(1), 66–72. <https://doi.org/10.1071/AN16512>
- Verpoorte, R. (2004). Alkaloids. In *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* (pp. 56–61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00010-8>
- Verza, S. G., Pavei, C., & Ortega, G. G. (2008). Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. In *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(8), 1627–1633. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000800025>
- Vestena, A., Piton, Y., de Loretto Bordignon, S. A., Garcia, S., Arbo, M. D., Zuanazzi, J. A., & von Poser, G. (2019). Hepatoprotective activity of *Verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside. In *Journal of Ethnopharmacology*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111906>
- Vicente, J. J., Rodrigues, H. de O., Gomes, D. C., & Pinto, R. M. (1997). Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos. In *Revista Brasileira de Zoologia*, 14(suppl 1). <https://doi.org/10.1590/s0101-81751997000500001>
- Vijayalakshmi, S., Ranjitha, J., Devi Rajeswari, V., & Bhagiyalakshmi, M. (2013). Pharmacological profile of *Cassia occidentalis* L - A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 29–33.
- Villalba, J. J., Provenza, F. D., & Han, G. D. (2004). Experience influences diet mixing by herbivores: Implications for plant biochemical diversity. In *Oikos*, 107(1), 100–109. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12983.x>

- Von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., ... Wirthlerle, N. (2009). Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. In *Parasitology Research*, *105*(3). <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1466-1>
- Waller, P. J., Bernes, G., Thamsborg, S. M., Sukura, A., Richter, S. H., Ingebrigtsen, K., & Höglund, J. (2001). Plants as De-Worming Agents of Livestock in the Nordic Countries: Historical Perspective, Popular Beliefs and Prospects for the Future. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, *42*(1), 31–44. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-42-31>
- Waller, P. J., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., & Hansen, J. W. (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. In *Veterinary Parasitology*, *62*(3–4), 181–187. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00909-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00909-4)
- Waller, P. J. (2004). Management and control of nematode parasites of small ruminants in the face of total anthelmintic failure. In *Tropical Biomedicine*, *21*(2).
- Waller, Peter J. (1997). Anthelmintic resistance. In *Veterinary Parasitology*, *72*(3–4), 391–412. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00107-6)
- Waller, Peter J., & Thamsborg, S. M. (2004). Nematode control in “green” ruminant production systems. In *Trends in Parasitology* (20; 10). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.012>
- Warburton, E. M., & Vonhof, M. J. (2018). From individual heterogeneity to population-level overdispersion: quantifying the relative roles of host exposure and parasite establishment in driving aggregated helminth distributions. In *International Journal for Parasitology*, *48*(3–4), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.10.005>
- Watt, G. (2014). A Dictionary of the Economic Products of India. In *A Dictionary of the Economic Products of India*. <https://doi.org/10.1017/cbo9781107239227>
- Wei, J. Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S. C., & Aroian, R. V. (2003). Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.0538072100>
- WHO. (2019). *Global report on traditional and complementary medicine 2019*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Williams, A. R., Krych, L., Ahmad, H. F., Nejsum, P., Skovgaard, K., Nielsen, D. S., & Thamsborg, S. M. (2017). A polyphenol-enriched diet and Ascaris suum infection modulate mucosal immune responses and gut microbiota composition in pigs. In *PLoS ONE*, *12*(10), e0186546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186546>
- Wilson, K., Bjørnstad, O. N., Dobson, a. P., Merler, S., Poglayen, G., Randolph, S. E., Read, a. F., & Skorpington, A. (2001). Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. In *The Ecology of Wildlife Diseases*, 6–44.
- Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G., & Sangster, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. In *Trends in Parasitology*, *20*(10). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>
- Woodward, A., & Coppock, D. L. (1995). Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. In *Agroforestry Systems*, *32*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00711570>

- World Health Organization. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*. World Health Organization.
- Yadav, J. P., Arya, V., Yadav, S., Panghal, M., Kumar, S., & Dhankhar, S. (2010). Cassia occidentalis L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. In *Fitoterapia*, 81(4), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.09.008>
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yang, Y., Laval, S., & Yu, B. (2014). Chemical synthesis of saponins. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (71) 137–226. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800128-8.00002-9>
- Yarihuamán, D. A., & Zárate, J. B. (2008). Determinacion del contenido Tanico de la corteza de cinco árboles de la Amazonia Peruana. *Revista Forestal Del Perú V*, 10(12), 1–10.
- Yeates, G. W., Skipp, R. A., Gray, R. A. J., Chen, L. Y., & Waghorn, T. S. (2007). Impact on soil fauna of sheep faeces containing a range of parasite control agents. In *Applied Soil Ecology*, 35(2), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.07.003>
- Yoshihara, E., Minho, A. P., Cardim, S. T., Tabacow, V. B. D., & Yamamura, M. H. (2014). In vitro ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). *Semina: Ciências Agrárias*, 35(6), 3173–3180. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p3173>
- Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B., Katiki, L. M., Costa-Júnior, L. M., Tamboura, H. H., Belem, A. M. G., Abdalla, A. L., Niderkorn, V., Hoste, H., & Louvandini, H. (2017). Comparison of the in vitro anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. In *Parasite*, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017044>
- Zafab, M. M., Hamdard, M. E., & Hameed, A. (1990). Screening of *Artemisia absinthium* for antimalarial effects on *Plasmodium berghei* in mice: A preliminary report. In *Journal of Ethnopharmacology*, 30(2), 223–226. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90011-H](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90011-H)
- Zajac, A. M. (2006). Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 22, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.006>
- Zajac, A. M., & Garza, J. (2020). Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 36(1), 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.005>
- Zajíčková, M., Nguyen, L. T., Skálová, L., Raisová Stuchlíková, L., & Matoušková, P. (2020). Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. In *Drug Discovery Today* (Vol. 25, Issue 2, pp. 430–437). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>
- Zangueu, C. B., Olounlade, A. P., Ossokomack, M., Djouatsa, Y. N. N., Alowanou, G. G., Azebaze, A. G. B., Llorent-Martínez, E. J., de Córdova, M. L. F., Dongmo, A. B., & Hounzangbe-Adote, M. S. (2018). *In vitro* effects of aqueous extract from *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell stem bark on egg hatching, larval migration and adult worms of *Haemonchus contortus*. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1475-3>

- Zeineldin, M. M., Sabek, A. A., Barakat, R. A., Elghandour, M. M. M. Y., Salem, A. Z. M., & de Oca Jiménez, R. M. (2020). Potential contribution of plants bioactive in ruminant productive performance and their impact on gastrointestinal parasites elimination. In *Agroforestry Systems*, 94(4), 1415–1432. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0295-6>
- Zhu, J., Filippich, L. J., & Alsalami, M. T. (1992). Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Research in Veterinary Science*, 53(3), 280–292. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90128-0](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90128-0)
- Zucchi, M. R., Oliveira, V. F., Gussoni, M. A., Silva, M. B., Silva, F. C., & Marques, N. E. (2013). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri - GO. In *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(2), 273–279. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000200016>
- Zuloaga, Fernando; Belgrano, M. (2015). The Catalogue of Vascular Plants of the Southern Cone and the Flora of Argentina: their contribution to the World Flora. *Rodriguésia*, 66, 989–1024. <https://www.scielo.br/pdf/rod/v66n4/2175-7860-rod-66-04-00989.pdf>

VIII. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication (Accepted)

1. **Meza Ocampos, Griselda Asunción**; Torres Ñumbay, Miguel; Alvarenga, Nelson; Pereira Sühsner, Claudia; Delmás, Gloria, Hoste, Hervé. 2021. Ethnobotanical and ethnoveterinary survey in Paraguay: Medicinal plants used for deworming. *Indian Journal Traditional Knowledge*. Article #IJTK-3983
2. Hoste H, **Meza Ocampos G**, Marchand S ; Sotiraki S, Saratsi K , Torres Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C Blomstrand B . ; Thamsborg S.M., Williams A.R. , Einemark H. , Athanasiadou S.. Costa Junior, L ; Louvandini H. ; Salminen J.P Charlier J., Morgan E. 2021. Use of agro- industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastro intestinal nematodes in ruminants. *Parasite*.

En preparation

3. **Meza Ocampos Griselda**, Torres Ñumbay Miguel, Haddad Mohamed, Messi Ambassa Lin Marcellin, Alvarenga Nelson, Hoste Hervé. 2021. *In vitro* evaluation of the anthelmintic activity of four medicinal plants against gastrointestinal nematodes and their chemical composition.
4. **Meza Ocampos Griselda**, Torres Ñumbay Miguel, Haddad Mohamed, Hoste Hervé. *In vitro* evaluation of the anthelmintic activity of four medicinal plants against eggs of *T. colubriformis* and *H. contortus* using the eggs hatch assay.
5. **Meza Ocampos Griselda**, Osmite Berlus, Bordes, Léa, SETHA Ketavong, Hoste Hervé. *In vivo* test of a mixture - complex rich in condensed tannins in sheep with natural infection of gastrointestinal nematodes.

Poster

1. **Meza Ocampos, Griselda**; Torres Ñumbay, Miguel; Alvarenga, Nelson; Hoste Hervé. 2019. La importância social y econômica de las plantas medicinales para la poblacion del Departamento Central, Paraguay. BIENAL CIENTIFICA 12 – 13 setiembre 2019. Foz de Iguazu, Paraguay. DOI : [10.13140/RG.2.2.28500.01929](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28500.01929)
2. **Meza Ocampos, Griselda**; Torres Ñumbay, Miguel; Alvarenga, Nelson; Pereira Sühsner, Claudia; Ketavong SETHA; Hoste, Hervé. 2020. *In vitro* anthelmintic activity of *Kyllinga odorata* Valh (Cyperacea) using the Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA) and Eggs Hatch Assay (EHA) on *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. COMBAR Meeting 9 – 10 december 2020 – Online event. DOI: https://www.combar-a.eu/sites/default/files/Poster%20book_COMBAR4thWG.pdf.

Présentation Orale

1. **Meza Ocampos, Griselda**; Torres Ñumbay, Miguel; Alvarenga, Nelson; Pereira Sühsner, Claudia; Hoste, Hervé. 2020. Traditional medicine. Cross sectional survey on medicinal plants used as anthelmintic by the population of Central Department, Paraguay. Webinar on Traditional & Alternative Medicine; August 19, 2020; Osaka, Japan DOI: <https://www.iomcworld.org/articles/traditional-medicine-in-paraguay-a-crosssectional-ethnobotanical-survey-of-medicinal-plants-used-for-the-treatment-of-th.pdf>.
2. **Meza Ocampos, Griselda**; Torres, Ñumbay Miguel; Haddad, Mohammed; Messi Ambassa, Linn; Alvarenga, Nelson; Ketavong, Seta; Hoste, Hervé. *In vitro* evaluation of anthelmintic activity of four medicinal plants from Paraguay, against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. WAAVP 2021 19th – 22nd July 2021, Dublin, Irlande. DOI: <https://app.oxfordabstracts.com/dashboard/events/1723>.

Diffusion d'informations

1. *Antihelmínticos pasado, presente, futuro* (18 noviembre 2020). Universidad Nacional de Asunción, Departamento Fisiología Animal Facultad de Ciencias Veterinarias.
2. Présentation des objectifs et résultats de la thèse aux étudiants de l'Université Nationale d'Asuncion 2 -3eme année. Cathedra Physiologie
3. Présentation des objectifs et des résultats aux étudiants de la Université National de Canindeyú 2 – 3eme année. Cathedra Parasitologie DOI: <https://fcaa.edu.py/2019/07/01/gestion-integral-de-parasitismo-en-pequenos-rumiantes-y-resistencia-a-antiparasitarios/>

Articles de vulgarisation – Magazine

- Jornada Técnica. Gestión integral del Parasitismo en Pequeños Rumiantes. *Pecuaría y Negocios*. DOI: https://issuu.com/adca/docs/pecuaría_n_175_febrero-19.
-