



Le sainfoin déshydraté - un modèle de nutriment dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants

Elodie Gaudin

► To cite this version:

Elodie Gaudin. Le sainfoin déshydraté - un modèle de nutriment dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2017. Français. NNT: 2017INPT0042 . tel-04222809

HAL Id: tel-04222809

<https://theses.hal.science/tel-04222809>

Submitted on 29 Sep 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 (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme ELODIE GAUDIN

le mardi 16 mai 2017

Titre :

Le sainfoin déshydraté: un modèle de nutriment dans la lutte contre les
nématodes parasites des petits ruminants.

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

Directeur(s) de Thèse :

M. HERVÉ HOSTE

MME CECILE GINANE

Rapporteurs :

M. CHRISTINE DUVAUX-PONTER, AGROPARISTECH

M. CHRISTOPHE CHARTIER, ECOLE NLE VETERINAIRE DE NANTES - ONIRIS

Membre(s) du jury :

M. CHRISTOPHE CHARTIER, ECOLE NLE VETERINAIRE DE NANTES - ONIRIS, Président

M. DENIS BASTIANELLI, CIRAD MONTPELLIER, Membre

M. HERVÉ HOSTE, INRA TOULOUSE, Membre

Mme CECILE GINANE, INRA CLERMONT FERRAND, Membre

M. VINCENT GERFAULT, MG2MIX, Membre

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, Dr. Hervé Hoste, directeur de recherche de l'équipe « Interactions Nématodes-Milieus Digestifs » de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) INRA 1225 « Interactions Hôtes-Agents Pathogènes ». Je suis extrêmement fière d'avoir pu réaliser ma thèse à ses côtés et je suis très reconnaissante des conseils qu'il a pu m'apporter au cours de ces trois ans, que ce soit pour les manipulations au laboratoire, sur animaux, mais aussi pour la rédaction des divers articles et de cette thèse, leur publication et la participation à des conférences internationales comme le congrès WAAVP en Août 2015. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée, pour la diversité des tâches qui m'ont été confiées, pour m'avoir intégrée aux divers programmes dont il fait partie et pour m'avoir fait découvrir une partie de son vaste réseau. MERCI.

Merci à Cécile Ginane, ma co-directrice de thèse, chargée de recherches dans l'équipe « Comportement Animal, Robustesse et Approche Intégrée du Bien-Être » de l'UMRH, pour avoir encadré mon dernier essai de thèse à l'UMR1213 de Theix. Je la remercie pour m'avoir initiée au comportement alimentaire, de m'avoir autant aidée tout au long de cet essai et pour sa rigueur.

Merci également à Vincent Gerfault, mon directeur de thèse du côté industriel, pour la grande confiance dont il a fait part envers moi, pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant des PME de la nutrition animale et pour son ouverture d'esprit.

Merci à Pascale Gombault, directrice de Multifolia et Sainfolia, pour l'enthousiasme et la détermination dont elle a fait preuve tout au long de cette thèse.

Je remercie les deux membres de mon comité de thèse, le Dr Carine Paraud (ANSES de Niort) et le Dr Vincent Niderkorn (UMRH INRA de Theix) pour avoir accepté de participer au suivi de ma thèse au cours de ces trois ans.

Merci aux membres du jury, Pr. Christine Duvaux-Ponter, Pr. Christophe Chartier et Dr. Denis Bastianelli, pour l'intérêt démontré et le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à l'évaluation de ma thèse.

Mes deux premières années de thèse se sont déroulées principalement sur le site de l'école vétérinaire de Toulouse (la première essentiellement au laboratoire afin d'analyser les échantillons de sainfoin et la seconde principalement en contact avec les animaux au cours d'un essai *in vivo* sur les conditions d'utilisation du sainfoin).

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu travailler et qui ont participé au bon déroulement de cette première phase de thèse :

- Le Pr. François Schelcher et le Dr. Christine Citti pour m'avoir acceptée au sein de leur équipe UMR 1225 « Interactions Hôtes-Agents Pathogènes », mais également tout le personnel de cette UMR, notamment l'équipe administrative (Mesdames Pascale Fauré, Marie Perrin, Corinne Fabreguettes et Laurence Lecomte), pour leur disponibilité et les services rendus.
- Je n'oublie pas non plus Mr. Jean-Marc Delmas et toute l'équipe de l'animalerie pour leur appui technique lors des différents essais menés à la bergerie.
- Merci également au Pr. Michel Franc et à toute l'équipe du département de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour leur bonne humeur quotidienne.

Enfin, merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées au tannin-lab, pour leur aide, leur soutien et la bonne ambiance apportée au quotidien :

- Ramzi El Korso, merci de m'avoir autant aidée, pour avoir été chercher les chèvres pour les essais *in vivo* ou pour nourrir mon lapin mes semaines d'absence.
- Dr. Jessica Quijada, merci pour ta gentillesse et ton soutien tout au long de cette thèse.
- Liza Bastide, merci pour ton aide si précieuse lors de mon essai *in vivo* et pour toutes les diverses manip dans lesquelles on s'est lancées. Je te souhaite la plus grande réussite en tant que véto !
- Dr. Aïna Ramsay, merci pour tes conseils d'ancienne thésarde !
- Dr. Guiseppe Copani, merci pour ta bonne humeur italienne !
- Dr. Marica Engström, thank you for being yourself.
- Mr Eric Pardo, merci pour ta bonne humeur et ton aide dans l'analyse de mes derniers résultats.

La fin de ma première année s'est réalisée au sein de l'entreprise MG2MIX. Merci à tous les employés d'MG2MIX pour m'avoir aussi bien intégrée, même en étant souvent à distance. Merci pour leur état d'esprit d'équipe. Je remercie tout particulièrement :

- Mrs Maignan et Gétain, pour m'avoir accueillie et m'avoir montrée qu'il faut toujours croire en ce que l'on veut.
- Le service ruminant, à savoir Mickaël Routier, Mathilde Renaudin et Bertrand Meline pour leurs conseils techniques si précieux sur les ruminants et leur bonne humeur.
- Françoise Edom, pour toute la partie administrative à distance. Merci pour ton grand professionnalisme et de m'avoir autant simplifié la vie !!

En deuxième année, j'ai également pu participer à des essais en élevage. Merci à toutes les personnes qui ont fait de ces essais une réussite :

- Mr. Charles Robuchon, on ne rencontre pas souvent des gens aussi passionnés que toi. Merci pour tous tes conseils et ta volonté durant les deux essais réalisés chez toi.
- Mr. Jean-Baptiste Gely de la société Terrya, pour ses contacts et sa connaissance du monde du cheval.
- Mr. Xavier Senegas, pour son intérêt envers mon sujet de thèse.

Ma deuxième année s'est terminée par un échange d'un mois au Mexique sur des tests en laboratoire sur l'activité antiparasitaire des feuilles et cabosses de cacao. Merci à :

- Dr. Felipe Torres-Acosta, pour son extrême gentillesse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et son pays comme un des leurs.
- Dr. Pedro Gonzalez Pech pour son aide dans toutes les traductions espagnoles qui me manquaient, et pour avoir couru avec moi les 10 km de l'Universidad Autónoma de Yucatán.
- Gloria Sarahi Castañeda, pour son aide durant ce mois et sa patience envers mon niveau d'espagnol !
- Et au Dr. Israel Chan Perez, à Marilem Rodriguez et à Rubi Graciano pour les bons moments passés au labo et à côté.

Ma dernière année de thèse s'est réalisée à l'UMR 1213 Herbivores à l'INRA de Theix pour un essai sur le comportement alimentaire de jeunes chèvres et jeunes brebis, ainsi que sur leur capacité d'automédication. Merci à toutes les personnes suivantes :

- Dr. Isabelle Vessier et Dr. Xavier Boivin pour m'avoir accueillie, respectivement dans leur unité et équipe.
- Mickaël Bernard et toute l'équipe d'Herbipôle (en particulier Aline et Bruno) pour leur très grande disponibilité tout au long de l'essai et leur bonne volonté.
- Toute l'équipe Caraïbe pour leur aide durant les nombreuses et longues journées d'analyses après prélèvements.
- Morgane Costes-Thiré pour l'aide à distance.

Last but not least, je remercie aussi ma famille de m'avoir donné l'envie d'apprendre et de travailler, et sans quoi je ne serais jamais arrivée jusque-là. Merci à mon père qui me prouve tous les jours qu'on peut y arriver quoi qu'il arrive et à ma mère de m'avoir donné l'envie de me diriger vers le monde agricole qui lui est si cher. Merci à ma sœur Ophélie de m'avoir toujours écoutée (je sais que ce n'était pas toujours marrant). Et merci à Yohan pour son amour et pour être aussi présent, pour tout ce que tu as fait pour moi durant cette thèse, les sacrifices comme les coups de main.

Merci à tous les agneaux, chevreux, moutons et chèvres qui m'ont supportée pendant tous ces essais. Merci à Jackpot pour avoir été le plus stoïque et rassurant collègue de bureau qu'il soit, mais aussi pour me permettre de m'évader avec toi et Molly. Et merci à Best of de me rappeler que rien n'est jamais acquis.

Je remercie aussi tous mes proches, amis ou famille, qui m'ont soutenue durant ces trois années.

Enfin, ce travail de thèse a pu être réalisé grâce aux soutiens financiers de divers programmes :

- L'Association Nationale de Recherche Technologique pour l'octroi de la bourse CIFRE n°20131480.
- Le projet EMIDA ERANET CARES.
- Le programme PCP Franco-Mexicain.
- Le métaprogramme INRA GISA STREP.

« Ce que signifie le mot recherche ? Vivre pleinement la question ».
Edgar Morin

Liste des abréviations

Français

ADN Acide DésoxyriboNucléique
 AH(s) Anthelminthique(s)
 AMM Autorisation de Mise sur le Marché
 AOP Appellation d'Origine Protégée
 C Catéchine
 Da Dalton
 EC Epicatéchine
 EGC Epigallocatechine
 g Gramme
 GC Gallocatechine
 GI(s) Gastro-Intestinal(aux)
 ha Hectare
 kg kilogramme
 L1 ; 2 ; 3 ; 4 (s) Larve(s) de stade 1 ; 2 ; 3 ; 4
 ml millilitre
 MS Matière Sèche
 NGI(s) Nématode(s) Gastro-Intestinal(aux)
 OPG Œufs Par Gramme de fèces
 PC(s) Pro-Cyanidine(s)
 PD(s) Pro-Delphinidine(s)
 PDIA Protéines Digestibles dans l'Intestin
 provenant des protéines Alimentaires non
 dégradées dans le rumen réseau
 PEG PolyEthylène Glycol
 pH Potentiel Hydrogène
 PM Poids Moléculaire
 PVPP PolyVinyl PolyPyrrolidone
 RMN Résonance Magnétique Nucléaire
 SGI(s) Strongle(s) Gastro-Intestinal(aux)
 SPIR Spectroscopie Proche Infra-Rouge
 TCs Tanins Condensés
 THs Tanins Hydrolysables

Anglais

AH(s) Anthelmintic(s)
 ALF Alfalfa
 ANOVA Analysis of variance
 BSA Bovine Serum Albumin
 BW Body Weight
 CT Condensed Tannins
 DM Dried Matter
 EC Effective Concentration
 FC Folin-Ciocalteu
 FEC Fecal Egg Counts
 GIN(s) GastroIntestinal Nematodes
 HPLC High Performance Liquid Chromatography
 LEIA Larval Exsheathment Inhibition Assay
 NIRS Near InfraRed Spectroscopy
 NP Non-Parasitized
 P Parasitized
 PCA Principal Component Analysis
 PCV Packed Cell Volume
 PDO Protected Designation of Origin
 PLS Partial Least Squares
 PSM Plant Secondary Metabolites
 PVPP PolyVinyl PolyPyrrolidone
 RD Radial Diffusion
 RMSECV Root Mean Square Error of Cross
 Validation
 RPD Residual Prediction Deviation
 SD Standard Deviation
 SF Sainfoin

Table des matières

Liste des abréviations	7
Table des matières	8
Table des figures	11
Table des tableaux	12
Résumé	13
Abstract	15
Introduction	17
1. Les nématodes gastro-intestinaux des ruminants	20
1.1 Généralités	20
1.2 Cycle de développement	21
1.2.1 Phase exogène	22
1.2.2 Phase endogène	22
1.3 Epidémiologie des strongyloses gastro-intestinales	24
1.3.1 Source	24
1.3.2 Facteurs de variation de l'infestation liés aux strongles	24
1.3.3 Facteurs de variation de l'infestation liés à l'hôte	24
1.4 Conséquences des strongyloses gastro-intestinales chez les ruminants	27
1.4.1 Pertes de production	28
1.4.2 Signes cliniques	29
2. Les moyens de lutte contre les nématodes gastro-intestinaux : les anthelminthiques de synthèse.	31
2.1 Les familles d'anthelminthiques de synthèse	31
2.1.1 Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles	31
2.1.2 Les imidazothiazoles	32
2.1.3 Les lactones macrocycliques	32
2.2 Limites des anthelminthiques de synthèse	33
2.2.1 Ecotoxicité	33
2.2.2 Résidus médicamenteux	34
2.2.3 Résistance des populations de nématodes aux AHs	34
2.2.3.1 Résistance due aux nématodes (facteurs intrinsèques)	36
2.2.3.2 Résistance due à l'application des traitements (facteurs extrinsèques)	36
3. Les alternatives aux moyens actuels de lutte contre les NGIs	37
3.1 Changement des pratiques d'élevage au pâturage	38
3.2 Améliorer la résistance de l'hôte	39
3.2.1 Vaccination	39
3.2.2 Sélection génétique	40
3.2.3 Améliorer la nutrition	40
3.3 Moduler la biologie des vers par des substances naturelles	40
4. Le sainfoin	43
4.1 Généralités	43
4.2 Culture du sainfoin	43
4.3 Composition du sainfoin	44
4.4 Effets zootechniques et anthelminthiques du sainfoin	45

4.5 Granulés déshydratés de sainfoin.....	46
4.6 Présentation de la filière française de déshydratation Multifolia / Sainfolia.....	48
5. Les tanins	49
5.1 Généralités	49
5.2 Les différentes familles	49
5.2.1 Tanins hydrolysables	50
5.2.2 Tanins condensés	50
5.3 Propriétés des tanins	53
5.3.1 Propriétés physico-chimiques des tanins	53
5.3.2 Propriétés biologiques des tanins.....	53
5.4 Plantes riches en tanins	55
5.4.1 Plantes contenant des tanins hydrolysables.....	55
5.4.2 Plantes contenant des tanins condensés.....	55
5.5 Facteurs de variations de la teneur en tanins condensés	56
6. Méthodes de dosage des tanins.....	58
6.1 Dosage des tanins condensés par des méthodes spécifiques	58
6.2 Dosage des tanins par des méthodes simples	59
6.2.1 Méthode biochimique de Folin-Ciocalteu	59
6.2.2 Méthodes biologiques	59
6.2.3 Méthode de précipitation des protéines	59
6.2.4 Dosage des tanins totaux par la spectroscopie en milieu infra-rouge proche	59
7. Effets des tanins condensés chez les animaux parasités et sur les nématodes gastro-intestinaux.....	63
7.1 Généralités	64
7.2 Effets <i>in vitro</i> des tanins condensés sur la biologie des nématodes	65
7.3 Effets <i>in vivo</i> des tanins condensés sur la biologie des nématodes	66
7.4 Mode d'action des tanins sur les nématodes gastro-intestinaux	68
7.4.1 Effet direct.....	68
7.4.2 Effet indirect.....	69
7.5 Effets des tanins condensés sur la résilience des animaux	69
7.6 Variabilité des effets	69
7.6.1 En fonction du parasite	69
7.6.2 En fonction de la ressource riche en tanins condensés et de son mode d'utilisation	70
7.6.3 Utilisation combinée avec d'autres ressources riches en tanins condensés.	71
7.6.4 Utilisation combinée avec un anthelminthique de synthèse	72
8. Consommation des plantes riches en tanins par les animaux	73
8.1 Définition de l'automédication	73
8.3 Types d'automédication.....	75
8.1.1 Automédication prophylactique ou préventive.....	75
8.1.2 Automédication thérapeutique ou curative	76
8.2 Les mécanismes sous-jacents à l'automédication	77
8.3 Modifications quantitatives du comportement : cas de plantes médicinales qui ont aussi une valeur nutritionnelle	79
8.4 L'automédication en élevage	81
8.4.1 Intérêts de l'automédication en élevage	81
8.4.2 Capacités d'automédication des ruminants	82
Objectifs	86
Chapitre 1	89

Article 1 : Comparaison de méthodes d'analyse simples des valeurs protéiques, des teneurs en tanins condensés et des activités biologique et anthelminthique d'échantillons de sainfoin	90
Abstract.....	91
1. Introduction	92
2. Materials and methods.....	95
3. Results.....	100
4. Discussion.....	103
Conclusion.....	106
Chapitre 2.....	121
Article 2 : Etude de l'interaction entre la durée de distribution et la concentration en tanins de granulés de sainfoin sur l'établissement des larves L3 d'<i>H. contortus</i> et <i>T. colubriformis</i> chez les ovins, et sur les vers adultes chez les caprins	122
Abstract.....	124
1. Introduction	125
2. Materials and methods	127
3. Results.....	131
4. Discussion.....	135
Conclusion.....	140
Article 3 : Etude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'interaction entre un anthelminthique de synthèse et les tanins condensés	157
Chapitre 3	166
Article 4 : Comportement alimentaire des ovins et caprins lors d'un challenge parasitaire : sélection de sainfoin riche en tanins et capacités d'automédication	167
Abstract.....	168
1. Introduction	169
2. Materials and methods	171
3. Results.....	178
4. Discussion.....	181
Conclusion.....	187
Discussion Générale	204
1. Synthèse des principaux résultats en lien avec les objectifs de la thèse	204
2. Interprétation critique des résultats	209
2.1 Chapitre 1 : Méthodes simples d'analyse du sainfoin	210
2.2 Chapitres 2 et 3 : Essais <i>in vivo</i>	214
2.2.1 Conditions optimales d'utilisation des granulés de sainfoin	214
2.2.2 Interactions entre un AH de synthèse et la distribution de sainfoin.....	217
2.2.3 Capacité d'automédication des petits ruminants.	218
3. Perspectives d'exploitation des granulés déshydratés de sainfoin en élevage.	219
3.1 Possibilité d'analyses rapides des lots de sainfoin pour qualifier leur valeur en tant que « nutricament » avant usage	219
3.2 Vers des indications pour une exploitation optimisée en élevage.....	221
Conclusion / Perspectives.....	225
Références	229
Liste des publications et communications issues de ce travail de thèse	257

Table des figures

Figure 1: Objectif général et objectifs spécifiques de la thèse	19
Figure 2 : Cycle biologique des nématodes gastro-intestinaux avec les deux phases, endogène et exogène.....	21
Figure 3 : Les trois étapes du dégainement d'une larve L3 : 1) formation d'un anneau indenté ; 2) digestion et séparation de la partie antérieure de la gaine ; 3) libération de la L3	23
Figure 4 : Signes cliniques de l'infestation par les NGIs (à gauche œil anémié – à droite diarrhée)	29
Figure 5 : Trois principes de lutte contre les nématodes (flèches roses) sur le cycle de développement des nématodes (Source : Torres Acosta et Hoste, 2008).....	38
Figure 6: Photo du sainfoin (Source : P. Gombault)	43
Figure 7 : Champ de sainfoin fauché pour préparation de fourrage (Source : P. Gombault)	44
Figure 8 : Schéma de la déshydratation depuis le champ jusqu'aux granulés (Source : coopérative Coopédome).....	47
Figure 9 : Structure de base des tanins hydrolysables	50
Figure 10 : Structure de base des tanins condensés	50
Figure 11 : Structure de base d'un flavan-3-ol.....	51
Figure 12 : Exemples de Légumineuses riches en TCs	55
Figure 13 : Régions du spectre électromagnétique et longueurs d'onde correspondantes	60
Figure 14 : Fonctionnement du spectromètre à transformée de Fourier (Source : Université Claude Bernard, Lyon).....	60
Figure 15 : Spectre d'un échantillon de sainfoin en région infra-rouge récolté par un spectrophotomètre, et ses absorptions caractéristiques (overtone = oscillation harmonique)	61
Figure 16 : Stades des nématodes ciblés par les tests <i>in vitro</i> et relation avec le cycle biologique (AMIA = Adult Mobility Inhibition Assay ; EHA = Egg Hatch Assay ; LFIA = Larval Feeding Inhibition Assay ; IVDC = <i>In Vitro</i> Direct Challenge ; LMIA = Larval Migration Inhibition Assay ; LEIA = Larval Exsheathment Inhibition Assay	66
Figure 17 : Résumé des principaux effets constatés sur les divers stades des nématodes <i>in vivo</i> et variabilité des résultats observés	68
Figure 18: Ingestion de PEG chez des agneaux recevant <i>ad libitum</i> (de 9h à 17h) un aliment contenant 0, 5, 10, 15, ou 20% de tanins. <i>D'après Provenza et al. 2000.</i>	82
Figure 19: Préférence d'agneaux pour trois substances (gris clair: bentonite sodique ; gris foncé: PEG ; rayé: phosphate dicalcique) permettant de diminuer le malaise induit respectivement par l'ingestion d'un aliment riche en céréales, en tanins ou en acide oxalique. <i>D'après Villalba et al. 2006.</i>	83
Figure 20: Ingestion journalière de <i>Lysiloma latisiliquum</i> chez des agneaux infestés avec <i>Haemonchus contortus</i> (TI) ou non infestés (TNI). <i>D'après Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. 2010.</i>	84
Figure 21: Résumé des objectifs de la thèse.....	88
Figure 22: Synthèse des résultats obtenus sur l'application de méthodes d'analyse simples des tanins et des activités antiparasitaire et de complexation avec les protéines de granulés de sainfoin.....	207
Figure 23: Synthèse des résultats obtenus sur le mode d'utilisation des granulés de sainfoin en élevage	208
Figure 24: Synthèse des résultats obtenus sur la comparaison du comportement alimentaire d'ovins et caprins et leur capacité d'automédication (P = parasitées / NP = non-parasitées).....	209

Table des tableaux

Tableau 1 : Les sous-familles des nématodes gastro-intestinaux avec exemples d'espèces, leur hôte et leur localisation chez l'hôte (<i>Chabertiinae</i> = famille des <i>Strongyloidea</i> ; autres sous-familles = famille des <i>Trichostrongyloidea</i>) (Source : Euzéby, 1963)	20
Tableau 2 : Quelques exemples d'études réalisées avec des plantes riches en métabolites secondaires (famille de molécule, plante, étude <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> , hôte)	42
Tableau 3 : Classes d'homopolymères de flavan-3-ols et position et nombre du groupement H ou O-H	51
Tableau 4 : Tests <i>in vitro</i> utilisés afin d'évaluer l'activité anthelminthique de ressources riches en tanins condensés : stades et action ciblés sur les vers (Source : Jackson et Hoste, 2010; Hoste et al., 2016)	65
Tableau 5 : Exemples d'études <i>in vivo</i> réalisées avec des plantes riches en TCs (G = Granulé ; F = Fourrage ; P = Péricarpe ; Fe = Feuille ; E = conditions expérimentales contrôlées ; N = infestations naturelles, O = Ovins, C = Caprins, <i>H. c</i> = <i>H. contortus</i> ; <i>T. c</i> = <i>T. colubriformis</i> ; <i>Te. c</i> = <i>T. circumcincta</i> ; <i>C. o</i> = <i>C. ovina</i>) (Source : Hoste et al., 2016).....	67

Résumé

« *Le sainfoin déshydraté un modèle de nutriment dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants* »

Les nématodes gastro-intestinaux (NGIs) sont une contrainte majeure en élevage des ruminants au pâturage. La méthode de lutte usuelle est l'utilisation de traitements anthelminthiques (AH) de synthèse. Cependant, la diffusion croissante de résistances aux AHs dans les populations de NGIs chez les petits ruminants impose de rechercher des méthodes alternatives de maîtrise. L'exploitation de plantes contenant des métabolites secondaires est une de ces options. Le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), une Légumineuse riche en tanins condensés (TCs), est un modèle pour explorer le concept d'aliment = fourrage associant valeurs nutritionnelles et propriétés sanitaires (propriétés anthelminthiques dans le cadre de cette thèse). Récemment, une filière de production de granulés déshydratés de sainfoin (GDS) s'est construite.

L'objectif général de cette thèse a été de fournir les informations scientifiques pour favoriser l'utilisation de GDS en élevage de petits ruminants. Il s'est décliné en 3 axes de recherche :

Le premier axe visait à valider des méthodes simples de dosage des tanins et d'analyse de l'activité biologique du sainfoin, pour caractériser les ressources avant usage, en se fondant sur des mesures biochimiques (méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu) et de complexation aux protéines = méthode de diffusion radiale et d'activité AH = méthode du dégagement larvaire imitant le processus d'infestation *in vivo*), ainsi que sur la possible utilisation de la spectroscopie en milieu infra-rouge proche (SPIR) dans l'analyse rapide et automatisée de la teneur en tanin.

Les corrélations entre les diverses mesures confirment que les tanins (TCs dans le sainfoin) sont responsables de l'activité AH et mettent en avant l'intérêt de la spectroscopie en milieu infra-rouge proche pour caractériser les différentes sources de sainfoin (GDS et fourrages).

Le second axe visait à mieux définir, sur la base d'études en conditions expérimentales contrôlées, les conditions optimales d'utilisation des GDS en élevage. Une première série d'études a cherché à explorer 1) les effets AHs en fonction de la concentration en TCs de la ration et de la durée de distribution, contre divers stades (L3, vers adultes) d'espèces abomasales ou intestinales et 2) l'intérêt d'associer le sainfoin avec un AH de synthèse.

Les résultats montrent 1) qu'un seuil minimum de TCs dans la ration doit être atteint (entre 1.5 et 2% de la matière sèche totale ingérée) et une période minimum de 15 jours de distribution est nécessaire pour altérer la biologie des nématodes (notamment la fertilité des vers femelles de *Trichostrongylus colubriformis* et le nombre d'*Haemonchus contortus*) et 2) qu'une utilisation du sainfoin dissociée d'un AH de synthèse (ivermectine par voie orale) est préférable en raison d'interactions négatives.

Le dernier axe a visé à comparer la capacité d'ovins ou de caprins à moduler leur comportement alimentaire vis-à-vis de GDS en fonction de leur état parasitaire (capacité d'automédication). L'objectif était de vérifier les hypothèses suivantes : compte-tenu de leur plus grande propension à consommer des tanins, les caprins consommeraient plus de sainfoin que les ovins ; les animaux fortement parasités exprimeraient une préférence pour le sainfoin, par rapport à une autre Légumineuse sans tanins, particulièrement les chèvres en raison de leur moindre résistance envers les parasites, et que celle-ci augmenterait au cours du temps.

Les résultats de cet essai ont montré, dans un test de cafétéria, 1) que les chèvres préféraient le sainfoin et 2) une augmentation de la consommation de sainfoin au cours du temps chez les agnelles parasitées, sans toutefois devenir supérieure à celle des animaux sains. En revanche, aucune différence entre les animaux n'a été remarquée en terme de motivation pour obtenir le sainfoin (lorsqu'il était disponible en quantité limitée) dans un test de conditionnement opérant.

Ces résultats montrent l'intérêt de l'utilisation de granulés de sainfoin en élevage, afin de compléter les AHs de synthèse et tenter de limiter le développement des résistances à ces molécules chez les NGIs.

Abstract

“ Dehydrated sainfoin : a model of nutraceutical for the control of parasitic infections of small ruminants ”

Gastrointestinal nematodes (GINs) represent a major threat for grazing ruminants. The usual mode of control of these parasites mainly relied on the use of synthetic anthelmintics (AHs). However, the repeated use of these molecules has led to resistance against all AH drugs in worm populations of small ruminants. Alternative solutions are needed. Among those, the use of plants that contain plant secondary metabolites, such as condensed tannins (CTs), has been studied for the last 20 years. These CT-containing resources, such as sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) have AH properties and beneficial effects on health and also interesting nutritional values; hence they correspond to the definition of nutraceuticals. Recently, in France, an organization has developed to produce dehydrated pellets of sainfoin.

The general aim of this thesis was to optimize the use of sainfoin pellets in farm conditions.

Our first objective was to characterize the CT content and AH properties of sainfoin pellets. For industrial purposes, simple, low cost and repeatable methods to evaluate the CT content and the AH activity are requested in order to rapidly qualify the pellets.

The CT content was evaluated by biochemical measurements of total phenols and tannins (Folin-Ciocalteu). This was completed by the measure of the complexation of tannins with proteins (Radial Diffusion) and by development of prediction calibrations using near infra-red spectroscopy (NIRS). The AH evaluation was performed on samples before and after dehydration, using the Larval Exsheathment Inhibition Assay.

Calculations of correlations between the different methods showed significant links between the quantity of CT and the AH activity, and the possible use of NIRS to measure the CT content and the AH activity of pellets and forages.

The second objective aimed at defining the optimal conditions to use sainfoin pellets on farm, to improve the AH activity.

We aimed at analyzing, in experimental conditions, 1) how the combination of 2 factors, namely the CT concentration in feed and the length of distribution, influenced the AH efficacy of sainfoin pellets on intestinal and abomasal L3 larvae or adult worms; 2) whether or not the combined use of sainfoin with a chemical AH (oral ivermectine) was beneficial.

Results showed that a minimum CT content in sainfoin and a minimum length of distribution of 15 days are mandatory to alter the adult worm and L3 larvae biology of nematodes, particularly the *Trichostrongylus colubriformis* female fertility and the number of *Haemonchus contortus* worms. However, the combined use of AH (oral ivermectine) and sainfoin consumption should be avoided because of possible negative interactions.

The last axis aimed at studying the behavior of sheep and goats in relation to sainfoin pellets and their ability to change the feeding behavior according to their parasitic status (self-medication ability).

The objective was to verify the following hypotheses: due to their higher propensity to eat CTs, goats will eat more sainfoin than sheep; parasitized animals will prefer sainfoin, especially goats because of their lower resistance against parasites, and this preference will increase overtime.

The results showed that two of our hypothesis were verified in a cafeteria study: 1) goats preferred sainfoin in comparison to alfalfa and 2) the sainfoin consumption increased overtime in infected sheep, without being higher than in non-parasitized ones. However, no differences between animals were observed in term of motivation to get sainfoin (when available in restricted quantity) in an operant-conditioning trial.

All the results showed the interest to use sainfoin pellets in farms, as one alternative to AHs molecules in order to limit the development of resistances to these drugs in GIN populations.

Introduction

La présence de nombreux parasites gastro-intestinaux est une menace pour l'élevage des petits ruminants à l'herbe. En effet, les pâtures sont source d'infestation car les œufs puis les larves de stade L3 (= larves infestantes) des nématodes gastro-intestinaux y résident après avoir été déposés lors de l'excrétion de fèces par les animaux infestés. Une fois l'herbe broutée par les ruminants, les nématodes infestent différents organes, dont l'abomasum et l'intestin grêle. Cette infestation induit par la suite des conséquences physiopathologiques telles qu'une anémie sévère, une baisse d'appétit et une dénutrition des animaux pouvant mener à la mort de l'animal. Les élevages ovins et caprins subissent alors des pertes de production importantes, affectant la santé des animaux et la production.

La méthode conventionnelle de lutte contre ces nématodes est l'utilisation de traitements anthelminthiques chimiques. Ces produits de synthèse sont aujourd'hui remis en cause, en raison des résistances qui sont apparues au sein des populations des nématodes gastro-intestinaux depuis une cinquantaine d'années (Jackson et al., 2012; Crook et al., 2016), mais également de par la constante demande des consommateurs pour des produits indemnes de résidus chimiques. Ainsi, il est nécessaire de trouver des solutions alternatives en accord avec les préoccupations environnementales et sociétales actuelles.

Les plantes aux propriétés anthelminthiques, riches en métabolites secondaires, notamment en tanins condensés, mais également aux valeurs nutritionnelles intéressantes, peuvent être utilisées comme alicaments en élevage (effets combinés sur la santé et la nutrition) (Hoste et al., 2006).

Le sainfoin est une Légumineuse riche en tanins condensés. Proposé en frais ou récolté puis séché sous forme de foin, sa durée de conservation reste limitée et nécessite une capacité importante de stockage en élevage. Récemment, une filière s'est développée pour proposer des granulés déshydratés de sainfoin, qui offrent 1/ la possibilité de cultiver le sainfoin dans les conditions agronomiques les plus favorables puis de le distribuer facilement en élevage ; 2/ une meilleure stabilité de ses caractéristiques nutritionnelles et anthelminthiques au cours du temps, que les fourrages par exemple ; 3/ la possibilité de caractériser et de standardiser les lots avant usage en élevage.

L'objectif général de cette thèse a été d'évaluer l'utilisation de granulés de sainfoin en élevage, avec trois sous-objectifs (Figure 1) : (1) Caractériser les granulés et évaluer les facteurs de culture influant sur la quantité de tanins, (2) identifier les conditions optimales d'utilisation *in vivo* pour des effets anthelminthiques et zootechniques, et (3) évaluer leur ingestion par l'animal d'un point de vue comportemental. La thèse sera composée de 3 parties.

Une première partie bibliographique rappellera des généralités sur les nématodes gastro-intestinaux et leurs méthodes de contrôle ainsi que sur les méthodes alternatives aux traitements anthelminthiques de synthèse. Des études réalisées *in vitro* ou *in vivo* avec des plantes riches en tanins condensés, que ce soit sur des aspects antiparasitaires ou sur l'étude du comportement des animaux consommant ces plantes seront également présentées.

Une seconde partie débutera par la présentation, sous forme d'articles scientifiques préparés, des résultats acquis pendant la thèse sur les tests *in vitro* réalisés avec ces granulés, notamment l'utilisation de méthodes simples permettant d'analyser rapidement la teneur en tanins et les activités de fixation aux protéines et antiparasitaire des granulés. Cette partie présentera par la suite les études *in vivo* réalisées au cours de cette thèse, focalisées sur la définition des conditions pratiques d'utilisation du sainfoin en élevage, que ce soit en termes d'utilisation avec un anthelminthique de synthèse, de quantité à apporter dans la ration, du temps de traitement et de la sélection du sainfoin par les animaux.

Enfin, une troisième partie permettra de discuter l'ensemble des résultats acquis en regard des connaissances bibliographiques, et de tirer quelques conclusions de ce travail.

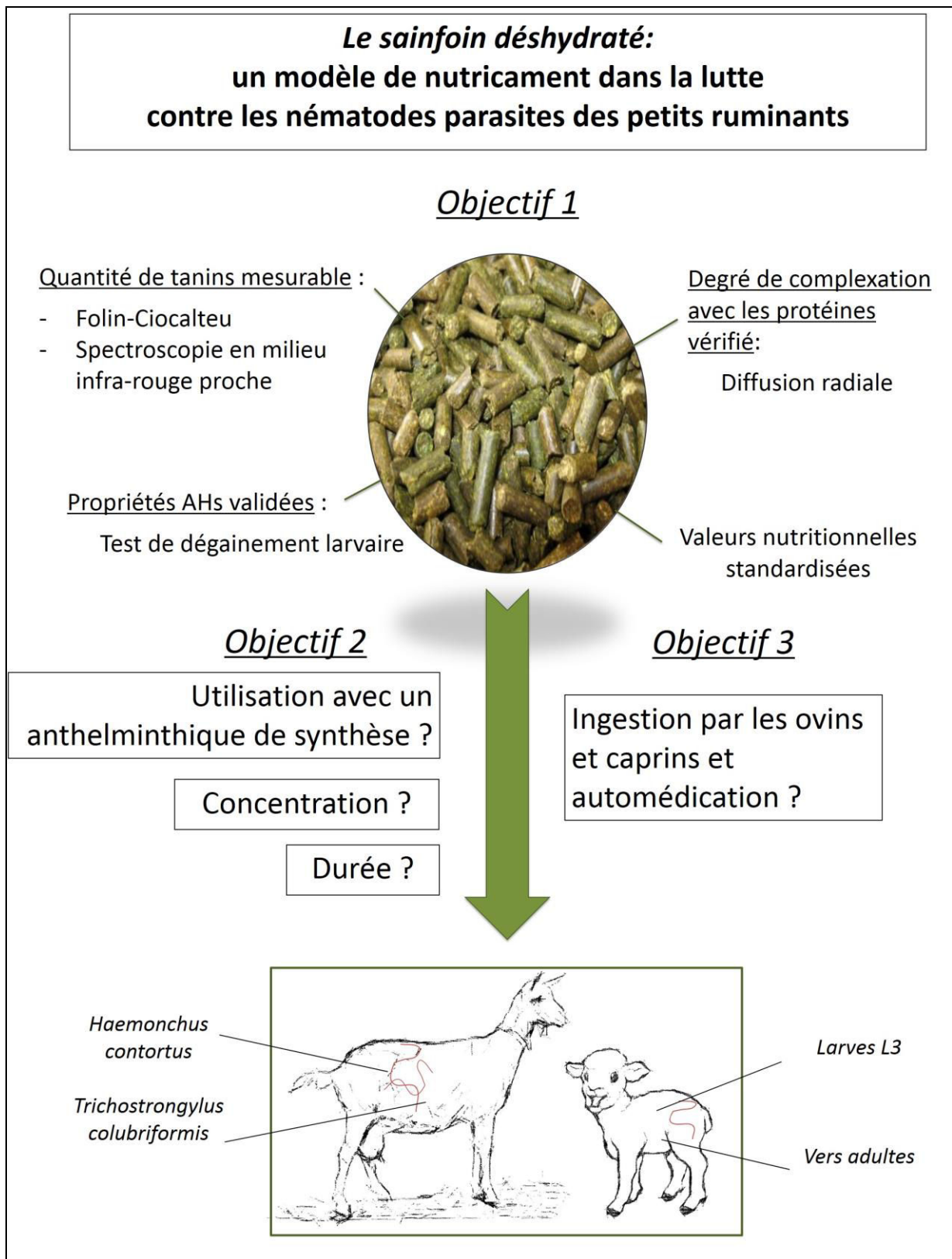


Figure 1: Objectif général et objectifs spécifiques de la thèse

1. Les nématodes gastro-intestinaux des ruminants

1.1 Généralités

Les strongles sont des nématodes gastro-intestinaux (GIs) appartenant à l'ordre des *Strongylida*, à l'origine de pathologies appelées strongyloses GIs, souvent dues à la présence de plusieurs nématodes au sein du tube digestif de l'hôte. La classe des nématodes comporte deux super-familles (*Trichostrongyloidea* et *Strongyloidea*) et sept sous-familles (Euzéby, 1963; Urquhart et al., 1996; Jacquiet, 1997).

Selon, l'espèce, ils parasitent l'abomasum (caillette) ou bien l'intestin grêle des petits ruminants, voire le caecum et le colon (Tableau 1).

Tableau 1 : Les sous-familles des nématodes gastro-intestinaux avec exemples d'espèces, leur hôte et leur localisation chez l'hôte (*Chabertiinae* = famille des *Strongyloidea* ; autres sous-familles = famille des *Trichostrongyloidea*) (Source : Euzéby, 1963)

Sous-famille	Exemples d'espèces	Hôte	Localisation
<i>Haemonchinae</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Caprins, Ovins	Abomasum
	<i>Haemonchus placei</i>	Bovins	
<i>Ostertaginae</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Caprins, Ovins	Abomasum
	<i>Ostertagia ostertagi</i>	Bovins	
<i>Trichostrongylinae</i>	<i>Trichostrongylus axei</i>	Bovins, Caprins, Ovins, Chevaux, Porcs	Abomasum
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Bovins, Caprins, Ovins	Intestin grêle
	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>		
<i>Cooperiinae</i>	<i>Cooperia curticei</i>	Caprins, Ovins	Intestin grêle
	<i>Cooperia punctata</i>	Bovins	
<i>Nematodirinae</i>	<i>Nematodirus battus</i>	Caprins, Ovins	Intestin grêle
	<i>Nematodirus helvetianus</i>	Bovins	
	<i>Nematodirus spathiger</i>	Bovins, Caprins, Ovins	
<i>Chabertiinae</i>	<i>Chabertia ovina</i>	Bovins, Caprins, Ovins	Colon
<i>Oesophagostominae</i>	<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Caprins, Ovins	Caecum, Colon
	<i>Oesophagostomum venulosum</i>		

On distingue les *Trichostrongyloidea* des *Strongyloidea* par la présence d'une capsule buccale réduite chez les *Trichostrongyloidea* et développée chez les *Strongyloidea* (Euzéby, 1963).

Trichostrongylus colubriformis et *T. axei* ainsi que *Teladorsagia circumcincta* sont des espèces fréquentes des petits ruminants en climat tempéré (Chartier et Reche, 1992).

Les espèces de la famille des *Haemonchinae* se retrouvent principalement dans des zones tropicales et sub-tropicales (Yadav et Tandon, 1989). Cependant on retrouve très fréquemment *Haemonchus contortus* dans les zones tempérées (Besier et al., 2016a).

Ces nématodes ont une morphologie de petite taille (4 à 35 mm selon les espèces). Les mâles sont plus petits que les femelles et leur bourse caudale est développée, contrairement aux femelles qui présentent une queue effilée (Urquhart et al., 1996).

1.2 Cycle de développement

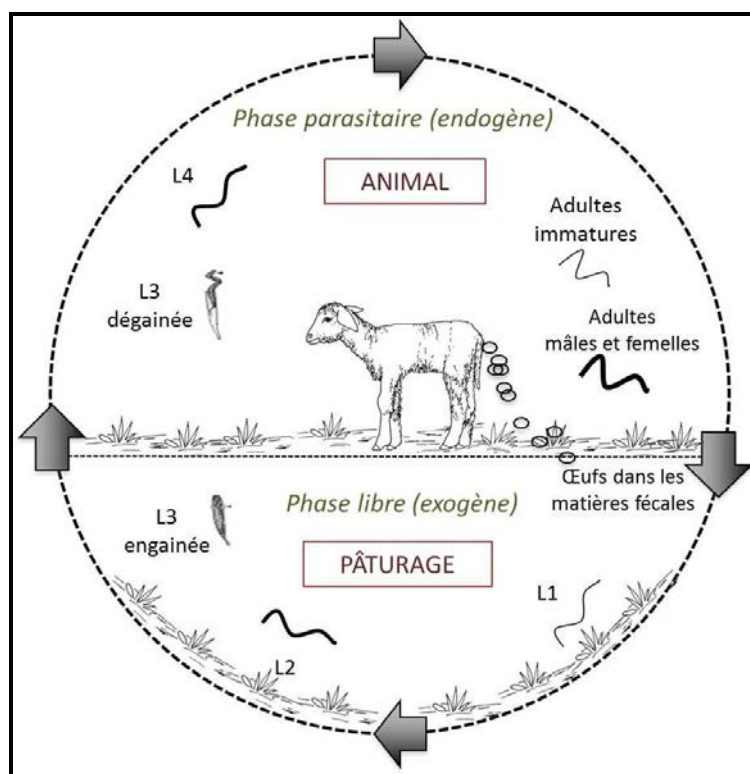


Figure 2 : Cycle biologique des nématodes gastro-intestinaux avec les deux phases, endogène et exogène

Le cycle biologique de ces vers est assez semblable d'une espèce à l'autre. Ce cycle est monoxène (**le ruminant est l'unique hôte hébergeant les vers adultes**). Le cycle comporte deux phases : **une phase libre** (ou exogène) dans le milieu extérieur (où l'œuf passe au stade larve L3) et **une phase parasitaire** (ou endogène) chez l'hôte (passage du stade de larve L3 au stade adulte puis ponte des œufs) (Urquhart et al., 1996) (Figure 2).

La parcelle est contaminée lorsque les œufs sont répandus sur la pâture via les fèces d'animaux infestés.

1.2.1 Phase exogène

Cette phase est initiée lors de l'excrétion de fèces par les animaux, dans lesquels sont présents les œufs que les vers femelles ont pondus. **L'éclosion des œufs** (donnant les larves L1s) **et les mues L1s→L2s puis L2s→L3s s'effectuent dans le milieu extérieur**. L'humidité et l'oxygénation sont des inducteurs de l'évolution alors que les températures chaudes ou froides régulent la vitesse de développement. A l'inverse, la sécheresse et le gel (facteurs limitants pour les stades libres) limitent l'évolution (Euzéby, 1963; Urquhart et al., 1996; O'Connor et al., 2006). Cette phase libre a lieu avec une température minimale de 10°C et un taux d'humidité optimal autour de 60 %. Selon l'espèce, les conditions climatiques et l'environnement, la durée de survie est variable. En zone tempérée, les larves peuvent vivre plusieurs mois sur les pâtures si les conditions environnementales sont optimales alors qu'elles vivent seulement quelques semaines sur les pâtures en zones tropicales (O'Connor et al., 2006).

Sur le pâturage, les larves L3s sont encore pourvues de leur gaine (ou exuvie), vestige de la cuticule des larves de stade L2, et sont donc résistantes aux conditions environnementales, mais aussi aux agents chimiques et biologiques (O'Connor et al., 2006).

Leur facilité de déplacement (horizontal ou vertical) va les aider à être très présentes sur une grande majorité de la surface de la prairie. Cependant, cette mobilité va rapidement les fatiguer par épuisement des réserves énergétiques car ces larves L3 n'ont pas la possibilité de se nourrir (O'Connor et al., 2006).

1.2.2 Phase endogène

La contamination des ruminants se fait par l'ingestion des larves de stade L3 présentes sur la prairie. Ces larves vont, au cours d'un processus initial appelé **dégainement**, se débarrasser de leur gaine, dans les muqueuses de l'organe digestif antérieur à celui où les vers adultes vont résider (Hertzberg et al., 2002). Une fois ingérées par les animaux, les larves vont se libérer de leur gaine (Figure 3), processus d'une durée d'environ une heure (Hertzberg et al., 2002).

Pour les espèces abomasales comme *H. contortus*, cette étape se déroule dans le rumen, et pour les espèces intestinales telles *T. colubriformis*, elle se déroule dans l'abomasum (Rogers et Sommerville, 1963).

Le processus de dégainement dépend de divers paramètres physiques et biologiques tels que les **variations de température** ou de **pH** au sein du tube digestif (environnement neutre pour *H. contortus* et acide pour *T. colubriformis*), ou encore **la pression en CO₂** (Rogers et Sommerville, 1963; 1968). Ces stimuli vont directement influencer sur la sécrétion d'enzymes qui initient le processus de dégainement (Mallet et Lesage, 1987), à savoir 1) la formation d'un anneau indenté sur la partie antérieure de la gaine, 2) la digestion et donc la séparation de cet anneau du reste de la gaine et enfin 3) la libération de la L3 (Rogers et Sommerville, 1963).

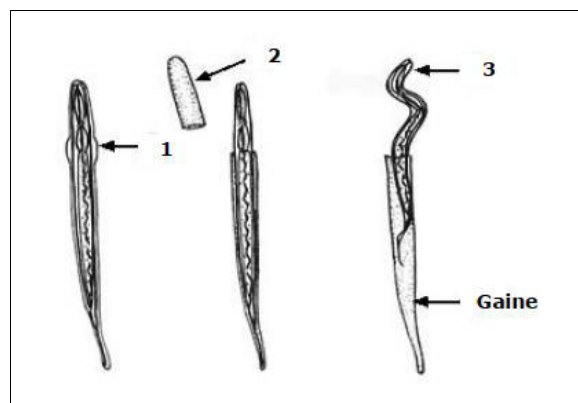


Figure 3 : Les trois étapes du dégainement d'une larve L3 : 1) formation d'un anneau indenté ; 2) digestion et séparation de la partie antérieure de la gaine ; 3) libération de la L3

Les L3s vont ensuite muer en stade L4, L5 (stade pré-adulte) puis adulte (acquisition de la maturité sexuelle) (Euzéby, 1963). Le temps de développement des L3s en vers adultes varie selon l'hôte ou l'espèce de nématode (durée moyenne de 3 semaines mais peut être de 4 semaines chez des espèces du genre *Oesophagostomum*) (Jacquiet, 1997). En cas de canicule (exemple en Afrique, Jacquiet et al., 1996) ou de froid intense, les mues en L4s vont être retardées dues à une **hypobiose larvaire** et la période pré-patente (période entre l'ingestion des L3s et la première ponte d'œufs) pourra alors passer à une durée de trois ou quatre mois (Euzéby, 1963).

1.3 Epidémiologie des strongyloses gastro-intestinales

1.3.1 Source

Les infestations des ruminants par les nématodes GI dépendent de la façon dont sont conduits les animaux au pâturage. En effet, **la phase de vie libre des strongles ne peut se dérouler que sur la prairie et les ruminants s'infestent par la présence des L3s sur l'herbe**, d'où la notion d'infestivité de la parcelle. La quantité de L3s qui y est présente dépend du nombre d'œufs déposés, de leur vitesse de développement et de la survie des L3s (Torres-Acosta et Hoste, 2008).

L'infestation a lieu par contact entre l'hôte et les L3s. L'intensité de l'infestation dépend de la biologie des vers, du comportement des L3s mais également de celui des hôtes.

1.3.2 Facteurs de variation de l'infestation liés aux strongles

✓ Niveau d'excrétion d'œufs (prolificité parasitaire)

Toutes les espèces de trichostrongles digestifs n'ayant pas la même prolificité (Chartier et al., 2000), **la densité en larves des prairies ne sera pas identique selon l'espèce de nématode parasite présente**. Les femelles de *T. colubriformis* pondent par exemple des centaines d'œufs par femelle et par jour alors que les femelles d'*H. contortus* peuvent en pondre 5 000 à 10 000.

✓ Mobilité des L3s

Les L3s se déplacent sur l'herbe suivant un phototropisme négatif et un hygrotropisme positif (Rogers et Sommerville, 1963; Wang et al., 2014). Les moments qui favorisent le plus les infestations sont donc **l'aube et le crépuscule**, lorsque l'ensoleillement est réduit et les prairies rendues humides par la rosée sur l'herbe (Smith et Sherman, 2009).

1.3.3 Facteurs de variation de l'infestation liés à l'hôte

✓ Comportement alimentaire de l'hôte

Deux principaux modes de comportements ont été décrits chez les deux espèces de petits ruminants, illustrant l'importance du comportement alimentaire dans les différences d'ingestion de L3s de nématodes GI et donc de niveaux d'infestation. **Les caprins ont un comportement plutôt cueilleur**, ils vont consommer d'avantage d'arbustes ou de buissons que les **ovins au comportement brouteur** (Hofmann, 1989), évitant ainsi la consommation d'herbe et réduisant le contact avec les L3s (Vercruysse, 1983; Hoste et Chartier, 1998; Hoste et al., 2001; 2010).

Les ruminants « cueilleurs » seraient plus aptes à consommer des plantes à tanins grâce à des adaptations physiologiques, alors que les brouteurs auraient développé des adaptations comportementales comme l'évitement de ces mêmes plantes (Mc Arthur et al., 1991; Provenza et al., 2003). De plus, des études suggèrent que les animaux parasités évitent d'avantage les zones riches en matières fécales, ce qui contribue à réduire les infestations (Hutchings et al., 2003).

✓ Réponses de l'hôte : résilience et résistance

La **résilience** est l'**aptitude de l'hôte à supporter les effets pathologiques des infestations par les NGIs et à maintenir un état clinique et un bon niveau de production en dépit de la présence des parasites** (Van Houtert et Sykes, 1996; Baker et al., 1998; Hoste et al., 2006). Les mécanismes sous-jacents expliquant la résilience restent très peu explorés.

La **résistance** est l'**aptitude de l'hôte à mettre en place et maintenir des réponses immunitaires modifiant la biologie des vers**, comme par exemple une installation des L3s limitée, une diminution de la reproduction et du développement des NGIs, ou l'élimination de populations établies (Douch et al., 1996; Hoste et al., 2006).

▪ *Mécanismes de l'immunité face aux NGIs*

Deux types de réponses immunitaires (innée ou acquise) ont été évoqués pour expliquer la résistance de l'hôte aux infestations par les NGIs (Andronicos et al., 2010).

La **réponse innée** correspond à l'**aptitude de l'hôte à réguler les populations de vers par des mécanismes non-spécifiques** tels que des particularités physiologiques (mouvements péristaltiques, pH gastrique, sécrétion de mucus) et une **grande réactivité inflammatoire** (phagocytose, sécrétion de cytokines) (Lacroux, 2006; Guedes et al., 2010). La **réponse acquise** fait suite à des infestations préalables et serait associée au rôle des lymphocytes T produisant des interleukines (Karanu et al., 1997) et des lymphocytes B (Pérez et al., 2008), ainsi qu'une production accrue d'anticorps IgG1, IgA et IgE (Lacroux, 2006). Cependant, les mécanismes précis de la mise en place de ces réponses ne sont pas totalement connus.

- *Facteurs de variation de la résistance de l'hôte*

- ✓ Âge

De manière générale, **les jeunes animaux sont les plus sensibles et réceptifs aux infestations**, ce qui peut s'expliquer par une immunité acquise non développée (Urquhart et al., 1996; Hoste et al., 1999; Chartier et al., 2000; Tariq et al., 2008). Néanmoins, le facteur 'Âge' serait plus discriminant chez les ovins et les bovins que chez les caprins (Urquhart et al., 1996).

- ✓ Espèce animale

La réceptivité des animaux aux nématodes GIs dépend de l'espèce hôte. Ainsi, à la suite d'infestations répétées par des trichostrongles GIs, **la réponse immunitaire est moins développée chez les caprins que chez les ovins et les bovins** (Hoste et al., 1999; Smith et Sherman, 2009).

- ✓ Facteurs génétiques (race)

Des différences inter-races et inter-lignées (intra-races) de résistance aux nématodes GIs ont été décrites chez les ovins (exemples des races tropicales Barbados Blackbelly et St. Croix qui sont plus résistantes aux NGIs que d'autres races importées) (Bishop et Morris, 2007; Shakya et al., 2011) et à moindre degré chez les caprins (la race Small East African a été décrite comme plus résistante que la race Galla) (Vagenas et al., 2002; Bricarello et al., 2005; Bishop et Morris, 2007).

- ✓ Statut physiologique (gestation)

Chez les animaux en gestation, des augmentations d'excrétion fécale d'œufs de nématodes ont été observées **autour de la période de mise bas** (en fin de gestation et début de lactation). Ce phénomène est appelé le 'periparturient rise'. Il a été suggéré que des perturbations endocriniennes, liées à la gestation, expliqueraient ce phénomène (Rahman et Collins, 1992; Hoste et al., 1999; Kidane et al., 2010). Alternativement, ces augmentations d'excrétion d'œufs seraient associées à un **affaiblissement du système immunitaire des animaux**, lié à une augmentation des besoins **nutritionnels, notamment** en protéines, provoqués par **la fin de gestation et le début de lactation, et l'insuffisance d'ingestion pour couvrir ces besoins** (Perri et al., 2011; Houdijk, 2012).

✓ Effet de la parité (primipare vs. multipare)

Certaines études ont montré des niveaux d'excrétion d'œufs par gramme de fèces (OPG) divergents en fonction de la parité (les primipares étant les plus infestées) chez les ovins (Haile et al., 2007) et les caprins (Hoste et al., 1999), alors que d'autres n'ont pas observé de différences d'OPG entre les primipares et les multipares (Etter et al., 2000). Cet **effet de la parité serait en fait à relier à l'âge des animaux** et au premier contact avec les nématodes car en élevage ovin ou caprin laitiers, les femelles ne sortent pas ou peu avant les premières mise-bas et sont donc peu en contact avec les L3s.

✓ Niveau de production

Une réceptivité élevée au parasitisme GI et des conséquences pathologiques plus sévères ont été rapportées chez les ruminants laitiers présentant les meilleurs niveaux de production (Chartier et Hoste, 1994; Hoste et al., 1999; Etter et al., 2000; Veneziano et al., 2007). Chez les animaux les plus performants, ces niveaux d'infestation plus élevés pourraient s'expliquer par une **plus forte consommation d'herbe au pâturage, et donc d'ingestion de L3s si la prairie est contaminée**. Néanmoins, comme pour le phénomène de 'periparturient rise', l'hypothèse de **déséquilibres alimentaires exacerbés**, liée à des besoins nutritionnels plus élevés, a également été envisagée et en partie démontrée par des études sur des complémentations de la ration (Kidane et al., 2010; Falzon et al., 2013).

1.4 Conséquences des strongyloses gastro-intestinales chez les ruminants

Chez les petits ruminants, les strongyloses digestives évoluent généralement sous forme chronique entraînant en premier lieu 1/ des baisses de production (Holmes, 1993; Coop et Holmes, 1996; Hoste et al., 1997), 2/ l'apparition de signes cliniques (Urquhart et al., 1996) et 3/ pouvant conduire jusqu'à la mort de l'animal.

1.4.1 Pertes de production

En terme économique, chez les ruminants, les strongyloses GI sont reconnues mondialement, comme une des pathologies majeures en raison des pertes de production qu'elles entraînent. En élevage, la présence des vers influence à la fois la quantité et la qualité des productions (Charlier et al., 2014). De multiples études ont montré que le parasitisme GI est responsable de **retards de croissance** des jeunes animaux (Urquhart et al., 1996), que ce soit chez les agneaux (Kyriazakis et al., 1996), ou les chevreaux (Torres-Acosta, 1999). Ce retard de croissance se traduit par des **réductions de poids de carcasse à l'abattage**. Par ailleurs, des **modifications de la qualité des carcasses ou de la viande** (réduction du taux de gras des carcasses ou rétention d'eau) ont été décrites à la suite d'infestations par les nématodes GI (Sykes et Coop, 1976; 1977). Chez les femelles laitières, les infestations par les trichostrongles digestifs ont été régulièrement associées à des **baisses de production de lait** (Chartier et Hoste, 1994; Veneziano et al., 2007) et, de manière plus rare, à des **modifications de la composition du lait** (diminution du taux de matière grasse par exemple) (Hoste et Chartier, 1993; Chartier et Hoste, 1994), observées chez les plus fortes productrices. Enfin, de multiples exemples en Australie et en Nouvelle-Zélande ont illustré des **baisses de production et des altérations de la quantité et de qualité de la laine**, dues à une diminution de la quantité d'acides aminé soufrés (Knox et al., 2006).

Les baisses de production et les symptômes observés chez les animaux parasités s'expliquent par des perturbations de la physiologie digestive. Les principaux processus physiopathologiques impliqués ont été largement décrits. A l'inverse, les mécanismes pathogéniques à la base de ces perturbations restent mal identifiés.

1.4.2 Signes cliniques

D'abord, des symptômes généraux apparaissent telles une **baisse d'appétit** entraînant un **amaigrissement progressif**, une **asthénie** ou des signes de **malnutrition** (Urquhart et al., 1996). Des signes de **gastroentérites** accompagnées de **diarrhées** aiguës sont également fréquents (Williams et al., 2010). Des symptômes plus spécifiques peuvent aussi être constatés comme une **anémie** et des **œdèmes sous maxillaires** dans le cas d'infestation par des nématodes hématophages, comme *H. contortus* (Urquhart et al., 1996; Jacquet, 1997). Il a été estimé qu'un mouton parasité par 5000 *H. contortus* perdait l'équivalent de 250 ml de sang par jour, dû à l'absorption de sang par ce parasite (Urquhart et al., 1996) (Figure 4).



Figure 4 : Signes cliniques de l'infestation par les NGIs (à gauche œil anémié – à droite diarrhée)

Ces symptômes, ainsi que les baisses de production, ont pour origine différents processus physiopathologiques.

✓ Diminution de l'ingestion

Les infestations par les nématodes GI s'accompagnent généralement d'une baisse d'appétit. Dans le cas d'infestation massive, cette perte d'appétit peut aller jusqu'à une anorexie quasi totale (Urquhart et al., 1996; Knox et al., 2006).

✓ Mal-digestion et mal-absorption

Les NGIs présents dans les différents organes digestifs provoquent **d'importantes lésions des divers épithéliums et des muqueuses** (Knox et al., 2006 ; Williams et al., 2010). Mécaniquement, ces lésions sont dues en partie à la **fixation ou à la pénétration des nématodes dans les muqueuses** (Hoste et al., 1997).

Dans l'abomasum, la présence des vers est associée à des **modifications des glandes gastriques** et à une **réduction de la densité de cellules différenciées**, en particulier les cellules à HCl.

Dans l'intestin, une **abrasion des villosités** et une **altération sévère des entérocytes** sont les principales lésions décrites (Hoste et al., 1997). Le parasitisme GI induit également une **augmentation du pH gastrique**, rendant la transformation du pepsinogène en pepsine moins efficace, et altérant l'activité enzymatique intestinale. De plus, une altération de la **perméabilité des épithéliums** est souvent observée (Hoste et al., 1997). Enfin, des **perturbations du péristaltisme** réduisant le temps de contact du chyme avec les muqueuses ont aussi été signalées (Hoste et al., 1997).

✓ Altérations des métabolismes

Les effets du parasitisme GI sur l'appétit et la digestion sont amplifiés par une **réorientation des métabolismes** (Hoste et al., 1997). En parallèle, la présence des vers augmente les besoins nutritionnels de l'hôte pour maintenir l'homéostasie sanguine et l'intégrité des épithéliums digestifs et développer une réponse immunitaire (Coop et Kyriazakis, 2001; Kyriazakis et Houdijk, 2006). Il en résulte une **réquisition des nutriments**, en particulier **protéiques** (Hoste et al., 2005), vers les sites endommagés par les vers (muqueuses) au détriment des sites habituels de synthèse (mamelle, follicule pileux, muscle), ou afin de synthétiser des globules rouges, ce qui accroît les pertes de production.

Tous ces symptômes peuvent évoluer jusqu'à entraîner la mort des animaux.

Les nématodes gastro-intestinaux sont associés à l'exploitation du pâturage partout dans le monde.

Ils entraînent des baisses de production et sont responsables de divers signes cliniques (anémie, troubles digestifs), voire ils peuvent provoquer la mort des moutons ou des chèvres.

2. Les moyens de lutte contre les nématodes gastro-intestinaux : les anthelminthiques de synthèse.

Jusqu'à présent, le parasitisme par les NGIs a été **géré de manière quasi exclusive par des anthelminthiques chimiques** ou de synthèse, apparus depuis la fin des années 1950 avec la phénothiazine (Waller, 2006). Ces AHs peuvent être administrés selon deux buts : 1/ **Stratégique** (ou préventif), mis en place selon les connaissances de l'éleveur, lorsque les animaux rentrent ou sortent au pâturage afin d'assainir les animaux et réduire la contamination des parcelles (Leathwick et Besier, 2014); 2/ **Curatif**, afin d'éliminer les nématodes présents chez les animaux pendant la saison du pâturage.

2.1 Les familles d'anthelminthiques de synthèse

On retrouve plusieurs familles d'AHs, différant selon leur mode d'action. Elles sont distinguées selon leur spectre d'efficacité. Chez les ruminants, quatre familles dites « à large spectre » (efficaces sur plusieurs nématodes gastro-intestinaux et certains nématodes respiratoires) sont communément utilisées : les **benzimidazoles et pro-benzimidazoles** ; les **imidazothiazoles** et les **lactones macrocycliques (avermectines et milbemycines)**. Les **dérivés d'amino-acétonitrile** ont été développés en 2008. Par ailleurs, il existe des **familles à spectre étroit** (exemple les salicylanilides) dont les cibles sont des nématodes hématophages (ex *H. contortus*) mais elles sont peu utilisées. Aujourd'hui certains produits sont commercialisés par association de plusieurs molécules dans le but d'être efficaces contre les nématodes résistants et pour réduire le taux de sélection de populations résistantes (exemple derquantel-abamectine) (Little et al., 2010; Besier et al., 2016b).

2.1.1 Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles

La plupart des molécules de cette famille sont **efficaces contre les strongles GI et respiratoires** (Gordon, 1961). La structure chimique de base est la même pour toute la famille et les molécules se différencient ensuite par la présence de différents groupements.

Les molécules de cette famille sont administrées par **voie orale** (Smith et Sherman, 2009). Les **benzimidazoles sont directement actifs** sur les vers alors que les **pro-benzimidazoles doivent se convertir en molécules actives** dans le foie grâce à des réactions enzymatiques (Lanusse et Prichard, 1993). Les molécules empêchent la synthèse et la polymérisation des microtubules dans les cellules des nématodes, en se fixant à la β -tubuline des vers (Samson-Himmelsjerna, 2007). Les vers meurent, leur morphologie cellulaire étant endommagées et les mitoses altérées (Besier et al., 2016b).

2.1.2 Les imidazothiazoles

Les molécules de cette famille sont **efficaces contre les strongles GIs et respiratoires**. Elles sont administrées par voie orale ou injectable. Ils sont actifs sur les récepteurs nicotiniques à acétylcholine des NGIs, rendant perméable leur membrane post-synaptique (= mort par paralysie spastique) (von Samson-Himmelsjerna, 2007).

2.1.3 Les lactones macrocycliques

Les lactones macrocycliques sont efficaces contre **les strongles GIs** (ou endoparasites), et contre **certains insectes et acariens** (ou ectoparasites). On les qualifie donc d'**endectocides** (Campbell et al., 1983; Bengone-Ndong et Alvinerie, 2004). Elles sont administrées par voie orale ou injectable.

La structure de base des molécules de la famille est similaire mais les différences entre les hétérocycles lactones qu'elle comporte permettent de différencier les avermectines (ivermectine, doramectine et éprinomectine) des milbémycines (moxidectine). Leur mode d'action est décrit dans la littérature comme commun mais reste mal identifié (Bengone-Ndong et Alvinerie, 2004). L'hypothèse la plus confortée serait celle où **les lactones macrocycliques se fixent aux canaux ioniques glutamate-dépendant** présents sur la membrane des cellules neuromusculaires des nématodes (von Samson-Himmelsjerna, 2007), les rendant perméables aux ions chlorures. Ces mécanismes entraîneraient une **inhibition du contrôle nerveux de muscles des nématodes**, entraînant leur **mort par paralysie** (Urquhart et al., 1996; Bengone-Ndong et Alvinerie, 2004).

2.1.4 Les dérivés d'amino-acétonitrile

Cette famille est représentée par une seule molécule (le monepantel), commercialisée depuis 2008. Cette molécule agit comme un antagoniste nicotinique (Kaminsky et al., 2008; Hosking et al., 2010). Le monepantel a été commercialisé pour son **efficacité contre les larves L4s et les formes adultes de nombreux nématodes, notamment de souches résistantes** aux familles d'anthelminthiques précédemment citées.

En revanche, des résistances sont déjà apparues seulement quelques années après sa commercialisation (Scott et al., 2013; Mederos et al., 2014; Van-den-Brom et al., 2015), ce qui correspond aux modèles généraux de développement des résistances décrits par Waller (2006).

2.2 Limites des anthelminthiques de synthèse

L'emploi des anthelminthiques de synthèse est aujourd'hui remis en question car des cas de résistances et de **multi-résistances** sont apparus face à **toutes les molécules** actuellement commercialisées (Kaplan et Vidyashankar, 2012; Jackson et al., 2012; Crook et al., 2016). L'**utilisation accrue** de ces anthelminthiques induit une baisse de leur efficacité alliée à une augmentation de la résistance des NGIs. La demande de nouveaux anthelminthiques est donc grandissante (Geary et al., 2004).

De plus, les consommateurs souhaitent aujourd'hui une diminution générale des intrants chimiques en élevage (pour limiter les risques de résidus dans les produits animaux et dans l'environnement), ce qui répond à une conception plus agro-écologique de l'élevage.

2.2.1 Ecotoxicité

Les AHs de synthèse ont été développés pour être efficaces contre les nématodes dans les divers organes du tube digestif. Ils sont donc métabolisés dans le système digestif de l'animal, voire par le foie après absorption (Mc Kellar, 1997). Ils sont donc évacués dans les fèces et **se retrouvent présents sur les prairies**. Des études ont été menées afin de déterminer l'impact de ces molécules sur l'écosystème des prairies (Wardhaugh et Rodriguez-Menendez, 1988; Jensen et al., 2003; Erzen et al., 2005). Pour certaines lactones macrocycliques (des avermectines longue action), des études *in vitro* et des études menées sur les prairies, ont révélé une **toxicité** notamment sur des coléoptères coprophages (Lumaret et Errouisi, 2002; Lumaret et al., 2012).

2.2.2 Résidus médicamenteux

Les consommateurs **craignent également de retrouver des résidus médicamenteux dans la viande ou le lait des animaux**. Ainsi, la législation concernant les médicaments vétérinaires a imposé des délais d'attente après l'administration de médicaments pour la traite ou l'abattage des animaux, afin de minimiser le risque de résidus. Pour les ovins et caprins laitiers, les familles des benzimidazoles et pro-benzimidazoles et des lactones macrocycliques sont autorisées en lactation. Cependant, aujourd'hui seules certaines formulations commerciales de **l'éprinomectine présente une AMM avec un temps d'attente nul pour le lait** chez ces petits ruminants laitiers.

L'intérêt grandissant de la population pour les produits **issus de l'Agriculture Biologique** impose de répondre à un cahier des charges spécifique (CC-Repab-F, 2000), avec notamment des **traitements thérapeutiques réglementés** (les vaccins et vermifuges doivent être donnés sur justification vétérinaire) ainsi qu'un **recours maximal au pâturage** (Cabaret et al., 2002). Parmi ces critères réglementés par l'IFOAM, 1998, quatre sont reliés à la santé animale (Cabaret, 2003) : 1/ mettre en place un équilibre entre les cultures et l'élevage ; 2/ fournir aux troupeaux des conditions appropriées pour le développement de leurs comportements innés ; 3/ **minimiser toutes formes de pollution** environnementale; 4/ utiliser de préférence les médecines alternatives (**homéopathie, aromathérapie, phytothérapie**) pour la santé des animaux.

2.2.3 Résistance des populations de nématodes aux AHs

✓ Définition de la résistance et de la multi-résistance aux AHs

Des populations de nématodes GI résistants aux AHs sont des populations **ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'un AH** (ou de plusieurs dans le cas de multi-résistances) **qui leur était précédemment létale** (Prichard et al., 1980; Sutherland et Leathwick, 2011). Ce caractère se transmet de façon héréditaire (Coles, 2002).

✓ Situation de la résistance aux AHs

Globalement, quelles que soient les molécules, les premiers cas de résistance aux AHs apparaissent environ **10 ans après leur mise sur le marché**. Les **premiers cas de résistances aux benzimidazoles ont par exemple été remarqués en 1970** (Kaplan, 2004; Waller, 2006).

La recrudescence des résistances des populations de nématodes face à ces molécules est aujourd'hui fréquente dans de nombreux élevages de petits ruminants puisqu'on dénombre des **résistances à toutes les classes d'AHs de synthèse** (Cezar et al., 2010; da Cruz et al., 2010; Scott et al., 2013; Van-den-Brom et al., 2015), en particulier chez les caprins (Chartier et al., 2000). Des cas de **multi-résistances ont été décrits dès les années 1980** en Afrique du Sud, Australie et Nouvelle-Zélande (Van Wyk et al., 1987; Besier, 2007; McKenna, 2010) puis en Asie (Chandrawathani et al., 2004), Amérique latine (Sczesny-Moraes et al., 2010) et aux USA (Kaplan et Vidyashankar, 2012). En Europe, des résistances ont été mentionnées, même si elles sont moindres que dans d'autres régions du globe (Paraud et al., 2009). En France, une forte prévalence des résistances aux benzimidazoles a été rapportée chez les chèvres et les moutons à vocation laitière, mais peu de résistances au lévamisole ont été répertoriées (Chartier et al., 1998; 2001). Un cas de double résistance au benzimidazole et lévamisole a été confirmé dans un élevage de caprins laitiers (Paraud et al., 2009). Des suspicions de résistances à l'ivermectine ont été émises dans des études datant de 2001-2002 (Chartier et al., 2007) et une étude récente a montré un cas de double résistance à l'ivermectine et à la moxidectine chez des ovins (Paraud et al., 2016).

Des **résistances envers des associations de plusieurs molécules** actives ont également été documentées (Mariadass et al., 2006; Playford et al., 2014).

Chez les autres espèces animales, les résistances sont moins souvent mentionnées. Elles sont arrivées rapidement chez les nématodes digestifs des **porcs** et des **chevaux** (Gerwert et al., 2002; Traversa et al., 2009) et sont aujourd'hui également décrites chez les **bovins** (Wolstenholme et al., 2004), notamment pour les espèces intestinales du genre *Cooperia spp.* (Demeler et al., 2012; Geurden et al., 2015; Merlin, 2017).

✓ Mécanisme d'acquisition de la résistance

Trois mécanismes généraux de résistance aux AHs (et par généralisation à tout xénobiotique) ont été décrits (Prichard et al., 1980; Waller, 1986; Kotze et Prichard, 2016) :

- Modification de la cellule ou molécule cible ;
- Modifications des voies métaboliques induisant l'inactivation ou l'élimination rapide des molécules AHs ;
- Amplification du nombre de cellules ou molécules cibles pour diluer l'activation des molécules AHs dans l'organisme du ver.

2.2.3.1 Résistance due aux nématodes (facteurs intrinsèques)

Des facteurs inhérents aux nématodes eux-mêmes peuvent favoriser la diffusion des allèles de résistances. Plus les trichostrongles sont **prolifiques**, plus les générations futures arrivent en nombre et plus la résistance va se diffuser. Par ailleurs, plus la **durée du cycle biologique est courte** et plus les nouvelles générations résistantes vont arriver rapidement (Wolstenholme et al., 2004).

Ces caractéristiques sont remarquables chez *H. contortus* (espèce prolifique, cycle biologique (période prépatente) court), ce qui explique la forte prévalence des résistances aux AHs dans cette espèce de nématode gastro-intestinal à l'échelle mondiale (Jackson et Coop, 2000; Wolstenholme et al., 2004; Besier et al., 2016a).

2.2.3.2 Résistance due à l'application des traitements (facteurs extrinsèques)

Ces facteurs sont principalement liés aux pratiques d'élevage (Smith et Sherman, 2009).

La **pression du traitement** (nombre de traitements AHs effectués, généralisation d'application) est un facteur prépondérant dans la mise en place des résistances (Besier et al., 2016a).

En cas d'**introduction d'animaux parasités par des vers résistants dans un troupeau sensible** (achat d'animaux ou changement des lots), les nématodes résistants vont se reproduire avec les sensibles et augmenter le pourcentage de résistants au sein des populations (Wolstenholme et al., 2004). Ceci est contraire au principe de la « stratégie de **refuge** » Ce concept correspond à l'idée de maintenir une proportion de nématodes, non exposés aux traitements et donc demeurant sensibles aux AHs au sein de la population totale (Jackson, 1993; Coles, 2002) (Waghorn et al., 2008; Leathwick et al., 2009; Kenyon et Jackson, 2012; Besier et al., 2016b).

En raison des pratiques des éleveurs, certains animaux sont **traités fréquemment** et **avec la même classe d’AHs** (Besier et al., 2016b). Ces deux facteurs peuvent augmenter les résistances. De plus, parfois les animaux sont traités avec une **dose insuffisante d’AH de synthèse**, par une mauvaise appréciation du poids ou ignorance de particularités métaboliques des caprins (la nécessité d’adapter les doses chez les chèvres est souvent ignorée) (Besier et al., 2016b). Cette dose sera seulement létale pour les vers les plus sensibles (homozygotes « sensibles ») et la proportion d’allèles résistants (les homozygotes « résistants » et aussi les hétérozygotes « sensibles/résistants ») (Barnes et al., 1995) va augmenter considérablement au sein d’une famille (cas souvent relevé chez les benzimidazoles).

Les anthelminthiques de synthèse, représentés par quatre familles à large spectre, sont apparus dans les années 1950. Ils peuvent être employés pour des buts préventif ou curatif.

Depuis plusieurs décennies, l’usage des molécules de synthèse est remis en cause en raison de problèmes de toxicité qu’elles engendrent (sur les pâtures et par la présence éventuelle de résidus dans les produits animaux), et par l’apparition de résistances envers toutes les classes d’anthelminthiques chimiques dans les populations de nématodes.

Des solutions alternatives sont donc recherchées afin de limiter l’utilisation quasi-exclusive de ces AHs et limiter l’apparition de possibles résistances.

3. Les alternatives aux moyens actuels de lutte contre les NGIs

Compte-tenu des limites inhérentes aux AHs de synthèse, des équipes travaillent actuellement sur la recherche de **méthodes alternatives** afin de traiter les strongyloses GI. Ces recherches sont axées sur trois moyens de lutte : **réduire l'origine des contaminations** (notamment par de nouvelles pratiques d'élevage), **améliorer la résistance de l'hôte** et **moduler la biologie des nématodes** (Figure 5) (Torres Acosta et Hoste, 2008; Besier et al., 2016b).

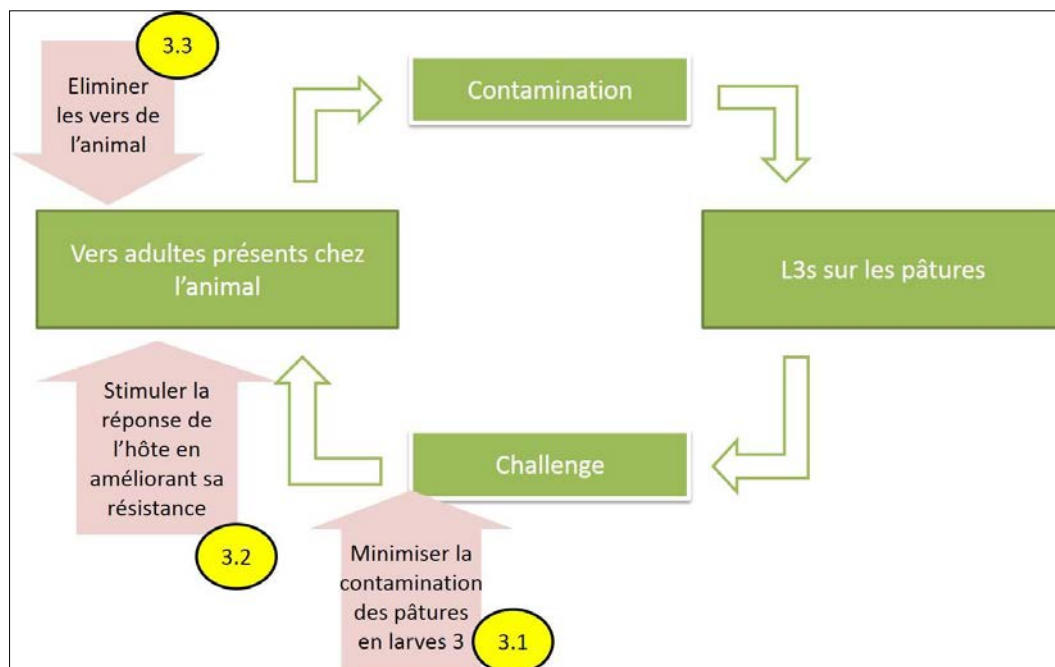


Figure 5 : Trois principes de lutte contre les nématodes (flèches roses) sur le cycle de développement des nématodes (Source : Torres Acosta et Hoste, 2008).

3.1 Changement des pratiques d'élevage au pâturage

Afin de réduire les sources de contamination, deux leviers peuvent être actionnés afin de bloquer le cycle des nématodes GI : **diminuer la quantité de larves** dans le milieu extérieur ou **diminuer le contact entre l'hôte et les larves** (Hoste et al., 1997; Heckendorn, 2007).

Certaines pratiques d'élevage peuvent permettre d'y parvenir (Pomroy, 2006; Colvin et al., 2008) comme **déplacer des animaux sains sur des parcelles non contaminées** (principe de prévention). Ceci est possible en cas de disponibilité de parcelles propres au sein d'un élevage (exemple : parcelles retournées). Sans-disponibilité de ce type de parcelles, attendre la mort naturelle des larves L3s présentes avant de remettre des animaux dans ces pâtures peut répondre à ce principe de prévention (Hoste et al., 2004). Cependant, ceci est peu efficace en régions tempérées compte-tenu du temps de survie important des larves (nécessité d'immobiliser les pâtures pendant 6 à 12 mois). A l'inverse, la méthode s'avère efficace dans les zones tropicales infestées par *H. contortus* car les larves L3 ne survivent que quelques semaines (Mahieu et Aumont, 2009).

La dilution permet de réduire le risque d'infestation en diminuant la quantité de L3s sur le pâturage, en **diminuant le nombre d'animaux présents sur la parcelle** (Etter et al., 2000), ou en **mélangeant les animaux** (sensibles et résistants ou pâturage mixte commun à plusieurs espèces animales, comme bovins-ovins, en pâturage simultané ou alterné) (Waller, 2006; Besier et al., 2016b).

Finalement, l'application de **substances chimiques** (chaux) ou de **moyens physiques** (exploitation des pâtures après fauche ou retournement par labour) peuvent réduire l'infestation (Hounzangbe-Adote, 2004; Hoste et al., 2004). Certains **champignons nématophages** sont également un moyen de lutte biologique puisque leurs mycéliums émettent des pièges qui paralysent les L3s (Kelly et al., 2009).

3.2 Améliorer la résistance de l'hôte

3.2.1 Vaccination

Par définition, la vaccination consiste à **mettre l'hôte en contact avec des faibles doses d'antigènes parasitaires afin de stimuler son système immunitaire lors de futures infestations** par le parasite en question (Besier et al., 2016b). Un vaccin contre *H. contortus* (« Barbervax ») est commercialisé en Australie depuis 2014 (Besier et Smith, 2014) et met en avant le potentiel de la vaccination pour réduire l'utilisation des AHs contre cette espèce très pathogène.

3.2.2 Sélection génétique

Les recherches sur la **sélection génétique d'animaux résistants aux nématodes** (Baker et al., 1998; Pomroy, 2006) ou d'**animaux présentant une plus grande résilience** (Bisset et Morris, 1996) ont débuté dans l'hémisphère sud dans les années 1980s. En France, des études de sélection génétique sont actuellement réalisées mais elles portent principalement chez les ovins (De la Chevrotière et al., 2011), à l'exception des travaux sur le modèle caprin creole en Guadeloupe (Mandonnet et al., 2001 ; 2006).

Après quelques années de sélection, les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible de distinguer des lignées avec des degrés moindres d'infestation sans conséquences sur les capacités de production (croissance) (Kelly et al., 2013; Nisbet et al., 2016). Ceci permet par la suite de **diminuer l'infestation du pâturage** (Baker et al., 1998). Des recherches actives sont en cours sur cette stratégie de lutte.

3.2.3 Améliorer la nutrition

Les strongyloses GIs provoquent des lésions le long du tractus digestif, induisant des perturbations digestives, principalement sur le plan **protéique** (Knox et al., 2006; Nnadi et al., 2009) et également sur le plan **énergétique** (Retama-Flores et al., 2012; Gárate-Gallardo et al., 2015). En raison de l'importance de ces conséquences nutritionnelles, compléter la ration offerte à l'hôte en augmentant les teneurs en protéines ou en énergie, notamment aux périodes critiques (exemple : mises bas), pourrait aider l'animal à répondre aux infestations (Coop et Kyriazakis, 2001; Torres-Acosta et al., 2006).

3.3 Moduler la biologie des vers par des substances naturelles

Les études actuelles sur les moyens de moduler la biologie des vers portent notamment sur l'**utilisation de substances naturelles à effets antiparasitaires** (Hoste et al., 2016).

La **pharmacopée** mondiale recense une multitude de plantes à usage thérapeutique. Elles sont encore très utilisée dans de nombreux pays en voie de développement (Hounzangbe-Adote, 2004; Githiori et al., 2006). De plus, elles répondent aux préoccupations actuelles en terme d'agriculture durable et biologique afin de réduire les intrants chimiques en élevage (moins de résidus dans les produits animaux ou moins de produits chimiques sur les parcelles par exemple) (Waller et Thamsborg, 2004).

Ces plantes qualifiées de « **bioactives** » offrent un nouveau mode de gestion des nématodes gastro-intestinaux en élevage permettant de **compléter l'action des AHs de synthèse** et/ou des autres méthodes alternatives, et de **diminuer la pression parasitaire**.

Ces plantes peuvent être administrées sous le terme de **phytothérapie** (préparations de plantes ou d'extraits de plantes administrées aux animaux de manière ponctuelle, sur une période courte, et visant à traiter les animaux infestés) (Hoste et Torres-Acosta, 2011). Les études réalisées sur la phytothérapie ont montré des effets intéressants de l'armoise (*Artemisia*) par exemple (Irum et al., 2015).

Plus récemment, un autre mode d'exploitation des plantes a été proposé : les **nutricaments** ou **aliments**. Un nutriment est un aliment faisant **partie à part entière de la ration** des animaux, ayant également un intérêt sanitaire (Andlauer et Fürst, 2002; Hoste et al., 2006). Un nutriment est une ressource nutritionnelle, proposée aux animaux de manière prolongée (au moins 7 jours) et dont le but premier est plutôt préventif. Le terme de nutriment est régulé législativement par le **règlement (CE) n°767/2009** et répond à l'appellation **d'aliments complémentaires pour animaux**. Les animaux auxquels ils peuvent être donnés, ainsi que leur intérêt sanitaire, doivent être précisés selon l'article 10 de la Directive (CE) n°39:2008.

Les études réalisées avec les nutriments ont porté, entre autres, sur l'utilisation de Légumineuses et plus généralement de plantes riches en métabolites secondaires comme les tanins condensés, à savoir le sulla (*Hedysarium coronarium*) (Pomroy et Adlington, 2006), sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) (Burke et al., 2012ab; Gujja et al., 2013) ou le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) (Hoste et al., 2012; 2015), auquel on va s'intéresser particulièrement dans cette thèse.

Les métabolites secondaires sont souvent évoqués afin d'expliquer le potentiel bioactif de ces plantes mais la **nature exacte des composés actifs à l'origine des effets observés est souvent peu connue**. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer différentes classes biochimiques illustrées lors de différentes études : les protéinases (Steppek et al., 2004), les alcaloïdes (Githiori et al., 2006), les saponines (Deepak et al., 2002) ou bien les polyphénols et plus précisément les tanins condensés (Barrau et al., 2005). Toutes ces molécules ont été associées à un impact anthelminthique sur différentes classes de nématodes, même si les molécules actives en cause sont souvent peu identifiées (Brunet et al., 2008a) (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques exemples d'études réalisées avec des plantes riches en métabolites secondaires (famille de molécule, plante, étude *in vitro* ou *in vivo*, hôte)

Molécules bioactives suspectées	Nom des plantes	Etude <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	Hôtes	Références
Cysteine-protéase	<i>Carica papaya</i> (Papaye)	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	Ovins, Caprins,	Hounzangbe-Adote, 2004
Alcaloïdes	<i>Azadirachta indica</i> (Margousier, Neem)	<i>In vivo</i>	Ovins	Chagas et al., 2008
Sesquiterpènes Lactones	<i>Chicorium intybus</i> (Chicorée)	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	Ovins, Bovins, Porcs	Marley et al., 2006 ; Peña-Espinoza et al., 2016 ; Williams et al., 2016
Triterpènes Alcaloïdes	<i>Calotropis procera</i> (Pommier de Sodome)	<i>In vivo</i>	Ovins	Githiori et al., 2006
Anthraquinones	<i>Terminalia glaucescens</i> (Badamier glaqué)	<i>In vivo</i>	Bovins	Githiori et al., 2006
Saponines Glucosides	<i>Tribulus terrestris</i> (Croix-de-Malte)	<i>In vitro</i>	/	Deepak et al., 2002
Tanins condensés	<i>Lespedeza cuneata</i> (Sericea lespedeza)	<i>In vivo</i>	Ovins, Caprins	Terrill et al., 2007; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015
Tanins condensés	<i>Hedysarium coronarium</i> (Sulla)	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	Ovins	Athanasiadou et al., 2001; Pomroy et Adlington, 2006
Tanins condensés	<i>Onobrychis viciifolia</i> (Sainfoin)	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	Caprins, Ovins, Bovins	Paolini et al. 2003, Manolaraki et al., 2010 Novobilský et al., 2013; Saratsi et al., 2015; Desrues et al., 2016a

Plusieurs méthodes de lutte peuvent être envisagées afin de réduire la pression parasitaire :

- Changer les pratiques d'élevage (assainir les parcelles, pâturage mixte, ...) et de gestion du pâturage
- Améliorer la résistance de l'hôte (vaccination, sélection génétique, compenser les effets délétères sur les protéines en augmentant leur quantité dans la ration, ...)
- Modifier la biologie des nématodes (utilisation de plantes riches en métabolites secondaires)

Dans le cadre de cette thèse, c'est sur cette dernière approche qu'a porté notre attention, et sur une plante en particulier : le sainfoin, riche en tanins condensés.

4. Le sainfoin

4.1 Généralités

Le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*, dérivant du grec *ónos* (âne) et *brýkein* (dévorer) (Ortiz et Smith, 2016)), est une plante **Légumineuse** (famille des *Fabaceae*), **introduite d'Asie en Europe au 15^{ème} siècle**. Il était très présent en France avant les années 1940s mais, sa culture a beaucoup chuté à partir de la fin des années 1950s: Ainsi, malgré ses réels intérêts zootechniques et agronomiques (fixation de l'azote atmosphérique), la culture du sainfoin est passée de 400 000 ha en 1960 à 20 000 ha en 1986 et presque plus rien aujourd'hui (Aufrère et al., 2013). Cette réduction serait due à la diminution du nombre de chevaux de travail dans les fermes pour qui le sainfoin était un fourrage privilégié, mais aussi à la mauvaise réponse du sainfoin à l'intensification et **à la recherche génétique qui s'est portée sur des plantes avec un rendement plus important**. Cependant, depuis quelques années, sa culture connaît un intérêt renouvelé (cf. partie 4.6).

Il existe **deux types** de sainfoin (19 variétés sont référencées en Europe dont 4 en France en 2010 (Hayot-Carbonero et al., 2011)) :

- Le sainfoin simple (ou « common ») : Il est originaire d'Europe centrale. C'est le sainfoin à une coupe. Il fleurit peu l'année du semis et fleurit deux fois par an ensuite.
- Le sainfoin double (ou « giant ») : Il est originaire du Moyen-Orient. C'est le sainfoin le plus productif. Il fleurit l'année du semis puis deux à trois fois l'année suivante, permettant ainsi plusieurs coupes.

4.2 Culture du sainfoin

Le sainfoin se cultive sur les sols **calcaires** (pH compris entre 6.6 et 8.0), **pauvres, séchants** et **peu profonds** (Meyer-Jones, 2000). Un **apport de potassium** dans les sols est nécessaire pour maintenir sa production (Koivisto et Lane, 2001). C'est une plante **supportant bien la sécheresse et le froid** mais qui est **sensible à l'excès d'eau et au piétinement**.

La plante mesure **50 à 70 cm** de hauteur et contient environ 16 à 18 tiges par plante, d'un diamètre de 3 à 9 mm (Ortiz et Smith, 2016). Elle porte des grappes de fleurs roses striées de blanc (Figures 6 et 7).



Figure 6: Photo du sainfoin
(Source : P. Gombault)



Son rendement varie **entre 6,3 t MS/ha/an et 11,9 t MS/ha/an** (entre 10 et 20% inférieur aux rendements observés pour la luzerne) (Peel et al., 2004; Kazuk, 2010).

Figure 7 : Champ de sainfoin fauché pour préparation de **fourrage**
(Source : P. Gombault)

Le sainfoin, faisant partie de la famille des Légumineuses, est capable d'établir des **liaisons avec des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*** dans des nodules situés dans ses racines. Les bactéries vont **réduire l'azote** de l'atmosphère en ammoniac dans les racines de la plante pour **synthétiser par la suite des acides aminés** (Malisch et al., 2016). Il peut également créer des liaisons avec **des champignons mycorhiziens** qui vont permettre à la plante d'obtenir une **résistance envers des infestations** par des insectes par exemple, les champignons fournissant au sainfoin du phosphate et des nutriments venant du sol (Malisch et al., 2016).

4.3 Composition du sainfoin

Sa composition chimique lui confère une **bonne valeur alimentaire** : la teneur moyenne en matières grasses du sainfoin sélectionné par Multifolia est de 2,2% et les teneurs moyennes en azote sur le 1^{er} cycle végétatif ont été relevées à 2,27% MS, soit 14,2% de protéines (Theodoridou et al., 2011). La **teneur en azote soluble est plus faible** chez le sainfoin que chez d'autres Légumineuses comme la luzerne (Niderkorn et al., 2016), ce qui est principalement expliqué par la présence de TCs qui protègeraient la dégradation des protéines (22,1% d'azote soluble en moyenne sur 3 variétés au 1^{er} cycle chez le sainfoin vs. 43,6% pour la luzerne) (Theodoridou et al., 2011). Cette teneur en azote soluble plus faible est donc associée à **un plus haut taux de protéines digestibles dans l'intestin (PDIA)** (Waghorn, 2008).

C'est un fourrage **appétant** et apprécié par les ruminants (Hoste et al., 2005; Chung et al., 2013). Même si la raison de cette appétence est encore inconnue (Wang et al., 2015), la présence de **sucres** au sein de la plante est suspectée dans ces effets appétents. Il a de nombreux avantages sanitaires, dûs à sa **teneur en tanins condensés**, qui lui confère des effets antiparasitaires et antimétabolites.

Les tanins ont également des effets favorables sur l'environnement : la réduction de rejets de méthane et autres gaz à effets de serre (Chung et al., 2013), moindre rejets azotés dans l'urine au profit des fèces (azote mobilisable) (Aufrère et al., 2013).

Les tanins condensés du sainfoin sont un mélange de prodelphinidines et procyanidines, répartis en général de la façon suivante en terme de pourcentage entre les deux classes de polymères : **70% PDs et 30% PCs** (Barrau et al., 2005; Quijada, 2015). Les poids moléculaires des TCs contenus dans le sainfoin varient entre **1000 et 28000 Da** (Foo et al., 1982; Stringano et al., 2012). Le degré moyen de polymérisation est compris entre **6.5 et 9** (Quijada et al., 2015; Wang et al., 2015).

4.4 Effets zootechniques et anthelminthiques du sainfoin

Des essais menés sur des vaches laitières aux Pays-Bas ont montré que le remplacement de 50% d'ensilage d'herbe par de l'ensilage de sainfoin (proposé à volonté) **augmentait de 5% la consommation alimentaire, de 10% la production laitière et réduisait de 12% l'émission de méthane et de gaz à effets de serre** par kilo de lait produit (Huyen et al., 2016; Niderkorn et al., 2016). Des données ont également été obtenues sur la **prévention de la météorisation**.

D'autres essais menés sur la qualité du lait de vache ont montré une **augmentation de la teneur en acide linoléique** du lait et du fromage de vache nourries avec des granulés de sainfoin (Girard et al., 2015). Lors d'un essai similaire, la viande d'agneau obtenue après avoir alimenté ces animaux avec de l'ensilage de sainfoin, était **plus riche en acide linoléique et en oméga 3** (Girard et al., 2016).

La consommation de sainfoin par des petits ruminants a également été associée à des effets sur l'infestation par les **coccidies** (Saratsis et al., 2012) et surtout sur les infestations par les **nématodes gastro-intestinaux** (Hoste et al., 2015). Ces effets anthelminthiques seront présentés dans la partie 7.

Enfin, c'est également une plante **mellifère** : de mai à juillet, elle produit une grande quantité de nectar, rendant la plante attractive pour les abeilles (Pellett, 1947; Ogle et al., 2007).

4.5 Granulés déshydratés de sainfoin

L'exploitation du sainfoin pour ses propriétés nutritives et anthelminthiques peut se faire sous différentes formes :

- Pâturage : moyen le plus naturel d'exploiter les ressources riches en TCs pour les petits ruminants (Valderrábano et al., 2010) ;
- Foin : donne aux éleveurs une plus grande **facilité de stockage et d'utilisation** des fourrages bio-actifs avec peu d'impact sur la qualité et la teneur en TCs (Paolini et al., 2003; Heckendorn et al., 2006) ;
- Ensilage : les études recensées avec cette forme de distribution n'ont pas montré d'effets négatifs sur la teneur en TCs du sainfoin et les propriétés AHs associées (Heckendorn et al., 2006; Ojeda-Robertos et al., 2010; Theodoridou et al., 2010; Copani et al., 2014; Lüscher et al., 2014; Wang et al., 2015) ;
- Granulés : Ils offrent la possibilité de **cultiver le sainfoin dans les zones agricoles adéquates**, de **l'inclure directement dans les aliments composés des rations des ruminants** et de le **caractériser** aisément avant distribution, puis de le **transporter** et le **stocker** facilement (Girard et al., 2013; Desrues et al., 2016a). En revanche, les traitements technologiques nécessaires (haute température et haute pression) peuvent provoquer une **possible destruction des tanins et une conversion des tanins de la forme libre** (forme majoritaire) **vers la forme liée** (fixée aux protéines) (Terrill et al., 1992; 2007; Minnée et al., 2002; Lorenz et Udén, 2011), mais aucune étude à ce jour met en avant une possible réduction de l'activité anthelminthique liée à cette diminution ou conversion des tanins.

✓ Généralités

La déshydratation des fourrages est un **mode de conservation de la plante par voie sèche** (ou physique), au même titre que le fanage ou la ventilation sous abri. Ce mode de conservation s'oppose à la voie humide (ou microbienne) représentée par l'ensilage. Les procédés de conservation par voie sèche permettent de conserver des produits végétaux destinés à l'alimentation animale, récoltés à des stades aqueux (Commission des Communautés Européennes (CCE), 1980).

La déshydratation se déroule selon trois étapes principales (CCE, 1980) (Figure 8) :

- Récolte du fourrage vert (contenant **entre 75% et 85% d'humidité**) et transport jusqu'à l'unité de déshydratation
- Séchage dans la déshydrateuse, à l'aide d'un courant d'air de basse température (**50°C-300°C pendant 1 à 4 h**) ou de haute température (**600°C-1100°C pendant 10 à 30 min**)
- Conditionnement : **broyage** du fourrage sec, teneur en **humidité inférieure à 13%** (seuil assurant une bonne conservation), et compactage par une presse à filière. Le diamètre de cette filière va définir la taille du granulé.

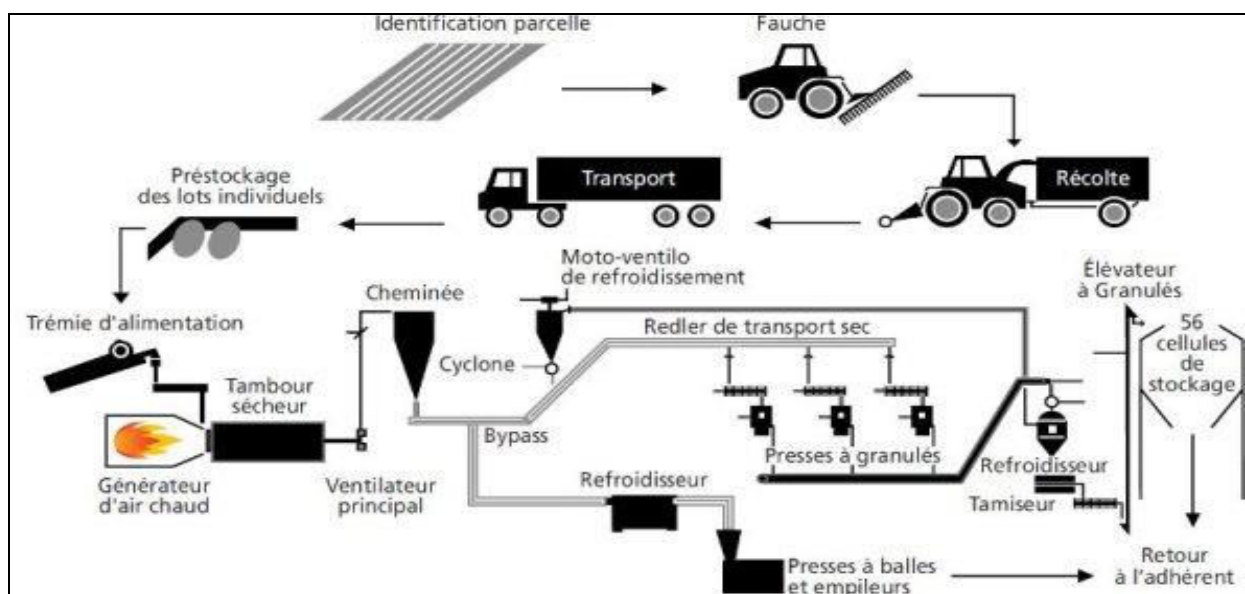


Figure 8 : Schéma de la déshydratation depuis le champ jusqu'aux granulés (Source : coopérative Coopédome)

✓ Avantages

Le principal avantage qu'offre la déshydratation en comparaison avec les procédés de conservation par voie humide ou sèche sans granulation est sa **conservation** et sa **facilité de transport**. En effet, les produits déshydratés sont faciles à manipuler et leur densité volumique élevée permet de stocker des tonnages importants dans de faibles surfaces. La densité volumique d'un foin de luzerne en vrac est de 80 kg/m^3 , pour 850 kg/m^3 pour des granulés (CCE, 1980). Enfin, elle permet facilement **l'analyse du produit avant distribution** aux animaux.

✓ Inconvénients

Il est généralement admis que les méthodes de préservation par déshydratation **peuvent altérer la composition biochimique** des fourrages, en causant l'**oxydation des TCs** et en réduisant ainsi leur activité biologique, en fonction de la température, le temps d'exposition et les rayons ultra-violets (Wolfe et al., 2008; Lorenz et Udén, 2011; Wang et al., 2015). Tous les processus incluant un chauffage sont suspectés d'**affecter la quantité de tanins** et d'entraîner une **conversion des TCs de la forme extractible vers la forme liée** (Terrill et al., 1992; Wolfe et al., 2008). Cette conversion pourrait être à l'origine d'une détérioration des propriétés anthelminthiques.

Lors du procédé de déshydratation, l'élévation de température que va subir la plante va directement déshydrater la cellule et l'eau présente dans la vacuole va s'évaporer, pouvant ainsi laisser échapper des tanins (Lees et al., 1994).

✓ Caractéristiques physiques et sensorielles des granulés

Les caractéristiques physiques et sensorielles d'un aliment vont jouer sur son acceptabilité par l'animal et influencer la quantité consommée (Favreau-Peigné, 2015). Cette régulation de l'ingestion par les sens de l'animal est définie comme la palatabilité, ou les caractéristiques de l'aliment qui provoquent un appétit chez l'animal, notamment la texture, le goût et l'odeur (Baumont, 1996). Dans les études réalisées avec des granulés de sainfoin, cet aliment a toujours été très appétent pour les animaux. La présence de sucres au sein de la plante est suspectée intervenir dans cette bonne appétence.

4.6 Présentation de la filière française de déshydratation Multifolia / Sainfolia

En France, le principal lieu actuel de culture du sainfoin se situe en Champagne crayeuse. En 2008, une structure appelée Multifolia s'est créée de par la volonté de deux agriculteurs voulant ré-introduire cette culture disparue des sols français. Multifolia, aujourd'hui rassemblée sous une coopérative nommée Sainfolia et conseillée par la firme service MG2MIX, gère toute la filière de production de sainfoin : depuis la sélection des semences jusqu'à la déshydratation sous forme de granulés de la récolte. En 2016, **55 producteurs** sont impliqués dans le projet et Sainfolia compte **500 ha de sainfoin** dans la Champagne crayeuse, en Bourgogne et dans le Périgord. En 2016, la production de granulés déshydratés de Sainfolia s'est élevée à **4200 tonnes de granulés**.

5. Les tanins

5.1 Généralités

Les tanins sont des molécules d'origine végétale qui ont la faculté de rendre la peau imputrescible (= la tanner) en **se fixant aux protéines** et en la transformant en cuir (Bruneton, 2009). Ces molécules hautement polymérisées sont **présentes dans tout le règne végétal**, principalement dans les vacuoles des plantes supérieures mais sont **absents chez les animaux** (Hagerman et Butler, 1991; Mueller-Harvey et McAllan, 1992; Bruneton, 2009).

Ce sont des molécules issues du métabolisme secondaire des végétaux supérieurs, d'où le nom de **métabolites secondaires**, qui sont **présents dans les vacuoles** des plantes. Leur **production est augmentée lors d'une agression subie par la plante**, comme par exemple l'attaque par des bactéries, des champignons ou des nématodes (Feucht et Treutter, 1999). Des agressions par des prédateurs (insectes, herbivores) conduisent également à une production de tanins de la part de la plante (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Feucht et al., 1997). Les tanins produits par la plante et consommés par les insectes induiraient des lésions dans leur tube digestif (Ayres et al., 1997). De plus, les tanins sont des substances astringentes et une présence excessive au sein d'une plante la rend peu appétente et donc éloigne les herbivores (Jean-Blain, 1998).

Leur définition biochimique est la suivante (Bate-Smith, 1973) : « **composés phénoliques hydrosolubles** de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Da, qui présentent des réactions classiques des phénols, la propriété de **précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines** ». Le développement de méthodes d'analyse a ensuite permis d'identifier plus précisément la structure des tanins : leur poids moléculaire peut s'étendre à **20 000 Da** et ils sont alors considérés comme des **polyphénols de masse** (Hagerman, 2002).

5.2 Les différentes familles

Les tanins font partie de la grande famille des **polyphénols**, au même titre que des molécules simples comme les acides phénoliques. De façon générale, ils comprennent un **noyau aromatique** et **un ou plusieurs groupements phénoliques**. On distingue les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

5.2.1 Tanins hydrolysables

Ce sont des **oligo- ou poly-esters de sucre** (souvent le glucose) et de molécules **d'acide phénolique** (Mueller-Harvey, 2006; Bruneton, 2009). Selon la nature de l'acide phénol, ils sont sub-divisés en tanins galliques (acide gallique) ou éllagiques (acide hexahydroxyphénique) (Hagerman, 2002) (Figure 9).

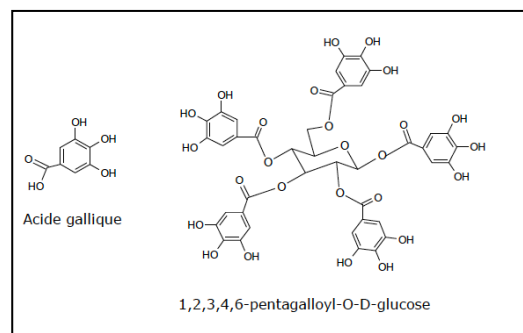


Figure 9 : Structure de base des tanins hydrolysables

Leur **poids moléculaire est généralement assez faible** mais ils peuvent se **coupler entre eux de façon oxydative** et ainsi augmenter considérablement leur taille (Mueller-Harvey, 2001).

Leur nom vient de leur **propriété à s'hydrolyser** (hydrolyse acide) **dans le tractus digestif des ruminants**. Leurs produits de dégradation peuvent être absorbés et sont alors souvent toxiques pour les herbivores (Plumlee et al., 1998; Mueller-Harvey, 2001).

5.2.2 Tanins condensés

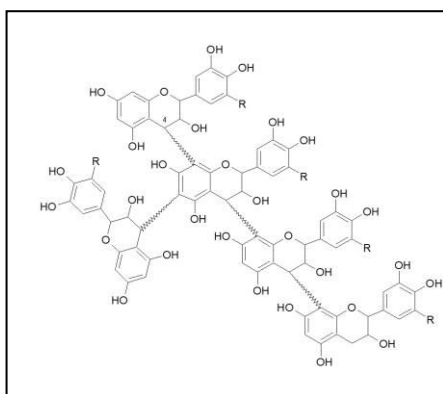


Figure 10 : Structure de base des tanins condensés

Ce sont des **polymères d'unités flavan-3-ols**, appartenant à la famille des **flavonoïdes** (Mueller-Harvey, 2006; Bruneton, 2009). La structure chimique est basée sur un système d'**hétérocycles** (Figure 10) qui sont liés **par des liaisons de type C-C** (type B) ou **C-O-C** (type A) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 2009)

Les flavonoïdes sont répartis en **six sous-groupes** (flavonols, flavones, isoflavones, flavonones, flavanols, anthocyanidines), auxquels il faut ajouter les néo-flavonoïdes, les aurones et les catéchines (Bruneton, 2009). Leur poids moléculaire est plus important que celui des tanins hydrolysables (**1 000 à 3 000 Da**) (Hagerman, 2012). Les familles de flavonoïdes présentes dans les plantes varient selon la famille de la plante et est **plus largement présente dans le règne végétal que les tanins hydrolysables** (Bruneton, 2009).

Les TCs sont plus précisément définis selon (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002; Mueller-Harvey, 2006) :

- Les monomères qui les constituent
- La position et la stœchiométrie (α ou β) de(s) la (les) liaison(s) interflavanique(s)
- Le degré de polymérisation (nombre de flavan-3-ols) : oligomères (2 à 10 monomères) ou polymères (>10 monomères)
- Le nombre de classes de flavan-3-ols dans la structure (homo ou hétéro-polymères)

✓ Structure bio-chimique des flavan-3-ols

Quatre classes de flavan-3-ols peuvent être distinguées, selon la **position du groupement hydrogène (H) ou du groupement phénol (OH) aux positions R1, R2 et R3** (Figure 11).

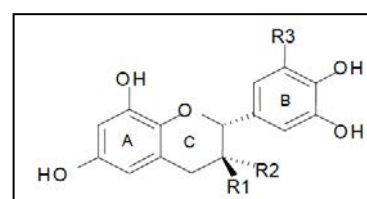


Figure 11 : Structure de base d'un flavan-3-ol

Tableau 3 : Classes d'homopolymères de flavan-3-ols et position et nombre du groupement H ou O-H

Flavan-3-ol	Classes d'homopolymères	R1	R2	R3	Nombre de fonctions OH
Catechol (C)	Procyanidols (PCs)	OH	H	H	5
Epicatechol (EC)	Procyanidols (PCs)	H	OH	H	5
Gallocatechol (GC)	Prodelphinidols (PDs)	OH	H	OH	6
Epigallocatechol (EGC)	Prodelphinidols (PDs)	H	OH	OH	6
Fisetinidinol	Profisetinidols	H	H	H	4
Robinetinidol	Prorobinetinidols	H	H	OH	5

Les monomères de procyanidols se différencient des prodelphinidols car ces derniers possèdent un groupement OH en position R3. C'est cette position spécifique qui leur donne leur très forte affinité pour les protéines (Aerts et al., 1999; Schofield et al., 2001).

✓ Structure bio-chimique des polymères

Deux classes de polymères se retrouvent de façon majoritaire chez les végétaux supérieurs : les **procyanidines** (PCs) et **prodelphinidines** (PDs) (Tableau 3) (Bruneton, 2009). Chez certaines plantes comme le sainfoin (Marais et al., 2000), il est possible de rencontrer des hétéro-oligomères, composés par exemple de catechol et d'epicatechol (procyanidines) ou de gallocatechol et d'epi gallocatechol (prodelphinidines) (Bruneton, 2009).

Le degré moyen de polymérisation des TCs est très variable. Il **varie selon le stade végétatif** de la plante : plus la plante est mature, plus le degré de polymérisation et le ratio PCs/PDs est élevé (Wang et al., 2015). Il **varie également selon la quantité de tanins présente dans la plante** : plus la plante en contient, plus les polymères auront des poids moléculaires faibles et donc plus le degré de polymérisation sera faible (Wang et al., 2015). Enfin, il **varie selon la plante elle-même** : les TCs du raisin comportent entre 2 et 7 monomères (Prieur et al., 1994) alors que ceux du sainfoin sont constitués de 6.5 à 9 monomères (Quijada et al., 2015; Wang et al., 2015). Cependant, certaines études ont recensé des TCs du sainfoin comprenant entre 13.1 et 73.7 monomères (Novobilský et al., 2011). Plus le degré de polymérisation est élevé, plus les polymères sont insolubles et donc leur analyse difficile, ainsi que leur activité biologique incertaine (Mueller-Harvey, 2006).

Les tanins sont des molécules présentes dans tout le règne végétal, qui ont la capacité de se fixer aux protéines. Ils font partie de 2 familles :

- Les tanins hydrolysables : peuvent être scindés dans le tube digestif des herbivores : Les métabolites libérés peuvent être absorbés, circulés dans le sang, et s'avérer parfois toxiques pour l'animal.
- Les tanins condensés : appartiennent à la famille des flavonoïdes et sont davantage recensés comme ayant des effets bénéfiques chez l'animal.

5.3 Propriétés des tanins

La famille des tanins présente des **groupes hydroxyles et phénoliques**. Cette structure biochimique leur confère de nombreuses propriétés telle que leur aptitude à complexer certaines macromolécules (notamment les protéines, des glucides, voire des ions métalliques) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992).

5.3.1 Propriétés physico-chimiques des tanins

Ce sont des molécules **solubles dans l'eau**. Cette solubilité **dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation** (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 2009). Les tanins sont également **solubles dans l'acétone et les alcools**, c'est pourquoi de nombreuses solutions d'extraction sont préparées à base d'acétone-eau ou de méthanol-eau (Makkar, 2000).

5.3.2 Propriétés biologiques des tanins

- Formation de complexes avec les protéines

Ils peuvent **se fixer à de nombreuses protéines et former des complexes** dans une gamme de pH comprise entre 3.5 et 7.0 (Zimmer et Cordesse, 1996; Mueller-Harvey, 2006). Ces complexes peuvent être rompus dans l'abomasum (pH<3,5) ou dans l'intestin grêle (pH>7,0) (Jones et Mangan, 1977). Les tanins permettent également de **créer des « ponts » avec les protéines**, sans formation de complexes, favorisant ainsi leur précipitation (Bruneton, 2009).

Le degré de complexation entre les tanins et les protéines dépend de leur structure et de leur configuration tridimensionnelle respectives (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Waterman, 1999; Poncet-Legrand et al., 2006). La complexation sera favorisée avec **des tanins d'un PM assez faible et des protéines de conformation « ouverte », d'un PM élevé (> 20 kDa)** et riches en acides aminés hydrophobes (exemples : proline et hydroxy-proline). La formation de ces complexes dépend également des conditions environnementales (pH, température, force ionique, présence de molécules compétitrices), et sera favorisée dans un **environnement proche de leur pH isoélectrique** (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Zimmer et Cordesse, 1996; Hagerman, 2002). De plus, l'affinité des tanins pour les protéines augmente lorsque le **degré de polymérisation est plus élevé** (Theodoridou et al., 2011) et lorsque la plante contient une **proportion de PDs plus importante** (Jones et al., 1976).

Deux types de complexes peuvent se créer, de surface (pH proche de 7) ou irréversible (liaisons covalentes formées autour des points isoélectriques des protéines, soit inférieur à 7) (Jones et Mangan, 1977).

- Inhibition d'enzymes

Les tanins peuvent inactiver des enzymes, par **fixation directe aux sites actifs de l'enzyme**, par **l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tanins sur les enzymes**, ou par **interférence avec le substrat potentiel de nature protéique** (Zimmer et Cordesse, 1996).

- Activité anti-oxydante

Cette activité est due aux fonctions phénoliques des tanins, présentant un **fort caractère nucléophile et piégeant les radicaux libres** (Feucht et al., 1997; Bruneton, 2009), qui sont des molécules chimiques instables et réactives, perturbant le processus de réplication de l'ADN et induisant des mutations cancérigènes. Les **activités antimutagènes et anticancérigènes** attribuées aux tanins sont donc à relier à leur activité antioxydante (Barbehenn et al., 2006).

- Effet antiseptique

Les tanins présentent des allégations d'**effets antimicrobiens** (Chung et al., 1998) et **antifongiques** (Bruneton, 2009) et sont ainsi reconnus comme **antiseptiques** dans la pharmacopée médicale (Bruneton, 2009).

- Effets anthelminthiques

Les tanins ont également des effets anthelminthiques de par leurs effets sur les nématodes gastro-intestinaux (Hoste et al., 2016). Ce sont ces effets qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse et seront détaillés dans la partie 7.

On retrouve deux principales classes de polymères au sein des tanins condensés : les prodelphinidines et les procyanidines.

Les tanins présentent différentes propriétés :

- **Physicochimiques** : solubilité dans l'eau, les alcools et l'acétone.
- **Biologiques** : formation de complexes avec les protéines, inhibition d'enzymes, activité antioxydante (en piégeant les radicaux libres), activité antiseptique (antifongique, antimicrobienne) et activité anthelminthique.

5.4 Plantes riches en tanins

5.4.1 Plantes contenant des tanins hydrolysables

Les THs peuvent être retrouvés chez des plantes **angiospermes dicotylédones** telles que les **Fagaceae** (châtaigner), **Anacardiaceae** et **Geraniaceae** (Bruneton, 2009). En revanche, les tanins hydrolysables (THs) ne sont pas présents chez les Gymnospermes et les Monocotylédones (Jean-Blain, 1998).

5.4.2 Plantes contenant des tanins condensés

Dans le règne végétal, les TCs sont plus largement répartis que les THs (Jean-Blain, 1998) puisqu'ils sont présents chez les **angiospermes** et chez les **gymnospermes** (Bruneton, 2009).

Les **Fabaceae** (Légumineuses), comprennent de nombreuses plantes riches en TCs, contenant des TCs entre 2 à 5 % de la MS : *Onobrychis viciifolia* (sainfoin), *Hedysarum coronarium* (sulla), *Lotus pedunculatus* et *corniculatus* (lotier pédonculé et corniculé). D'autres espèces en contiennent de faibles quantités (ex : *Medicago sativa* L., la luzerne) (Bruneton, 2009).

La présence de TCs dans de multiples Légumineuses tropicales comme par exemple *Acacia mearnsii* ou *Lysiloma latisiliquum*, a permis l'exploitation de ces plantes locales afin de réduire les infestations parasitaires de petits ruminants (Cenci et al., 2007; Brunet et al., 2008b).

Enfin, des co-produits de l'industrie de l'alimentation humaine issus notamment des espèces de la famille des **Bétulaceae** comme la noisette (*Corylus avellana*) contiennent des TCs (Del Rio et al., 2011; Desrues et al., 2012; Girard et al., 2013).



Figure 12 : Exemples de Légumineuses riches en TCs

5.5 Facteurs de variations de la teneur en tanins condensés

- L'espèce végétale ou la variété (facteurs intrinsèques)

Selon les **familles botaniques et variétés**, des variations de teneurs en tanins entre les plantes ont été observées (Mueller-Harvey, 2006; Stringano et al., 2012).

La famille des Légumineuses est par exemple une famille botanique très variable en termes de teneur et de nature des tanins présents **au sein de ses espèces**. Certaines plantes sont considérées sans tanins comme par exemple la luzerne alors qu'on pourra en retrouver plus de 100 fois plus dans le sainfoin (Marais et al., 2000).

De même, **au sein d'un même genre**, des différences entre deux espèces peuvent être remarquées : le lotier pédonculé contient entre 16 et 80 g de TCs/kg MS (Foo et al., 1997; Copani, 2015) alors que le lotier corniculé en contient entre 8 et 47 g/kg MS (Foo et al., 1996; Copani, 2015). **Au sein d'une même plante**, des variations de la teneur en TCs ont été observées selon les **variétés**, comme par exemple chez le sainfoin (Manolaraki, 2011; Malisch et al., 2015).

Selon la **partie de la plante**, les teneurs en TCs sont également variables : plus de PC ont par exemple été retrouvés dans la tige du sainfoin alors que les feuilles contenaient plus de PDs (Theodoridou et al., 2010; Malish et al., 2015).

Des **facteurs génétiques**, le **stade végétatif** et **l'âge** de la plante peuvent aussi influencer la teneur en TCs (Kotze et al., 2009; Theodoridou et al., 2011; Azuhwi et al., 2013ab; Grabber et al., 2014). Lors de la croissance de l'appareil végétatif, il a été observé une dilution des tanins, un changement de la quantité et de la qualité des tanins présents dans les feuilles (comme par exemple une augmentation du degré de polymérisation), ainsi qu'une augmentation du degré de polymérisation des tanins (Makkar et al., 1991). De la même façon, le pourcentage de prodelphinidols est passé de 60% à 95% au cours de la maturation dans le sainfoin (Koupai-Abyazani et al., 1993).

- L'environnement (facteurs extrinsèques)

L'environnement de culture de la plante, comme par exemple l'année de récolte, différant selon les conditions météorologiques, peut impacter la quantité de tanins (Medjekal, 2016).

Le **stress** est le facteur extrinsèque influençant le plus la teneur en tanins d'une plante, puisque la production des tanins est augmentée en réponse à un stress nutritif, environnemental (hydrique, appauvrissement du sol, ou ensoleillement trop fort) (Bennick, 2002) ou à une agression par des insectes (Feucht et al., 1997).

Enfin, les **processus technologiques** tels que la **récolte** (la coupe) ou les différents modes de conservation comme le **séchage** à l'air libre, la **déshydratation** ou l'**ensilage** peuvent également impacter la composition en polyphénols (Azuhwi et al., 2011). Les modes de conservation à haute température (ensilage ou déshydratation sous forme de granulés) peuvent conduire à une plus forte **conversion des tanins de la forme libre vers la forme liée aux protéines** (Terrill et al., 1992; 2007; Minnée et al., 2002; Lorenz et Udén, 2011).

Les tanins condensés sont des métabolites présents dans de nombreux végétaux supérieurs.

A la différence des tanins hydrolysables (seulement présents chez les angiospermes dicotylédones), les TCs sont également présents chez les gymnospermes. Au sein des angiospermes, ils sont notamment largement présents au sein des Légumineuses, y compris tropicales, et dans divers co-produits industriels.

Leur teneur varie selon l'espèce végétale (notamment les familles botaniques et les variétés), les organes de la plante, le stade végétatif, l'environnement de culture, les processus technologiques (récolte, fanage, ensilage ou déshydratation) et selon les stress que va subir la plante.

6. Méthodes de dosage des tanins

Les tanins sont des molécules formant des **structures complexes**, et leur dosage précis est souvent délicat. Des **méthodes spécifiques** permettent de doser les TCs. Des revues des années 2000 listent ces méthodes (Mueller-Harvey, 2001; Huemmer et Schreier, 2008; Salminen et Karonen, 2011). Des méthodes plus récentes ont été développées pour but améliorer l'analyse des tanins (Grabber et al., 2013; Engström et al., 2014; Zeller et al., 2015). Parallèlement, des méthodes simples de dosage des tanins totaux existent depuis longtemps fondées sur leurs **propriétés physico-chimiques ou biologiques**. Dans le cas du sainfoin, comme chez toutes les légumineuses tempérées, tous les tanins présents sont des TCs (Brunet, 2008). Dans ce cas, les méthodes de dosage des tanins totaux correspondent au dosage des TCs.

6.1 Dosage des tanins condensés par des méthodes spécifiques

Les TCs peuvent être **libres** dans la plante ou **fixés aux protéines**, rendant leur analyse plus délicate. Une fois les liaisons rompues et les TCs extraits, différentes méthodes colorimétriques peuvent les doser:

- La méthode à la **vanilline** (spécifique des flavanols, Hagerman, 2002) dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs formant des complexes colorés (Makkar, 2000; Schofield et al., 2001).
- La méthode du **butanol-HCl** (Porter et al., 1986), spécifique des TCs, est basée sur la réaction de dépolymérisation des TCs en milieu acide, libérant des anthocyanidines, correspondant aux monomères clivés (Schofield et al., 2001; Grabber et al., 2013). C'est la méthode de dosage des TCs la plus utilisée (Makkar, 2000; Schofield et al., 2001; Hagerman, 2002).
- La **thiolyse** (méthode basée sur le clivage des liaisons interflavaniques en présence d'un nucléophile, Mueller-Harvey, 2006) **couplée à une HPLC**, permet de quantifier les TCs, de déterminer le degré de polymérisation moyen des TCs, la nature des monomères terminaux et même la proportion de flavan-3-ols, de PDs et de PCs (Engström et al., 2014; Zeller et al., 2015). Elle est donc plus précise que la méthode butanol-HCl par exemple.

- L'analyse en **spectrométrie de masse ou par RMN** (Résonance Magnétique Nucléaire) permet d'analyser des extraits ou fractions de TCs (Schofield et al., 2001; Zeller et al., 2015).

6.2 Dosage des tanins par des méthodes simples

6.2.1 Méthode biochimique de Folin-Ciocalteu

Elle utilise le **réactif de Folin-Ciocalteu**, spécifique des phénols. Elle se décompose en **deux étapes de dosages colorimétriques successifs** : elle dose **premièrement les phénols totaux** puis, **après ajout de PolyVinyl PolyPyrrolidone (PVPP)** qui se lie aux tanins présents dans l'extrait, elle permet d'obtenir la proportion de phénols non-tanniques d'un extrait acétonique (Folin et Denis, 1915; Makkar, 2000; Mueller-Harvey, 2006; Rover et Brown, 2013). La teneur en tanins totaux peut être déterminée par différence entre les phénols totaux et les phénols non-tanniques.

6.2.2 Méthodes biologiques

Elles se basent sur les propriétés biologiques des TCs :

- Méthodes basées sur **l'inhibition d'enzymes** (trypsine par exemple) (Schofield et al., 2001).
- Une méthode basée sur **la propriété des tanins à réduire la production de gaz lors de fermentations anaérobies** (Makkar et al., 1995; Makkar, 2000; Mueller-Harvey, 2006).

6.2.3 Méthode de précipitation des protéines

La méthode de **Diffusion Radiale** est basée sur la propriété des tanins à se fixer aux protéines. L'extrait de la plante à tester est placé au sein d'un puits dans un gel d'agarose et son **pouvoir de complexation avec les protéines** est mis en évidence par la formation de cercles de précipitation dans ce gel (Hagerman, 1987; 2002; Mueller-Harvey, 2006).

6.2.4 Dosage des tanins totaux par la spectroscopie en milieu infra-rouge proche

✓ Généralités

La technique de spectroscopie en proche infra-rouge (SPIR), située entre les longueurs d'ondes 10^{-6} et 2.5×10^{-6} du spectre électromagnétique (Figure 13), est aujourd'hui très utilisée dans les entreprises fabriquant des aliments, afin d'analyser à faible coût et de façon rapide et automatisée des produits solides ou liquides.

	Rayons gamma	Rayons X	UV	Visible	Infrarouge (IR)	Radars, Micro-ondes	FM	TV	SW	AM
<i>Longueur d'onde (en mètres)</i>	10^{-14}	10^{-12}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6} 10^{-4}	10^{-2}	1	10^2	10^4	

Figure 13 : Régions du spectre électromagnétique et longueurs d'onde correspondantes

La méthode SPIR repose sur le **principe de mesure de la réflexion (ou de l'absorbance) de la lumière par des objets** (les échantillons de plantes). Les spectres récoltés vont permettre d'établir une équation de calibration, par la mise en relation des spectres avec des données chimiques d'une méthode de laboratoire de référence (Siesler et al., 2002; Dykes et al., 2014).

✓ Appareil

L'appareil peut être un système multicanal, un filtre factoriel, un photomètre à filtre, un spectromètre à réseau, à filtre acousto-optique réglable, à barrette de diodes, à diodes électroluminescentes ou encore un **spectromètre à transformée de Fourier**, incluant un interféromètre de Michelson : le rayon lumineux en direction de l'échantillon peut prendre deux trajets optiques différents, une interférence peut donc se créer.

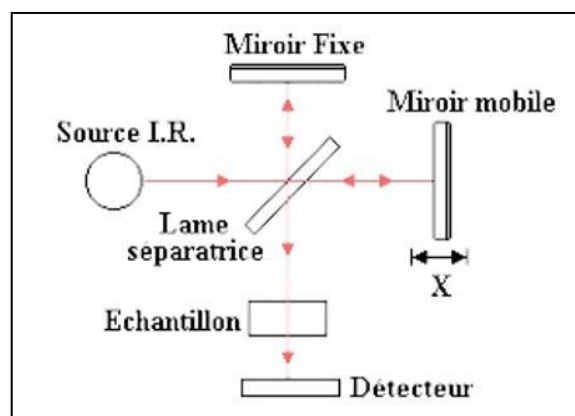


Figure 14 : Fonctionnement du spectromètre à transformée de Fourier
(Source : Université Claude Bernard, Lyon)

Le rayon lumineux émis par la source va frapper un miroir ou lame séparatrice transmettant 50% de l'intensité lumineuse et réfléchissant 50% de l'intensité restante (Figure 14) (Derouault, 1994).

L'appareil infrarouge proche va permettre d'acquérir des **données spectrales d'absorption des molécules présentes dans les produits analysés**. La radiation qui sera émise et entrera en contact avec l'échantillon pourra être **absorbée, réfléchie ou transmise** (Fatela, 2012). L'intensité de ces radiations incidentes (I_0) sera égale à la somme des intensités des radiations transmises (I_T), absorbées (I_A) et réfléchies (I_R) : $I_0 = I_T + I_A + I_R$.

✓ Spectre d'absorption

Lorsqu'un échantillon est soumis à la lumière infrarouge, il va **absorber** dans ce rayonnement, à des longueurs d'onde comprises entre 780 et 1400 nm. L'absorption de chaque échantillon permet la caractérisation de l'échantillon : l'absorption est **typique de ses liaisons chimiques et physicochimiques** (voir figure 15 les groupements chimiques présents pour le spectre du sainfoin). En revanche, à la différence des spectres récoltés en région infra-rouge moyen, il est difficile d'interpréter des spectres acquis dans l'infrarouge proche : les pics d'absorptions énergétiques se chevauchent et rendent ainsi l'assignation difficile (Giordanengo et al., 2009).

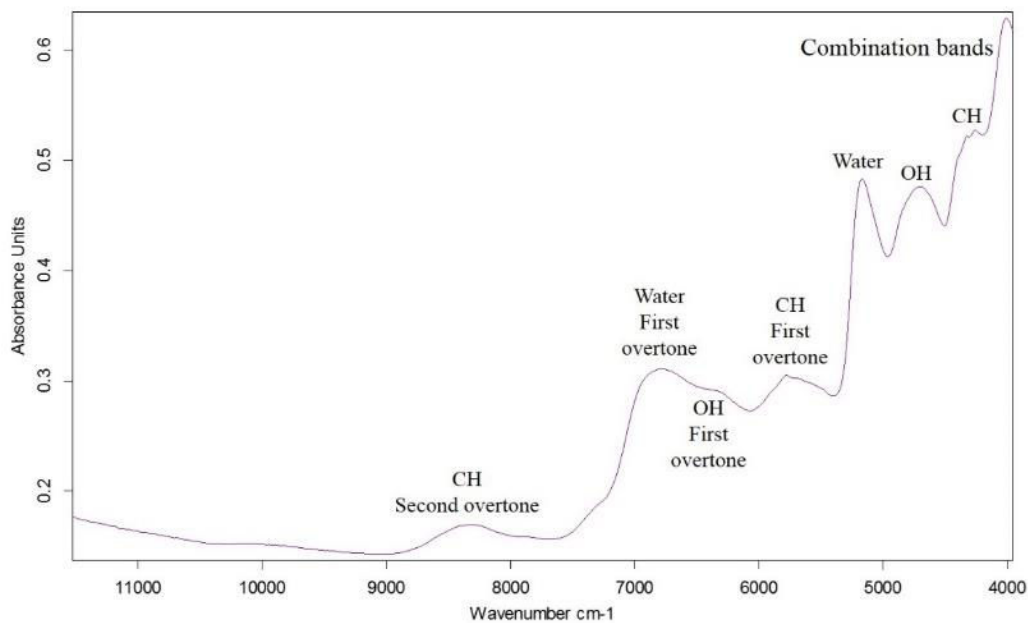


Figure 15 : Spectre d'un échantillon de sainfoin en région infra-rouge récolté par un spectrophotomètre, et ses absorptions caractéristiques (overtone = oscillation harmonique)

✓ La chimiométrie

C'est la science permettant **d'extraire de l'information caractérisant les spectres** (Fontanges et Chauchard, 2009). Elle comprend des méthodes statistiques qui permettent de transposer des informations obtenues, via la chimie, sur des échantillons. Un nombre conséquent de données spectrales est nécessaire afin de prédire de façon la plus précise possible la valeur des échantillons ultérieurs.

Deux méthodes sont utilisées (Bertrand et Dufour, 2000; Adu-Amankwa et al., 2011) :

- La **régression linéaire**, reliant une variable quantitative Y (que l'on cherche à prédire) à des variables x (correspondant à l'absorbance, à une longueur d'onde donnée).

- La **méthode Partial Least Squares** (= méthode des moindres carrés) comprend 3 étapes :
 - Les données spectrales vont permettre de générer des composantes principales qui seront combinées pour reconstruire les spectres d'étalonnage.
 - L'analyse des moindres carrés va comparer les valeurs prédites avec les valeurs de références, engendrant, après régression, le vecteur de régression.
 - Pour tout spectre d'un nouvel échantillon récolté, le vecteur de régression précédemment obtenu sera multiplié aux nouvelles données spectrales, permettant de prédire l'échantillon.

✓ Utilisation de la spectroscopie proche infra-rouge en agriculture

Les premiers essais ont été répertoriés avec des **analyses de fourrages** (Norris et al., 1976).

De nombreux constituants ont ainsi été prédits par la SPIR :

- **L'humidité** est la plus dominante, due à ses absorptions caractéristiques (1870-1945 nm et 1430-1450 nm) (Roberts et al., 2004).
- Les **protéines**, avec des prédictions précises ($R^2 > 0.95$), dues aux fortes absorptions N-H dans la région infrarouge proche (Mc Graw et Marten, 1986; Roberts et al., 2004).
- Les **glucides, fibres, cendres** (Gossen et al., 1994; Givens et Deaville, 1999).

La **digestibilité** et l'**énergie métabolisable** ont également déjà été prédites via la SPIR (Redshaw et al., 1986; Windham et al., 1991).

En revanche, dans les fourrages (à l'inverse des grains), les **lipides sont peu souvent prédits**, dû à de faibles teneurs et à une variabilité faible, ce qui rend difficile le développement des équations. De même pour les minéraux, les résultats sont souvent de moins bonne précision, en raison de la non absorption des minéraux dans la région infra-rouge (Van Kempen, 2001).

Des études ont déjà conduit au développement de calibrations permettant de **prédire la teneur en tanins condensés** de différentes plantes comme le **lotier** (Roberts et al., 1993), le **sorgho** (Dykes et al., 2014), **Lathyrus spp.** (Goodchild et al., 1998), **sericea lespedeza** (Windham et al., 1988; Petersen et al., 1991; Wheeler et al., 1996), **Pinus caribaea** (Adu-Amankwa et al., 2011), ou **diverses plantes méditerranéennes** (Mancilla-Leytón et al., 2014).

Certaines études ont également permis d'évaluer les capacités **antioxydantes** de maïs ou de miels de différentes origines botaniques (Redaelli et al., 2016; Tahir et al., 2016).

Il existe une grande diversité de méthodes, plus ou moins sophistiquées permettant l'analyse des polyphénols et plus précisément des tanins condensés.

Certaines méthodes sont spécifiques des TCs comme la méthode au Butanol-HCl mais longues à mettre en œuvre.

La méthode biochimique de dosage de tanins totaux Folin-Ciocalteu est non spécifique des TCs.

La méthode de précipitation avec les protéines par diffusion radiale se base sur les propriétés des tanins à se fixer aux protéines. Elle indique le niveau de complexation des TCs avec les protéines mais ne quantifie qu'indirectement les TCs présents.

Enfin, la technique de spectroscopie en milieu infra-rouge proche permet d'établir des équations de calibration qui pourront prédire les valeurs de nouveaux échantillons de façon rapide.

7. Effets des tanins condensés chez les animaux parasités et sur les nématodes gastro-intestinaux

7.1 Généralités

A l'inverse des THs, peu d'études recensent une toxicité aiguë suite à l'ingestion par l'animal de TCs (Butter et al., 1999). Ce sont essentiellement des effets négatifs sur **l'appétit** et **l'ingestion**, sur la **physiologie digestive** (diminution de la digestibilité de l'aliment) et sur la **production** qui ont été observés avec une **consommation excessive de ressources très riches en TCs** (> 10% de la MS de la ration) (Aerts et al., 1999; Min et al., 2003; Mc Sweeney et al., 2008).

A des doses plus modérées, de nombreuses études ont mis en évidence plusieurs **effets bénéfiques des tanins condensés**. Un apport faible à modéré (< 10% de la matière sèche) a été associé à des effets favorables sur **l'ingestion des aliments** (Waghorn et al., 1987; Terrill et al., 1992), à une **moindre protéolyse ruminale** (Aerts et al., 1999; Min et al., 2003) et à une **réduction de la production de méthane et d'ammoniaque** (Animut et al., 2008; Niderkorn et al., 2016) associée à un **meilleur taux de protéines digestibles dans l'intestin** (Waghorn, 2008). En terme de productions, des études ont relevé une **meilleure croissance**, et une **meilleure qualité de viande** et de **lait** (plus fort taux d'oméga 3 et d'acide linoléique), ou de **laine** (augmentation de la quantité et de la qualité de la toison) (Rochfort et al., 2008; Girard et al., 2015; 2016).

La suite de cette partie sera focalisée sur les effets anthelminthiques des tanins condensés chez les petits ruminants. Bien que les **mécanismes précis ne soient pas encore clairement identifiés**, les effets des TCs sur les nématodes GIs des petits ruminants sont largement **étudiés depuis une vingtaine d'années** (Niezen et al., 1996; Hoste et al., 2016).

Les principales plantes d'intérêt dans ces études ont été les **Légumineuses fourragères** comme sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*), le sulla (*Hedysarum coronarium*) ou le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Leurs **propriétés AHs ont été de nombreuses fois démontrées** (Hoste et al., 2012; 2015; 2016). Récemment, des plantes tropicales et des co-produits de l'industrie de l'alimentation humaine, comme par la noisette (*Corylus avellana*), à teneurs intéressantes en TCs, ont été utilisés dans des études réalisées sur des caprins et ovins (Cenci et al., 2007; Desrues et al., 2012; Girard et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Costa-Júnior et al., 2014). **Le rôle précis des tanins** dans les effets observés a été déterminé à l'aide **d'inhibiteurs de tanins** comme le polyéthylène glycol ou le PolyVinyl PolyPyrrolidone (PVPP) (Brunet et al., 2008b).

Les études réalisées avec les plantes contenant des tanins condensés ont montré des effets sur les trois principaux stades du cycle de vie des nématodes (Hoste et al., 2016) :

- Larves infestantes L3s : une **moindre installation des L3s** chez l'hôte a été observée chez les animaux consommant des plantes riches en TCs (Mupeyo et al., 2011).
- Vers adultes : une diminution d'œufs par gramme de fèces a été observée chez les animaux consommant des plantes contenant des TCs, reliée à une **diminution du nombre de vers** et/ou une **moindre fertilité des vers femelles** (Costa-Júnior et al., 2014; Kommuru et al., 2015).
- Œufs : un **moindre développement des œufs en larves** a été observé chez les animaux consommant des plantes contenant des TCs (Shaik et al., 2006).

7.2 Effets *in vitro* des tanins condensés sur la biologie des nématodes

Afin de vérifier l'effet anthelminthique de plantes riches en tanins condensés, des **tests *in vitro* destinés à différents stades parasitaires** sont disponibles (Tableau 4 et Figure 16). Ils émanent de tests développés pour mesurer l'efficacité des AHs chimiques (Wood et al., 1995).

Tableau 4 : Tests *in vitro* utilisés afin d'évaluer l'activité anthelminthique de ressources riches en tanins condensés : stades et action ciblés sur les vers (Source : Jackson et Hoste, 2010; Hoste et al., 2016)

Tests	Stades ciblés	Action sur les vers	Références
EHA : Egg Hatch Assay	Œufs	Eclosion	Hernández-Villegas et al., 2011 Vargas-Magaña et al., 2014
LDIA : Larval Development Inhibition Assay	Œufs → L3s	Développement des œufs en L3	Molan, 2014 Anthanasiadou et al., 2001
LFIA : Larval Feeding Inhibition Assay	Larves L1	Alimentation des L1s	Desrués et al., 2016b Novobilský et al., 2011; 2013
LMIA : Larval Migration Inhibition Assay	Larves L3	Mobilité des L3s	Calderón-Quintal et al., 2010 Alonso-Díaz et al., 2008ab; 2011
LEIA : Larval Exsheatment Inhibition Assay	Larves L3	Dégainement des L3s	Quijada, 2015; Quijada et al., 2015 Klongsiriwet et al., 2015
AMIA : Adult Mobility Inhibition Assay	Adultes	Mobilité et viabilité des vers adultes	Hoste et al., 2009 Paolini et al., 2004
IVDC : <i>In Vitro</i> Direct Challenge	Larves L3	Pénétration des L3 dans la muqueuse abomasal	Brunet et al., 2008a Jackson et al., 2004

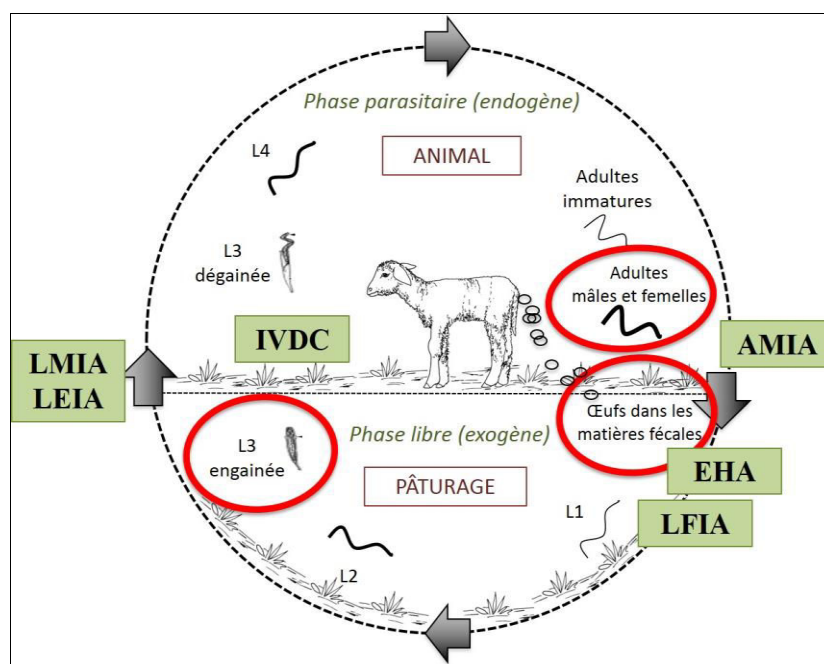


Figure 16 : Stades des nématodes ciblés par les tests *in vitro* et relation avec le cycle biologique (AMIA = Adult Mobility Inhibition Assay ; EHA = Egg Hatch Assay ; LFIA = Larval Feeding Inhibition Assay ; IVDC = *In Vitro* Direct Challenge ; LMIA = Larval Migration Inhibition Assay ; LEIA = Larval Exsheathment Inhibition Assay)

Les concentrations de TCs utilisées pour ces tests *in vitro* ont été calculées par référence à des concentrations observées *in vivo* (Terrill et al., 1994; Molan et al., 2002).

En revanche, les résultats *in vitro* ne prennent pas en compte l'influence de l'immunité des animaux et de leur statut physiologique et une **vérification *in vivo* est donc nécessaire**.

Plusieurs tests *in vitro* permettent d'explorer l'effet perturbant des tanins sur différents stades des vers. Seuls certains essais (LFIA, LEIA, EHA) permettent le calcul de la dose d'inhibition à 50% (EC50).

7.3 Effets *in vivo* des tanins condensés sur la biologie des nématodes

Les études *in vivo* réalisées afin de vérifier l'effet des TCs sur le parasitisme GI des petits ruminants peuvent se dérouler en **conditions expérimentales contrôlées** ou lors d'**infestations naturelles** (Hoste et al., 2016). Elles sont basées sur **différentes espèces parasites** et les ressources sont proposées sous **différentes formes**. Le tableau 5 recense quelques études réalisées avec diverses plantes riches en TCs qui ont montré des effets positifs sur les infestations parasites d'ovins et de caprins et la figure 17 recense les stades de nématodes ciblés par ces tests *in vivo* et la variabilité des résultats obtenus selon les études.

Tableau 5 : Exemples d'études *in vivo* réalisées avec des plantes riches en TCs (G = Granulé ; F = Fourrage ; P = Péricarpe ; Fe = Feuille ; E = conditions expérimentales contrôlées ; N = infestations naturelles, O = Ovins, C = Caprins, *H. c* = *H. contortus* ; *T. c* = *T. colubriformis* ; *Te. c* = *T. circumcincta* ; *C. o* = *C. ovina*) (Source : Hoste et al., 2016)

Ressource et famille botanique	Forme	Condi-tions	Hôte	Parasite	Durée d'administration des plantes	Principaux résultats	Référence
Pistache (<i>Pistacia lentiscus</i>) <i>Anacardiaceae</i>	Fe	E	C	<i>T. c</i> <i>Te. c</i> <i>C. o</i>	24 j	OPG réduits	Landau et al., 2010
Noisette (<i>Corylus avellana</i>) <i>Betulaceae</i>	P	E	C	<i>H. c</i> <i>T. c</i>	14 j	Réduction des OPG, de l'installation des L3 et de fertilité des ♀ <i>H.c</i>	Desrues et al., 2012
Lotier pédonculé (<i>Lotus pedunculatus</i>) <i>Fabacea</i>	F	E	O	<i>T. c</i> <i>Te. c</i>	42 j	OPG réduits, moins de vers femelles <i>Te.c</i>	Niezen et al., 1998
Sericea lespedeza (<i>Lespedeza cuneata</i>) <i>Fabacea</i>	F	E	C	<i>H. c</i> <i>T. c</i> <i>Te. c</i>	7 sem	OPG réduits, moins de L3s et de vers adultes <i>H. c</i>	Shaik et al., 2006
	G	E	C	<i>H. c</i>	28 j	OPG réduits, cuticules des vers endommagées	Kommuru et al., 2015
	G	N	C	<i>H. c</i> <i>T. c</i> <i>Te. c</i>	6 sem	OPG réduits, moins de vers adultes et de L3s	Terrill et al., 2009
Sainfoin (<i>Onobrychis viciifolia</i>) <i>Fabacea</i>	F	E	O	<i>H. c</i> <i>T. c</i>	6 sem	OPG réduits, moins de vers <i>H.c</i> , moindre fertilité des ♀ <i>H.c</i>	Arroyo-Lopez et al., 2014

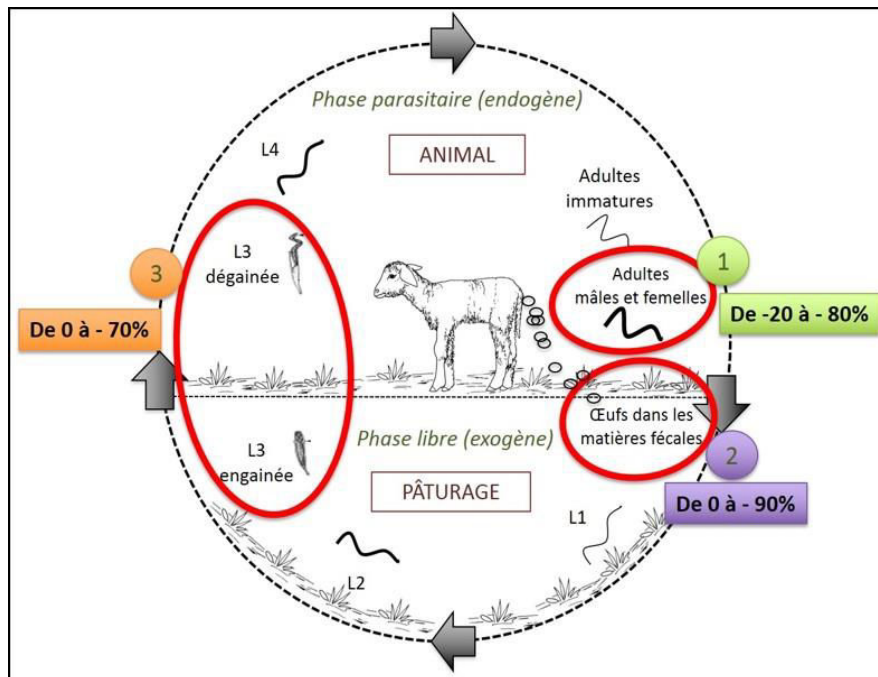


Figure 17 : Résumé des principaux effets constatés sur les divers stades des nématodes *in vivo* et variabilité des résultats observés

7.4 Mode d'action des tanins sur les nématodes gastro-intestinaux

7.4.1 Effet direct

L'hypothèse d'une action directe due aux **propriétés intrinsèques des TCs** (Min et al., 2003; Hoste et al., 2006) a été émise en raison des résultats des essais fonctionnels *in vitro*, pour lesquels aucun facteur lié à l'animal n'interfère. Cette hypothèse a été confortée par la mise en évidence en conditions *in vitro*, et *in vivo* via l'utilisation de méthodes de **microscopie électronique à transmission ou à balayage**, des **lésions affectant divers tissus des nématodes (cuticule, tube digestif)** après contact avec des plantes riches en TCs (Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2013; 2015; Williams et al., 2014; Hoste et al., 2016). La capacité **des TCs à former des complexes avec les protéines et glycoprotéines** de la gaine des larves infestantes, de la cuticule ou de l'épithélium digestif des vers adultes expliquerait en partie ces effets directs (Molan et al., 2002; Min et al., 2003; Hoste et al., 2006) en perturbant le dégainement, la mobilité des vers ou leur nutrition (Brunet, 2008).

Des études *in vivo* ont confirmé cet effet par observation des muqueuses intestinales (Athanasiadou et al., 2001; Brunet et al., 2008b).

7.4.2 Effet indirect

Les TCs pourraient également agir de manière indirecte sur la biologie des nématodes, en **améliorant la réponse immunitaire de l'hôte**, notamment grâce à leur **rôle protecteur contre les dégradations ruminales des protéines**, qui favorisent un flux de PDIA, l'absorption intestinale d'acides aminés et donc entraîne une amélioration de la nutrition protéique et de la réponse locale de l'hôte dans les muqueuses (Coop et Kyriazakis, 1999; Hoste et al., 2012; Tedeschi et al., 2014).

7.5 Effets des tanins condensés sur la résilience des animaux

De nombreuses études citées précédemment ont également étudié l'effet des TCs sur la **résilience** des petits ruminants. Pour résumer, de manière générale, les résultats suivants ont été observés (Hoste et al., 2016) :

- Meilleurs paramètres de production : meilleure croissance des agneaux (Niezen et al., 1996) ou plus forte production de lait (Hoste et al., 2005) ;
- Diminution des signes d'anémie (si infestation par des parasites hématophages) (Paolini et al., 2005) ;
- Moins de mortalité (Min et al., 2005).

Ces effets sur la résilience sont à mettre en parallèle au moins en partie avec la **qualité nutritive** des Légumineuses fourragères, pouvant améliorer les performances (Githiori et al., 2006). En effet, **la teneur en protéines** et les **effets de protection des TCs vis-à-vis des dégradations ruminales** (augmentation du taux de PDIA) peuvent avoir participé aux effets observés (Waghorn, 2008). Les mécanismes expliquant cette meilleure résilience demeurent mal connus.

7.6 Variabilité des effets

7.6.1 En fonction du parasite

La plupart des essais *in vitro* mettant en œuvre plusieurs espèces de parasites ont conclu à des **résultats différents selon l'espèce parasite**. Pour une même concentration d'un extrait de sainfoin par exemple, une inhibition de la migration des L3s d'*H. contortus* et de *T. colubriformis* a été observée mais pas de *T. circumcincta* (Paolini et al., 2004). Cette variabilité pourrait s'expliquer par des **différences intrinsèques de sensibilité des nématodes GI aux TCs** (Quijada et al., 2015).

In vivo, des conclusions similaires ont été exposées (Shaik et al., 2006). De nombreux essais ont relevé des divergences sur les résultats selon les espèces intestinales ou abomasales (Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2003; 2005). Cette variabilité des résultats s'explique par des **différences de disponibilité des TCs libres selon l'organe digestif** où ils sont localisés, jouant un rôle sur l'exposition des vers aux TCs (Quijada, 2015; Desrues et al., 2016b). La disponibilité des TCs sous forme libre est dépendante du pH : l'acidité de l'abomasum favoriserait la libération des TCs fixés aux protéines salivaires ou alimentaires pour les libérer comme tanins libres et qu'ils aillent ensuite potentiellement se fixer sur les nématodes gastro-intestinaux (Hoste et al., 2016).

Dans la majorité des études, *H. contortus* ou plus généralement les espèces abomasales, se sont montrées plus sensibles aux tanins que *T. colubriformis* et d'autres espèces intestinales (Molan et al., 2004; Paolini et al., 2004; Quijada et al., 2015), même si des réponses spécifiques différentes ont été observées en fonction de la qualité des tanins condensés (Quijada, 2015).

Des résultats différents selon le **stade parasitaire** du ver en question ont également été observés avec un même aliment riche en TCs.

In vitro, les **L3s semblent plus sensibles aux TCs que les vers adultes**. Un extrait de sainfoin a par exemple inhibé la migration larvaire mais pas la mobilité des vers adultes de *T. colubriformis* (Paolini et al., 2004).

In vivo, le quebracho (tanins condensés issus de l'écorce de l'arbre du même nom, *Schinopsis quebracho-colorado*) a induit une diminution de l'installation des L3s de *T. colubriformis* et *T. circumcincta* alors qu'il n'a eu aucune incidence sur les vers adultes (Paolini et al., 2003). Des résultats similaires ont été observés pour un régime à base de sulla sur *T. circumcincta* (Tzamaloukas et al., 2005).

Ces différences de sensibilité peuvent s'expliquer par des **spécificités biologiques propres à chaque stade parasitaire**, influençant le mode d'action des TCs sur ces stades.

7.6.2 En fonction de la ressource riche en tanins condensés et de son mode d'utilisation

In vitro, de nombreuses études suggèrent que les effets observés dépendent de la **concentration en tanins et polyphénols** (Molan et al., 2000; Paolini et al., 2004; Hoste et al., 2015) et à la **nature des TCs présents dans la ressource** comprenant leur structure, dépendant principalement des liaisons inter-flavaniques, et leur composition biochimique ou la nature des monomères (Molan et al., 2002).

Ces facteurs varient selon (cf. 5.5) 1/ la plante elle-même ou sa variété ; 2/ les organes de la plante ; 3/ le stade de croissance ; 4/ l'environnement et 5/ les process technologiques (Hoste et al., 2016).

In vivo, les études disponibles montrent que la dose réelle de TCs à apporter dans la ration va dépendre de la **quantité et de la qualité des tanins présents dans la matière première**, de la quantité d'aliment ingérée par l'animal, de la **méthode d'analyse** permettant la quantification des TCs (la valeur obtenue étant différente selon la méthode et la standard utilisés) et de la **présence d'autres métabolites secondaires** comme des flavonoïdes (Lyman et al., 2008; Vargas-Magaña et al., 2014; Klongsiriwet et al., 2015).

La **durée minimale** durant laquelle introduire (proposer dans la ration) les plantes riches en TCs a été estimée à **7 jours** chez les chèvres (Min et al., 2005; Luginbuhl et al., 2013) et **entre 14 et 35 jours** chez des agneaux (Burke et al., 2012ab). Les effets semblent disparaître 14 jours après suppression des TCs dans la ration (Burke et al., 2012b). Cette nécessité d'une durée minimale de **plusieurs jours** s'explique par le besoin d **atteindre des concentrations en TCs suffisantes dans les divers organes du système digestif des animaux parasités, et ainsi d'exposer les parasites à ces composés bioactifs** (Hoste et al., 2016).

Deux modes de distribution ont été envisagés : en **continu** (Gujja et al., 2013) ou en **cures sur de courtes périodes à intervalles réguliers** (Paolini et al., 2005), la cure ayant montré des effets plus importants sur la réduction de l'infestation.

Les périodes les plus propices à la distribution pourraient être **calquées sur les modes de distribution stratégiques** (ou préventifs) **des AHs de synthèse : quelques semaines après la sortie au pâturage des animaux** afin de réduire les infestations et la contamination des parcelles (Leathwick et Besier, 2014).

7.6.3 Utilisation combinée avec d'autres ressources riches en tanins condensés

De récentes études ont analysé l'**utilisation combinée de plusieurs ressources riches en TCs** afin d'**augmenter la quantité de TCs** proposée aux animaux ou de **combiner l'action de différents types de TCs** pour optimiser les effets AHs (Hoste et al., 2016).

La plupart de ces études ont montré un **effet synergique** entre l'association de sainfoin et de noisette (Girard et al., 2013), de feuilles de figuier (*Ficus infectoria*) et de goyavier (*Psidium guajava*) (Pathak et al., 2013), de sainfoin et de féveroles (*Vicia faba*) (Werne et al., 2013) et de sericea lespedeza et d'écorce de pin (*Pinus taeda*) (Wright, 2015).

7.6.4 Utilisation combinée avec un anthelminthique de synthèse

Peu d'études recensent les interactions entre des ressources riches en TCs et des AHs de synthèse. De récentes études ont mis en avant **un effet synergétique entre la consommation de genévrier (*Juniperus pinchotti*) et l'efficacité de l'ivermectine** (Armstrong et al., 2013; Whitney et al., 2013).

In vivo, les plantes riches en tanins condensés peuvent être proposées au pâturage, sous forme de fourrage frais ou séché, sous forme d'ensilage ou de granulés.

Les résultats ont montré un effet des tanins condensés sur :

- les œufs : moindre développement des œufs en larves
- les larves L3 : diminution du nombre
- les vers adultes : diminution de la quantité d'œufs excrétés (due à une diminution du nombre de vers et/ou de la fertilité des vers femelles).

Une amélioration de la résilience des animaux a été observée dans la majorité des cas.

Une variabilité de réponse a été observée en fonction de l'hôte (ovin ou caprin), du parasite (espèce et stade), de la ressource riche en tanins utilisée (quantité et qualité des tanins et quantité et durée de distribution des TCs dans la ration), ou de son utilisation avec d'autres ressources riches en TCS ou avec un anthelminthique de synthèse.

8. Consommation des plantes riches en tanins par les animaux

Les chapitres précédents ont illustré l'importance des tanins dans le monde végétal, et leurs effets chez les herbivores et les parasites, mais également l'ingestion des nutriments par les animaux. Ce chapitre vise à comprendre si les animaux peuvent augmenter leur ingestion de tanins afin d'en tirer profit pour améliorer leur bien-être ou leur santé.

8.1 Définition de l'automédication

L'observation de comportements d'automédication chez les animaux remonte à plusieurs siècles. Par exemple, la consommation d'herbe par les chiens afin de se faire vomir lorsqu'ils font face à une douleur digestive a été observée dès le IV^{ème} siècle avant notre ère par Aristote (Morel, 2015). Chez les herbivores, ces observations remontent au VIII^{ème} siècle, où des bergers éthiopiens ont constaté que la consommation de baies sauvages, lors de périodes où leurs chèvres étaient épuisées, les stimulaient. Ces constatations auraient été à l'origine de la découverte du café (Huffman, 2003).

Les observations de l'utilisation de plantes par les animaux ont poussé les chercheurs en éthologie à s'intéresser à ce domaine et à développer une démarche expérimentale pour analyser les variations de comportement des différentes espèces, au delà des anecdotes et des observations empiriques (Clayton et Wolfe, 1993; Krief et Hoste, 2014). La notion d'automédication est apparue suite à la découverte par les scientifiques que des animaux consommaient certaines plantes, pas seulement en raison de leurs propriétés nutritionnelles ou de leur appétence, mais parfois pour leurs bienfaits sanitaires ou de confort. On peut préciser ici que ces situations où une plante possède à la fois une valeur nutritionnelle et une valeur médicinale complique la mise en évidence d'un comportement d'automédication (cf. section 8.4).

La première définition de l'automédication a été donnée par le chercheur américain Eloy Rodriguez et le primatologue anglais Richard Wrangham en 1993 (Rodriguez et Wrangham, 1993). Ils ont appelé ce phénomène la zoopharmacognosie, ou l'utilisation de plantes, par les animaux, ayant des propriétés médicinales, pour traiter ou prévenir des maladies (Rodriguez et Wrangham, 1993).

D'un point de vue évolutif, la préservation de la santé est un principe de base de la survie (Huffman, 2003). Parfois, les adaptations physiologiques et les réponses immunitaires, souvent coûteuses pour l'animal (de Roode et al., 2013), ne sont pas suffisantes et une modification du comportement doit être mise en place (Huffman, 2003; Choisy et de Roode, 2014).

Les comportements d'automédication ont été les plus largement explorés chez les primates (Wrangham et Nishida, 1983; Carrai et al., 2003). Mais faisant suite aux recherches dans ce domaine, ils ont été observés chez d'autres mammifères (Villalba et al. 2010), des oiseaux (Clark et Russel Masson, 1985) et même des insectes (Lefèvre et al., 2010; Milan et al., 2012).

Aujourd'hui la notion d'automédication est principalement associée à l'utilisation de plantes aux propriétés antiparasitaires (Lozano, 1998; Choisy et de Roode, 2014) mais l'utilisation de plantes aux propriétés antibiotiques est également référencée (Christe, 2014).

Le concept d'automédication a d'abord été illustré par des observations directes réalisées sur les animaux dans leur milieu naturel. Dans ce cadre, pour qu'un comportement relève de l'automédication animale, un certain nombre de critères ont été identifiés (Clayton et Wolfe, 1993; Singer et al., 2009; de Roode et al., 2013) :

- Le comportement doit être associé à un état sanitaire amoindri, une maladie ou un mal-être ;
- Il doit impliquer l'utilisation ou la consommation d'une plante ou d'une substance dotée de propriétés médicinales avérées ;
- Il doit être observable dans l'environnement naturel de l'individu ;
- Il doit contribuer à améliorer la fitness de l'individu malade ;

Ces conditions semblent principalement adaptées pour définir une automédication curative (cf. partie 8.2.2), mais elles sont considérées comme similaires dans le cas d'une automédication préventive (cf. partie 8.2.1), à la différence que pour cette dernière, c'est le risque d'infestation plutôt que l'infestation elle-même qui induit la réponse comportementale (de Roode et al., 2013).

L'automédication peut également être évaluée par des mesures réalisées en conditions expérimentales (exemple : tests de libre choix de consommation ou évaluation de la motivation à consommer un aliment). Elle est souvent plus difficile à mettre en évidence que dans le milieu d'origine de l'animal, celui-ci n'interagissant pas avec son milieu naturel (Messner et Wrangham, 1996).

8.3 Types d'automédication

8.1.1 Automédication prophylactique ou préventive

Dans le cas d'un comportement d'automédication prophylactique (ou préventive) l'animal va consommer ou utiliser une plante, un aliment ou une substance pour prévenir un mal-être. Dans cette situation, les individus ne présentent pas de signes de maladie. Ils utilisent l'aliment ou la substance afin d'éviter un possible mal-être futur (Hart, 2005), notamment lors d'un fort risque de maladie (y compris de parasites), mais non en réponse directe à la présence de pathogènes (Lozano, 1998; Castella et al., 2008; de Roode et al., 2013).

Les études mettant en avant la consommation de plantes dans un but prophylactique sont assez rares, ce qui peut s'expliquer par la difficulté d'établir un lien entre un comportement donné et la réduction de l'occurrence d'une maladie dans le futur, celle-ci n'étant pas présente chez l'animal au moment où il va utiliser la plante (Phillips-Conroy, 1986; Hart, 2005). Une autre difficulté est le fait de pouvoir affirmer que l'animal est sain au moment où il exprime le comportement.

Néanmoins, certains comportements semblent relever d'une automédication prophylactique. Ainsi, des études menées chez des oiseaux ont montré que des étourneaux incorporent certaines plantes fraîches riches en métabolites aux propriétés pharmacologiques dans leurs anciens nids afin de réduire la prévalence des pathogènes dans le nid (Clark et Russel Masson, 1985; Fauth et al., 1991; Gwinner et al., 2000). La plante la plus retrouvée dans ces études est *Solidago rugosa* qui contient des sesquiterpènes 2-bornyl acétate et du farnésol, qui ont la propriété de diminuer la fertilité des ectoparasites (Clark et Russel Masson, 1985).

Chez les mammifères, il a été observé chez les femelles sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*), une espèce de lémuriens de Madagascar, une consommation spécifique de plantes riches en tanins pendant la période du péri partum (Carrai et al., 2003). Cette consommation régulière sur de courts repas, de plantes que les autres membres du groupe ne consomment pas, relèverait selon les auteurs d'un comportement d'automédication prophylactique. Cela permettrait aux femelles, pendant cette période à risque (forts besoins physiologiques et baisse d'immunité liés à la fin de la gestation et à la lactation), de prévenir les carences en protéines grâce à l'action de complexation des tanins aux protéines, et ainsi d'assurer leur reproduction.

8.1.2 Automédication thérapeutique ou curative

Dans le cas d'un comportement d'automédication thérapeutique (ou curative), l'animal va utiliser ou consommer une plante, un aliment ou une substance suite à un malaise (Choisy et de Roode, 2014). L'automédication thérapeutique est plus facile à repérer que l'automédication prophylactique et certains scientifiques ne définissent l'automédication que sur la base des processus curatifs (Singer et al., 2009).

De nombreuses études recensent des cas d'automédication thérapeutique, chez différentes espèces animales et en utilisant comme modèle soit des molécules de synthèse soit des ressources contenant des composés bioactifs naturels. Pour ne citer que quelques exemples, l'automédication curative a été observée chez différentes espèces :

Chez les oiseaux, une étude a montré que des poulets atteints de boiteries ont consommé 1,5 fois plus d'un anti-inflammatoire de synthèse proposé à volonté (le carprofen, un anti-inflammatoire non stéroïdien aux propriétés analgésiques qui améliore la mobilité), que les poulets sains (Danburry et al., 2000).

Chez les mammifères, les animaux qui ont été les plus étudiés et qui ont montré des capacités d'automédication sont les grands singes. Des chimpanzés, des bonobos et des gorilles ont été vus avalant des feuilles entières rugueuses du genre *Aspilia*, sans les mâcher (Wrangham, 1977; Wrangham et Nishida, 1983; Huffman, 1997). Elles étaient ensuite retrouvées entières dans les fèces suggérant qu'elles n'étaient pas consommées pour leur valeur nutritionnelle. Les animaux consommaient ces plantes lorsqu'ils étaient infestés par des nématodes (dans 83% des cas) (Huffman, 1997). L'analyse des fèces qui contenaient à la fois des vers et des feuilles d'*Aspilia* a montré que les vers étaient soit accrochés à la surface de la feuille, soit emprisonnés dans la feuille repliée. De même, le "bitter pith chewing", a été proposé comme un cas d'automédication thérapeutique : des chimpanzés souffrant du paludisme ont consommé des tiges amères de *Vernonia amygdalina* (Huffman et Seifu, 1989; Huffman, 1997). Ces tiges contiennent 1) des aglycones qui sont efficaces pour lutter contre le paludisme, ou des amibiases, et 2) elles contiennent également des lactones sesquiterpéniques qui auraient des propriétés anthelminthiques, anti-amibiennes, antitumorales et antibiotiques (Jisaka et al., 1992; Ohigashi et al., 1994).

Ces deux exemples illustrent donc l'hypothèse que l'ingestion non-nutritionnelle de certaines plantes aide les grands singes à contrôler leurs infestations parasitaires et leur procure un soulagement vis-à-vis des troubles gastrointestinaux associés (Huffman, 1997).

L'automédication **préventive** (ou prophylactique) est l'utilisation d'une plante, d'un aliment ou d'une substance par un animal, pour prévenir un mal-être. D'un point de vue évolutif, ce type de comportement devrait être favorisé lorsque le risque d'apparition de la maladie est fort et prévisible (Choisy et de Roode, 2014).

L'automédication **curative** (ou thérapeutique) est l'utilisation d'une plante, d'un aliment ou d'une substance par l'animal suite à une gêne, par exemple pour atténuer un mal-être. D'un point de vue évolutif, le développement de ce type de comportement devrait être favorisé dans des situations où la mise en place d'un comportement prophylactique serait trop coûteuse, c'est-à-dire quand le risque d'apparition de la maladie est faible et imprévisible (Choisy et de Roode, 2014). Elle est plus facile à repérer dans les études que l'automédication prophylactique. Plusieurs études relatent des cas d'automédication thérapeutique chez les mammifères, des oiseaux ou des insectes.

8.2 Les mécanismes sous-jacents à l'automédication

Avant toute chose, la condition nécessaire pour qu'il y ait le développement d'un comportement d'automédication est la présence de caractéristiques particulières et de composés bioactifs dans la plante ou la substance, qui servent de marqueur à l'effet médicinal (Hart, 2005). Il peut s'agir de caractéristiques physiques comme l'aspect d'une plante (ex : rugosité) ou de caractéristiques chimiques comme la présence de composés bioactifs (ex : tanins, goût astringent ou amer). L'automédication, qui se met en place suite au repérage de ces marqueurs par l'animal, proviendra alors d'un processus de sélection naturelle (ou d'adaptation du phénotype = origine évolutive) ou d'un processus d'apprentissage (Hart, 2005; Singer et al., 2009).

L'automédication d'origine évolutive se mettrait en place via un processus de sélection naturelle qui favoriserait les individus ayant une prédisposition à utiliser une plante ou une substance aux propriétés médicinales, en augmentant ainsi leur reproduction et leur survie (Hart, 2005).

Cette prédisposition à utiliser une plante donnée procurerait un avantage évolutif aux individus qui la possèdent, que ce soit de façon préventive (on parle alors de "genetically fixed self-medication") ou curative ("phenotypic plasticity" ou "adaptive plasticity" - Hart, 2005; Singer et al., 2009; Choisy et de Roode, 2014). Le comportement conduisant à utiliser ou à consommer une plante ou une substance serait alors basé sur une modification de la sensibilité des animaux aux marqueurs responsables de l'effet médicinal, lorsque le risque sanitaire est plus important (automédication prophylactique) ou lorsque l'animal est malade (automédication thérapeutique).

Ceci a par exemple été mis en évidence chez les chenilles de certains papillons de nuit (*Grammia geneura* et *Estigmene acrea*) qui changent leur sensibilité gustative aux alcaloïdes pyrrolizidines, normalement peu appétents, lorsqu'elles sont parasitées afin d'accéder à une défense chimique via ces composés toxiques (Bernays et Singer, 2005).

L'automédication acquise est basée sur un processus associatif (apprentissage avec renforcement) permettant à l'animal de faire un lien entre l'ingestion d'un aliment et une amélioration de son état, de mémoriser cette relation et de l'utiliser ultérieurement (Hart, 2005; Provenza, 1995). L'hypothèse est que les animaux sont capables de sélectionner un aliment pour ses vertus médicinales, de la même façon qu'ils le font pour palier à un déséquilibre alimentaire ou pour éviter des substances toxiques (Richter, 1943; Kyriazakis et Oldham, 1993; Wang et Provenza, 1996; Ginane et al., 2005, Villalba et Provenza, 2007). Cette hypothèse de processus d'apprentissage paraît donc essentiellement réaliste pour une automédication thérapeutique. Lozano (1998) considère que la modification du régime alimentaire habituel pour intégrer des substances médicinales dans le cas d'une automédication thérapeutique, requiert de l'intentionnalité et donc nécessairement un comportement appris. Inversement, certains auteurs privilégient l'origine évolutive de façon plus ou moins marquée. Choisy et de Roode (2014) par exemple traitent dans leur article la mise en place d'une automédication curative vs. préventive, mais sans jamais parler d'apprentissage. Singer et al. (2009) considèrent que l'apprentissage n'est pas forcément nécessaire dans la mise en place d'un comportement d'automédication. Hart (2005), considère que l'automédication thérapeutique ne peut pas se faire via un processus d'apprentissage, notamment en raison du délai souvent long entre l'ingestion de la substance médicinale et les effets ressentis, du nombre d'aliments différents consommés et de la difficulté d'associer l'amélioration de l'état au bon aliment.

Enfin, il existerait deux types d'apprentissage : l'apprentissage individuel où chaque individu apprend à partir de ses propres essais et erreurs, et l'apprentissage social où, par exemple, l'animal imitera sa mère ; évitera un aliment rendant malade ses congénères ou cherchera à consommer un aliment exploité par ses congénères, y compris pour des vertus sanitaires.

Ces deux phénomènes ne sont pas exclusifs, l'apprentissage individuel pouvant être complété par l'apprentissage social (Hart, 2005; Choisy et de Roode, 2014).

Pour qu'il y ait développement d'un comportement d'automédication, la plante doit contenir des caractéristiques physiques ou chimiques servant de marqueur à l'effet médicinal (Hart, 2005).

Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer le développement de comportements d'automédication : la sélection naturelle (modification de la sensibilité aux marqueurs) et/ou par un processus d'apprentissage.

8.3 Modifications quantitatives du comportement : cas de plantes médicinales qui ont aussi une valeur nutritionnelle

Il a été établi que le comportement des animaux va déterminer quelles sont les plantes consommées, en quelle quantité et quels en sont les composés actifs (González-Pech et al., 2014).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'automédication est définie comme l'utilisation par les animaux de plantes ou de substances ayant des propriétés médicinales, pour traiter ou prévenir des maladies (Rodriguez et Wrangham, 1993). Les cas les plus démonstratifs de cette aptitude sont ceux qui relatent l'utilisation ou la consommation d'un aliment habituellement évité, comme l'ingestion de *Vernonia* ou d'*Aspilia* chez les chimpanzés (Huffman, 1997), ou de plantes riches en alcaloïdes chez les chenilles parasitées (Bernays et Singer, 2005). On peut alors parler de modifications qualitatives du comportement, un nouvel aliment étant introduit dans le régime de l'individu. En revanche, les modifications quantitatives du comportement, e.g. l'augmentation de l'ingestion d'un aliment déjà présent dans le régime de l'animal, sont plus difficiles à mettre en évidence et à rapprocher d'un comportement d'automédication. En effet, on peut facilement argumenter que cette modification est due à la variabilité aléatoire du régime alimentaire (Singer et al., 2009). De plus, la difficulté de mesure des composés ingérés rend cette modification quantitative délicate à déceler.

Egalement, une des difficultés dans la mise en avant de comportements d'automédication avec des plantes nutritionnelles réside dans le fait que les composés actifs présents dans les plantes sont associés à des nutriments. Il est alors parfois complexe de différencier l'attribution des effets obtenus aux composés actifs ou aux nutriments de l'aliment. En revanche, apporter aux animaux des plantes combinant propriétés médicinales et valeurs nutritives (nutricaments) peut favoriser la consommation de composés secondaires par l'animal, qui pourrait être sinon peu enclins à les consommer.

Cependant, un certain nombre de cas d'automédication recensent de telles modifications quantitatives du comportement (Huffman, 2003; de Roode et al., 2013). Les quantités consommées de la plante en question, et plus précisément celle de ses composés actifs (Villalba et Provenza, 2007) doivent donc être prises en compte afin d'étudier leur rôle dans les effets observés. En effet, c'est souvent la dose qui fait l'effet (Plotkin, 2000; Huffman, 2003) et la dose seule fait le poison (Paracelse, XVII^{ème} siècle). Les métabolites secondaires, produits davantage par la plante suite à un stress subi comme l'arrivée d'un prédateur, de conditions météorologiques difficiles ou de traitements mécaniques (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Feucht et al., 1997), peuvent avoir des effets toxiques chez l'animal (Plotkin, 2000; Villalba et Provenza, 2007). Cet équilibre entre effets bénéfiques (médicinaux) et négatifs (toxiques) a mené au développement de la théorie des compromis (ou trade-off), selon laquelle les herbivores font face à des compromis entre l'ingestion de métabolites secondaires et la présence de pathogènes. Les animaux font l'expérience des bénéfices et risques de l'ingestion d'un aliment et le consomment en plus ou moins grande quantité (Hutchings et al., 2006).

La consommation d'un aliment habituellement évité et/ou l'augmentation de l'ingestion d'un aliment riche en métabolites secondaires déjà présent dans le régime alimentaire de l'animal sont des signes suggérant des comportements d'automédication.

Il semble que les herbivores peuvent également faire des compromis entre les effets bénéfiques (curatifs) et négatifs (toxiques) de la plante.

8.4 L'automédication en élevage

8.4.1 Intérêts de l'automédication en élevage

✓ Amélioration du bien-être animal

Le bien-être animal en élevage prend une part de plus en plus importante dans les préoccupations des citoyens et dans les programmes de recherche. La santé est liée au bien-être et donner la possibilité aux animaux d'exprimer des comportements d'automédication pourrait permettre à chaque individu de "gérer" son état de santé, en ajustant son comportement y compris potentiellement lors d'états sub-cliniques asymptomatiques.

La condition nécessaire serait alors de leur donner accès à une diversité de ressources alimentaires et non-alimentaires aux propriétés variées (Engel, 2006). Cette diversité participerait également à enrichir l'environnement au-delà des effets médicinaux potentiels.

✓ Intégration d'une agriculture et médecine vétérinaire durables

Avec une demande de produits animaux de plus en plus importante, l'agriculture a dû se tourner vers l'utilisation de produits de synthèse pour y répondre (Durmic et Blache, 2012). Aujourd'hui, l'utilisation parfois démesurée de ces produits a conduit à des situations sanitaires irréversibles et les consommateurs souhaitent maintenant une agriculture limitant les traitements chimiques, que ce soit au niveau de l'animal ou des prairies. Si les herbivores domestiques sont capables de sélectionner des aliments aux propriétés anthelminthiques lorsqu'ils sont parasités, cela permettrait de réduire les traitements chimiques, afin notamment de maintenir des populations refuges sensibles et limiter le développement de résistances (Jackson et Miller, 2006). Cela permettrait aussi de mieux cibler les individus à qui administrer un traitement anthelminthique (Villalba et Provenza, 2007). Un changement de comportement général et plus particulièrement alimentaire, pourrait en effet être utilisé comme indicateur d'un animal en souffrance.

8.4.2 Capacités d'automédication des ruminants

Les études sur les capacités d'automédication des ruminants, et notamment la consommation volontaire de plantes contenant des métabolites secondaires chez des moutons ou chèvres parasités ont commencé dans les années 2000s. Certaines équipes travaillant sur le sujet ont émis l'hypothèse que les petits ruminants peuvent éviter les effets toxiques des tanins condensés et peuvent augmenter leur consommation d'aliments riches en tanins lorsqu'ils sont parasités par des nématodes gastro-intestinaux (Villalba et al., 2006). Les processus cités précédemment sur les moyens d'acquisition des comportements d'automédication (modifications évolutives) seraient également valables pour les herbivores d'élevage, à condition que ces capacités innées n'aient pas été réduites par des décennies de sélection pour des objectifs de production.

- Diminution des effets toxiques des tanins condensés

Les premiers travaux se sont intéressés aux composés secondaires des plantes mais pas en raison de leurs propriétés anthelminthiques. A forte dose ces composés, comme les tanins condensés, induisent des effets négatifs et sont évités par les animaux. Dans une étude de Provenza et al. en 2000, l'hypothèse testée était que les agneaux étaient capables de sélectionner du polyéthylène glycol (PEG, qui se fixe aux tanins et en réduit les effets négatifs) lorsqu'ils reçoivent un aliment riche en tanins.

Les résultats montrent que les animaux augmentent leur consommation de PEG, de façon dose-dépendante en fonction de la quantité de tanins dans la ration (Figure 18). Ils ont donc bien perçu les effets bénéfiques du PEG et ont été capables d'ajuster la quantité à ingérer, relativement à la sévérité de leur malaise.

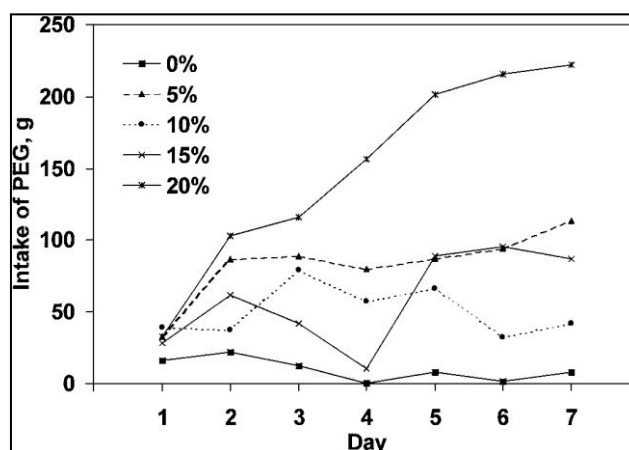


Figure 18: Ingestion de PEG chez des agneaux recevant *ad libitum* (de 9h à 17h) un aliment contenant 0, 5, 10, 15, ou 20% de tanins. D'après Provenza et al. 2000.

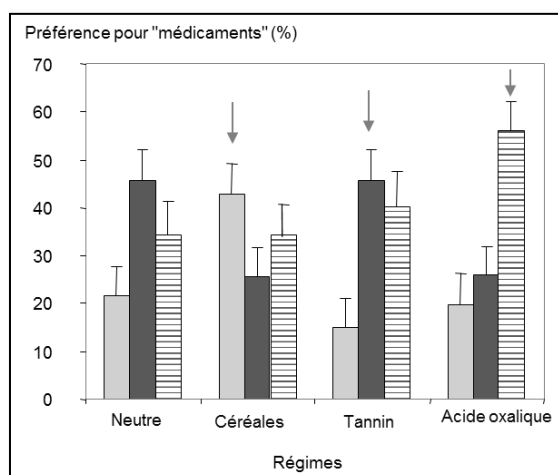


Figure 19: Préférence d'agneaux pour trois substances (gris clair: bentonite sodique ; gris foncé: PEG ; rayé: phosphate dicalcique) permettant de diminuer le malaise induit respectivement par l'ingestion d'un aliment riche en céréales, en tanins ou en acide oxalique. D'après Villalba et al. 2006.

En 2006, Villalba et al. ont testé la capacité d'agneaux à sélectionner trois substances (bentonite sodique, PEG, phosphate dicalcique) leur permettant chacun d'améliorer différents états de malaise induits par l'ingestion d'aliments spécifiques riches en céréales, en tanins ou en acide oxalique. Après une période de conditionnement pendant laquelle les animaux ont pu associer les effets bénéfiques de chaque substance pour chaque malaise spécifique associé, ils ont provoqué les trois malaises et ont proposé aux agneaux le choix entre les 3 substances. Les résultats présentés sur la figure 19 montrent que, même s'il y a toujours une consommation des 3 substances, la préférence est cohérente avec le malaise induit.

▪ Utilisation des tanins condensés comme antiparasitaire

Si l'on considère les études qui se sont intéressées à la consommation volontaire de tanins chez des animaux parasités par les nématodes gastro-intestinaux, plusieurs d'entre elles ont mis en évidence une plus grande consommation de tanins par les animaux parasités, corrélée à une diminution des OPG (Lisonbee et al., 2009; Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010; Amit et al., 2013; Villalba et al., 2010). Certaines ont également montré que cette plus grande consommation était bien due à l'infestation, puisqu'elle n'était plus observée après un traitement anthelminthique (Juhnke et al., 2012).

En dehors du cadre expérimental, des bergers pastoraux Ougandais ont relevé des comportements qu'ils observaient chez leurs animaux (chèvres, bovins, ovins et ânes majoritairement) (Gradé et al., 2009). Les conditions pour considérer un comportement d'automédication étaient que l'animal devait sembler malade, qu'il exprimait un comportement inhabituel, que les symptômes étaient améliorés après ce comportement, et que ce comportement cessait une fois l'animal en meilleure santé.

Environ 70% des 124 observations satisfaisaient ces critères, 30% concernaient des problèmes parasites (internes et externes) et la majorité des comportements d'automédication étaient basés sur l'utilisation de plantes par les animaux. La plante la plus mentionnée était *Albizia anthelmintica*, une plante aux propriétés anthelminthiques.

Selon les études, les modifications d'ingestion et de préférences étaient plus ou moins marquées. Ainsi, Villalba et al. (2010) ont observé une tendance à ce que des agneaux parasités expriment une préférence plus marquée que leurs congénères non parasités pour de la luzerne enrichie avec 10% de tanins de quebracho.

En revanche, dans une étude utilisant une Légumineuse naturellement riche en tanins (*Lysiloma latisiliquum*, 5.5% de TCs), il a été noté une ingestion de cette plante significativement plus importante chez les agneaux parasités que chez les non-parasités (Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010; Figure 20).

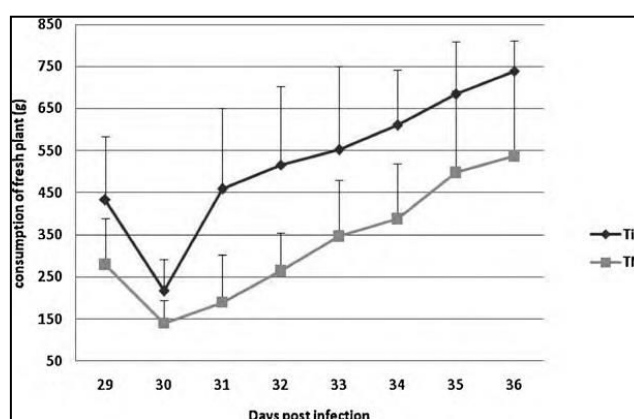


Figure 20: Ingestion journalière de *Lysiloma latisiliquum* chez des agneaux infestés avec *Haemonchus contortus* (TI) ou non infestés (TNI). D'après Martínez-Ortiz-de-Montellano et al. 2010.

Ces exemples illustrent le potentiel qu'ont les ruminants d'élevage pour s'automédiquer. Ils montrent également qu'un comportement d'automédication peut être basé sur un processus d'apprentissage, même s'il semble qu'une période de "conditionnement", c'est-à-dire une période pendant laquelle on aide l'animal à associer l'aliment riche en tanins et les effets anthelminthiques soit facilitante (Villalba et al., 2010; Juhnke et al., 2012).

Les études s'intéressant aux capacités d'automédication des ruminants concernent essentiellement l'automédication curative, sans doute car elle est plus facile à mettre en évidence. L'automédication préventive est cependant suggérée par certains auteurs. Ainsi Amit et al. (2013), qui ont étudié les réponses à l'infestation par les NGIs de deux races de chèvres (Mamber et Damascus), ont proposé une relation entre la propension initiale à consommer des aliments riches en composés secondaires et la sélection volontaire de ces aliments en cas de parasitisme.

Lorsqu'ils offraient le choix entre du foin et *Pistacia lentiscus* (aux propriétés anthelminthiques), les chèvres Mamber parasitées avaient une préférence pour *P. lentiscus* plus importante que les chèvres de la même race non parasitées. En revanche, ce comportement ne se retrouvait pas chez les chèvres Damascus. Les auteurs ont proposé que les chèvres Damascus, qui consomment facilement *P. lentiscus*, l'utilisaient de façon prophylactique tandis que les chèvres Mamber, réticentes à consommer cette plante initialement, peuvent la sélectionner de façon thérapeutique. Ce résultat suggère des trade-offs subtils entre les rôles d'aliment – toxine – remède pour ces plantes bioactives.

Objectifs

Les études évaluant les effets de plantes contenant des métabolites secondaires tels que les tanins condensés sur le parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants deviennent de plus en plus nombreuses, comme indiqué dans l'introduction de cette thèse. En effet, le développement de résistances envers toutes les classes d'anthelminthiques de synthèse chez les nématodes parasites des petits ruminants impose de s'orienter vers de nouvelles méthodes de lutte. Certains élevages font même face à des situations de multi-résistances, rendant ainsi la gestion du parasitisme quasi impossible via des traitements chimiques (Van Wyk et al., 1997; Chandrawathani et al., 2004; Cezar et al., 2010). De plus, les préoccupations des consommateurs concernant les impacts négatifs des traitements à l'aide de molécules de synthèse sur la qualité des produits d'origine animale (résidus possibles dans les produits carnés ou lactés) ou sur l'environnement, augmentent les demandes sociétales pour réduire le recours aux molécules de synthèse dans la gestion du parasitisme par les NGIs chez les animaux d'élevage.

Les nutricaments, aliments donnés aux animaux combinant une bonne valeur nutritionnelle et des effets bénéfiques sur leur santé, tendent à répondre à ces problématiques.

La majorité des résultats obtenus avec des Légumineuses contenant des tanins (un modèle de nutricament à propriétés AHs) vont dans la même direction, à savoir des effets négatifs sur différents stades du cycle des nématodes parasites, associés à des effets positifs sur la capacité des hôtes à vivre avec les nématodes (la résilience), voire à lutter contre ces populations de vers.

Néanmoins, une variabilité des résultats a été observée en fonction :

- a) des espèces de parasites présentes, et leur localisation chez l'hôte (abomasum et intestin) ;
- b) de l'espèce de ruminant hôte ;
- c) et surtout des ressources utilisées, soit directement (espèces de plante, quantité et qualité des tanins présents), soit à la suite de traitements technologiques.

Différents traitements technologiques afin d'améliorer la conservation de la plante ont été testés dans plusieurs études, comme par exemple la conservation sous forme de foin, d'ensilage ou encore de granulés. Les premières études visant à tester la déshydratation sous forme de granulés de ressources riches en tanins condensés datent d'il y a environ dix ans et sont aujourd'hui au cœur de cette thèse.

Afin de favoriser leur utilisation pertinente en élevage, des informations comme la durée de distribution ou la concentration dans la ration manquent pour favoriser l'utilisation de ces nutriments dans la ration des ruminants.

L'objectif général de mon travail de thèse est d'analyser l'influence de la déshydratation sur les qualités bio-chimiques et sur la bioactivité d'un nutriment utilisé comme modèle d'étude en Europe, le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Son utilisation en élevage est également étudiée. Ces travaux ont été réalisés avec les deux espèces de petits ruminants ovins et caprins (Figure 21).

Le premier objectif de la thèse était de caractériser le granulé de sainfoin. En effet, dans un but d'utilisation plus facile en élevage, la majeure partie du sainfoin cultivé en France est déshydratée sous forme de granulés. Des données concernant la préservation de la qualité de cette plante après traitement sont nécessaires. Ainsi, afin d'obtenir une évaluation rapide de la qualité des granulés, différentes méthodes de dosage des tanins et de l'activité AH associées aux granulés de sainfoin ont été utilisées. La méthode de référence utilisée tout au long de cette thèse a été une méthode de dosage des tanins totaux (Folin-Ciocalteu). La méthode de Diffusion Radiale (méthode simple d'évaluation de la capacité de complexation des tanins avec les protéines) a ensuite été utilisée. Enfin, la spectroscopie dans le milieu infra-rouge proche (SPIR) a également permis d'obtenir des évaluations de la teneur en tanins des échantillons, après récolte –collecte) des spectres et développement de calibrations. Le test de dégagement larvaire a quant à lui permis d'évaluer l'efficacité anthelminthique de l'échantillon. Ces méthodes ont été corrélées entre elles (Article 1). Une protection par savoir-faire secret est envisagée pour protéger les résultats de cette première étude.

Le deuxième objectif de la thèse a été de définir les conditions optimales d'utilisation des granulés de sainfoin en élevage pour une gestion plus durable du parasitisme. Le premier chapitre de cette partie a porté sur l'influence de la quantité de sainfoin dans la ration et de la durée d'administration sur l'infestation par les NGIs, afin d'avoir un effet maximal sur l'établissement des larves L3 et sur les vers adultes (Article 2). Cet article sera soumis à Veterinary Parasitology en 2017.

Dans un second temps, l'utilisation conjointe du sainfoin et d'un anthelminthique de synthèse a été étudiée. Certains éleveurs font face à des situations de multi-résistances des populations de NGIs aux diverses familles de molécules de synthèse dans leurs élevages. Réduire la pression parasitaire grâce à un régime à base de sainfoin permettrait potentiellement de redonner de l'efficacité aux AHs et de limiter l'application des traitements AHs et ainsi diminuer l'apparition de résistances (Article 3). Cet article a été publié dans *Veterinary Parasitology*, 227, pages 122-129, août 2016.

Le troisième objectif de la thèse était de comparer les ovins et caprins dans leur capacité à sélectionner volontairement des granulés de sainfoin pour améliorer leur état parasitaire (= faculté d'automédication) (Article 4). Cet article sera soumis à *Animal* avant la fin de l'année 2017.

Cette thèse a été préparée sous forme d'articles soit publiés soit en préparation pour soumission.

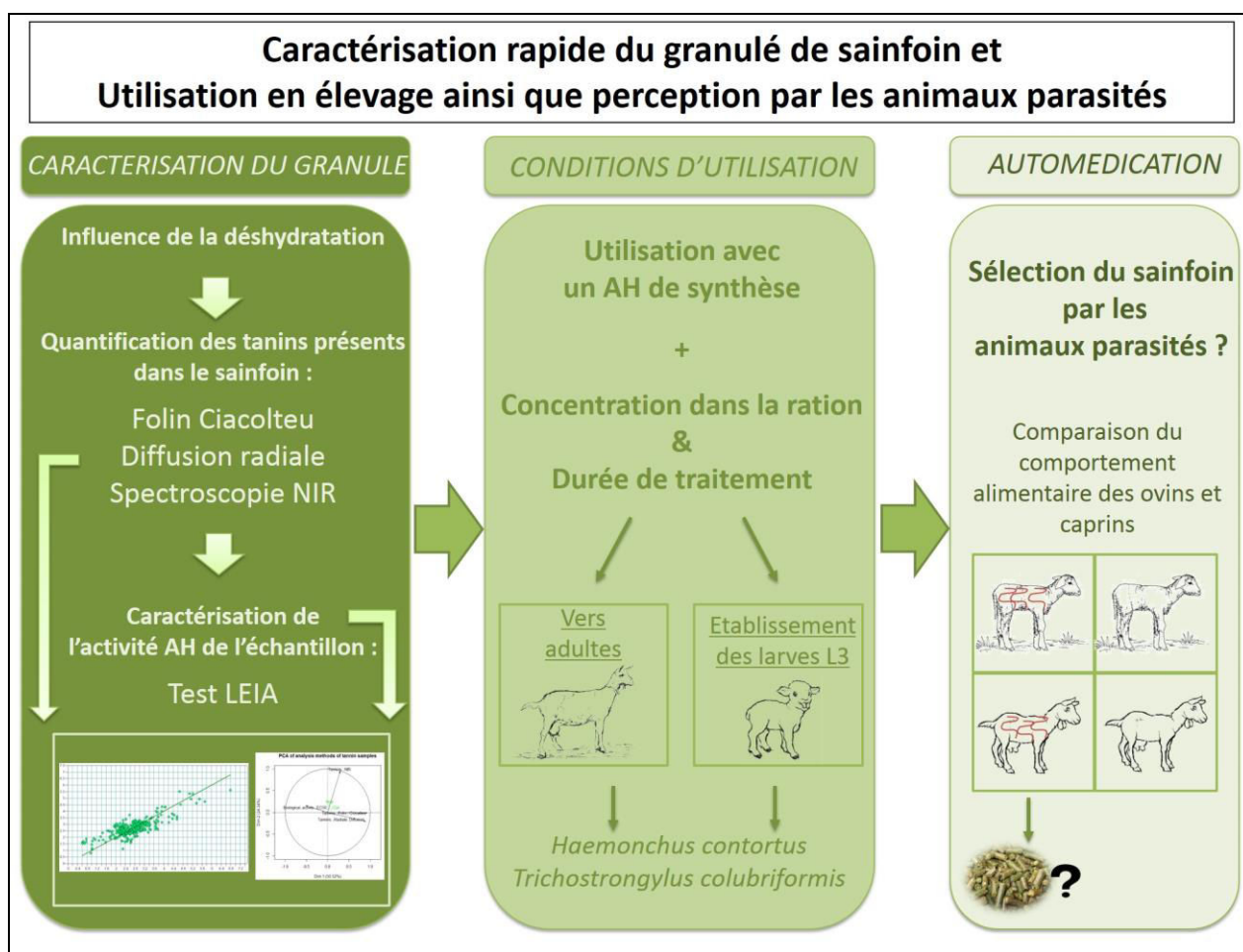


Figure 21: Résumé des objectifs de la thèse

Chapitre 1

Article 1 : Comparaison de méthodes d'analyse simples des valeurs protéiques, des teneurs en tanins condensés et des activités biologique et anthelminthique d'échantillons de sainfoin

Afin de déterminer rapidement la qualité et la bio-activité d'un granulé de sainfoin, il est nécessaire de mesurer rapidement sa teneur en tanins condensés (TCs). Parmi les méthodes d'analyse de la teneur en TCs, la méthode bio-chimique de Folin-Ciocalteu (FC) est fréquemment utilisée mais demande un temps considérable. La méthode de Diffusion Radiale (RD) est basée sur l'activité de complexation des TCs avec les protéines. La méthode d'inhibition du dégagement larvaire (LEIA) permet d'analyser l'activité anthelminthique (AH) du granulé. De plus, l'utilisation de la spectroscopie en infra-rouge proche (SPIR) pour déterminer de façon précise et rapide la teneur en TCs a été utilisée.

Les objectifs de cette première étude ont été d'évaluer les paramètres de culture ayant une influence sur la teneur en tanins, de comparer différentes méthodes de dosage des tanins et d'analyse de l'activité biologique et de les appliquer en entreprise.

La totalité des échantillons de sainfoin disponibles durant les quatre dernières années de récolte (324) ont été utilisés dans cette étude, provenant de différents lieux de culture, sous forme de fourrage ou de granulés (gamme de teneur en TCs de 0.61 à 7.80 % de la matière sèche). Trente deux pourcents de ces échantillons contenaient plus de 3 % de TCs. Tous les échantillons ont été analysés par la méthode bio-chimique de dosage des tanins totaux Folin-Ciocalteu. Quand la taille de l'échantillon était suffisante, la méthode de diffusion radiale a été réalisée. Afin de déterminer l'activité antiparasitaire de l'échantillon, les échantillons les plus discriminants en termes de quantités de tanins ont été testés par la méthode LEIA. Enfin, une calibration SPIR a été développée pour prédire la teneur en TCs.

La calibration SPIR a conduit à un coefficient de détermination de 0.66 pour la prédiction de la teneur en tanins. Les corrélations deux à deux entre les différentes méthodes d'analyse ont été confirmées par une analyse en composantes principales : les teneurs en tanins obtenues par la SPIR ont été très corrélées avec les teneurs obtenues avec la méthode de référence Folin-Ciocalteu et avec les valeurs EC50, résultat du test LEIA ($P < 0.05$). Les valeurs FC ont également été corrélées avec les valeurs EC50, mettant en avant l'influence des TCs dans l'activité antiparasitaire. En revanche, aucune corrélation n'a été obtenue entre la RD et les autres méthodes, allant ainsi à l'encontre de notre hypothèse que l'activité AH du sainfoin était due à la complexation des TCs avec les protéines.

L'utilisation de la spectroscopie en milieu infra-rouge proche peut permettre de prédire rapidement la quantité de tanins d'un échantillon, voire son activité anthelminthique. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette calibration pourrait être utilisée sur d'autres légumineuses ou co-produits industriels riches en TCs.

Comparative evaluation of simple methods to analyze protein values, tannin content, biological and anthelmintic activities of sainfoin samples

Elodie Gaudin ^{a, b*}, Vincent Gerfault ^b, Cécile Ginane ^c, Pascale Gombault ^d, Irène Mueller-Harvey ^e, Hervé Hoste ^a

^a IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

^b MG 2 MIX, La basse haye, 35220 Châteaubourg, France

^c INRA, UR1213 Herbivores F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^d MULTIFOLIA, 1 bis Grande Rue, 10380 Viâpres-Le-Petit, France

^e University of Reading, School of Agriculture, Policy and Development, 1 Earley Gate, P.O. Box 236, Reading RG6 6AT, United Kingdom

* Corresponding author: Tel.: +335 61 19 38 75; fax: +335 61 19 38 34; e-mail: e.gaudin@envt.fr

Abstract

In order to determine the quality and possible bioactivity of sainfoin pellet, it is necessary to rapidly measure the condensed tannin (CT) content. Among the conventional methods to analyze the tannin content, the Folin Ciocalteu (FC) method is classically used but it is time consuming. The Radial Diffusion (RD) method is based on the precipitating activity of CT. This method gives a rapid estimation of the CT content and the biological activity of the extract. The Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA) permits to analyze the anthelmintic (AH) activity of the pellet. Moreover, Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for rapidly and accurately determining the tannin content was also assessed.

324 sainfoin samples were used in this study. All the samples were analyzed with the FC method (reference) and when possible (i.e. sufficient quantity), they were tested with the RD. The most discriminatory samples (in CT content) were tested with the LEIA. The 324 sainfoin samples were used for the NIRS calibration (they covered a range of CT content from 0.61% to 7.80% of dry matter).

The coefficient of determination (R^2) of the NIR tannin content calibration was 0.66. The 2 by 2 correlations between the methods were confirmed by the Principal Component Analysis. The NIR values were highly correlated with the FC values and the EC50 values (results of the LEIA = AH activity of a sample). The FC values were also correlated with the EC50 values, whereas the RD values were not correlated with other analytical methods.

The use of NIRS for the determination of the CT content in sainfoin and other legumes, and the anthelmintic activity, provides an advantage of time saving and lower cost of analysis than chemical analysis.

Keywords: Sainfoin; Nutraceutical; Condensed Tannin; Radial diffusion; Near Infra-Red Spectroscopy; Folin Ciocalteu; Larval Exsheathment Inhibition Assay; Nematodes

1. Introduction

Condensed tannins (CT) are polyphenolic compounds belonging to the flavonoid group (Mueller-Harvey and McAllan, 1992). They are located in various parts of the plant and they have the capacity to bind proteins (Mueller-Harvey, 2006). Legumes containing CT, as sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), but also sulla (*Hedysarum coronarium*) or sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) for example, seem to represent an alternative to commercial anthelmintic (AH) treatments, when used as nutraceuticals (plants that combine positive effects for animal nutrition and health) (Hoste et al., 2015).

Many *in vitro* assays with extracts of tanniniferous legumes rich in CT have shown promising results (Brunet et al., 2007; Manolaraki et al., 2010).

Furthermore, several *in vivo* studies performed with sainfoin (see Hoste et al., 2012 and 2015), sulla (Niezen et al., 2002; Pomroy and Adlington, 2006) or sericea lespedeza (Shaik et al., 2006; Gujja et al., 2013) have confirmed these anthelmintic effects and defined the concept of nutraceuticals.

Recently, some studies were performed with pelleted legumes. Industry has focused on the dehydration processes to produce pellets to improve the conservation and stability of CT-rich forages. This has been applied on sericea lespedeza (Terrill et al., 2007; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015) and sainfoin (Girard et al., 2013; Saratsi et al., 2015; Gaudin et al., 2016; Desrues et al., 2016). These pellets have the advantage to permit the control of the quality of the plant compounds, to facilitate the distribution in farm and to be exported widely.

One of the main advantage is also to permit the characterization of the products before use. This characterization might include the analysis of the CT content in the plant but also the bioactivity of the sample. For industrial development, it seems important to promote simple, low cost, repeatable and if possible automatic methods.

A lot of different methods have been described to determine the CT content in plants.

Tannins can be detected by chemical methods and more specifically with colorimetric assays, after producing a color with several different reagents (Mueller-Harvey, 2006).

One of the most applied chemical method is the Folin-Ciocalteu (FC), which uses the specific phenol reagent Folin-Ciocalteu (Bruneton, 1999). The FC method is based on chemical reduction of the reagent (mixture of tungsten and molybdenum oxides). The products of the metal oxide reduction have a blue color that has broad light absorption with a maximum at 765 nm (Waterhouse, 2001). It was stated that the FC method, which takes into account all hydroxyl aromatic compounds (Rover and Brown, 2013), is a better method for quantification of CT (Yu and Dahlgren, 2000).

The butanol-HCl method is also classically used (Porter et al., 1986). It is based on the depolymerisation reaction of CTs in an acid environment (Makkar, 2000; Schofield et al., 2001). Recently, an adaptation of this method was developed (Grabber et al., 2013): acetone was added in the reaction which permitted to recover 3.2 times more tannins from plants compared to the previous conventional butanol-HCl method. The vanillin method measures colored complexes formed between vanillin and the last flavonoid of the CTs (Makkar, 2000; Schofield et al., 2001). Last, thiolysis coupled with High Performance Liquid Chromatography is also suitable to quantify tannins in plants (Mueller-Harvey, 2006).

Finally, the Radial Diffusion (RD) technique can also measure indirectly the tannin content in plant extracts. It is a protein precipitation assay based on the properties of tannins to bind proteins, by reacting the tannin with a protein and quantifying the precipitated complex (Hagerman, 1987). This method is simple and gives a rapid estimation of the biological activity of a sample (Makkar, 2000; Hagerman, 2002; Mueller-Harvey, 2006).

To evaluate the anthelmintic activity of a plant sample, several *in vitro* analysis are available targeting different stages of nematodes (eggs, L1 larvae, L3 larvae, adults), for example the Egg Hatch Assay, the Larval Migration Inhibition Assay or the Adult Motility Inhibition Assay (Jackson and Hoste, 2010). One of the simple, repeatable and less time consuming parasitological *in vitro* test is the Larval Exsheathment Inhibition Assay (LEIA) (Bahuaud et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2011). This assay compares the inhibitory effects of the plant extracts on the exsheathment process of gastrointestinal nematodes (GINs).

There is a huge variability among these analytical assays. A lot of these methods are time consuming and some are not specific of the CTs, but are more generally applied to flavonols (e.g. the vanillin method) (Hagerman, 2002). Some methods can be affected by other nonphenolic

reducing molecules (e.g. the FC method) (Yu and Dahlgren, 2000). Some are only semi-quantitative because they do not dose all the products released after depolymerisation (e.g. the butanol-HCl method) (Schofield et al., 2001). Moreover, some of these methods require specific laboratory equipment (e.g. thiolysis) and cannot be performed everywhere.

An alternative to the chemical analysis of tannins is the use of Near Infra-Red Spectroscopy (NIRS). Nowadays, NIR spectroscopy is widely used in feed companies to analyze solid or liquid products. It is based on the principle of the measure of the reflexion (or absorbance) of the light source (the NIR apparel) by objects (sainfoin extracts for example) (Siesler et al., 2002). The recorded spectra would permit to develop calibration curve by relating these spectra with data collected from laboratory-based assays (Folin-Ciocalteu method) to predict the values of new samples (Dykes et al., 2014). Mathematical modeling using data obtained from wet chemical methods and spectra information can be performed using classical least squares, multiple linear regression, principal component regression, and partial least squares (Adu-Amankwa et al., 2011). NIR spectroscopy induced fast and accurate analysis with no need of sample preparation, no waste, reduced costs and ease of use.

Some studies using NIRS had been previously performed to measure the phenolic or tannin content in plant containing tannins, such as *Vicia* and *Lathyrus* spp. (Goodchild et al., 1998), *Pinus caribaea* (Adu-Amankwa et al., 2011) or sorghum (Dykes et al., 2014), but never in sainfoin. On the other hand, information remains very limited on the evaluation of the biological activity of tannins by NIRS; only some studies were performed to evaluate the antioxidant capacity of plant (Redaelli et al., 2016; Tahir et al., 2016).

The aim of this study was to evaluate a combination of simple, efficient, cheap, repeatable and applicable, on industrial conditions, methods to determine nutritional values (e.g protein content) of sainfoin samples (forage or pellets), but also the CT content, the protein binding capacity and the AH properties. The objectives were to investigate whether the RD technique and NIRS could be used to rapidly and accurately predict protein and tannin contents of sainfoin and predict the biological activity of sainfoin, by reference calculation of tannin with the Folin-Ciocalteu method and AH activity with the LEIA. A second objective was to test the NIRS calibration to predict CT content of new legumes or by-products of the food industry.

A specific objective was to evaluate the effects of different factors of sainfoin culture and dehydration on the CT content.

2. Materials and methods

2.1 Samples

324 sainfoin samples were used in this exploratory work, to have a large range of variation of tannin content. No experimental plan was performed, they correspond to the samples available during the four previous years of harvest. The main factors of variations are listed in Table 1. Briefly, different factors of sainfoin culture were explored, i) Quality: 256 samples were cropped on a standard quality and 68 samples were cropped in Protected Designation of Origin (PDO); ii) Cut: They were collected from three cuts per year; iii) Year: They were harvested between May 2012 and September 2015; iv) Variety: 304 samples belonged to the Perly variety and 20 samples to the Perlix; v) Geographical origin: 287 samples came from the east of France (parcels located around Viâpres-Le-Petit). In addition, 17 samples were obtained from other parts of France. Finally, 20 samples came from Swiss (but it was a different variety).

The form of the sample was also registred to evaluate the dehydration process: 222 samples were pelleted. From these, 102 samples were kept in forage in order to examine the impact of the dehydration process.

In addition, three *Onobrychis* hay samples (varieties: *peloponnesiaca*, *alba subsp. laconica* and *ebenoides*), two legume samples (coronilla (*Coronilla coronata*) and bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*)) and three by-products of the Human food industry (Hazelnut (*Corylus avellana*), Walnut (*Juglans*) and Chestnut (*Castanea sylva*)) were then used to examine whether the NIRS calibration can be expended to other tannin-containing samples.

2.2 Kjeldahl method

The Kjeldahl method is an usual method for the quantitative determination of nitrogen in chemical substances (Kjeldahl, 1983).

- *Reagents*

All the reagents (sulphuric acid, potassium sulphate, sodium hydroxide, boric acid and sodium carbonate) were obtained from Sigma Aldrich® (France).

- *Analysis*

Briefly, the sample to be analyzed was heated with sulphuric acid (the organic substance was decomposed) and potassium sulphate was added (the sample was becoming colourless because

of chemical decomposition). Sodium hydroxide was added during the distillation of the solution (ammonium salt was converted to ammonia) and the nitrogen content was determined by back titration. A solution of boric acid permitted to titrate the ammonia with sodium carbonate.

2.3 Folin-Ciocalteu

The FC method is a colorimetric method used to determine total phenolics in samples in a first step (Zhishen et al., 1999; Makkar, 2000). In a second step, Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), which binds tannins, is added to the samples to determine the non-tannin molecules in the plant and the tannin concentration can then be measured by calculating the difference between total phenolics and non-tannin molecules (Makkar, 2000). The method used in this study was adapted from Folin and Denis (1915).

▪ *Reagents and solutions*

The dichloromethane was obtained from CARLO ERBA[®] and the acetone from CHEM-LAB[®]. The FC reagent (consisting of sodium tungstate, sodium molybdate, lithium sulfate, bromine and some acids) was obtained from VWR[®]. The tannic acid was obtained from HACH[®]. The PVPP was obtained from MERCK[®]. The sodium carbonate was obtained from Sigma Aldrich[®] (France).

The standard solution was made of a tannic acid stock solution by dissolution of 0.5 of dry tannic acid in 10 ml of ethanol and diluted to 100 ml with water.

▪ *Calibration curve and determination of phenol levels in the samples*

Briefly, solutions of tannic acid with phenol concentration of 0, 50, 100, 150, 250 and 500 mg/l tannic acid were added to the FC reagent and a sodium carbonate solution. The absorbance was determined after 2 hours at 765 nm against the blank (the “0 ml” solution) and the absorbance vs. concentration was plotted, according to the standards (Waterhouse, 2001). Then, instead of the standard, the sample extract was added. Results were read on the calibration curve and reported as Tannic Acid Equivalent.

2.4 Radial diffusion

This method can be used to determine the ability of tannin content in plant extracts to make complex with protein (Hagerman, 1987). Tannins react with proteins and make precipitated complexes. The radial diffusion technique aims at quantifying these complexes: a tannin-containing solution is placed in a well in a protein containing agar plate.

▪ *Reagents and buffer*

All reagents (agarose, BSA, acetic acid, ascorbic acid, acetone) and the tannic acid were obtained from Sigma Aldrich[®] (France).

▪ *Buffer, agar plate, tannin-containing solutions, expression of results*

Briefly, an agar plate which contains Bovine Serum Albumin (BSA) and a buffer of 50 mM acetic acid and 60/xM ascorbic acid is made and adjusted to pH 5.0. Wells were formed into the plate. 60 µl of the tannin-containing solution (extracted for one hour with acetone-water, 7:3 v/v) were added in each well (15 µl aliquots of the same extract were added to a single well as the liquid was absorbed by the gel) and 15 µl of tannic acid were added in the middle well. The Petri dishes were then incubated at 25°C for 48 hours and the exact diameter of the well and the rings was measured. The tannin concentration was calculated using the following formulas:

$$\text{a) } \begin{array}{l} \text{Protein} \\ \text{Precipitation} \\ \text{Activity} \end{array} = \frac{((D \text{ of the ring in mm})^2 - (d \text{ of the well in mm})^2) * \frac{\text{Vol. extraction in } \mu\text{l}}{\text{Vol. put into the well in } \mu\text{l}}}{\text{Weight of the sample}}$$

$$\text{b) } \frac{\% \text{ tannin in the plant extract}}{(\% \text{ eq. tannic acid})} = \frac{\text{PPA sample}}{\text{PPA tannic acid in the Petri dish}} * 100$$

2.5 Larval Exsheathment Inhibition Assay

The LEIA was performed as described by Bahuaud et al., 2006. This assay aims at comparing the inhibitory effects of the tannin containing extracts on the exsheathment process of gastrointestinal nematodes such as *H. contortus*.

- *Reagents, buffer, gastrointestinal nematodes*

All reagents (acetone, phosphate sodium chloride, sodium hypochlorite) were obtained from Sigma Aldrich[®] (France).

The third-stage larvae (L3) were obtained from feces of donor sheep, kept indoors and infected monospecifically with an AH susceptible strain of *Haemonchus contortus*. The facilities hosting the animals and trial performance met French ethical and welfare rules (agreement SSA n°115, December 15, 2014). Faeces were maintained for 12 days at 23°C to obtain the third-stage larvae. Larvae were then recovered from feces using the Baermann technique (Baermann, 1917) and stored at 4°C in a horizontally vented cap flask at a concentration of 1000–1500 L3/ml. Prior to use, the larvae were checked to ensure that at least 90% of them were mobile and ensheated. Larvae from the same isolates were approximately 2-month-old to perform the *in vitro* assay.

- *Larval exsheathment inhibition assay*

Briefly, 1000 ensheated L3 larvae of *H. contortus* were first incubated for 3 h at 20 °C with one extract at serial dilutions of 1200, 600, 300, 150 and 0 µg/mL in Phosphate Buffer Solution (PBS) (0.1 M phosphate, 0.05 M NaCl, pH 7.2). After washings, they were submitted to the artificial exsheathment process by contact with a solution containing sodium hypochlorite (2% w/v) and sodium chloride (16.5% w/v), diluted 1 to 400 in PBS.

The exsheathment kinetics were measured under a microscope at ×200 magnification by identifying the proportion of exsheated larvae. Regular examination was performed at 0, 20, 40, and 60 min after contact with the exsheathment solution.

The exsheathment percentage was calculated according to the following formula: ((number of exsheated larvae) × 100) / (number of exsheated larvae + ensheated larvae). For each sample, four replicates were run per concentration and observation time to examine the exsheathment kinetics. Effective concentration that causes 50% of exsheathment (EC50) can then be calculated: the more tannins in the sample there will be, the lower EC50 value it will have (and a higher biological activity).

2.6 Near Infrared Spectroscopy

- *Material*

A total of 324 sainfoin samples were used to develop the protein and CT calibrations. All the samples have been first evaluated for protein and CT contents, with the Kjeldahl and FC methods in the reference laboratory.

- *Spectra acquisition*

50 g of all the samples, both pellets and forages, were ground with a 1 mm sieve, Retsch ZM200. Then, they were placed in a NIRS system micro sample cup. NIR spectra were recorded on a Bruker FT-IR[®] spectrometer (TANGO Serial Number: 359) to measure diffuse reflected light in the range from 870 nm to 2500 nm. 367 spectra were accumulated for one sample and a mean was done by the software. After the spectrum had been obtained, the sample cup was emptied and cleaned.

For purposes of NIR calibration curve development, 13 outlier samples (a few samples with extreme values which could bias the model) were excluded from the calibration (i.e. 311 samples are included in the calibration). 189 new samples were then tested with this NIR calibration for validation.

- *Calibration modeling*

Chemometric (science of extracting information from chemical systems by data-driven means) modelling was performed with the OPUS[®] software package (version 7.2). For preprocessing, full multiplicative scatter correction, first derivative, straight line subtraction or standard normal derivation were tested and the first derivative was applied. Calibrations were developed (based on NIR spectra and lab chemical analysis of protein and tannin contents) using partial least squares (PLS) regression after principal component analysis (PCA). Calibrations were tested by full cross-validation and predicted protein and tannin contents were compared to measured ones. The root mean square error was calculated for the calibration samples and for the predicted samples.

2.7 Statistical Analysis

The effective concentration that causes 50% exsheathment inhibition (EC50) for each extract was calculated at 60 min (using the software Probit Polo Plus[®]).

The statistical comparison of data according to the form of the sainfoin (forage or pellet, the quality, the variety, the cut and the year of harvest were analyzed using a one-way variance analysis (ANOVA). Significant values ($P < 0.05$) were reported.

Then, nonparametric rank correlations of Spearman between the different methods of analysis were calculated 2 by 2. Significant values ($P < 0.05$) were reported.

Finally, a multivariate analysis (Principal Component Analysis (PCA)) was performed to obtain an overall synthesis of the relationships between the different techniques. The variables

composing the column of the two PCA matrices included quantitative data (% CT with the FC technique, with the RD method and with the NIR calibration and the EC50 per sample) and qualitative parameters (variety and quality of the sainfoin, cut, year of harvest and form of the product).

All statistical analyses were performed using the R[®] software.

3. Results

3.1 Kjeldahl method

Protein content ranged from 9.83 % and 20.08 % (of Dried Matter, DM) in the different sainfoin samples with a mean of 15.21 % (S.D. = 1.66).

3.2 Folin-Ciocalteu

The FC method is the reference method in this study to evaluate total tannins. All the sainfoin samples were analyzed by the same laboratory. The CT content ranged between 0.61 and 7.80 % of dry matter (eq. tannic acid) for sainfoin, with a mean CT content of 2.84 (S.D. = 0.99). 32 % of all the samples had TCs values above 3 %.

The table 1 presents the results of the ANOVA depending on different factors affecting the sainfoin culture and samples. There was no effect of the variety (PDO vs. standard) on the CT content ($P = 0.62$). Statistical differences were observed between the cuts: more tannins were found in the second cut and then in the third cut (respectively 2.42 eq. tannic acid, 2.89 and 3.01) ($P < 0.05$). Significant results were found according to the year of harvest: the principal result was that more tannins were found in 2015 than in 2013 and 2014 (respectively 3.38 eq. tannic acid, 2.36 and 2.57) ($P < 0.05$). The Perlix variety from Switzerland contained more CTs than the Perly one (5.10 eq. tannic acid vs 2.69) ($P < 0.05$) (there was a confounding effect between the variety and the origin).

Finally, the dehydration had a significant impact of the content in CTs: the mean of CT content for pellets was 2.73 eq. tannic acid (S.D. = 0.59) and 3.07 eq. tannic acid for hay (S.D. = 1.52) ($P < 0.05$).

The table 2 presents the results of the ANOVA depending on different factors affecting the sainfoin culture and samples, to test the interaction between factors. The dehydration was the less impacting factor and the cut the most impacting factor.

3.3 Radial diffusion

Radial diffusion values of the different sainfoin samples (% of tannic acid) ranged from 0.04 % to 3.40 %, with a mean of 0.83 (S.D. = 0.56).

3.4 Larval Exsheathment Inhibition Assay

A range of 63 discriminatory samples (with high or low CT content measured by FC) were tested for AH activity with the LEIA. If a low EC50 value is measured in the extract, the extract will have a high anthelmintic activity. The EC50 results ranged between 84 µg/ml and 981 µg/ml, with a mean EC50 value of 326 µg/ml (S.D. = 107).

3.5 NIR

a) Protein prediction calibration of sainfoin samples

The figure 1 gives the data obtained with the OPUS[®] software on the protein calibration and the criteria to judge the quality of the method. The correlation coefficient R^2 reached 0.85, which indicated a good correlation between the predicted values and the reference laboratory values. The Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) was 0.62 (a model is robust when the RMSECV is close to 0). The Residual Prediction Deviation (RPD) (ratio of standard deviation to standard error of prediction) was 2.59.

The protein content of the calibration extracts varied from 9.83 % to 20.08 % with a mean of 15.21 % (S.D. of 1.66), which covered a large enough range.

b) CT prediction calibration of sainfoin samples

The figure 2 gives the data obtained with the OPUS[®] software on the tannin calibration and the criteria to judge the quality of the method. The correlation coefficient R^2 reached 0.66, the RMSECV was 0.48 and the RPD was 1.71.

The CT content of the calibration extracts varied from 0.61 to 7.80 of dry matter (eq. tannic acid) with a mean of 2.84 (S.D. of 0.99).

3.6 Spearman's Correlations and PCA (Table 3 and Figures 3 and 4)

The table 3 presents the values of the Spearman's correlation coefficients and the significant p values between the different methods to analyze the tannin content. The correlation between FC and NIRS was positive and significant ($S = 0.74$; $P < 0.01$). Conversely, the correlation between EC50 and FC was negative and significant ($S = -0.37$; $P < 0.01$), as well as the correlation between EC50 and NIRS ($S = -0.33$; $P < 0.05$). The correlations between RD and the three other methods were not significant.

When PCA was applied, the two main components of axis 1 were NIRS and FC (i.e methods performed to determine the content in CT), and to a lesser degree the EC50 (i.e assay determining the AH activity of sainfoin). For axis 2, RD was the main component explaining this axis (i.e assay determining the biological activity of sainfoin). The plane defined by the combination of axes 1 and 2 represented 69% of the overall variability (Figure 3). The figure 4 represents the histogram of each analytical method.

The aim of this type of analysis was to describe the global relationships between the different variables. Variables that are positively related are closely located on the same side of the plane. In contrast, variables that are negatively related are located diagonally in opposed quadrants. The analyses of these planes tended to confirm the 2 by 2 Spearman's correlation results. The EC50 values were in opposition to the methods determining the CT content (NIRS and FC) and, to a lesser degree, to the RD.

3.7 Exploration of CT prediction calibration of other tannin-containing samples

The table 4 presents the results of the prediction of CT content in samples not included in the calibration : 3 other *Onobrychis* extracts, 2 tannin-containing legumes and 3 by-products. The

percentage of deviation between the laboratory values and the NIR predicted values varied from 5% to 22% for the sainfoin samples, from 45% to 71% for the legume samples and from 84% and 1062% for the by-product samples.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study where several *in vitro* methods to analyze CT contents and their properties were combined and correlated together. The general aim of this study was to investigate if the NIR spectroscopy could measure protein and CT contents in sainfoin, but also some biological activities related to these polyphenolic compounds (e.g the protein precipitating activity of tannins and the AH activity). Another preliminary objective was to verify if this calibration could be used to predict values of other legumes. Finally, a secondary objective was to study the variability, in term of CT content, between different culture factors and conservation process of sainfoin.

The reference method to measure CTs and to study the variability between samples in our study was the Folin-Ciocalteu method.

First, different factors conditioning the culture of sainfoin did impact the CT content. Firstly, the variety did have a significant effect on the CT content: the Perlix variety from Swiss did have more CTs than the French genetically selected variety Perly. However, some *in vitro* (Azuhni et al., 2012) or *in vivo* studies (Werne et al., 2013; Campidonico et al., 2016) were performed with the Perly variety and provided promising results on animal health, whereas no effects were obtained with the Perlix variety, highlighting its biological or AH activity. Such differences between sainfoin varieties were already observed in other studies which mentioned an effect on the CT content and quality, and also on the AH activity (Manolaraki, 2011; Malisch et al., 2015). Secondly, the year of harvest, differing in weather conditions, did have a significant impact on CT content. This was already observed with other CT-rich plants (*Atrilex canescens*) where the season of harvest had significant effect on the CT content (Medjekal, 2016). Thirdly, the number of cuts was significantly correlated to the increase in CT content. This was previously observed (Azuhni et al., 2011): the harvest being considered as a physical stress, could explain the increased plant secondary metabolites (PSM) content with higher number of cuts. The plants produce PSM to adapt to environmental conditions, such as diseases and aggressors, UV screens, physical or chemical stress (Mueller-Harvey and McAllan, 1992). Finally, the quality of the cultivation soil did not have an

effect on the CT content. This is different from other studies where sainfoin of different localizations had different CT content values (Manolaraki, 2011; Azuhnwi et al., 2011).

In relation to technological processes, the data obtained from the analysis of the sainfoin pellet and forage samples confirm some previous studies where the CT content of pelleted sericea lespedeza was lower than before dehydration (Terrill et al., 1992). Processes such as sun drying, grinding and pelleting, and in general any processes involving heat, are suspected to affect the quantity of CTs, or alter plant's CTs ratio from extractable to bound forms (Minnee et al., 2002; Wolfe et al., 2008; Lorenz et al., 2011). When the plant is heated (temperature > 100°C), the cell is dehydrated and the water and tannins located in the vacuoles will evaporate (Lees et al., 1994). However, the use of pelleted sainfoin gives farmers greater flexibility to use bioactive forages with an easier storage, and transport to areas where these legumes do not grow well or at all (Hoste et al., 2015).

The Folin-Ciocalteu is a method to measure extractable phenolic compounds (Yu and Dahlgren, 2000). It was chosen as the reference method in this study because it is simpler than the butanol-HCl method (Mueller-Harvey, 2006). However, this method is complicated and time-consuming because some sample dilution and long incubation periods are required.

There is a huge CT content variability between sainfoin samples, which imposes to find rapid measurements to direct the batches for the good purposes for animal nutrition.

NIR calibration was thus explored to evaluate whether it can provide rapid analysis available in industrial conditions. NIR spectroscopy offers a number of advantages for qualitative and quantitative analysis and process control applications, such as: no sample preparation, no waste, reduced costs, fast measurements and analysis, accuracy and ease of use. NIRS is now widely used in the food industry (Osborne et al., 1993; Bertrand and Dufour, 2000). It is a quick, inexpensive and non-destructive method.

For more than 30 years, some studies have been performed with NIRS to predict condensed tannin contents in tannin containing forages such as bird's-foot trefoil (Roberts et al., 1993), sericea lespedeza (Petersen et al., 1991; Windham and Barton, 1991), *Leucaena leucocephala* (Wheeler et al., 1996), *Vicia* spp. or *Lathyrus* spp. (Goodchild et al., 1998). However, as far as we know, only preliminary studies using chemometrics (informatic NIR analysis) performed with sainfoin had only been rarely described to predict tannin content in this legume (Mueller-Harvey et al., 2011). Moreover, in the previous cited study, the calibration was performed with reference values obtained with the butanol-HCl and not the FC method.

In this study, the development of the tannin calibration was possible due to a variability in term of CT content between the sainfoin samples: the CT content obtained with the FC method ranged between 0.61 and 7.80 of dry matter (eq. tannic acid). The RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation) was close to 0 which is a criterion to develop a robust model. A Residual Prediction Deviation (RDP) (ratio between the standard deviation of the reference value and RMSECV) value above 2 is a criterion to judge a high quality model (Chang et al., 2001; Chang and Lair, 2002). In our case, the RDP was 1.71. However, in other documented prediction models (Derkyi et al., 2011), the RDP was higher, meaning that the model predicting CT content in sainfoin can be improved by adding spectra with a higher range of CT content in the calibration. Besides, in sainfoin, calibrations predicting protein content have RDP higher than 2, meaning that tannins are molecules more complex to predict than proteins (see figure 1).

The PCA and Spearman's correlations confirmed that the Folin-Ciocalteu analysis was highly correlated to the NIR analysis predicting the tannin content, meaning that the NIR analysis seems an option to rapidly analyze the CT content in a plant sample.

One of the main hypothesis of this study was that NIR calibration could also predict the AH activity or the protein precipitating activity.

Three *in vitro* assays are available to explore the interactions between tannins and infective third-stage larvae of gastrointestinal nematodes: the Larval Migration Inhibition Assay (LMIA), the Larval Feeding Inhibition Assay (LFIA) and the LEIA. The LEIA had been widely used to screen AH activity of either plant extracts (Jackson and Hoste, 2010; Klongsiriwet et al., 2015), tannin fractions (Novobilský et al., 2013; Quijada et al., 2015) or flavan-3-ol monomers (Molan et al., 2002; Brunet and Hoste, 2006). This test can give a quick overview of the anthelmintic activity of a sample (it allows the calculation of EC50 values, which is rarely possible with the LMIA) and these results can be related to *in vivo* processes (Brunet et al., 2007). It is also simple and reproducible (Quijada et al., 2015). However, almost one day is mandatory for each sample.

The PCA and Spearman's correlations confirmed that the EC50 was significantly correlated with the FC method, confirming the hypothesis that the CTs are responsible of the AH activity (Hoste et al., 2015). The EC50 was also correlated to the NIR analysis, meaning that the fast and accurate NIR analysis could be used to predict the AH activity of sainfoin, although less data was available for this correlation (than the one between FC and NIR).

The radial diffusion method was developed 30 years ago (Hagerman, 1987). This method gives a rapid overview of the precipitating activity of sainfoin and the tannin content. It is a protein precipitation assay, used to determine the ability of tannins to make complex with proteins (Theodorou et al, 2011; Villalba et al., 2016). The formation of complex between tannins and

proteins can have consequences on the capacity of CTs to bind protein and reduce their degradation in the rumen or to reduce enteric production of greenhouse gases (Theodorou et al., 2010; Niderkorn et al., 2012; Copani et al., 2015). These abilities of tannins were not evaluated in this study.

The PCA and Spearman's correlations revealed no correlations between the RD values and the FC, NIR and EC50, meaning that the complexation to proteins could be linked to other molecules than CTs. The hypothesis that the AH activity is related to the precipitating activity of tannins with proteins was thus not confirmed in the present study (Hoste et al., 2012). However, the study should be expanded on more samples with a wider range of CT.

The NIR calibration in this study was developed with Perly sainfoin samples of two forms (forage and pellets). We have performed a preliminary study to explore if this calibration could also predict CT content in other *Onobrychis* samples not included in the calibration, and also other legumes rich in CT. Indeed, the spectra of these samples are very close and can be explained in the same way with the NIR model (Figure 5). This offers interesting industrial applications. However, spectra of the by-products, such as hazelnut, walnut or chestnut are different from the sainfoin spectra (especially the chestnut spectra which is totally different, the two others are only differing in the peaks) and cannot be predicted with this calibration for the moment (more samples need to be added in the calibration). More studies are needed.

Most of the calibrations developed to predict polyphenols content are only applicable on one product, such as *Pinus caribaea* bark (Derkyi et al., 2011) or sorghum (Dykes et al., 2014) for example. Using a calibration on diverse tannin-containing products is very interesting on operating conditions, to predict nutritional values or tannin content with the same model on a large range of products present in companies.

Conclusion

As a response to the resistance of anthelmintics, the use of nutraceuticals rich in condensed tannins becomes more common. The quality of these nutraceuticals has to be accessed rapidly to be used by farmers as feed or nutraceuticals.

This study has demonstrated how the non-destructive NIR measurements could be used as a routine method to determine the CT content but also the AH activity of tannin-containing samples.

Calibrations has to be improved, by adding new samples with a high range of values, to predict the AH activity of tannin-containing samples.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support of the French Agency for Research (ANRt) for the CIFRE PhD project 2013/1480 of Ms Elodie Gaudin. The following persons and team are acknowledged for having supplied products: the society Inov' Fruit for the walnut, hazelnut and chestnut extracts, the Veterinary Research Institute of Thessaloniki in Greece for the Mediterranean plants (*Onobrychis*, coronilla and bird's-foot trefoil samples) and Xavier Simonnet from Agroscope for the sainfoin hay samples.

References

- Adu-Amankwa, B., Sekyere, D., Darkwa, N.A., 2011. Rapid prediction of extractives and polyphenolic contents in *Pinus caribaea* bark using near infrared reflectance spectroscopy. *Int. J. Appl. Sci.* 2, 1–11.
- 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*. *Vet. Parasitol.* 181, 360–364.
- Azuhnwi, B.N., Boller, B., Martens, M., Dohme-Meier, M., Ampuero, S., Günter, S., Kreuzer, M., Hess, H.D., 2011. Morphology, tannin concentration and forage value of 15 Swiss accessions of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as influenced by harvest time and cultivation site. *Grass Forage Sci.* 66, 474–487.
- Azuhnwi, B.N., Thomann, B., Arrigo, Y., Boller, B., Hess, H.D., Kreuzer, M., Dohme-Meier, F., 2012. Ruminant dry matter and crude protein degradation kinetics of five sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) accessions differing in condensed tannin content and obtained from different harvests. *Anim. Feed Sci. Tech.* 177, 135–143.
- Baermann, G., 1917. Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (nematoden) larven in erdproben. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië*, 57, 131–137.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545–554.
- Bertrand, D., Dufour, E., 2000. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. *Collection sciences et technique agroalimentaires*, édition Tec et Doc, 660 p.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7481–7487.

- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, L., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Bruneton, J., 2009. Tanins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, Lavoisier (4th edition), Paris, pp. 458-461.
- Campidonico, L., Toral, P.G., Priolo, A., Luciano, G., Valenti, B., Hervas, G., Frutos, P., Copani, G., Ginane, C., Niderkorn, V., 2016. Fatty acid composition of ruminal digesta and longissimus muscle from lambs fed silage mixtures including red clover, sainfoin, and timothy. *J. Anim. Sci.* 94, 1550-1560.
- Chang, C.W., Laird, D.A., Mausbach, M.J., Hurburgh, C.R., 2011. Near infrared reflectance spectroscopy-principal components regression analyses of soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 480-490.
- Chang, C.W., Laird, D.A., 2002. Near-infrared reflectance spectroscopic analysis of soil C and N. *Soil Sci.* 167, 110-116.
- Copani, G., Ginane, C., Le Morvan, A., Niderkorn, V., 2015. Patterns of *in vitro* rumen fermentation of silage mixtures including sainfoin and red clover as bioactive legumes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 208, 220-224.
- Derkyi, N.S.A., Adu-Amankwa, B., Sekyere, D., Darkwa, N.A., 2011. Rapid prediction of extractives and polyphenolic contents in *Pinus caribaea* bark using near infrared reflectance spectroscopy. *Int. J. Appl. Sci.* 2, 1-11.
- Desrues, O., Peña-Espinoza, M., Hansen, T.V., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M., 2016. Anti-parasitic activity of pelleted sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Parasit. Vectors* 9, 329.
- Dykes, L., Hoffmann, L.Jr., Portillo-Ridriguez, O., Rooney, W.L., Lloyd W.R., 2014. Prediction of total phenols, condensed tannins, and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. *J. Cereal Sci.* 10, 1-4.
- Folin, O., Denis, W., 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22, 305-308.
- Gaudin, E., Simon, M., Quijada, J., Schelcher, F., Sutra, J-F., Lespine, A., Hoste, H., 2016. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Vet. Parasitol.* 227, 122-129.
- 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. In: 64th EAAP Nantes, 26th-30th August 2013, 506.
- Goodchild, A.V., El Hamein, F.J., El Moneim, A. Abd., Makkar, H.P.S., Williams, P.C., 1998. Prediction of phenolics and tannins in forage legumes by near infrared reflectance. *J. Near Infrared Spectrosc.* 6, 175-181.

- Grabber, J., Zeller, W.E., Mueller-Harvey, I., 2013. Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in *Lotus* species by the butanol-HCl-iron assay. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2669-2678.
- 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. *Vet. Parasitol.* 191, 51-58.
- Hagerman, A.E., 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ec.* 13, 437-449.
- Hagerman, A.E., 2002. Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae).
- Hoste, H., Martínez-Ortíz-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 infection. *Vet. Parasitol.* 186, 18-27.
- 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.
- Kjeldahl, J., 1983. Neue method zur bestimmung des stickstoffs in organishcen körpen. *Fresen. Z. Anal. Chem.* 22, 366-383.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, R.A., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int. J. Parasitol. Drugs and Drug Resistance* 5, 127-134.
- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Parasitol.* 205, 170-175.
- Jackson, F., Hoste, H., 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. Dans: Vercoe, P.E.; Makkar, H.P.S.; Schlink, A.C. (Eds.), *In vitro* screening of Plant Resources for Extra Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies, FAO/IAEA Springer Edition. pp 24-45.
- Lees, G.L., Hinks, C.F., Suttill, N.H., 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big U trefoil (*Lotus uliginosus* Schkuhr). *J. Sci. Food Agric.* 65, 415-421.
- Lorenz, M. M., Udén, P., 2011. Influence of formic acid and dry matter on protein degradation in the tanniniferous legume sainfoin. *Anim. Feed Sci. Tech.* 164, 217-224.
- Makkar, H.P.S., 2000. Quantification of tannins in tree foliage: Working document. In: FAO/IAEA, Vienna.

- Malisch, C.S., Lüscher, A., Baert, N., Engström, M.T., Studer, B., Fryganas, C., Suter, D., Mueller-Harvey, I., Salminen, J.-P., 2015. Large variability of proanthocyanidin content and composition in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *J. Agric. Food Chem.*, 63, 10234-10242.
- 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.
- Manolaraki, F., 2011. Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse de doctorat en sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bio ingénieries. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 185 p.
- Medjekal, S., 2016. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et de tannins condensés d'arbustes fourragers locaux. Essai de contrôle *in vitro* de la méthanogénèse ruminale d'ovins par l'utilisation de plantes médicinales. Thèse de doctorat en sciences biochimiques et microbiologiques appliquées. Université des Frères Constantine 1, Constantine, Algérie, p.
- Minnee, E.M.K., Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Laboyrie, P.G., 2002. The effect of ensiling forage legumes on condensed tannins. *Agron. N. Z.*, 32/33, 117-119.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2002. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 33, 1691–1698.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Cell. Mol. Biol. Plants*. 1, 151-217.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2010–2037.
- Mueller-Harvey, I., Martin Lorzeno, M., Stringano, E., Barnes, R., Oliver, J., Theodoridou, K., Aufrère, J., Hatew Chuko, B., Pellikan, W., Manolaraki, F., Hoste, H., Hayot Carbonero, C., Smith, L., 2011. NIR spectroscopy for predicting the nutritional, anthelmintic and environmental effects of sainfoin. In: 8th Int. Symposium on Nutrition of Herbivores, Aberystwyth Univ., 6th-9th September 2011, Page 265.
- Niderkorn, V., Mueller-Harvey, I., Le Morvan, A., Aufrère, J., 2012. Synergistic effects of mixing cocksfoot and sainfoin on *in vitro* rumen fermentation. Role of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Tech.* 178, 45-56.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A, Shelton, I.D, Waghorn, G., Green, R., 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 105, 229-245.
- Novobilský, A., Stringano, E., Hayot Carbonero, C., Smith, L. M., Enemark, H.L., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2013. *In vitro* effect of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against tow cattle nematodes. *Vet. Parasitol.*, 196, 532–537.

- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H., 1993. "Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis". Longman Scientist and Technical, Harlow, UK.
- Petersen, J.C., Hill, N.S., Mosjidis, J.A., Windham, W.R., 1991. Screening *Sericea lespedeza* germplasm for herbage quality. *Agron. J.*, 83, 581-588.
- Pomroy, W.E., Adlington, B.A., 2006. Efficacy of short-term feeding of sulla (*Hedysarum coronarium*) to young goats against a mixed burden of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, 136, 363–366.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry*, 1, 223-230.
- Quijada, J., Fryganas, 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. *J. Agric. Food. Chem.* 63, 6346-6354.
- Redaelli, R., Alfieri, M., Cabassi, G., 2016. Development of a NIRS calibration for total antioxidant capacity in maize germplasm. *Talanta* 154, 164-168.
- Roberts, C.A., Beuselinck, P.R., Ellersieck, M.R., Davis, D.K., Mc Graw, R.L., 1993. Quantification of tannins in bird's-foot trefoil germplasm. *Crop. Sci.* 37, 281-284.
- Rover, M.R., Brown, R.C., 2013. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method? *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366–371.
- Saratsi, K., Voutzourakis, N., Tzanidakis, N., Saratsis, A., Stefanakis, A., Hoste, H., Thamsborg, S.M., Hadjigeorgio, I., Sotiraki, S., 2015. Effect of carob pod (*Ceratonia siliqua*) meal fed in sheep against gastrointestinal nematodes. In: The 25th International Conference of WAAVP, Liverpool, UK. p. 172.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 9, 21-40.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150–157.
- Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M., 2002. Near-infrared spectroscopy: Principle, instruments, applications. Wiley-VCH Ed.
- Tahir, H.E., Zou, X.B., Shen, T.T., Shi, J.Y., Mariod, A.A., 2016. Near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid measurement of antioxidant properties and discrimination of Sudanese honeys from different botanical origin. *Food Anal. Method.* 9, 2631-2641.
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., Barry, T.N., 1992. Effects of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci.*, 119, 265-273.

- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117-122.
- Theodorou, K., Aufrere, J., Andueza, A., Pourrat, J., Le Morvan, A., Stringano, E., Mueller-Harvey, I., Baumont, R., 2010. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Tech.* 160, 23-38.
- Theodorou, K., Aufrere, J., Niderkorn, V., Andueza, A., Le Morvan, A., Picard, F., Baumont, R., 2011. *In vitro* study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles? *Anim. Feed Sci. Tech.*, 170, 147–159.
- Villalba, J.J., Spackman, C., Goff, B.M., Klotz, J.L., Griggs, T., MacAdam, J.W., 2016. Interaction between a tannin-containing legume and endophyte-infected tall fescue seed on lambs' feeding behavior and physiology. *J. Anim. Sci.* 94, 845-857.
- Waterhouse, A.L., 2001. Determination of Total Phenolics. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., 11.1.1-11.1.8.
- Werne, S., Perler, E., Maurer, V., Probst, J.K., Hoste, H., Drewke, A., Heckendorn, F., 2013. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and faba bean (*Vicia faba*) on the periparturient rise in ewes infected with gastrointestinal nematodes. *Small Ruminant Res.* 113, 454-460.
- Wheeler, R.A., Chaney, W.R., Johnson, K.D., Butler, L.G., 1996. Leucaena forage analysis using near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Techn.* 64, 2-9.
- Windham, W.R., Barton II, F.E., 1991. Moisture analysis in forage by near infrared reflectance spectroscopy: collaborative study of calibration methodology. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74, 324-331.
- Wolfe, R.M., Terrill, T.H., Muir, J.P., 2008. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *J. Sci. Food Agr.* 88, 1060-1067.
- Yu, Z., Dahlgren, R.A., 2000. Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *J. Chem. Ecol.*, 26, 2119-2140.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64, 555–559.

Figure captions

Fig. 1 Results of the protein prediction calibration of sainfoin (R^2 = correlation coefficient between predicted values by NIRS and reference values obtained with the Kjeldahl method – RMSECV = Root Mean Square Error of Cross Validation – RPD = Residual Prediction Deviation).

Fig. 2 Results of the tannin prediction calibration of sainfoin (R^2 = correlation coefficient between predicted values by NIRS and reference values obtained with the FC method – RMSECV = Root Mean Square Error of Cross Validation – RPD = Residual Prediction Deviation).

Fig. 3 Multivariate principal component analysis (PCA) explained to the four analysis methods of CT content (Folin-Ciocalteu, Radial Diffusion, NIRS, biological activity assessed with the LEIA test). The matrix was composed of 4 quantitative variables and 5 illustrative variables on the chart below (year, cut, variety, quality, form) and 324 lines (corresponding to 324 sainfoin samples). The planes represent 69% of the variability.

Fig. 4 Histogram plots of the four analysis methods of CT content (Folin-Ciocalteu, Radial Diffusion, NIRS, biological activity assessed with the LEIA test).

Fig. 5 NIR spectra of tannin-containing samples

Figures

Figure 1

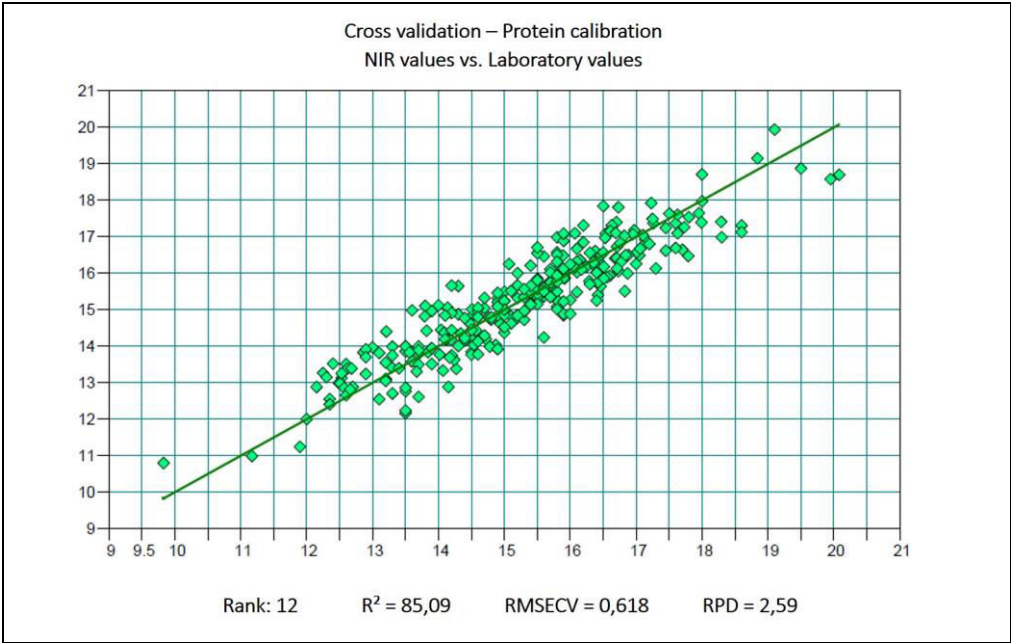


Figure 2

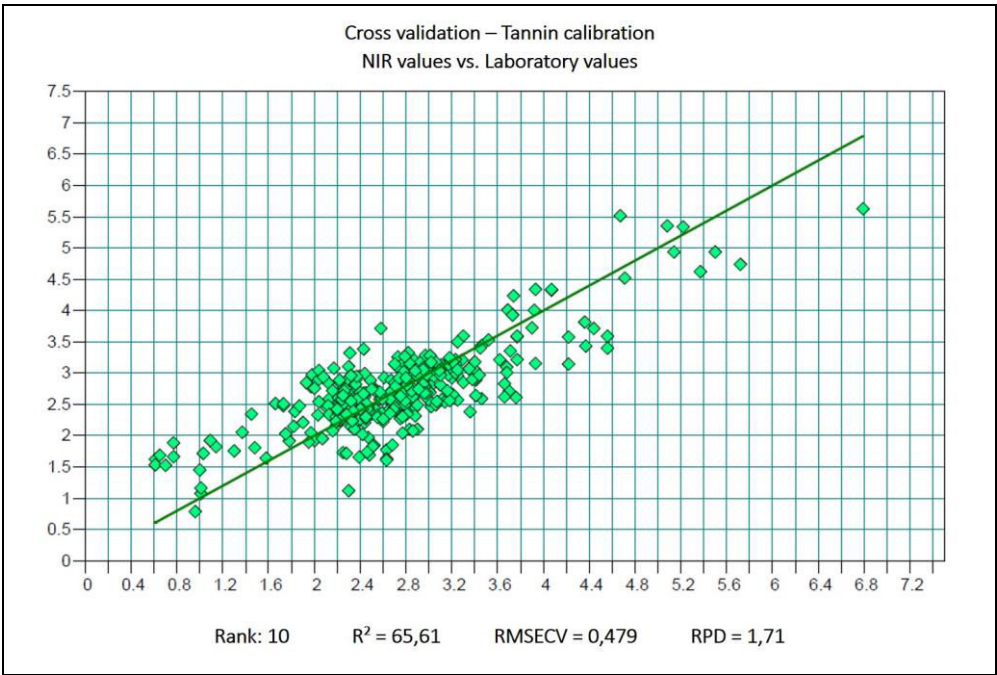


Figure 3

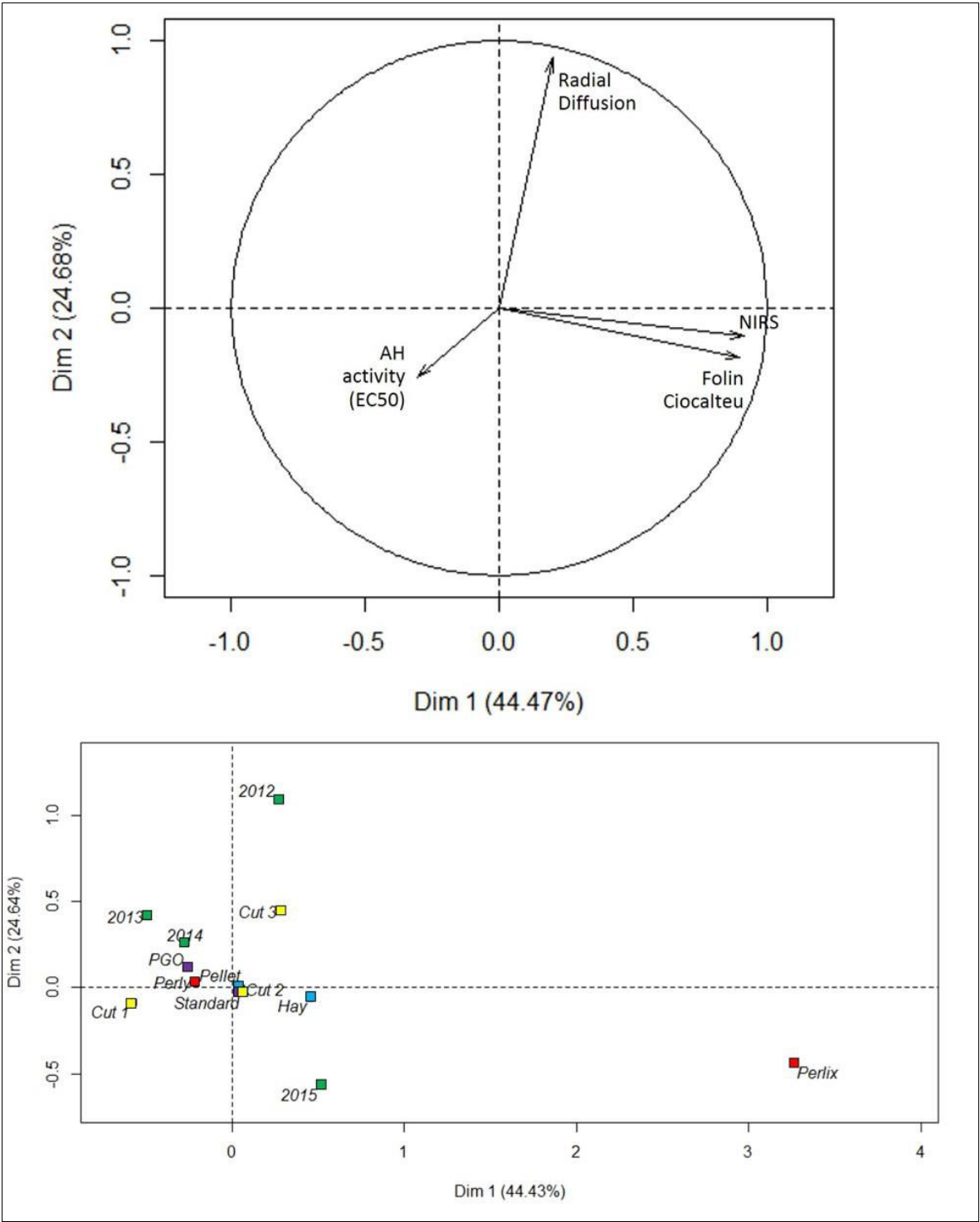


Figure 4

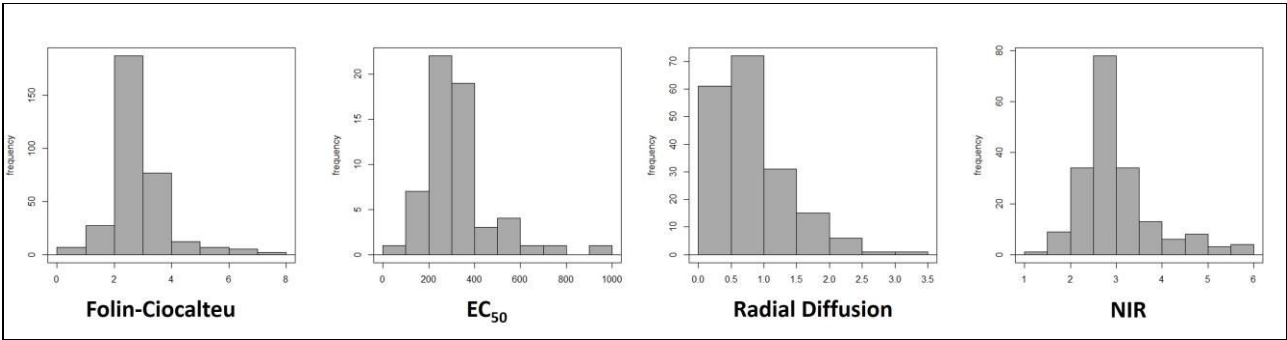
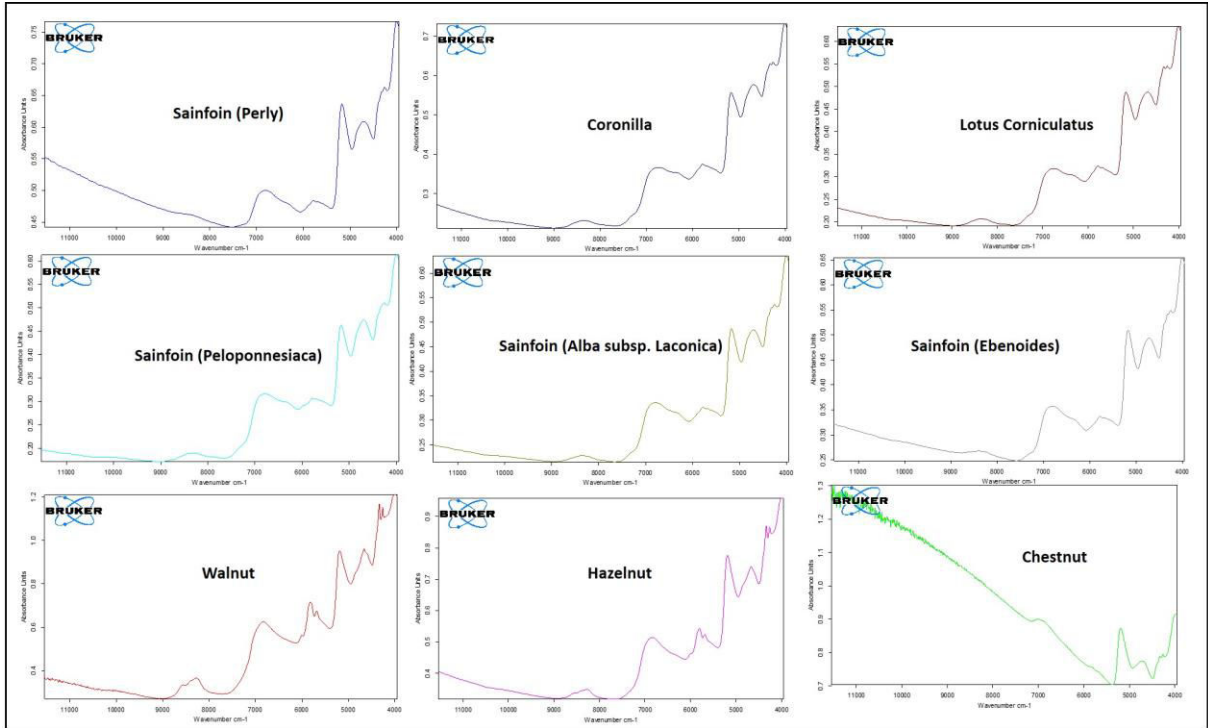


Figure 5



Tables

Table 1: The effect of dehydration, quality, cut, year and variety on the CT content (% of CT with the FC method $\pm$ S.D.) of sainfoin samples. Results of a one-way analysis of variance.

Parameter	Class	<i>n</i>	Mean ($\pm$ S.D.)	p value
Quality	PDO	68	2.67 ($\pm$ 0.62)	0.62
	Standard	256	2.72 ($\pm$ 0.81)	
Cut	1	142	2.42 ($\pm$ 0.63) ^a	< 0.05
	2	106	2.89 ($\pm$ 0.82) ^b	
	3	44	3.01 ($\pm$ 0.86) ^b	
	No available data	32		
Year	2012	10	2.88 ($\pm$ 0.83) ^{a, b, c}	< 0.05
	2013	91	2.36 ($\pm$ 0.85) ^{a, d}	
	2014	93	2.57 ($\pm$ 0.46) ^{b, d}	
	2015	130	3.38 ($\pm$ 1.11) ^c	
Variety	Perlix	20	5.10 ($\pm$ 1.22)	< 0.05
	Perly	304	2.57 ($\pm$ 1.12)	
Form	Pellet	222	2.73 ($\pm$ 0.59)	< 0.05
	Hay	102	3.07 ($\pm$ 1.52)	

Table 2: The effect of interactions between dehydration, quality, cut, and year on the CT content of sainfoin samples. Results of an analysis of variance.

Parameter	p value
Cut x Dehydration	< 0.01
Cut x Quality	< 0.01
Dehydration x Quality	0.04
Cut x Year	< 0.01
Dehydration x Year	< 0.01
Quality x Year	< 0.05
Cut x Dehydration x Quality	< 0.01
Cut x Dehydration x Year	0
Cut x Quality x Year	< 0.01
Dehydration x Quality x Year	0
Cut x Dehydration x Quality x Year	0

Table 3: Spearman's correlation coefficients and significativity for tannin content according to different analysis methods

	Folin-Ciocalteu	Radial Diffusion	NIR	EC50
Folin-Ciocalteu		$df = 191$ S value = 0.04 > 0.05	$df = 189$ S value = 0.74 < 0.01	$df = 63$ S value = - 0.37 < 0.01
Radial Diffusion			$df = 186$ S value = 0.05 > 0.05	$df = 63$ S value = - 0.17 > 0.05
NIR				$df = 58$ S value = - 0.33 < 0.05
EC50				

Table 4: CT predicted values with NIR equation established on sainfoin of CT containing samples differing from sainfoin and CT values with the Folin-Ciocalteu assay

Sample	Ct value in % of Tannic Acid (Folin-Ciocalteu)	Ct predicted value in % of Tannic Acid (NIR)	Deviation (=((% CT NIR - % CT FC) / (% CT FC)) * 100)
Coronilla (<i>Coronilla coronata</i>)	3.37	5.75	71%
Bird's-foot trefoil (<i>Lotus corniculatus</i>)	3.07	4.44	45%
<i>Onobrychis (peloponnesiaca)</i>	7.80	6.10	22%
<i>Onobrychis (alba subsp. laconica)</i>	4.64	3.68	21%
<i>Onobrychis (ebenoides)</i>	2.66	2.78	5%
Walnut (<i>Juglans regia</i>)	33.80	4.49	86 %
Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	23.48	5.77	75 %
Chestnut (<i>Castanea sylvia</i>)	14.85	172.59	1062 %

Chapitre 2

Article 2 : Etude de l'interaction entre la durée de distribution et la concentration en tanins de granulés de sainfoin sur l'établissement des larves L3 d'*H. contortus* et *T. colubriformis* chez les ovins, et sur les vers adultes chez les caprins

Le développement des résistances envers les anthelminthiques de synthèse, notamment chez les petits ruminants, nécessite de trouver des solutions alternatives. Les nutriments riches en métabolites secondaires semblent être une option intéressante afin de diminuer l'utilisation des anthelminthiques de synthèse et retarder l'apparition des résistances.

Les objectifs de ces deux études étaient de vérifier l'hypothèse que l'efficacité de granulés riches en tanins contre l'installation des larves infestantes et contre des populations adultes de nématodes, était liée à la durée de distribution et au niveau de tanins apporté dans la ration.

Trente six agneaux de trois mois ont été expérimentalement infestés par *H. contortus* et *T. colubriformis*. Ils ont été répartis en 3 lots : contrôle (0% de TCs), sainfoin (1,9% de TCs) ou sainfoin + châtaigne (5,0% de TCs). Ils ont été infestés 5 (n=18) ou 12 (n=18) jours après la mise en place des rations. Les régimes ont été maintenus 10 jours après l'infestation (date d'autopsie : à J20 ou J27, selon le jour d'infestation). L'abomasum et l'intestin grêle ont alors été prélevés pour comptage des vers.

Dans une seconde étude, trente chèvres de réforme ont été infestées par *H. contortus* et *T. colubriformis* à J0 et les différents régimes (0% de TCs, sainfoin à 2,1% de TCs ou sainfoin + noisette à 2,8% de TCs) ont été définitivement mis en place à J28. Les animaux ont été autopsiés afin de compter les vers adultes, à J50 (pour la moitié des individus de chaque groupe) ou à J70 (pour les animaux restants).

La consommation de tanins a été associée à une tendance à une réduction du nombre de larves infestantes d'*H. contortus* (expérimentation 1) et à une réduction de la fertilité des vers femelles (moins d'œufs produits par femelle) de *T. colubriformis* (expérimentation 2).

Dans les deux études, la plus longue durée de distribution a été associée à un effet plus important sur la biologie des nématodes.

Aucune différence n'a été observée entre les régimes sainfoin et sainfoin + co-produits industriels.

Des granulés de sainfoin, seuls ou associés à des endocarpes de noisette ou de châtaigne, ont altéré la biologie des larves infestantes et des vers adultes de nématodes, représentant une option dans la lutte contre les résistances aux anthelminthiques. Les effets observés ont été reliés à la durée de distribution des granulés contenant des tanins dans la ration. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer une durée plus précise.

Le tableau ci-dessous recense les différences entre les deux études réalisées.

Etude Critère	Etablissement des larves L3	Vers adultes
Animaux	36 agneaux de 2 mois	30 chèvres de réforme taries (1 – 7 ans)
Aliments	- <u>Granulés croissance</u> (540 g/jour – 15.2% protéines – 0% TCs) - <u>Granulés de sainfoin</u> (550 g/jour – 13.1% protéines – 1.9% TCs) - <u>Granulés de sainfoin + endocarpes de châtaigne</u> (575 g/jour – 14.6% protéines – 5.0% TCs)	- <u>Granulés luzerne</u> (800 g/jour – 14.6% protéines – 0.89% TCs) - <u>Granulés de sainfoin</u> (800 g/jour – 15.3% protéines – 2.11% TCs) - <u>Granulés de sainfoin + endocarpes de noisette</u> (800 g/jour – 15.3% protéines – 2.76% TCs)
Infestation	3000 L3 <i>Trichostrongylus colubriformis</i> + 3000 L3 <i>Haemonchus contortus</i> (en deux doses espacées de 12h)	5000 L3 <i>Trichostrongylus colubriformis</i> + 3000 L3 <i>Haemonchus contortus</i> (en une dose)
Protocole	<u>Etude de l'interaction concentration en TCs et durée de distribution</u> - 3 lots différant en quantité de TCs consommée - La moitié des animaux par lots ont consommé 5 jours de TCs avant infestation ; l'autre moitié 12 jours (régimes maintenus 10 jours après infestation) - Autopsie 10 jours après infestation	<u>Etude de l'interaction concentration en TCs et durée de distribution</u> - 3 lots différant en quantité de TCs consommée - La moitié des animaux par lots ont consommé 22 jours de TCs après infestation ; l'autre moitié 42 jours - Autopsie 50 ou 70 jours après infestation

Effects of interactions between length of distribution and tannin concentration of pellets (sainfoin, hazelnut and chestnut) on L3 larvae in lambs and adult populations in goats of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*.

Elodie Gaudin ^{a, b*}, Jessica Quijada ^a, Ramzi El Korso ^a, Aïna Ramsay ^a, Liza Bastide ^a,
Guillaume Boudaud ^a, Vincent Gerfault ^b, Cécile Ginane ^c, Hervé Hoste ^a

^a UMR IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

^b MG 2 MIX, La basse haye, 35220 Châteaubourg, France

^c UMR1213 Herbivores, INRA, VetAgro Sup, Clermont Université, Université de Lyon, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

* Corresponding author: Tel.: +335 61 19 38 75; fax: +335 61 19 38 34; e-mail: e.gaudin@envt.fr

Abstract

The increasing resistance to anthelmintic (AH) drugs in populations of gastrointestinal nematodes in small ruminant production imposes to find alternative solutions. The use of condensed tannin (CT)-containing nutraceuticals appears as one promising option. We aimed at verifying the hypothesis that the efficacy of pelleted CT containing resources (a model of nutraceutical) is related to two main factors: the length of distribution and the level of tannins in the feed.

The first study aimed at testing the effect of these 2 factors on the establishment of *H. contortus* and *T. colubriformis* infective larvae. Thirty-six lambs experimentally infected, were assigned to three dietary treatments differing in the quantity of CTs: sainfoin (1.9% CTs); sainfoin + chestnut (5.0% CTs); or control pellets (0% CTs). The lambs were exposed to the tannin diets either for 5 ($n = 18$) or 12 days ($n = 18$) before infection. Ten days after the infection, they were slaughtered and the abomasa and small intestine were collected for worm counts and larval stage composition.

The consumption of tannins was associated with a delay in the development of *H. contortus* larvae after 5 days of exposition to tannins and with a reduction in the number of *H. contortus* larvae after 12 days. No effect was observed for *T. colubriformis*.

In a second study, we examined the effect of the same factors on the adult populations biology of *H. contortus* and *T. colubriformis*. Thirty dry goats were experimentally infected on Day 0 and assigned to three dietary treatments differing in the quantity of CTs: sainfoin (2.1% CTs); sainfoin + hazelnut (2.8% CTs); or control pellets (0.9% CTs). The goats started to eat the diets on D28 and were exposed to the different diets either for 3 ($n = 15$) or 6 weeks ($n = 15$). At slaughter (D50 or D70), the abomasa and small intestine were collected for worm counts.

The consumption of tannins was associated with a reduction of the fertility of female *T. colubriformis* after 6 weeks of exposition to tannins. No effect was observed for *H. contortus*.

We noticed differences between worm species. The AH effects observed were related to the length of distribution, especially for infective larvae. An effect of the tannin concentration was observed, confirming the AH effects of tannin-containing nutraceuticals. However, no differences were observed between the different tannin-containing diets. Further studies are required to determine the exact quantity of tannins in the diet.

Keywords: Sainfoin; By-products; Gastrointestinal nematodes; Condensed tannins; Concentration; Length

1. Introduction

The control of gastrointestinal nematodes (GINs) remains one of the main threat in small ruminants' when bred outdoors, because of the consequences on animal health and welfare, and also on production losses (low growth rates, reduction in milk production) (Taylor et al., 2007). For more than 50 years, the conventional way to control these parasites has relied on the use of synthetic anthelmintics (Kaplan and Vidyashankar, 2012). However, in the last decades, this quasi exclusive reliance on chemical molecules to control GINs has been challenged for two main reasons : 1) the overall increasing societal demand of consumers to reduce the use of chemical compounds in agriculture and livestock husbandry; 2) the constant development and diffusion of resistance to anthelmintics (AHs) (Jackson et al., 2012; Peña-Espinoza et al., 2014; Crook et al., 2016), in worm populations which makes sometimes the control of GINs impossible in sheep or goat farms, when multiresistant strains occur (Van Wyk et al., 1997; Paraud et al., 2009; Cezar et al., 2010; Paraud et al., 2016).

Therefore, it is imperative to find new solutions to control GIN infections in sheep or goats, in order to reduce reliance on synthetic AHs. In this context, bioactive forages containing sufficient level of condensed tannins (CT) appear as one promising solution (Hoste et al., 2015).

CT are polyphenolic compounds present in various parts of the plant (Mueller-Harvey and McAllan, 1992; Mueller-Harvey, 2006). Many *in vitro* assays with extracts of tanniniferous legumes or with pure tannin fractions have shown promising results in regards of AH activity (Brunet et al., 2007; Quijada et al., 2015).

Furthermore, several *in vivo* studies using different models of tannin-containing legumes, such as sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) (Shaik et al., 2006; Gujja et al., 2013) or sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) (see Hoste et al., 2012 and 2015) have confirmed anthelmintic effects and have contributed to define the concept of nutraceuticals (a plant that combines positive effects on animal nutrition and health) (Andlauer and Fürst, 2002; Hoste et al., 2015).

Besides, by-products of the human food industry with high-tannin values, such as hazelnut skins (*Corylus avellana*) (Desrues et al., 2012; Girard et al., 2013) or carob (*Ceratonia siliqua*) (Arroyo-Lopez et al., 2014), have also shown positive results and led to promising options to control GINs.

Recently, industry has focused on dehydration processes to provide pellets of sainfoin (Werne et al., 2013; Desrues et al., 2016; Gaudin et al., 2016) or sericea lespedeza (Terrill et al., 2007; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015), in order to improve the conservation and stability of rich-CTs forages, to facilitate the distribution of this sort of bioactive resources and to control the quality before use. Some recent studies performed with such dehydrated pellets reported promising results, affecting the dynamics of infection by *Haemonchus contortus*, especially by reducing fecal egg counts (FECs) (Girard et al., 2013; Kommuru et al., 2015; Gaudin et al., 2016) and by improving the host resilience and limiting the anemia (Terrill et al., 2007).

Many studies have illustrated the effects of different CT-containing resources on different key stages of the nematode life cycle and also on different nematodes species (i.e abomasal or intestinal species) (Hoste et al., 2015). The hypothesis that these effects depend on the concentration of CTs has been supported by a wide range of *in vitro* studies (Hoste et al., 2015) and by fewer *in vivo* experiments (Athanasiadou et al., 2001; Terrill et al., 2009; Brunet et al., 2007; Girard et al., 2013) and we still miss information about the quantity of CTs to add in a diet. However, the concept of nutraceuticals supposes that these antiparasitic effects also depend on the length of distribution and studies are missing on this information.

Therefore, the hypothesis explored in the current study was that the effect of CTs on the worm populations might depend on an interaction between the level of condensed tannins and the length of distribution in the feed, and that these factors might influence stages and/or species of GINs, for example intestinal or abomasal species.

To test this hypothesis, we performed two *in vivo* studies to examine the effect on i) the establishment of L3 larvae and ii) the biology of adult worm populations, of feed with different tannin levels (depending on the resource available) and according to different lengths of distribution.

The first study was performed on lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (a blood-sucking abomasal specie, classically used in parasitological studies) and *Trichostrongylus colubriformis* (a classic intestinal specie of small ruminants), receiving either commercial dehydrated pellets (control), sainfoin pellets (with low tannin content) or sainfoin pellets + chestnut peels (with high tannin content), before and during the infection. The second study was performed on adult culled goats experimentally infected with the same nematode species, *H. contortus* and *T. colubriformis*, receiving dehydrated pellets of either lucerne (control), sainfoin pellets or sainfoin pellets enriched with hazelnut peels.

2. Materials and methods

2.1 Study performed on L3 infective larvae

2.1.1 Experimental design (Fig. 1)

A 27-days feeding trial was completed with thirty-six 2-month-old lambs (Lacaune breed) at the start of the assay. The lambs were reared indoors under conditions that excluded nematode infection. A control by egg counting in the feces was performed on arrival to verify the absence of GIN infections.

On D0, the lambs were stratified according to body weight (BW) and packed cell volume (PCV) values and assigned to three dietary treatments ($n = 12$ per treatment) :

- Control group : Mean weight of $30.6 \text{ kg} \pm 2.5 \text{ kg}$ – Mean PCV of $38.8 \% \pm 1.4 \%$
- Sainfoin group : Mean weight of $30.6 \text{ kg} \pm 2.6 \text{ kg}$ – Mean PCV of $39.4 \% \pm 1.8 \%$
- Sainfoin + chestnut group : Mean weight of $30.6 \text{ kg} \pm 3.2 \text{ kg}$ – Mean PCV of $36.7 \% \pm 3.8 \%$

Animals in the control group received 540 g of crude feed per day and per animal (distributed by group). The feed consisted of 100% control pellets (= C group). Animals in the sainfoin group received 550 g (crude) of feed per day and per animal (distributed by group). The feed consisted of 100% sainfoin pellets with low tannin content (= S group). Animal in the sainfoin + chestnut group (= SC group) received 475 g of crude sainfoin pellets with high tannin content plus 100 g of crude chestnut peels per day and per animal (distributed by group).

The three diets were isoproteic (approximately 14.3 % of crude protein) (Table 1). Sainfoin pellets of the S group had a content of 1.9 % of dry matter (DM) of CT (Folin-Ciocalteu method) and sainfoin pellets + chestnut peels of the high tannin group (SC) had a content of 5.0 % of DM of CT. These CT contents were chosen depending on the sainfoin available at the moment of the trial and to have a high different tannin content in the two groups. In addition, the three groups received hay *ad libitum* each day and had free access to water.

A five-days adjustment period (from D0 to D5) allowed animals to adapt to the new diet (from a diet based on the control pellets and the same hay that they will receive during the experiment). On D5, the lambs started to eat the full experimental diets.

On D10, after 5 days of consumption of the full diets, half of the animals per group ($n = 6$ per treatment) received two oral doses of 50% (v/v) of 3000 third stage larvae of *H. contortus* and 3000 third stage larvae of *T. colubriformis* in a 12-hour-interval (susceptible strains).

On D17, after 12 days of consumption of the diets, all the remaining animals ($n = 6$ per treatment) received similarly two oral doses of 50% (v/v) of 3000 third stage larvae of *H. contortus* and 3000 third stage larvae of *T. colubriformis* in a 12- hour-interval (susceptible strains).

10 days after the infection (either on D20 or on D27, depending of the infection session), the lambs were slaughtered by using 3.65 g of pentobarbital (Doléthal[®], 182.2 mg/ml, Vétoquinol S.A., Magny-Vernois, France). The abomasa and small intestine were immediately collected for future worm counts.

The facilities hosting the animals and trial performance met the French ethical and welfare rules (agreement SSA N°115 of December 15, 2014). The experimental protocol was approved by an ethic comity (Number *APAFIS*#2016061022352502).

2.1.2 Methods

2.1.2.1 Parasitological monitoring

At necropsy, the abomasum and the seven first meters of the small intestine were separated, tied, rapidly removed and then stored at -20°C for further larvae counts and determination of larvae stages (L3, early L4, L4) of the two worm species (Douvres, 1957).

The larvae were collected from the luminal contents, after abomasal and intestine washings, and also after a digestion of mucosae with pepsin-HCl (during 6 h at 37°C). Larvae counts were performed according to a 10% aliquot technique (MAFF, 1986).

2.1.2.2 Patho-physiological measurements

Individual blood samples were taken by jugular venipuncture two times for animal slaughtered on the first date and three times for animal slaughtered on the second date (on the day of infection, at the first necropsy and on the second necropsy) for determination of PCV, using a micro-hematocrit centrifuge and reader.

2.2 Study performed on adult worms

2.2.1 Experimental design (Fig. 2)

A 6-week feeding trial was completed with thirty dry goats (Alpine breed, from one to seven years old, previously bred indoors). An egg count was performed on arrival to control the absence of GIN infections.

On day D0, the goats received a single oral dose of 5000 third stage larvae of *T. colubriformis* and 3000 third stage larvae of *H. contortus* (susceptible strains).

The goats were weighed on arrival. Fecal egg counts (FEC) were determined twice weekly from D21 and blood samples were taken weekly for determination of blood PCV, as well as the observation of the eye mucosa according to the FAMACHA chart[®].

On day 21 post-infection (PI), the goats were stratified according to FEC, body weight (BW) and PCV and assigned to three dietary treatments ($n = 10$ per treatment; 800 g of crude feed per day and per animal, distributed by group), which consisted of 100% Sainfoin pellets (= S group), 100% Sainfoin + Hazelnut pellets (= SH group) or 100% Lucerne (or control) pellets (= C group). The three diets were isoproteic but differed in the quantity of condensed tannins (Table 2). In addition, the three groups received daily hay *ad libitum* and had free access to water.

A one-week adjustment period (from D21PI to D28PI) allowed the goats to adapt to the new diet (from a diet based on the control pellets and the same hay that they will receive during the experiment). Then they received the “full” experimental diet.

On day 50 PI, after 22 days of distribution of the diets, half of the animals per group ($n = 5$ per treatment) were slaughtered by using 3.65 g of pentobarbital (Doléthol[®], 182.2 mg/ml, Vétoquinol S.A., Magny-Vernois, France) and the abomasa and small intestine were immediately collected for future worm counts.

On day 70 post-infection, after 42 days of distribution of the diets, all the remaining animals ($n = 5$ per treatment) were slaughtered according to the same procedure. The abomasa and small intestines were immediately collected for future worm counts.

The facilities hosting the animals and trial performance met the French ethical and welfare rules (agreement SSA N°115 of December 15, 2014). The experimental protocol was approved by an ethic comity (Number APAFIS#1276-2015072810353703 v2).

2.2.2 Methods

2.2.2.1 Parasitological monitoring

From D21PI, individual fecal samples were rectally collected and used to measure the fecal egg count (FEC), using a modified McMaster procedure (Raynaud, 1970). Data were expressed as eggs per gram of feces (EPG).

After each egg counting, fecal samples were gathered, according to experimental treatment, 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 worm specie.

At necropsy, the abomasum and the seven first meters of the small intestine were separated, tied, rapidly removed and then stored at -20°C for further adult worm counts. The worms were collected from the luminal contents. Worm counts were performed according to a 10% aliquot technique (MAFF, 1986).

To measure the female fertility, ten adult female *H. contortus* worms and ten adult female *T. colubriformis* worms, per animal, were conserved in 70 % alcohol for further analysis. Then, the *H. contortus* female worms of each goat were placed in Eppendorf® tubes and grounded with a rod to release the eggs from the uterus (Kloosterman et al., 1982). Thereafter, the tube was filled with 1 ml of water and the total number of eggs was determined based on a 10 % aliquot. Subsamples were placed under a microscope slide and the number of eggs was counted at 100 × magnification. For *T. colubriformis*, the females were observed directly, after cleaning with lacto phenol, under a microscope slide and the number of eggs were counted *in utero* at 100 × magnification.

2.2.2.2 Patho-physiological measurements

During the trial, individual blood samples were taken weekly by jugular venipuncture for determination of PCV, using a micro-hematocrit centrifuge and reader. At the same time, eye-mucosa was evaluated using the FAMACHA® chart (note from 1 to 5 (anemia)) (Bath and Van Wyk, 2009).

2.3 Statistical analyses

For the first experiment, the data on the total number of worms and the total number of the different stages of larvae (L3, early L4 and L4) were analyzed for each nematode species, first by using an analysis of variance (ANOVA) 1 on each date of necropsy. In a second step, a two-way ANOVA (factors: type of diet and length of distribution before infection) was applied on the total number of larvae and on the percentage of larval stages, in order to detect possible interactions between the experimental diet and the length of distribution. Before analysis, the number of worms were $\log(x+1)$ transformed and the percentage were transformed by $\text{ArcSin}\sqrt{n}$ in order to normalize the distribution of data. All analyses were performed using the SYSTAT[®] software.

For the second experiment, the data on FEC, FAMACHA[®] score, PCV, as well as the number of adult worms, the female fertility for each species and the percentage of larvae obtained after coproculture were analyzed by a two-way analysis of variance (factors: type of diet and length of distribution). Before analysis, the FEC, the FAMACHA[®] scores and the number of adult worms were transformed by $\log(x+1)$ in order to normalize the distribution. All analyses were performed first in repeated data (in 4 periods: D0 to D28, D28 to D70, D28 to D50 and D50 to D70) and in a second step date by date, using the SYSTAT[®] software.

Differences were considered significant at $P < 0.05$, and a trend was considered when $P < 0.10$.

3. Results

3.1 Experiment 1: Effect of tannin diets and length of distribution on the establishment of third-stage infective larvae populations

3.1.1 *Haemonchus contortus* (Table 3 and Figure 3)

- Total number of larvae (Table 3)

Overall there was no difference in the mean number of *H. contortus* between the 2 dates of necropsy (hence according to the 2 different length of distribution).

On the first date of necropsy, results of the ANOVA 1 revealed a trend ($P < 0.07$) in the number of L3 and a significant difference in the number of early L4 (EL4) between the 3 feed groups. This corresponded to higher numbers of early stages (L3 and EL4) in the SC group compared to the S and C groups. However, no statistical difference was found between the 3 experimental groups in the total number of L4 and total *H. contortus*.

On the second date of necropsy, results of the ANOVA 1 suggested an overall reduction of the total number of *H. contortus* between the C group vs. the S group (reduction by - 70 %) and the SC group (- 72 %) when compared to control values ($P < 0.07$). No statistical differences were found for the L3 population, but a trend for the EL4 ($P < 0.10$), with lower values for animals in the C and S groups. Statistical values close to significance ($P = 0.054$) were found for the L4 number, with lower values for animals in the SC group.

The use of ANOVA 2 aimed at exploring possible interactions between the 2 factors: a) the type of diet (concentration of CT) and b) the length of distribution based on the raw data. The respective statistical values concerning the interaction between these 2 factors were respectively 0.063 for the total worm number, 0.09 for the total L3, 0.02 for the EL4 (higher percentage of EL4 in the necropsy n°2 for the animals of C and S groups and lower values in the necropsy n°2 for the animals in the SC group) and non-significant for the L4.

- Stage composition of the population (Table 3 and Figure 3)

The type of diet and length of distribution did not have any significant effect on the percentage of stages of larvae counted after necropsy for *H. contortus* ($P > 0.05$). Overall, the main stage on both dates was the L4 larvae (mean of 85% for the three groups). However, main differences were observed in the relative proportion between the L3/EL4 and L4 composition between the 3 experimental groups and the 2 dates of necropsy.

Such interactions focusing on the L4 were also underlined by the ANOVA 2 analyses applied on the transformed values of proportion of each stage for which a statistical trend for interactions was underlined for the % of L4.

3.1.2 *Trichostrongylus colubriformis* (Table 4 and Figure 4)

- Total number of larvae (Table 4)

Overall, a trend ($P < 0.1$) was observed suggesting differences in the mean total number of *T. colubriformis* established for the 2 dates of necropsy (= according to the 2 different lengths of distribution of the CT containing diets). However, the reductions in worm populations between date 1 and 2 of necropsy were similar for the 3 experimental groups (from - 23 % to -26 %).

Overall, the ANOVA 1 analyses did not show any significant effects between the experimental groups on both dates of necropsy for the total number of *T. colubriformis* and for the total number of the different stages. Overall, the main stage was the L4 larvae (mean of 82% between all groups).

- Stage composition of the population (Table 4 and Figure 4)

This lack of significant differences was confirmed by the ANOVA 2 analyses applied on the different stages. No significant differences according to the feed treatment, the length of distribution and for interactions were observed for both the raw data and the percentage of the different stages.

3.1.3 Blood packed cell volume

There was no statistical effect of the feed treatment and the length of distribution on the PCV values ($P > 0.05$). Overall, the animals with the lowest PCV values were the lambs fed with the sainfoin + chestnut, all along the experiment. However, all the PCV values remained above 35% during all the experiment.

3.2 Experiment 2: Effects of tannin diets on adult worm populations

3.2.1 Effect of the tannin concentration and length of distribution on parasitological data

- Fecal egg counts

Before the distribution of the different diets, there was no difference between treatment on the FEC results ($P > 0.05$) (D0 to D28). The same was observed from D28 to D70, from D28 to D50 and from D50 to D70. The date by date analysis of variance revealed no difference on any specific day. Compared to control values, the reductions in FEC varied from 11% to 55% (on D58) in the sainfoin group (mean reduction of 17%) and from 8% to 54% (on D71) in the sainfoin + hazelnut group (Fig. 5).

The length of distribution had no effect on the FEC values.

- Larval cultures

No differences between treatments were observed on the percentage of nematodes species recovered after larval cultures (on repeated data or date by date) (Table 5). Overall, there was no variability between treatments: *Haemonchus contortus* being the dominant specie (mean between 80 and 90% in the three groups).

- Number of adult worms and female fertility of *Haemonchus contortus*

The type of diet did not have any significant effect on the number of adult worms counted after necropsy for *H. contortus* (Table 6) ($P = 0.72$), whatever the date of necropsy. For the three groups, less adult worms were found in the slaughter n°2 than in the first one ($P > 0.05$).

The diet did not have any significant effect on the female fertility of *H. contortus* (Table 6) ($P = 0.11$), although the fertility was reduced by 14 % in the S group and 9 % in the SH group for *H. contortus* (compared to the control group).

- Number of adult worms and female fertility of *Trichostrongylus colubriformis*

The type of diet did not have any significant effect on the number of adult worms counted after necropsy for *T. colubriformis* (Table 7) ($P = 0.97$). For the three groups, less adult worms were found in the slaughter n°2 than in the first one. This resulted in a statistical trend to a lower parasitic burden in slaughter n°2 ($P = 0.07$).

In addition, the diet had a significant effect on the female fertility of *T. colubriformis* (Table 7) ($P < 0.05$): overall, the fertility was reduced by 11 % in the sainfoin group and 7 % in the sainfoin + hazelnut group (compared to the control group).

The length of distribution had a significant effect ($P < 0.05$) on the *T. colubriformis* fertility (+ 3.7% in the control group between the slaughter n°1 and the slaughter n°2; -16.1% in the S group and -13.1% in the SH group).

3.2.2 Effect of the tannin concentration and length of distribution on animal resilience and pathophysiological parameters

- Blood PCV

Before the start of the experimental diets, there was no statistical effect of the treatment on the PCV values ($P > 0.05$). Between D34 and D48, there was a significant effect of the diet on the PCV results ($P < 0.05$). Finally, between D55 and D69, the diet did not have significant effect on the PCV values.

The date by date analysis of variance revealed no statistical effect on any specific day.

The length of distribution did not have significant effect on the PCV values (Fig. 6).

▪ FAMACHA[®] score

Before the start of the experimental diets, there was a statistical trend to an effect of the treatment on the FAMACHA[®] score ($P = 0.05$) : animals in the sainfoin group had higher values than animal in the control group and animal in the sainfoin + hazelnut group. However, in the last day before the start of the experimental diet (on D27), there was no effect of the treatment ($P = 0.46$). Between D34 and D48, the diet had a significant effect on the FAMACHA[®] results ($P < 0.05$), with the highest values for the animals in the sainfoin group and the lowest values for the animals in the sainfoin + hazelnut group. Between D55 and D69, the diet did not have significant effect on the FAMACHA[®] scores. Finally, between D34 and D69, the diet had a significant effect on the FAMACHA[®] results ($P < 0.05$), with the highest values for the animals in the sainfoin group and the lowest values of animals in the sainfoin + hazelnut group.

The date by date analysis of variance revealed a statistical effect of the diet on D41 ($P < 0.05$) and D48 ($P < 0.05$) : the difference was explained by a difference between animals in the two tannin containing diet treatments (and not with the control group) ($P < 0.05$).

The length of distribution did not have any significant effect on the FAMACHA[®] score (Fig. 7).

4. Discussion

The aims of these 2 experiments composing this study were **1)** to confirm the effects of dehydrated pellets of sainfoin on 2 different key steps/stages in the nematode life cycle; **2)** to examine the role of 2 factors, namely the tannin concentration and the length of distribution to modulate these effects; **3)** to explore the hypothesis that the association between these 2 factors might show some synergistic effect on either the early phase of nematode parasitic development or on adult populations and **4)** to confirm possible differences in the AH effects depending on the nematode species. To the best of our knowledge, this is the first study with tannin-rich diets where the effect of tannin concentration and length of distribution were tested on different live stages and GINs species. The objective was to provide information to implement solutions based on dehydrated pellets for farmers facing multiresistant strains in their flock (Van Wyk et al., 1997).

Tannins-containing nutraceuticals have three main potential impacts on the GIN life cycle (Hoste et al., 2012; 2015): **1)** a lower establishment of the infective larvae (L3) in the host (Mupeyo et al., 2011); **2)** a lower excretion of nematode eggs by adult worms, due either to a lower female fertility or to a reduction in worm numbers (Costa-Júnior et al., 2014; Kommuru et al., 2015) and **3)** a lower development of eggs into L3 larvae (Shaik et al., 2006). However, the possible impact on the early phase of nematode development has rarely been examined in details.

1) To confirm the effects of dehydrated pellets of sainfoin on 2 different key steps/stages in the nematode life cycle

The first experiment suggested different results depending on the nematode species. For *T. colubriformis*, reductions from -16 % to -23 %, compared to control, were observed in the worm number on both dates of necropsy. However, these differences were non-significant. In addition, no difference in stage composition was noticed. For *H. contortus*, several trends in statistical differences were noticed by comparison to the control on the 2 dates of necropsy. To sum up, the results on the first date of necropsy (i.e. 5 days of consumption of the tannin containing feed before infection) showed a higher proportion of early stages (L3 and early L4) in the SC group suggesting some delay in the development of *H. contortus*. A previous *in vivo* study focusing on the exsheathment of the larvae (Brunet et al., 2007), comforted by results of several *in vitro* studies (Brunet et al., 2007; 2008; 2011), have suggested that the consumption of sainfoin and tannins was associated with a delay in this early process of nematode establishment in a dose-dependent manner. It is possible that the change in stage composition observed in the current study is a post pone effect of these early event. In contrast, on the second date (i.e. after 12 days of consumption of dehydrated pellets of sainfoin), the stage composition was similar between the 3 groups. One hypothesis was that we noticed a delay in the larvae development with 5 days of consumption and a difference on the number of larvae with 12 days but no effect on the larvae stages composition. On the other hand, substantial reductions by -70 % and -72 % ($P < 0.07$) in total worm number were measured. In previous studies in goats drenched with quebracho, around the time of infection and the establishment of third stage infective larvae (necropsy on day 12 after infection), decreases of -33 %, -70 % and -64 % were reported respectively for *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* (Paolini et al, 2003; Paolini et al, 2004). With sainfoin hay, in similar conditions, the reduction in *H. contortus* establishment was by -38 % (Paolini et al, 2004).

In the second experiment, the effect of the 2 same factors (concentration of tannins in the pellets and length of distribution) were measured on the 2 same nematode species, but the adult worm populations were the main target. Some reductions in FEC in goats fed tannins relative to control group approximated -50 % to -55 % on some dates, especially after the first necropsy (from D55 to D70). These values are similar to those mentioned in previous studies with goats fed sainfoin (Paolini et al., 2005) or receiving other tannin-rich plants, such as sericea lespedeza (Kommuru et al., 2015) or *Acacia mearnsii* (Costa-Júnior et al., 2014). However, in our study, no differences were obtained.

This lack of statistical difference in FEC was associated with a lack of difference between the 3 experimental groups for the PCV values and the FAMACHA index (Figures 6 and 7). This is in contrast with other studies performed with either sainfoin (Paolini et al., 2005) or with other resources such as sericea lespedeza (Terrill et al., 2007), when the consumption of bioactive forages was frequently associated with an improved host resilience and a reduced anemic status of the animal (Terrill et al., 2007; Hoste et al., 2015). However, an absence of effect has also been previously described in another study with pelleted sericea lespedeza (Kommuru et al., 2015). The mechanism by which the consumption of tannin-containing Legume contribute to improve the host resilience remains unclear.

Last, differences between the 3 experimental groups related to the worm count data also remain scarce and moderate. For *H. contortus*, no difference neither in the worm number nor in the female fertility was observed whatever the date of necropsy. For the intestinal specie, no difference in worm count and female fertility was assessed on date 1. On the second date of necropsy, a general reduction in the number of *T. colubriformis* was observed compared to date 1 but the same trend occurred in the 3 groups. No statistical differences were found between the 3 feeding regimes. In contrast, statistical differences were found between the values on fertility between control group and the 2 the tannin-containing groups ($P < 0.05$). However, considering the proportion of the 2 nematode species, it is doubtful that this decrease observed in the female fertility of *T. colubriformis* can explain by itself the reduction in FEC.

Overall, these results illustrate different impacts on adult worm populations (reduction in EPG and in the fertility of some female worms) and are in agreement with some previous observations illustrating the anthelmintic efficacy of sainfoin (Paolini et al., 2003; 2005; Heckendorn et al., 2006; 2007; Manolaraki et al., 2010) and also of other tannin-rich Legumes, such as sericea lespedeza (Shaik et al., 2006; Gujja et al., 2013; Costa-Júnior et al., 2014; Kommuru et al., 2015). Nevertheless, the lack of statistical differences between the S and SH groups compared to the C group makes the current results obtained in experiment 2 moderate compared to previous studies. This can probably be associated to the relatively low level of CT measured in the pellets of the 2 experimental groups

2) To examine the role of 2 factors, namely the tannin concentration in the feed and the length of distribution to modulate the AH effects

Although the two successive studies targeted two different stages of the same, abomasal and/or intestinal species, some of the current results obtained in both experiments support the first hypothesis :

the length of distribution of tannin-containing pellets might modulate the AH effects on both the early development of the parasitic stages and on some biological traits of adult worms.

In the experiment 1, results obtained after 5 days of consumption suggested that some disturbances can occur in the early development of *H. contortus* in the SC group. In contrast, results obtained after 12 days of impregnation of the digestive tract with bioactive tannins was related to consistent decreases ($P < 0.07$) in *H. contortus* worm numbers in both S and SC groups. In the experiment 2, the sole statistical difference observed concerned the decrease of the fertility of the female *T. colubriformis* on the second date of necropsy.

On the first date on necropsy in experiment 1, only minor differences were observed between the two levels of tannins in both experiments. In experiment 1, the tannin content in the diet SC was twice the values measured in the diet S. However, the sole difference between groups was on date 1 in the composition of the *H. contortus* whereas similar reduction was observed in *H. contortus* populations on date 2. One can wonder whether the 1.9 % of tannins in the S pellets was sufficient to achieve a maximum effect after 12 days of consumption.

In experiment 2, as previously discussed, the significant results were scares. This can probably be related to the level of tannins in the S pellets (namely 2.11 % of CTs), available at the time of experiment, which was relatively low, and to the minor difference achieved after incorporation of hazelnut peels in the SH groups (namely 2.76 in the SH group). The need to adjust iso-proteic feed in the formulation of the SH pellets including the hazelnut peels has led to lower the difference in tannin contents. The same reason explained the selection of alfalfa pellets (0.89 % of TCs in the C group), containing some flavonoids whose AH properties have yet been underlined by some *in vitro* previous studies (Bahuaud et al., 2006; Brunet and Hoste., 2006).

The **addition of industrial by-products** (namely hazelnut and chestnut peels) to sainfoin has been applied to increase the total content of tannins in the pellets, sometimes because of the lack of availability of sainfoin pellets with higher CT content. This solution has been previously used and contributed to increase the effect on adult worm populations (Girard et al., 2013). However, it is worth to underline that the nature of CTs in both hazelnut peels and chestnut peels differ from those in sainfoin. For example, CTs of hazelnut peels are mainly galloylated procyanidin (PC)-rich (80 % PCs vs 20 % of prodelphinidines (PDs)), in contrast with sainfoin, which is a PD-rich resource (70 % vs 30 % of PCs). Results confirming a role of the quality of CT (in particular the PD/PC ratio but also the mean degree of polymerization) in the AH activity have been accumulated recently (Li et al., 2010; Quijada et al., 2015; Hoste et al., 2016; Ramsay et al., 2016; Ropiak et al., 2016).

3) To explore the hypothesis that the association between these 2 factors might show some synergetic effect on either the early phase of nematode parasitic development or on adult populations

Because of the lack of effects due to the difference in tannin contents in pellets, it was difficult to obtain any results to illustrate such interaction.

4) To confirm possible differences in the AH effects depending on the nematode species

In contrast, we have confirmed differences **between intestinal and abomasal worm species** in the response to CTs (Hoste et al., 2016).

This variability might be related to species specific responses. Several previous *in vitro* studies (Paolini et al., 2003; 2004; Moreno-Gonzalo et al., 2013ab; Quijada et al, 2015) have illustrated the fact that infective larvae of *H. contortus* and *T. colubriformis* did not have the same response to a range of tannin containing extracts including sainfoin. In particular, in a recent study relying on the LEIA, Quijada et al. (2015) suggested that *H. contortus* larvae were overall more susceptible (they showed lower EC50 values) than *T. colubriformis*. *In vivo*, differences in the AH effects have been also frequently mentioned between intestinal or abomasal species (Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2003; 2005, Hoste et al, 2015). These *in vivo* differences might be explained by differences in CT bioavailability along the digestive tract and thus differences in worm exposure to tannins, but only a few studies have explored this hypothesis (Terrill et al., 1994; Desrues et al., 2015; Quijada et al, 2016).

We have also confirmed differences between life stage of nematodes, explained by specific features of each parasitic stage. Previous studies have shown that L3 larvae seem more susceptible to the effects of CTs than adult worms: a same sainfoin extract did inhibit the larval migration of *T. colubriformis* but not the mobility of adult worms (Paolini et al., 2004) and *in vivo*, sulla did induce of reduction of the establishment of L3 larvae whereas no effect was observed on adult worms (Tzamaloukas et al., 2005).

Conclusion

The present study confirms previous results obtained when feeding small ruminant with tannin-containing legumes, to control the GIN infections with one abomasal and one intestinal species. The use of pelleted bioactive feed with measurable and standardized tannin contents, besides to have interesting nutritional values (approximately 15% of crude protein for sainfoin), might reduce the nematode egg excretion and therefore the field contamination and reduce the establishment of larvae. These studies also highlight the complexity of use of nutraceuticals in farm, especially to determine and adjust the quantity of CTs to add in the diet.

The current results suggest that a minimal period of distribution is necessary to obtain a reduction of the establishment of the L3 larvae and to reduce the fertility of the female nematodes.

Further experiments are thus needed to better evaluate the minimum tannin-content (threshold) in the diet and the minimum length of distribution.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support of the French Agency for Research (ANRt) for the CIFRE PhD project 2013/1480 for Ms Elodie Gaudin and the INRA program GISA STREP. The help of Mr J.M. Delmas and his team for taking care of the animals is particularly acknowledged. The companies MG2MIX, which have produced the pellets, and Inov' Fruit, for supplying the hazelnut and chestnut peels, are also acknowledged.

References

- Andlauer, W., Fürst, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. Food Res. Int. 35, 171-176.
- 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 2014, 21-71.
- 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. Vet. Parasitol. 99, 205-219.

- Baermann, G., 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië, 57, 131-137.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz De Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. Parasitology 132, 545-554.
- Bath, G.F., Van Wyk, J.A., 2009. The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. Small Rumin. Res. 86, 6-13.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. J. Agric. Food Chem. 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. Parasitology 134, 1253-1262.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. Int. J. Parasitol. 38, 783-790.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. Parasitol. Int. 60, 419-424.
- Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S.F., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. Vet. Parasitol. 173, 157-160.
- Costa-Júnior, L.M., Costa, J.I., Lôbo, I.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. Vet. Parasitol. 205, 725-729.
- Crook, E.K., O'Brien, D.J., Howell, S.B., Storey, B.E., Whitley, N.C., Burke, J.M., Kaplan, R.M., 2016. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of *in vivo* and *in vitro* detection methods. Small. Rumin. Res., 143, 89-96.
- Desrues, O., Vargas-Magaña, J.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 hazel-nut peels be used to control gastrointestinal nematodes in goats? 11th International Goat Conference. Las Canarias, Sept 2012.
- Desrues, O., Peña-Espinoza, M., Hansen, T.V., Mueller-Harvey, I., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M., 2015. Anthelmintic effects of sainfoin against different cattle nematodes may be linked to concentration of condensed tannins in different gut compartments. 25th WAAVP conference. Liverpool, UK, August 2015.
- Desrues, O., Peña-Espinoza, M., Hansen, T.V., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M., 2016. Anti-parasitic activity of pelleted sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. Parasit. Vectors 9, 329.

- Douvres, F. W., 1957. The morphogenesis of the parasitic stages of *Trichostrongylus axei* and *Trichostrongylus colubriformis*, nematode parasites of cattle. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 24(1), 4-14.
- Gaudin, E., Simon, M., Quijada, J., Schelcher, F., Sutra, J-F., Lespine, A., Hoste, H., 2016. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. Vet. Parasitol. 227, 122-129.
- 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. In: 64th EAAP Nantes, 26th-30th August 2013, Page 506.
- 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. Vet. Parasitol. 191, 51-58.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lamb. Vet. Parasitol. 142, 293-300.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. Vet. Parasitol. 146, 123-134.
- Hoste, H., Martínez-Ortíz-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 infection. Vet. Parasitol. 186, 18-27.
- 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.
- 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. Chapter seven – Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. Adv. Parasit., 93, 239-351.
- Jackson, F., Varady, M., Bartley, D.J., 2012. Managing anthelmintic resistance in goats-can we learn lessons from sheep ? Small Rumin. Res. 103, 3-9.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. Vet. Parasitol. 186, 70-78.
- Kloosterman, A., Parmentier, H.K., Ploeger, H.W., 1982. Breeding cattle and sheep for resistance to gastrointestinal nematodes. Parasitology Today 8, 330-335.

- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Parasitol.* 205, 170-175.
- Li, C., Leverage, R., Trombley, J.D., Xu, S., Yang, J., Tian, Y., Reed, J.D., Hagerman, A.E., 2010. High molecular weight persimmon (*Diospyros kaki* L.) proanthocyanidin: a highly galloylated, A-linked tannin with an unusual flavonol terminal unit, myricetin. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9033–9042.
- MAFF, 1986. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- 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.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste H., I. Ferre, I. 2013a. *In vitro* effect of heather extracts on *Trichostrongylus colubriformis* eggs, larvae and adults. *Vet. Parasitol.* 197, 586-594.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I., 2013b. *In vitro* effect of heather (*Ericaceae*) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 197, 235-243.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Cell. Mol. Biol. Plants.* 1, 151-217.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2010–2037.
- Mupeyo, B.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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164, 8–20.
- Paolini, V., Frayssines, A., De-La-Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.* 34, 331-339.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, 129, 69-77.
- Paolini, V., De-La-Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 277-283.
- Paraud, C., Kulo, A., Pors, I., Chartier, C., 2009. Resistance of goat nematodes to multiple anthelmintics on a farm in France. *Vet. Rec.* 164, 563–564.
- Paraud, C., Marcotty, T., Lespine, A., Sutra, JF., Pors, I., Devos, I., 2016. Cross-resistance to moxidectine and ivermectine on a meat sheep farm in France. *Vet. Parasitol.* 226, 88-92.

- Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S.M., Demeler, J., Enemark, H.L., 2014. Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Vet. Parasitol.* 206, 208-215.
- Quijada, J., Fryganas, 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. *J. Agric. Food. Chem.* 63, 6346-6354.
- Quijada, J., Drake, C., Gaudin, E., El-Korso, R., Hoste H., Mueller-Harvey, I., 2016. Condensed tannin changes along the digestive tract in lambs fed with sainfoin pellets or hazelnut skins. Submitted to *Vet. Research*.
- Ramsay, A., Williams, A.R., Thamsborg, S.M., Mueller-Harvey, I., 2016. Galloylated proanthocyanidins from shea (*Vitellaria paradoxa*) meal have potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. *Phytochem.* 122, 146-153.
- Raynaud, J.P., 1970. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le controle des infestations parasitaires des bovins, ovins, equins et porcins. *Annales de Parasitologie (Paris)*, 45, 321-342.
- Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., 2016. Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *J. Pharmal. Biomed. Anal.* 121, 225-231.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. Sericea lespedeza hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150-157.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. The epidemiology of parasitic diseases. In: *Veterinary Parasitology (3rd Edition)*, Blackwell (Ed.), Oxford, pp. 764-769.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., Mc Nabb, W.C., Barry, T.N., 1994. Assay and digestion of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition*, 72, 467-477.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117-122.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2009. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: Dose titration study. *Vet. Parasitol.* 163, 52-56.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *Int. J. Parasitol.* 35, 329-335.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111-122.

Werne, S., Perler, E., Maurer, V., Probst, J.K., Hoste, H., Drewek, A., Heckendorn, F., 2013. Effet of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and faba bean (*Vicia faba*) on the periparturient rise in ewes infected with gastrointestinal nematodes. *Small Ruminant Res.* 113, 454-460.

Figure captions

Fig. 1 Experimental schedule of the experiment performed on L3 larvae (Three different diets : 1 = sainfoin + chestnut (SC) group; 2 = sainfoin (S) group; 3 = control (C) group and two length of distribution before infection : 5 days or 12 days).

Fig. 2 Experimental schedule of the experiment performed on adult worm populations (Three different diets : control ; sainfoin ; sainfoin + hazelnut and two length of distribution after infection : 22 days or 42 days).

Fig. 3 The effect of feeding sainfoin; sainfoin + chestnut or control pellets on the stage of larvae of *H. contortus* counted after the necropsies (percentage of larvae $\pm$ S.E.M.) of parasitized lambs.

Fig. 4 The effect of feeding sainfoin; sainfoin + chestnut or control pellets on the stage of larvae of *T. colubriformis* counted after the necropsies (percentage of larvae $\pm$ S.E.M.) of parasitized lambs.

Fig. 5 The effect of feeding sainfoin; sainfoin + hazelnut or lucerne pellets on eggs per gram (EPG $\pm$ S.E.M.) of feces from parasitized goats.

Fig. 6 The effect of feeding sainfoin; sainfoin + hazelnut or lucerne pellets on blood packed cell volume (PCV $\pm$ S.E.M.) of parasitized goats.

Fig. 7 The effect of feeding sainfoin; sainfoin + hazelnut or lucerne pellets on the FAMACHA[®] score (PCV $\pm$ S.E.M.) of parasitized goats.

Figures

Figure 1

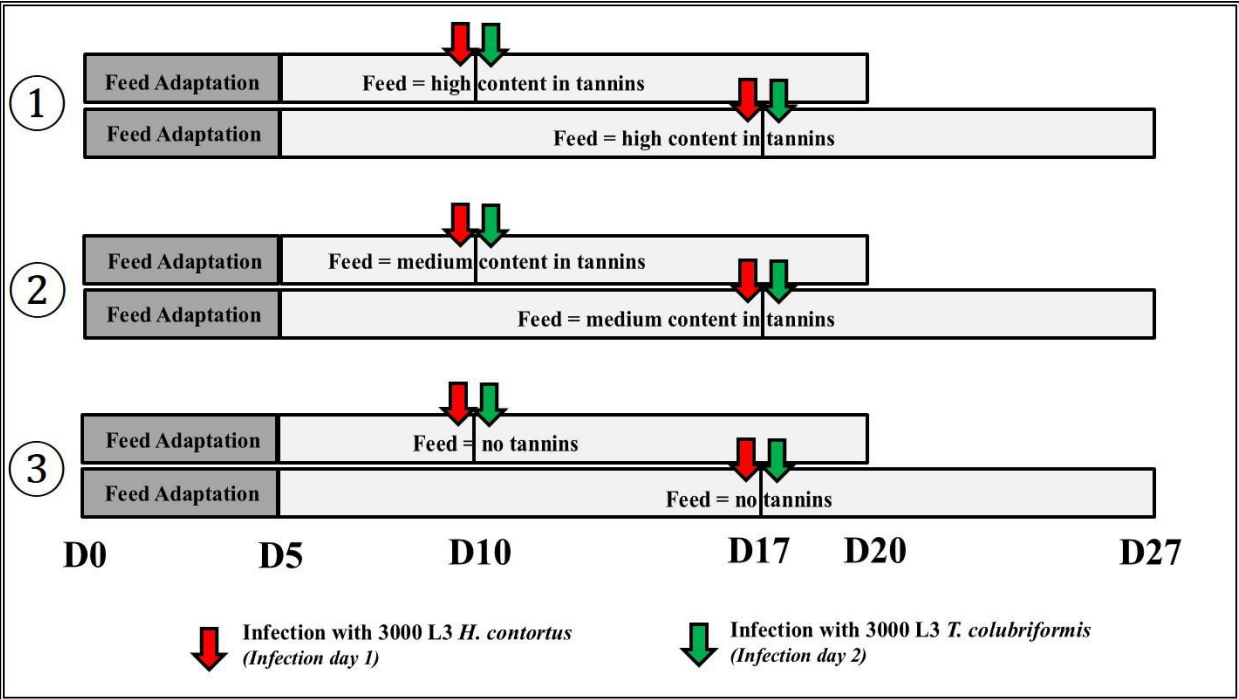


Figure 2

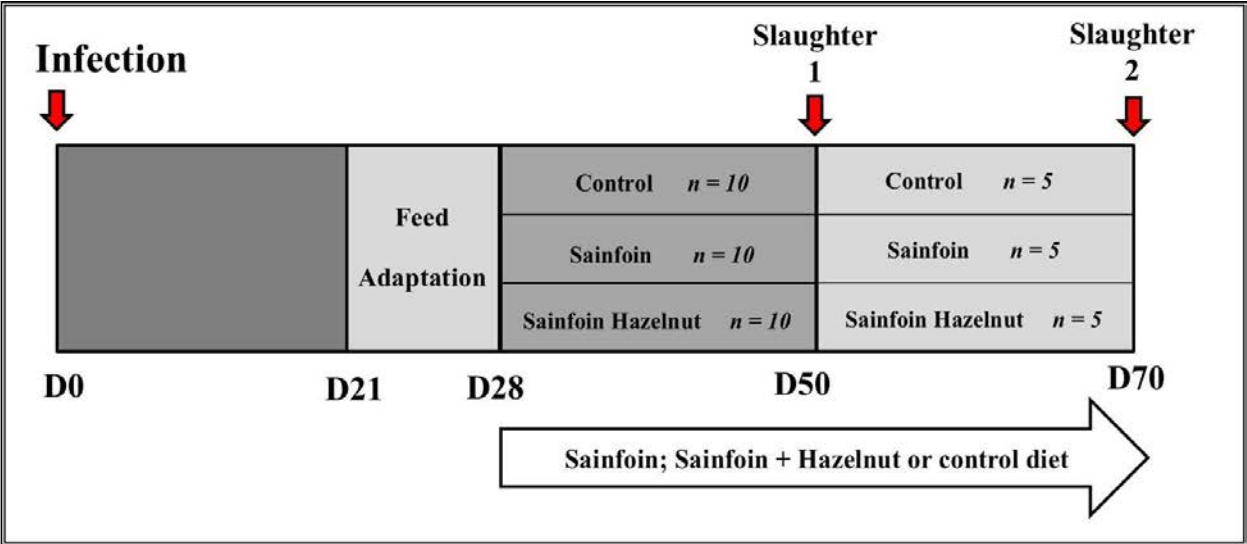


Figure 3

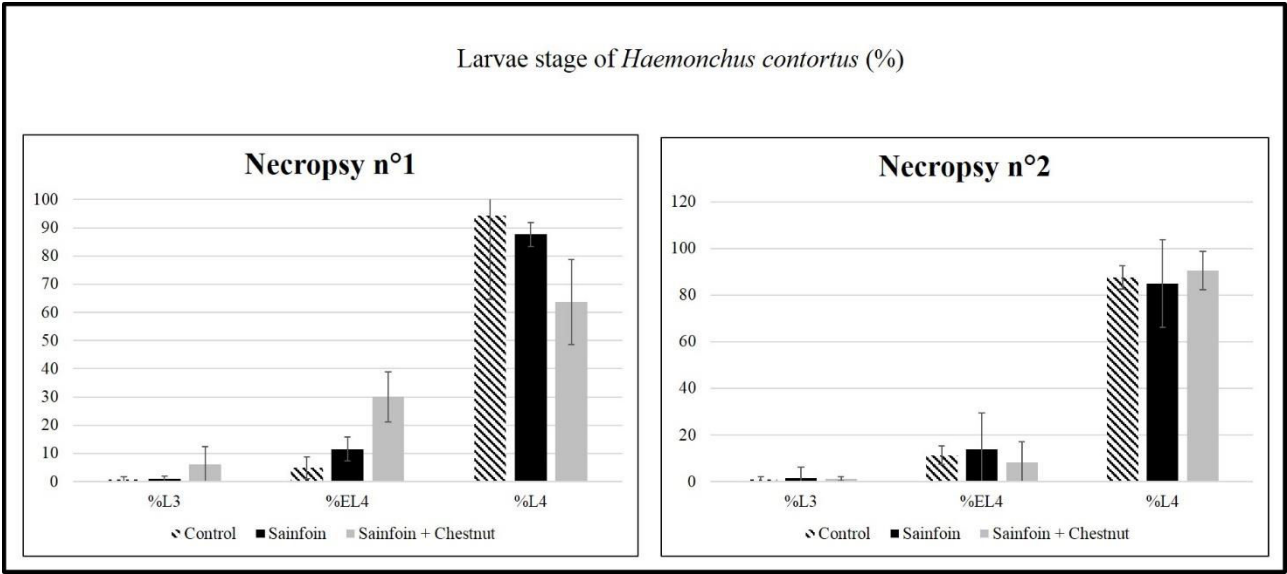


Figure 4

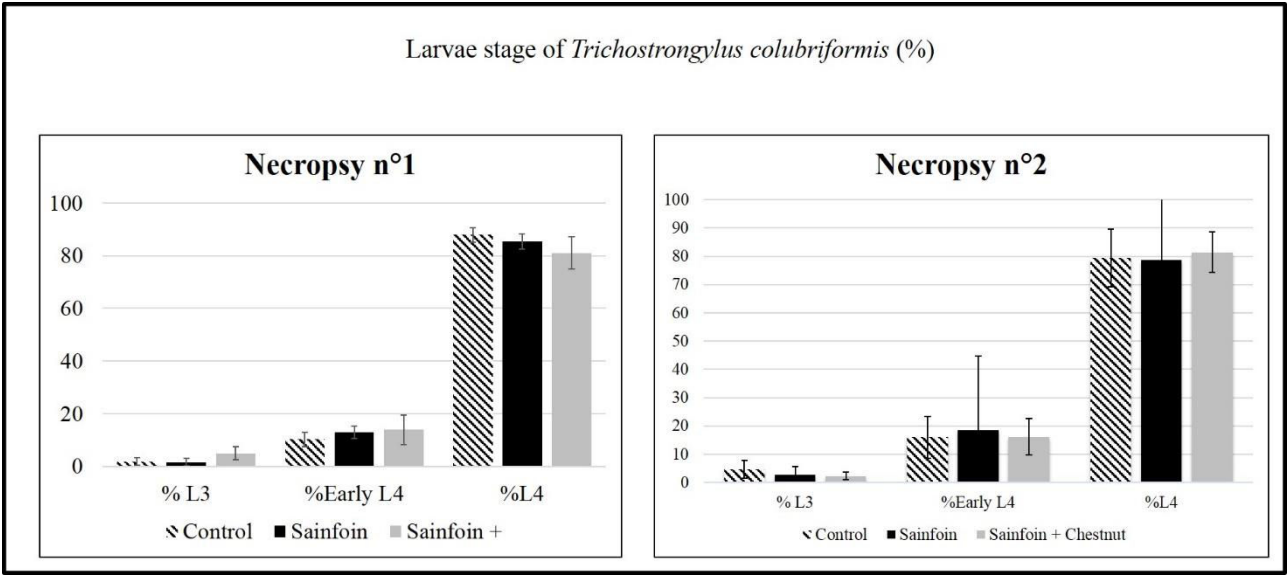


Figure 5

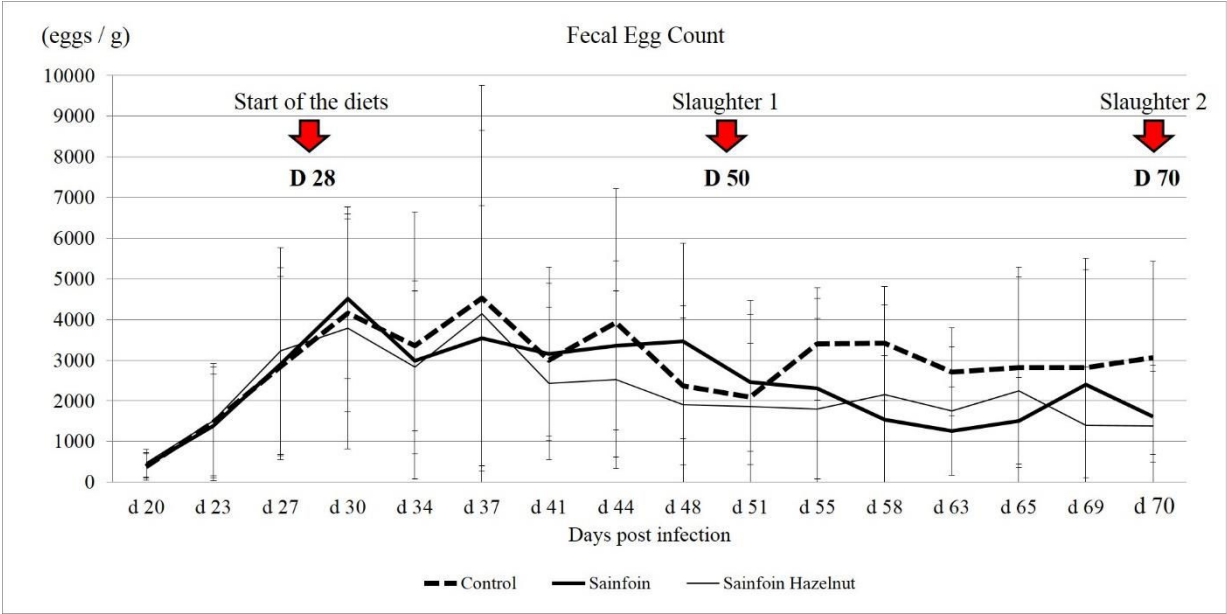


Figure 6

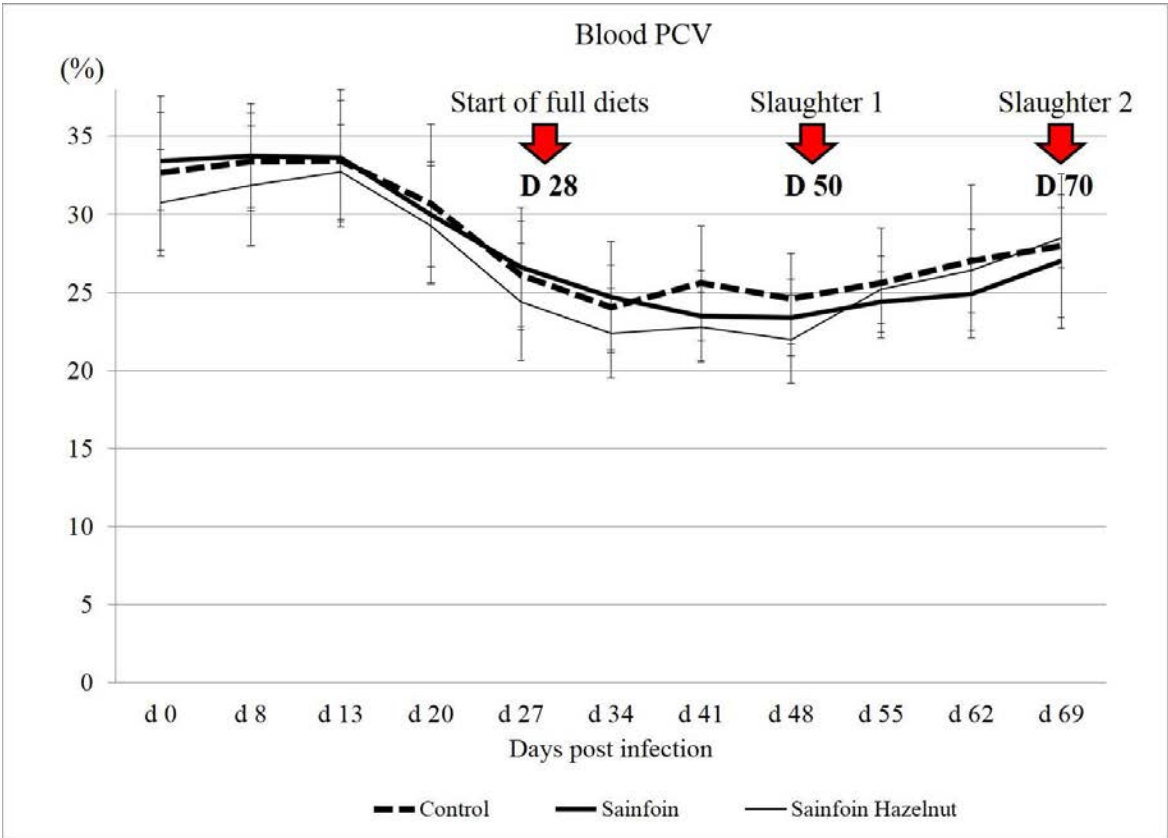
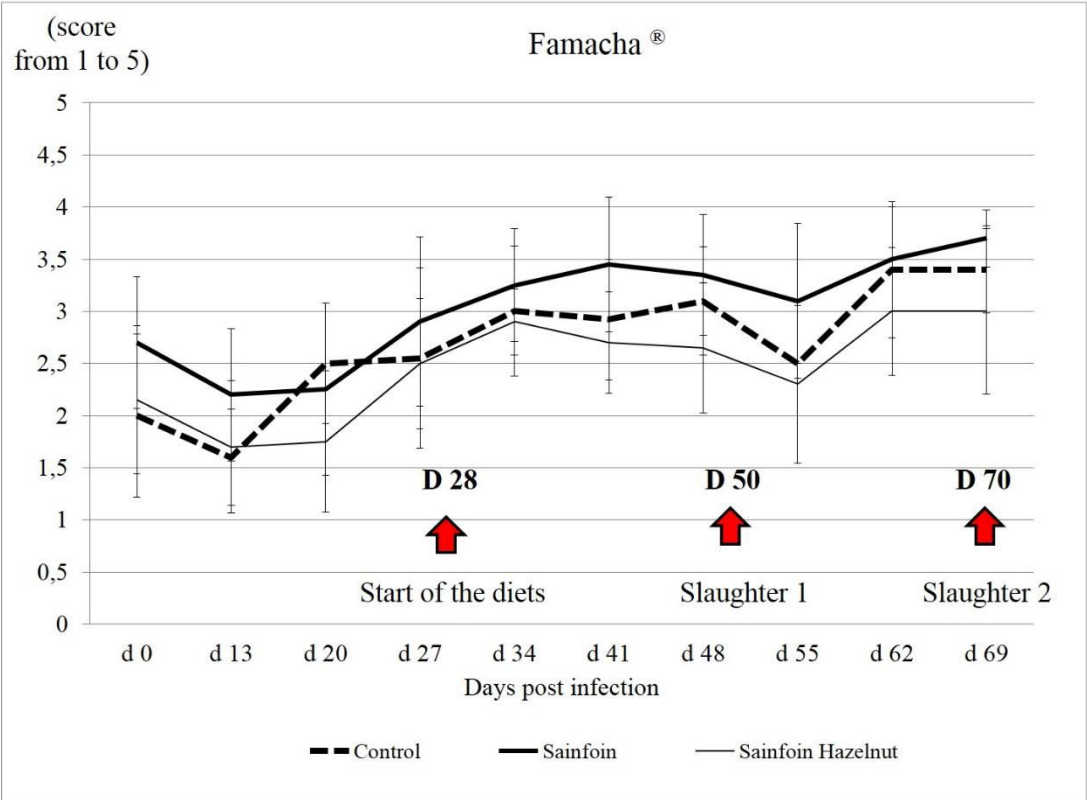


Figure 7



Tables

Table 1: Chemical compositions of the dietary treatments of the experiment on infective larvae, performed on lambs. The different superscripts indicate the methods used and the number of the method according to the French feed analysis system. C = control group ; S = sainfoin group ; SC = sainfoin + chestnut group.

	Dietary treatment		
	C	S	SC
Dried Matter ^a , g/kg of product	886.00	904.00	870.00
Crude Protein ^b , g/kg of product	152.00	131.00	146.00
Total tannin (% of tannic acid) ^c	0.00	1.90	5.00

^a Matter dried at 103°C

^b Kjeldahl method (NF EN ISO 5983-2)

^c Folin-Ciocalteu method

Table 2: Chemical compositions of the three dietary treatments of the experiment on adult worms, performed on adult goats. The different superscript indicate the methods used and the number of the method according to the French feed analysis system. C = control (lucerne) group ; S = sainfoin group ; SH = sainfoin + hazelnut group.

	Dietary treatment		
	C	S	SH
Dried Matter ^a , g/kg of product	907.00	890.00	888.00
Crude Protein ^b , g/kg of product	145.80	152.70	153.30
Crude fat ^c , g/kg of product	20.90	25.20	42.40
Cellulose ^d , g/kg of product	215.60	153.80	159.60
Total tannin (% of tannic acid) ^e	0.89	2.11	2.76

^a Matter dried at 103°C

^b Kjeldahl method (NF EN ISO 5983-2)

^c NF V18-104

^d NF V03-40

^e Folin-Ciocalteu method

Table 3: The effect of feeding sainfoin; sainfoin + chestnut or control pellets on L3 larvae (Number of larvae $\pm$ S.E.M.), and stage of larvae of *Haemonchus contortus* of parasitized lambs. Results of the two-way analysis of variance. The lack of any superscript means Non Significant differences. *a*, *b*, *e*, *f*, *g*, *h*, *i*, *j* mean a trend for statistical difference ($P < 0.1$) and *c* and *d* mean statistical difference ($P < 0.05$).

Larvae number and stage								
	Slaughter 1				Slaughter 2			
	<i>L3</i>	<i>Early</i> <i>L4</i>	<i>L4</i>	<i>Total</i>	<i>L3</i>	<i>Early</i> <i>L4</i>	<i>L4</i>	<i>Total</i>
Control	2.5 ^a ± 5.0	15.0 ^c ± 5.8	290.0 ± 167.9	307.5 $\pm$ 127.5	6.0 ± 8.9	68.0 ^e ± 49.2	526.0 ^g ± 354.2	600.0 $\pm$ 316.0 ⁱ
Sainfoin	4.3 ^a ± 5.0	51.4 ^c ± 20.6	392.9 ± 127.7	448.6 $\pm$ 102.5	2.5 ± 5.0	25.0 ^f ± 37.9	155.0 ^h ± 91.5	182.5 $\pm$ 57.5 ^j
Sainfoin + Chestnut	40.0 ^b ± 39.2	195.0 ^d ± 119.6	412.5 ± 340.5	647.5 $\pm$ 357.5	2.0 ± 4.5	14.0 ^f ± 16.7	152.0 ^h ± 164.5	168.0 $\pm$ 154.0 ^j
Mean	16.0 ± 27.8	87.0 ± 106.6	365.0 ± 221.9	410.0 $\pm$ 312.3	4.0 ± 6.3	36.0 ± 42.2	278.0 ± 288.4	326.4 $\pm$ 322.9

Table 4: The effect of feeding sainfoin; sainfoin + chestnut or control pellets on L3 larvae (Number of larvae $\pm$ S.E.M.), and stage of larvae of *Trichostrongylus colubriformis* of parasitized lambs. Results of the two-way analysis of variance. The lack of any superscript means Non Significant differences.

Larvae number and stage								
	Slaughter 1				Slaughter 2			
	<i>L3</i>	<i>Early L4</i>	<i>L4</i>	<i>Total</i>	<i>L3</i>	<i>Early L4</i>	<i>L4</i>	<i>Total</i>
Control	18.0 ± 13.6	98.0 ± 29.6	842.0 ± 13.6	958.0 $\pm$ 25.6	34.0 ± 28.8	118.0 ± 66.4	586.0 ± 95.2	738.0 $\pm$ 129.6
Sainfoin	12.0 ± 10.4	96.0 ± 20.8	630.0 ± 100.0	738.0 $\pm$ 114.4	16.0 ± 19.2	106.0 ± 61.6	448.0 ± 237.6	570.0 $\pm$ 300.0
Sainfoin + Chestnut	40.0 ± 20.0	112.0 ± 66.4	652.0 ± 114.4	804.0 $\pm$ 188.8	14.0 ± 8.58	96.0 ± 59.2	484.0 ± 135.2	594.0 $\pm$ 162.0
Mean	23.3 $\pm$ 17.3	102.0 $\pm$ 38.4	708.0 $\pm$ 115.7	833.3 $\pm$ 175.2	21.3 $\pm$ 19.1	106.7 $\pm$ 6	506.0 $\pm$ 157.6	634.0 $\pm$ 274.9

Table 5: The effect of feeding sainfoin; sainfoin + hazelnut or control (lucerne) pellets on percentage of *H. contortus* (% larvae of the species / total of L3 larvae recovered after larval culture) (% of *H. contortus* and *T. colubriformis* $\pm$ S.E.M.). Results of the two-way analysis of variance. The lack of any superscript means Non Significant differences.

	Control		Sainfoin		Sainfoin + Hazelnut	
	% <i>H. contortus</i>	% <i>T. colubriformis</i>	% <i>H. contortus</i>	% <i>T. colubriformis</i>	% <i>H. contortus</i>	% <i>T. colubriformis</i>
D27	72	28	95	5	88	12
D34	97	3	94	6	98	2
D41	81	19	87	13	91	9
D48	89	11	96	4	88	12
D55	90	10	85	15	96	4
D62	90	10	89	11	93	7
D69	88	12	88	12	93	7
Mean	87 $\pm$ 5.8	13 $\pm$ 5.8	91 $\pm$ 3.8	9 $\pm$ 3.8	92 $\pm$ 2.9	8 $\pm$ 2.9

Table 6: The effect of feeding sainfoin; sainfoin + hazelnut or control (lucerne) pellets on adult worms (Number of worms $\pm$ S.E.M.), and female fertility (Number of eggs per female $\pm$ S.E.M.) of *Haemonchus contortus* of parasitized goats. Results of the two-way analysis of variance. The lack of any superscript means Non Significant differences.

	Worm number		Female fertility	
	<i>Slaughter 1</i>	<i>Slaughter 2</i>	<i>Slaughter 1</i>	<i>Slaughter 2</i>
Control	770 $\pm$ 353	588 $\pm$ 389	153 $\pm$ 42	163 $\pm$ 77
Sainfoin	746 $\pm$ 591	620 $\pm$ 384	139 $\pm$ 51	138 $\pm$ 32
Sainfoin + Hazelnut	887 $\pm$ 216	889 $\pm$ 609	145 $\pm$ 32	145 $\pm$ 54
Mean	791 $\pm$ 428	699 $\pm$ 501	144 $\pm$ 42	149 $\pm$ 54

Table 7: The effect of feeding sainfoin; sainfoin + hazelnut or control pellets on adult worms (Number of worms $\pm$ S.E.M.), and female fertility (Number of eggs per female $\pm$ S.E.M.) of *Trichostrongylus colubriformis* of parasitized goats. Results of the two-way analysis of variance. The lack of any superscript means Non Significant differences. *a* and *b* mean a trend for statistical difference ($P < 0.1$) and *c* and *d* mean statistical difference ($P < 0.05$).

	Worm number		Female fertility	
	<i>Slaughter 1</i>	<i>Slaughter 2</i>	<i>Slaughter 1</i>	<i>Slaughter 2</i>
Control	1537 $\pm$ 579 ^a	956 $\pm$ 696 ^b	27.0 $\pm$ 5.2	27.9 $\pm$ 6.9 ^c
Sainfoin	1137 $\pm$ 344 ^a	786 $\pm$ 162 ^b	27.2 $\pm$ 5.3	22.6 $\pm$ 5.3 ^d
Sainfoin + Hazelnut	1346 $\pm$ 606 ^a	862 $\pm$ 327 ^b	28.5 $\pm$ 4.6	23.0 $\pm$ 3.6 ^d
Mean	1339 $\pm$ 530	868 $\pm$ 399	27.5 $\pm$ 5.1	24.3 $\pm$ 5.3

Article 3 : Etude *in vitro* et *in vivo* de l'interaction entre un anthelminthique de synthèse et les tanins condensés

La diffusion généralisée à travers le monde de résistances aux anthelminthiques (AHs) de synthèse chez les nématodes gastro-intestinaux impose d'explorer de nouveaux modes de lutte. Parmi ces nouvelles méthodes, l'utilisation de nutricaments riches en tanins semble être une option intéressante pour remplacer (ou limiter) l'utilisation excessive des traitements chimiques. Les objectifs de cette étude ont été de tester l'efficacité anthelminthique de granulés de sainfoin contre une souche d'*Haemonchus contortus* multi-résistante aux AHs, chez des agneaux infestés expérimentalement, et d'examiner l'éventuelle interaction entre un AH de synthèse (ivermectine par voie orale) et une ressource riche en tanins condensés (TCs).

L'étude *in vivo* a été réalisée avec vingt-quatre agneaux, inoculés à J0 avec des larves infestantes d'*H. contortus*. A J21 post-infestation, les agneaux ont reçu soit des granulés de sainfoin (3.5 % de TCs), soit des granulés de luzerne (0 % de TCs). A J39, la moitié des agneaux de chaque groupe a reçu 0.25 ml/kg d'un traitement d'ivermectine par voie orale. A J47, les animaux ont été autopsiés afin de compter les vers adultes.

La consommation de sainfoin a été associée à des valeurs plus élevées d'hématocrite ($P < 0.05$) et une réduction du nombre d'œufs par gramme (OPGs) de fèces ($P < 0.05$). Sur toute la période où les régimes alimentaires étaient en place, les OPGs ont été réduits de 50% dans le groupe sainfoin, comparé au groupe témoin. Le régime n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de vers mais le sainfoin a réduit la fertilité des vers femelles ($P < 0.05$).

Les concentrations d'ivermectine dans le plasma ont été réduites chez les animaux nourris au sainfoin vs. contrôle, ce qui a été associé à une réduction de l'efficacité de l'ivermectine.

In vitro, des échantillons contenant des TCs (sainfoin, noisette ou un mélange des deux, 50/50, w/w) ont été incubés avec de l'ivermectine dans du jus de rumen. Le dosage des échantillons par HPLC a montré une chélation de l'ivermectine par les tanins. Ceci suggère que les tanins réduisent l'absorption intestinale de l'ivermectine, affectant ainsi la bio-disponibilité du médicament dans le plasma et donc son efficacité.

Les nutricaments contenant des tanins affectent la biologie des nématodes multi-résistants aux AHs, représentant ainsi une option pour leur contrôle durable. Les interactions *in vitro* et *in vivo* entre les nutricaments et les AHs de synthèse imposent d'être vigilant lors de l'association d'un régime riche en TCs avec un traitement d'ivermectine administrée oralement). Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier les mécanismes à l'origine de telles interactions.



Research paper

Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control



Elodie Gaudin^{a,b,*}, Margaux Simon^a, Jessica Quijada^a, François Schelcher^a, Jean-François Sutra^c, Anne Lespine^c, Hervé Hoste^{a,b}

^a IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France

^b MG 2 MIX, La basse haye, 35220 Châteaubourg, France

^c Toxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2016

Received in revised form 21 July 2016

Accepted 1 August 2016

Keywords:

Sainfoin pellets

Gastrointestinal nematodes

Anthelmintic resistance

Ivermectin

H. contortus

ABSTRACT

The worldwide spread of resistance to anthelmintic (AH) drugs in gastrointestinal nematodes (GINs) imposes to explore alternative solutions. Amongst those, the possible use of tannin-containing nutraceuticals appears as a relevant option to replace (or decrease the frequency of) chemical-based treatments. Our objectives were to test the AH efficacy of sainfoin pellets against a multiresistant strain of *Haemonchus contortus* in experimentally infected lambs and to examine possible interaction between ivermectin (IVM) and condensed tannins (CT)-rich resource.

In vivo study was performed with twenty-four lambs were inoculated (Day 0) with multiresistant *H. contortus* infective larvae. On D21 Post-Infection, the lambs were assigned to two dietary treatments (sainfoin vs lucerne control pellets). On D39, half of the animals per group received 0.25 ml/kg of an oral ivermectin treatment. On D47, animals were slaughtered to count worms. The consumption of sainfoin was associated with higher packed cell volume (PCV) values ($P < 0.05$) and reduced faecal egg counts (FECs) ($P < 0.05$). For the experimental feeding period, FECs were overall reduced by 50% in the sainfoin group. The diet did not have significant effect on the worm number but sainfoin significantly reduced female fertility. Decrease in plasma IVM concentrations was observed in the sainfoin-fed animals and was associated with a decrease of IVM efficiency when compared with the control group. Incubating tannin *in vitro* with ivermectin and rumen fluid showed a blocking of ivermectin by the tannins. This suggests that tannins lower the IVM intestinal absorption compromising thereby drug plasma bioavailability and efficacy.

Tannin-containing nutraceuticals alter the biology of multiresistant nematodes, thus representing an option for their sustainable control. *In vivo* and *in vitro* interactions between nutraceuticals and chemicals impose caution when both tannin-rich diet and drug-based treatments are combined. Further studies are required to clarify the mechanisms that support such interactions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Gastrointestinal nematodes (GIN) are a major constraint in small ruminants' production, because of the consequences on production losses, such as poor growth rates, reduction in milk production and animal health and welfare (Taylor et al., 2007). For more than 50 years, synthetic anthelmintics (AH) have been the cornerstone

to control these parasitic diseases in sheep and goats. However, this quasi exclusive reliance on commercial molecules is nowadays challenged, because i) of the increasing societal demand to reduce the use of chemical compounds in agriculture and livestock breeding, and ii) of the constant development and diffusion of resistance to AHs in GIN populations especially in small ruminants.

Resistances to the main, wide spectrum, AH families are nowadays worldwide spread (Hughes et al., 2007; Jackson et al., 2012; Kaplan and Vidyashankar, 2012; Peña-Espinoza et al., 2014). The rapid development of resistance in GIN populations to synthetic molecules (Waller, 2006) has recently been illustrated with monopantel, a representative of amino acetyl derivatives, a new class of

* Corresponding author at: IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France.

E-mail addresses: egaudin@envt.fr, egaudin@mg2mix.fr (E. Gaudin).

anthelmintics (Kaminsky et al., 2008) for which cases of resistance have yet been described after a few years of commercialization (Scott et al., 2013; Van-den-Brom et al., 2015). In addition, as predicted by Van Wyk et al., 1997; the multiplication of multiresistant strains, in particular *Haemonchus contortus*, indeed make impossible the control of GINs in some farms (Van Wyk et al., 1997; Chandrawathani et al., 2004; Cezar et al., 2010). This situation has led to a strong impetus to find alternatives to control GIN infections in sheep or goats breeding.

Forages containing condensed tannins (CT) with AH properties represent one of the novel promising option. The tannins are polyphenolic compounds, contained in various parts of the plant, belonging to the flavonoid groups (Mueller-Harvey and McAllan, 1992). Several *in vitro* results have been obtained with extracts of tanniferous legumes. Also *in vivo* trials with *Sericea lespedeza* or sainfoin used as nutraceuticals (see Hoste et al., 2012, 2015) have confirmed these antiparasitic effects. In addition, by-products of the human food industry with high-tannin contents, (e.g. hazelnut skins, carob) have also shown results in this novel mode of control of nematodes (Girard et al., 2013; Arroyo-Lopez et al., 2014).

To improve the conservation and stability of CT-rich forages, and to export this kind of plant, industry has focused on the possible dehydration (Terrill et al., 2007; Wolfe et al., 2008; Girard et al., 2013; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015). Studies performed with *Sericea lespedeza* or sainfoin pellets reported promising results against *Haemonchus contortus* infections, especially by reducing faecal eggs count (FEC) (Girard et al., 2013; Kommuru et al., 2015) and improving the host resilience [e.g. higher blood packed cell volume (PCV) (Terrill et al., 2007; Hoste et al., 2015)].

Most of the previous results have been obtained on susceptible strains of GINs. In contrast, only a few *in vitro* (Whitney et al., 2011; Naumann et al., 2014) or *in vivo* studies (Whitney et al., 2013) have clearly stated that they were been conducted with resistant strains. Moreover, results on the effects of CT resources on multiresistant strains are missing, despite the potential on-farm impact to provide solutions to farmers facing these situations.

On the other hand, information remains also very limited on the interactions between CT containing resources and synthetic AHs which might be also a way to improve the control of resistant strains of GINs. The occurrence of interactions between ruminant nutrition (quantitative aspects) and the efficacy of AHs has been previously demonstrated (Hennessy, 1993, 1997). In contrast, the possible effect of the diet quality, (e.g. presence of plant secondary metabolites (PSMs), in particular tannins), on the efficacy of synthetic commercialized AH has been scarcely explored. Recent studies have examined the interactions between the consumption of *Juniperus pinchotti* and the efficacy of ivermectin (IVM). The results suggest a potentialisation (synergy) between the IVM treatment and the diet (Armstrong et al., 2013; Whitney et al., 2013).

The general objective of the current study was to explore the effects of CT containing resources against a multiresistant strain of *Haemonchus contortus* and to explore the effects when combined with a synthetic AH drug. These objectives were defined because of the need to provide data to explore integrated approaches combining non-chemical mode of control associated with synthetic AH in case of multiresistance strains in sheep and goat farming systems.

The specific objectives of the current study can be described as followed:

- 1) An *in vivo* study was performed i) to examine the anthelmintic efficacy of CT containing resource (sainfoin) against a multiresistant strain of *Haemonchus contortus*; ii) to examine the interactions between the same CT-rich resource with a chemical AH (oral ivermectin).
- 2) A complementary *in vitro* assay aimed i) at confirming the results of the *in vivo* study and ii) at further analyzing the interactions

between CT-rich resources and ivermectin, by including tannin containing resources differing in the quality of tannins (either rich in prodelphinidins (PDs) (sainfoin), or in procyanidins (PCs) (hazelnut skins).

2. Materials and methods

2.1. In vivo assay

2.1.1. Experimental design and protocol

A 7-week feeding trial was composed of twenty-four 2-month-old lambs (Lacaune breed) at the start of the assay. The lambs were reared indoors under conditions that excluded nematode infection. A control by egg counting was performed on arrival with negative results. On D0, the lambs received a single dose of 3400 third stage larvae of a resistant strain of *H. contortus* (White River, South African isolate, resistant to benzimidazoles, ivermectin and rafoxanide) (Van Wyk et al., 1987; Riou et al., 2003). One day after the infection, all animals were treated with diclazuril (Vecoxan®, 2.5 mg/ml, Lilly-France, Neuilly-Sur-Seine, France) to control coccidia. Three weeks (D21) after the infection, the lambs were stratified by FEC, body weight (BW) and PCV and assigned to two experimental dietary treatments ($n = 12$ per treatment), which consisted of 100% sainfoin pellets (7 kg per day) (=S group) or 100% lucerne pellets (7 kg per day) (=C group). According to these concentrate part of the diet, the two diets were isoproteic. In addition, the two groups received hay ad libitum each day and have free access to water. From day 21 to day 28, a period permitted animals to adapt progressively to the new diet. On day 39 post-infection, half the animals per group ($n = 6$ per treatment) received an oral ivermectin treatment (Oramec®, 0.8 mg/ml and dose rate of 0.2 mg/kg of body weight, Merial, Lyon, France). On day 47 post-infection, all lambs were slaughtered by using 3.65 g of pentobarbital (Doléthol®, 182.2 mg/ml, Vétoquinol S.A., Magny-Vernois, France) and the abomasa were immediately collected (Fig. 1).

The facilities hosting the animals and trial performance met the French ethical and welfare rules (agreement SSA N°115 of December 15, 2014).

2.1.2. Sampling procedure

2.1.2.1. Patho-physiological measurements. During the trial, individual blood samples were taken by jugular venipuncture weekly for determination of PCV, using a micro-hematocrit centrifuge and reader.

2.1.2.2. Parasitological measurements. From D21 faecal samples were collected rectally twice weekly for determination of FEC, using a modified McMaster procedure (Raynaud, 1970). Data were expressed as eggs per gram of feces. At necropsy, the abomasum was separated, tied, rapidly removed and then stored at -20°C for further adult worm counts. The worms were collected from both the luminal contents and from the results of a peptic digestion performed on the mucosa for 4 h at 37°C . Worm counts were performed according to a 10% aliquot technique (MAFF, 1986). Morphological identification of worm stages and sex were conducted using standard recommendations (MAFF, 1986).

The relative fecundity estimate per female was estimated by dividing the individual number of eggs per gram found on the last FEC by the number of females found at necropsy (Athanasiadou et al., 2001).

2.1.2.3. Kinetics of ivermectin in plasma. After ivermectin treatment on D39, blood samples were collected in heparin tubes on 5; 10; 24; 48; 96 h and seven days after administration to establish the drug pharmacokinetics.

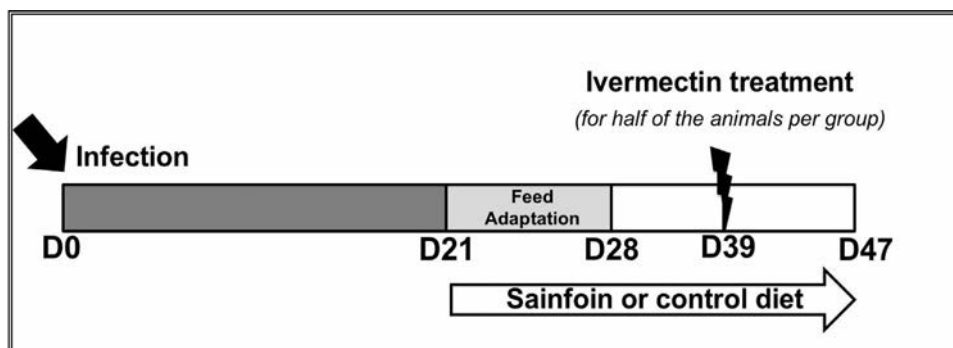


Fig. 1. Experimental schedule.

Plasmatic ivermectin concentrations were determined by HPLC with fluorescence detection according to previously described and validated methods (Alvinerie et al., 1999). Data were analysed using a non-compartmental approach with version 4.2 of the Kinetica Tm computer program (innaPhase, Philadelphia, USA). The partial area under the plasma concentration time curve (AUC) and the mean residence time (MRT) were calculated from 5 h to 7 days by the linear trapezoidal rule. Cmax, maximal concentration was then determined. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.).

2.2. In vitro assay: effect of tannins on ivermectin

The following *in vitro* assay was performed to study the influence of sainfoin extracts, hazelnut extracts and a mixture of both (1:1, w/w), on the availability of ivermectin.

2.2.1. Biological material and chemicals

Sainfoin and hazelnut extracts were obtained by freeze-drying of Multifolia pellets (Perly variety, 2013, third cut) and hazelnut peels. The rumen fluid was obtained from a goat slaughtered with 3.65 g of pentobarbital and kept at -20°C for 4 months. Ivermectin powder was provided by Sigma Aldrich®.

2.2.2. Experimental design

The rumen fluid was diluted in water (1:3, v/v). In order to achieve a final concentration of ivermectin of $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Avery and Schmidt, 1995); 1) ivermectin was diluted in 1.5% of DiMethyl Sulfoxide (DMSO); 2) $134\text{ }\mu\text{l}$ of the previous ivermectin solution was diluted in 40 ml of the rumen fluid and water solution. Then, three successive dilutions of each tannin-rich (TR) extract with phosphate buffer solution (PBS) (600, 1200 and $2400\text{ }\mu\text{g/ml}$: classic *in vitro* tannin test concentrations, matching the one found *in vivo*) were performed to provide stock solutions (Terrill et al., 1994). Thereafter, one ml of each TR dilution was added to one ml of the ivermectin + rumen fluid solution, in order to achieve a final concentration of $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ of ivermectin and 300, 600, $1200\text{ }\mu\text{g/ml}$ of extracts in the test tubes. The control was the ivermectin solution diluted in rumen fluid, without addition of any extracts. Three replicates were run per type of sample and per concentration.

All replicates were incubated for 3 h at 38°C , and mixed every hour. After incubation, the tubes were centrifuged ($14263g$ for 5 min). Then, both the supernatant (liquid phase) and the residue (solid phase) were collected. The ivermectin was extracted and measured in both types of samples.

The results were expressed as % of IVM in the liquid phase ((IVM in the liquid phase/Total IVM in the liquid + solid phases) * 100). It is considered that the ivermectin in the liquid phase corresponds to the available molecule in the rumen fluid which can interact with the condensed tannins.

2.3. Statistical analyses

The data on FEC and PCV have been analysed, date by date, by a one-way variance analysis, until D39. Then, the data on FEC and PCV obtained on D42 and D47 as well as the number of adult worms and the estimation of female fertility were analysed by a two-way analysis of variance (diet treatment and IVM). Before analysis, the FEC results and the number of adult worms (non-normal distribution) were transformed in $\text{Log}(n+1)$. All analyses were performed using the SYSTAT® 9.0 software. Comparison of the pharmacokinetic data between groups was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by an unpaired *t*-test using Statview software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

The *in vitro* data were analysed by a two-way variance analysis (factors: treatment and concentration) and a linear regression (on the percentage of ivermectin found in the liquid phase = bio-available ivermectin) on the SYSTAT® software.

3. Results

3.1. In vivo anthelmintic effect of a tannin-rich diet on multi resistant *H. contortus*

3.1.1. Effect of a tannin-rich diet on the parasitological data

• Faecal egg counts (Fig. 2).

Lambs fed with sainfoin had lower FEC than the lambs fed with lucerne (from D32 to D42 $P < 0.01$ and on D47 $P < 0.05$). Between D28 and D39, FEC was reduced by 45% for the sainfoin group (FEC observed on D42 was 3583 and 6513 on D47 for the sainfoin group).

On the 2 last dates of sampling, there was no effect of ivermectin treatment on FEC although on D42, the treatment reduced the FEC of the lucerne group (between D39 and D42, FEC was reduced by 65% for the treated animals in the lucerne group) but did not show any effect in the sainfoin group.

• Number of adult worms

The diet did not have any significant effect on the number of adult worms counted after necropsy. The ivermectin treatment did not show any effect on the number of adult worms counted after necropsy between the treated and untreated groups (Table 1).

• Measurements of relative fecundity estimate

The diet had a significant effect on the fertility of female *H. contortus* ($P < 0.01$): the fertility was reduced by 60% in the sainfoin group (Table 1), compared to the control group. In contrast, the ivermectin treatment did not affect the fertility.

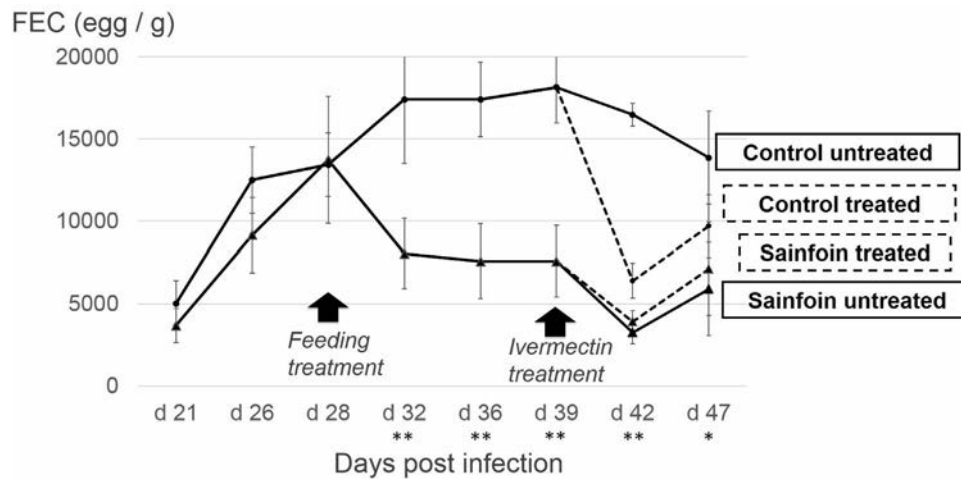


Fig. 2. The effect of feeding sainfoin or lucerne pellets on eggs per gram (EPG $\pm$ S.E.M.) of feces from parasitized lambs, before and after the ivermectin treatment. *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 1

The effect of feeding sainfoin or lucerne pellets on adult worms (Number of worms $\pm$ S.E.M.) and relative female fecundity estimates of *Haemonchus contortus* (Number of eggs by female $\pm$ S.E.M.) of parasitized treated or non-treated lambs. Results of the two-way analysis of variance completed by post hoc test: the presence of different superscript indicates differences between subgroups ($P < 0.01$). The lack of any superscript means Non Significant differences.

	Worm number		Relative fecundity estimate of female <i>H. contortus</i>	
	Untreated	Treated	Untreated	Treated
Sainfoin	1348 $\pm$ 542	1943 $\pm$ 681	4.24 $\pm$ 2.96 ^a	4.04 $\pm$ 2.13 ^a
Control	1255 $\pm$ 140	1632 $\pm$ 1299	9.79 $\pm$ 2.70 ^b	10.85 $\pm$ 7.01 ^b

3.1.2. Effect of a tannin-rich diet on blood PCV

The diets had a significant effect on blood PCV on D39 ($P < 0.05$) and on D42 and D47 ($P < 0.01$) between the sainfoin and the control groups. There was no overall ivermectin treatment effect on PCV of the lambs (Fig. 3).

3.1.3. Effect of a tannin-rich diet on the plasma kinetic of ivermectin after oral administration

The drug time concentration profiles reported in plasma of control sheep are relevant to those previously reported in sheep after oral administration (Alvinerie et al., 2008; Bartley et al., 2012). The ivermectin concentration increased for the first ten hours, then it stabilized for fifteen hours and decreased (Fig. 4). When animals were fed sainfoin diet, lower concentrations of ivermectin were measured in plasma when compared with animals fed control diet. Consequently, the area under the time-concentration curve (presenting a two-fold decrease in lambs fed sainfoin, when compared with those fed Luzerne and the maximal concentration ($C_{max} = 5.00$ for sainfoin group versus 10.10 10.17 for sainfoin group) was significantly lower in the sainfoin group, compared with the control group. The mean residence time (2.32 days for sainfoin group versus 1.65 days for control group) was significantly higher in the sainfoin group, compared with the control group (Table 2).

3.2. In vitro assay

In the control samples, on average 39% of the ivermectin were found in the supernatant, revealing that the rumen fluid had the capacity to trap ivermectin and thus limiting thereby its availability for intestinal absorption. The 3 types of extracts containing CTs increased significantly the amount ivermectin trapped in the solid phase ($P < 0.01$). For the highest concentration of sainfoin, 28% of the

Table 2

The effect of feeding sainfoin or lucerne pellets on the pharmacokinetics of ivermectin of parasitized lambs. C_{max} : maximal concentration; AUC: partial area under the plasma concentration-time curve; MRT: mean residence time. Data are means $\pm$ S.E.M. of six animals. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

	C_{max}	AUC	MRT
Control	10.17 $\pm$ 1.64	23.68 $\pm$ 4.12	2.32 $\pm$ 0.28
Sainfoin	5.00 $\pm$ 0.40*	9.59 $\pm$ 1.09*	1.66 $\pm$ 0.08**

ivermectin was determined as free ivermectin in the supernatant (11.2 μ g and 28.7 μ g in the solid phase), 4.3% with addition of the hazelnut (2.0 μ g and 44.7 μ g in the solid phase) and 7.9% μ g/ml in the mixture (3.5 μ g and 41.5 μ g in the solid phase).

The concentration of tannins had a significant effect on the availability of ivermectin ($P < 0.01$) and significant positive linear correlations were measured between the concentration of different tannin containing extracts and the ivermectin concentrations measured in the liquid phase (R^2 of sainfoin curve = 0.97; hazelnut = 0.95; mixture = 0.98) (Fig. 5).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study where the interactions between tannin-containing plants and ivermectin were ascertained by combining parasitological, pathophysiological data and pharmacological measurements. It is also the first study underlining that a diet based on a pelleted tannin-rich legume showed efficiency against a strain of *Haemonchus contortus* resistant to several anthelmintics, which is of interest considering the increasing prevalence of multiresistances to different AH families in GIN populations in sheep and goats breedings (Jackson et al., 2012).

Feeding sainfoin pellets was effective in disturbing *Haemonchus contortus* infection in sheep, when associated or not with oral ivermectin administration. The reduction in FEC for lambs fed sainfoin relative to control group was above 50% during the whole feeding period. These results are in line with other studies demonstrating the anthelmintic activity of different tanniniferous legumes like sainfoin (Paolini et al., 2003, 2005; Heckendorn et al., 2006, 2007; Manolaraki et al., 2010), *Sericea lespedeza* (Gujja et al., 2013; Shaik et al., 2006) or sulla (Niezen et al., 1998). In our study, the decrease in egg output was not related to any significant changes in worm numbers, but was mainly associated with significant decrease in relative fecundity estimate of female worms. Similar effects have

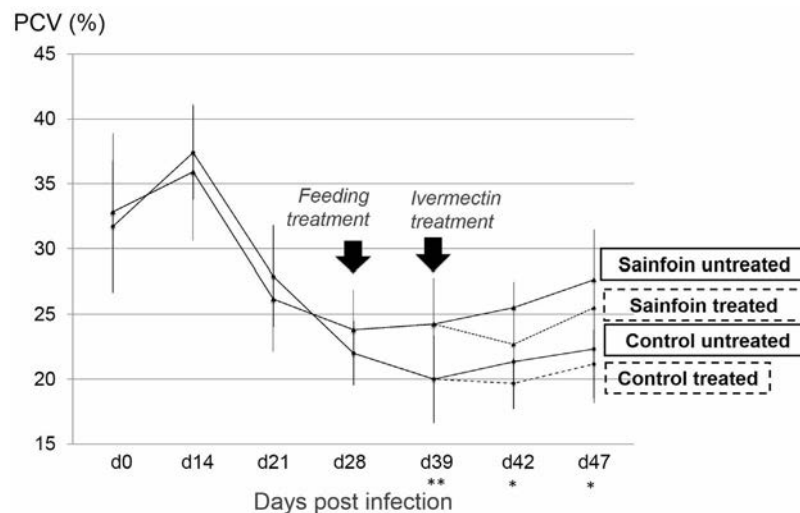


Fig. 3. The effect of feeding sainfoin or lucerne pellets on blood packed cell volume (PCV $\pm$ S.E.M.) of parasitized lambs, before and after the ivermectin treatment. *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

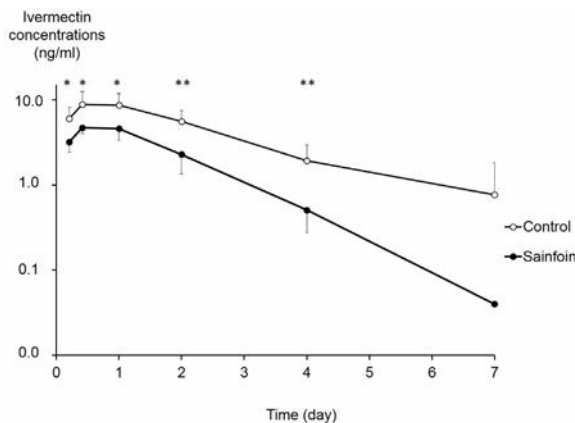


Fig. 4. The effect of feeding sainfoin or lucerne pellets on the pharmacokinetics of ivermectin of parasitized lambs C_{max} : maximal concentration; AUC: partial area under the plasma concentration-time curve) MRT: mean residence time. *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

been previously described in other studies on *Haemonchus contortus* in lambs of kids fed sainfoin (Paolini et al., 2005; Manolaraki et al., 2010), or with the tropical Legume, *Lysiloma latisiliquum*, (Martínez-Ortiz-De-Montellano et al., 2010). In contrast, in other studies, the decrease in FEC was related to reduced worm burdens as shown by Heckendorn et al. (2006, 2007) when testing the effect of *O. viciifolia* hay or silage in experimentally infected sheep.

The mean worm counts of the two groups (treated + untreated) were heterogeneous in the two diets, but the difference was not statistically different (1646 ± 613 and 1443 ± 718 in sainfoin and control, respectively). This highlighted the individual response of lambs to *H. contortus* infection. Similar variability has been described in previous studies (Paolini et al., 2005; Heckendorn et al., 2006; Manolaraki et al., 2010). The establishment rate of the infective larvae (number of worms recovered at necropsy/number of infective larvae given) was 48% in the sainfoin group and 43% in the control group. These values are in agreement with the values reported in sheep after experimental infection with *H. contortus* by Manolaraki et al. (2010). However, in some other studies, the establishment rate was much lower, approximating 15% (Heckendorn et al., 2006).

The consumption of tanniniferous legume forage by lambs has also been previously associated with an improved resilience of

the host (Terrill et al., 2007; Hoste et al., 2015). In our study, the measurements of blood PCV, which assess the anemic status of the lambs, was used to evaluate the resilience. Blood PCV values in the infected lambs were significantly and regularly higher in the animals fed sainfoin than in the control group, confirming other studies performed with various tannin containing resources (Paolini et al., 2005 (sainfoin); Terrill et al., 2007 (sericea lespedeza); Arroyo-Lopez et al., 2014 (sainfoin and carob)). This improved resilience might be associated either with some effects due to the presence of polyphenols, or alternatively to the high nutritive value of sainfoin compared to the control. However, the control diet relied on another legume (Lucerne); the diets were made isoproteic and there was no refusal in the two groups of lambs from D28 to D47.

This trial was performed with sainfoin pellets. The efficacy against parasites obtained with such diet confirms that the pelleting process of sainfoin (high temperature and high pressure) does not affect the anthelmintic properties of the sainfoin despite possible changes in the binding to proteins suggested by Terrill et al. (2007), in accordance with previous observations on *H. contortus* infections (Girard et al., 2013 [sainfoin]; Terrill et al., 2007; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015 [sericea lespedeza]).

The consumption of sainfoin pellets was associated with important changes in the drug plasma kinetics in lambs treated orally with ivermectin. The ivermectin concentrations were significantly lower in animal fed sainfoin when compared with those fed control diet, revealing an impaired overall exposure of the host animal to the anthelmintic drug. Altered absorption or elimination of the drug may account for abnormal plasma kinetic profile. These data are consistent with the lower efficacy of ivermectin in the sainfoin fed animals (High FEC on D42), when compared with the control group. This strongly suggests that the sainfoin diet interfered with the ivermectin treatment in our experimental conditions.

Our data are in contrast with previous *in vitro* (Armstrong et al., 2013) and *in vivo* (Whitney et al., 2013) studies, where increased anthelmintic activity was observed when ivermectin was combined with another tannin containing plants (*Juniperus pinchotti*). The general hypothesis was that, given that tannins can bind to different macro-molecules, especially proteins (Bruneton, 2009), the PSMs from tannin resources may contribute to chelate to ivermectin in the rumen, limiting thereby intestinal drug absorption. Although similar animal species and similar route of ivermectin administration were used, several other factors may account for the

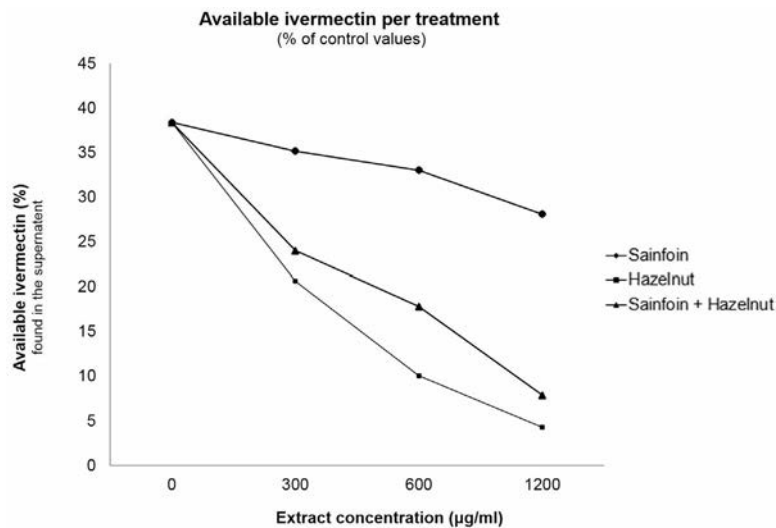


Fig. 5. Measurements of in vitro ivermectin in liquid phase (%) between groups of three tannin-rich extracts applied at different concentrations.

divergent results obtained in the two studies. First, the strains of *H. contortus* used by Whitney et al. (2013) was an ivermectin resistant strain while the White River strain used in our study was resistant not only to ivermectin but also to benzimidazoles, and rafoxanide (Riou et al., 2003). Another major difference concerns the type of diet used and the nature of the plant secondary metabolites (PSMs). In sainfoin, the main PSMs are flavonoids and CTs with a main proportion of tannins being PDs (70%) vs 30% of PCs (Quijada et al., 2015). *J. pinchotti* is also identified as a CT containing plant (4.1% of dry matter) but they are mainly PCs (Engelshove, 1983). One hypothesis is that tannins differing in their quality (namely by the PD/PC ratio) may interact in different ways with ivermectin.

To verify this hypothesis, ivermectin was incubated *in vitro* with different types (PD or PC rich) of tannin extracts in presence of rumen fluid in order to approximate the drugs physiological environment in the rumen. The experiment was performed with either sainfoin extracts, a PD-rich resource (70% vs 30% PCs) or hazelnut extracts, a tanniniferous resource rich in PCs (80% vs 20% of PDs) (Quijada et al., 2015) was also in tested parallel to examine whether the quality of tannins could affect the blocking capacity. In our assay, ivermectin blocking or chelation was clearly associated with the tannin-containing pellet and this was tannin dose-dependent. We therefore propose that by blocking ivermectin in the rumen, tannins could reduce the amount of drug available for intestinal absorption. This is consistent with the low plasma bioavailability and the low efficacy of ivermectin in infected animals receiving sainfoin when compared with animal fed control diet. Furthermore, the different data obtained with sainfoin and hazelnut peels extracts, suggest that procyanidins are more potent chelators of IVM than prodelphinidins. This hypothesis has to be tested further *in vivo*.

Juniperus species are also rich in a second type of PSM, namely some terpenoids (up to 2.2 mg of terpenoid oil/g of dry matter) (Whitney and Muir, 2010; Whitney et al., 2011). A second hypothesis is that terpenoids also react in different ways to ivermectin. The complexity of interactions between IVM and bioactive metabolites has been illustrated by a previous *in vitro* study performed by Armstrong et al. (2013), where the motility of an ivermectin resistant strain of *H. contortus* was measured in presence of IVM. The IVM efficacy was increased when incubating *H. contortus* larvae in a buffered ruminal fluid containing dried redberry juniper. In contrast a decrease in IVM efficacy was noticed when larvae were incubated in terpenoid oil. The experimental design suggests also

that terpenoid oils were the main PSM responsible for the interactions.

Other interferences between condensed tannins and the intestinal absorption process may also contribute to decrease the absorption of ivermectin. Drug concentration in the organism is controlled by the drug detoxification system, whose performance can be highly modulated by tannin-derived flavonoids. As example oral administration of *Hypericum perforatum* has been associated in humans with a decrease of metabolism of the tacrolimus, substrate of both CYP3A and P-gp, (Hebert et al., 2004). Overall, ivermectin and other related anthelmintic macrocyclic lactones are substrates of the transmembrane efflux pump P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) which largely contributes to elimination of these drugs by exporting them from the plasma compartment to the intestinal lumen (Kiki-Mvouaka et al., 2010; Ballent et al., 2006). It is well known that plant secondary metabolites and flavonoids can inhibit the activity of mammalian P-gp (Yazaki, 2005; Alvarez et al., 2010). As example, quercetin in sheep increases plasma bioavailability of moxidectin (Dupuy et al., 2003). Flavonoids can also induce P-gp gene expression (Alvarez et al., 2010). Therefore, in our study we cannot exclude that tannins and flavonoids induced P-gp gene expression in sheep fed sainfoin, enhancing the drug P-gp-mediated elimination process. Elucidating this aspect represents an important objective for future research.

5. Conclusion

As previously observed with AH susceptible *H. contortus*, feeding lambs with sainfoin, a tannin-containing legume, was also efficient to disturb the biology of a multiresistant AH strain. The use of such bioactive feed might reduce significantly the nematode egg excretion and consequently the pasture contamination. The present results appear of main importance in production systems where farmers remain without any therapeutic solutions to control gastrointestinal nematode populations which are resistant to all broad spectrum families of chemical anthelmintics (Van Wyk et al., 1997).

Based on this sole study, the current results also suggest that combining a tannin-containing diet and an oral administration of macrocyclic lactones might have negative consequences on the short term (immediate efficacy) and possible long term (development of resistance) use of macrocyclic lactones. Indeed, subtherapeutic drug concentrations as those observed in sainfoin fed sheep, may contribute to the selection of drug resistant nema-

todes. Further experiments are needed to verify the effect of other tannin containing resources on multi resistant strain of nematodes and to investigate the impact of the route of administration on the interactions between a tannin-rich diet and ivermectin (e.g. under injectable administration). These future studies should also help at exploring and clarifying the molecular mechanisms supporting the interaction of bioactive compounds and anthelmintic drugs.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support of the EMIDA ERANET project CARES, and the financial support of the French Agency for Research (ANR) for the CIFRE PhD thesis 2013/1480 of Ms Elodie Gaudin. The help of the following persons is particularly acknowledged: Mr J.M. Delmas and his team for taking care of the lambs, Pr Marian Varady Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, for providing the larvae of the White River strain, Dr. Jessica Quijada for her help and the society Inov' Fruit for supplying the hazelnut peels.

References

- Alvarez, A.I., Real, R., Perez, R., Mendoza, G., Prieto, J., Merino, G., 2010. Modulation of the activity of ABC transporter by flavonoids and drug response. *J. Pharm. Sci.* 99, 598–617.
- Alvinerie, M., Sutra, J.F., Galtier, P., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Linusse, C., 1999. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of sustained-release bolus to cattle. *Res. Vet. Sci.* 66, 57–61.
- Alvinerie, M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J.F., Lespine, A., 2008. Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Vet. Parasitol.* 157, 117–122.
- Armstrong, S.A., Klein, D.R., Whitney, T.R., Scott, C.B., Muir, J.P., Lambert, B.D., Craig, T.M., 2013. Effect of using redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* in vitro motility and increase ivermectin efficacy. *Vet. Parasitol.* 197, 271–276.
- 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* 2014, 21–71.
- 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. *Vet. Parasitol.* 99, 205–219.
- Avery, B., Schmidt, M., 1995. A dose-response study of ivermectin in a bovine in vitro production system. *Theriogenology* 43, 163.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., 2006. Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug Metab. Dispos.* 34, 457–463.
- Bartley, D.J., Morrison, A.A., Dupuy, J., Bartley, Y., Sutra, J.F., Menez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Devin, L., Lespine, A., 2012. Influence of Pluronic 85 and ketoconazole on disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Vet. Parasitol.* 187, 464–472.
- Bruneton, J., 2009. Tannins. In: Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 4th edition. Lavoisier, Paris, pp. 458–461.
- Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S.F., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 173, 157–160.
- Chandrawathani, P., Yusoff, N., Wan, L.C., Ham, A., Waller, P.J., 2004. Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. *Vet. Res. Comm.* 28, 1–11.
- Dupuy, J., Larrieu, G., Sutra, J.F., Lespine, A., Alvinerie, M., 2003. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet. Parasitol.* 112, 337–347.
- Engelshowe, R., 1983. Tannin producing dimeric proanthocyanidins in *Juiperus communis*. *Planta Med.* 49, 170–175.
- 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. In: 64th EAAP, Nantes, 26th–30th August, p. 506.
- 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. *Vet. Parasitol.* 191, 51–58.
- Hebert, M.F., Park, J.M., Chen, Y.L., Akhtar, S., Larson, A.M., 2004. Effects of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum*) on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 44, 89–94.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lamb. *Vet. Parasitol.* 142, 293–300.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123–134.
- Hennessy, D.R., 1993. Pharmacokinetic disposition of benzimidazole drugs in the ruminant gastrointestinal tract. *Parasitol. Today* 9.
- Hennessy, D.R., 1997. Physiology, pharmacology and parasitology. *Int. J. Parasitol.* 27, 145–152.
- Hoste, H., Martínez-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 infection. *Vet. Parasitol.* 186, 18–27.
- 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.
- Hughes, P.L., Dowling, A.F., Callinan, A.P., 2007. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 55, 177–183.
- Jackson, F., Varady, M., Bartley, D.J., 2012. Managing anthelmintic resistance in goats—can we learn lessons from sheep? *Small Rumin. Res.* 103, 3–9.
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S.S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauthy, N., Pautrat, F., Skripky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Maser, P., 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452, 176–181.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70–78.
- Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M., Lespine, A., 2010. Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug Metab. Dispos.* 38, 573–580.
- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Parasitol.* 205, 170–175.
- MAFF Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food, 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- 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.
- Martínez-Ortiz-De-Montellano, C., Vagars-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latissiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 172, 283–290.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Cell. Mol. Biol. Plants* 1, 151–217.
- Naumann, H.D., Armstrong, S.A., Lambert, B.D., Muir, J.P., Tedeschi, L.O., Kothmann, M.M., 2014. Effect of molecular weight and concentration of legume condensed tannins on in vitro larval migration inhibition of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 199, 93–98.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet. Parasitol.* 80, 15–27.
- Paolini, V., Frayssines, A., De-La-Farge, F., Dorchie, P., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.* 34, 331–339.
- Paolini, V., De-La-Farge, F., Prevot, F., Dorchie, P., Hoste, H., 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 277–283.
- Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S.M., Demeler, J., Enemark, H.L., 2014. Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Vet. Parasitol.* 206, 208–215.
- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2015. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6346–6354.
- 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. *Ann. Parasitol. (Paris)* 45, 321–342.
- Riou, M., Guégnard, F., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., 2003. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 180–187.

- 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*. *Vet. Parasitol.* 198, 166–171.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150–157.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. The epidemiology of parasitic diseases. In: *Veterinary Parasitology*, 3rd edition. Blackwell, Oxford, pp. 764–769.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., Mc Nabb, W.C., Barry, T.N., 1994. Assay and digestion of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *Br. J. Nutr.* 72, 467–477.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of *Sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117–122.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Gerber, H.M., Regina, M.R., 1987. Two field strains of *Haemonchus contortus* resistant to rafoxanide. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 143–146.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111–122.
- Van-den-Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet. Parasitol.* 209, 278–280.
- Waller, P.J., 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet. Parasitol.* 139, 13–22.
- Whitney, T.R., Muir, J.P., 2010. Redberry juniper as a roughage source in lamb feedlot rations: performance and serum nonesterified fatty acids, urea nitrogen, and insulin-like growth factor-1 concentrations. *J. Anim. Sci.* 88, 1492–1502.
- Whitney, T.R., Lee, A.E., Klein, D.R., Scott, C.B., Craig, T.M., Muir, J.P., 2011. A modified *in vitro* larvae migration inhibition assay using rumen fluid to evaluate *Haemonchus contortus* viability. *Vet. Parasitol.* 176, 217–225.
- Whitney, T.R., Wildeus, S., Zajac, A.M., 2013. The use of redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* fecal egg counts and increase ivermectin efficacy. *Vet. Parasitol.* 197, 182–188.
- Wolfe, R.M., Terrill, T.H., Muir, J.P., 2008. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *J. Sci. Food Agr.* 88, 1060–1067.
- Yazaki, K., 2005. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett.* 580, 1183–1191.

Chapitre 3

Article 4 : Comportement alimentaire des ovins et caprins lors d'un challenge parasitaire : sélection de sainfoin riche en tanins et capacités d'automédication

L'utilisation de plantes riches en métabolites secondaires, comme le sainfoin contenant des tanins condensés, est l'une des options dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants au pâturage. Différents tests comportementaux permettent de mesurer le degré de motivation qu'expriment les animaux pour obtenir ces ressources.

L'objectif de cette étude a été de vérifier les hypothèses suivantes, à l'aide de deux tests de comportement : les caprins consommeront plus de sainfoin, dû à une plus grande propension à consommer des tanins ; les animaux parasités peuvent s'auto-médiquer, notamment les caprins de par leur moindre résistance aux parasites ; la consommation de sainfoin augmentera avec le temps (l'hypothèse étant qu'un temps d'adaptation est nécessaire pour la consommation de granulés contenant des métabolites secondaires).

Un essai *in vivo* a été mené avec 20 chevrettes et 20 agnelles. La moitié de chaque lot a été expérimentalement infestée avec une souche sensible d'*Haemonchus contortus*. Un mois après l'infestation, les animaux ont participé à un test de cafétéria de 30 jours où des granulés de sainfoin et de luzerne étaient proposés à volonté. Les animaux ont ensuite participé à un test de conditionnement opérant (luzerne disponible à volonté et le sainfoin en quantité limitée).

Dans le test de cafétéria, les chevrettes ont montré une préférence pour le sainfoin plus marquée que les agnelles ($P < 0.01$). La consommation de sainfoin n'a pas été différente selon le statut parasitaire mais elle a augmenté au cours du temps pour les animaux parasités ($P < 0.01$), notamment chez les agnelles, sans devenir supérieure à celle des animaux non parasités.

Dans le test de conditionnement opérant, aucun effet du statut parasitaire ni de l'espèce n'a été mis en évidence sur la motivation à consommer le sainfoin.

Les résultats du test de cafétéria ont confirmé 2 de nos hypothèses, à savoir que (1) les caprins ont montré une préférence pour le sainfoin supérieure à celle des ovins, et (2) les agnelles parasitées ont augmenté leur consommation en sainfoin au cours du temps. Cependant, les animaux parasités n'ont pas consommé plus de sainfoin que les animaux non parasités, indiquant donc l'absence de comportement d'automédication curatif. De nouvelles études comportementales sont nécessaires afin de comprendre la motivation des animaux, parasités ou non, pour ingérer un aliment riche en métabolites secondaires.

Compared abilities of young sheep and goats to self-medicate with tannin-rich sainfoin when infected with gastrointestinal nematodes

Elodie Gaudin ^{a, b, c*}, Morgane Costes-Thiré ^a, Juan J. Villalba ^d, Hervé Hoste ^c, Vincent Gerfault ^b, Cécile Ginane ^a

^a *Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

^b *MG 2 MIX, La basse haye, 35220 Châteaubourg, France*

^c *IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France*

^d *Department of Wildland Resources, Utah State University, 5230 Old Main Hill, Logan, UT 84322, USA*

* Corresponding author: Tel.: +335 61 19 38 75; fax: +335 61 19 38 34; e-mail: e.gaudin@envt.fr

Abstract

Plant secondary metabolites (PSMs) are one of the promising options against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. The objective of this study was to assess the abilities of sheep and goats to self-medicate with tannin-rich sainfoin (SF) when infected with gastrointestinal nematodes, with a cafeteria and an operant conditioning trials. Hypotheses were that parasitized (P) lambs and goat kids will show greater intake and preference for SF than non-parasitized (NP) counterparts, that kids will eat more SF than lambs (due to their lower resistance against parasites and their higher ability to consume PSMs), and that SF intake will increase over time for P animals.

Twenty female kids and twenty lambs aged 3 months were involved in the study. Half of the animals per species (n=10) were experimentally infected with 170 L3 stage larvae of *Haemonchus contortus* /kg of body weight (P). The other half was free from parasites for the all experiment (NP). Five weeks after infection, animals were exposed to a 24-d cafeteria trial (three 8-d periods) offering a free choice at the day scale between two legume pellets: SF (*Onobrychis viciifolia*) containing condensed tannins (3.8 %) and alfalfa (ALF, *Medicago sativa*) with no tannin. Then, the animals were involved in an operant conditioning trial of two 4-d long sessions, to assess in short-term tests their motivation to walk for a SF reward (10 or 25 g) when offered in choice with freely available ALF.

In the cafeteria trial, SF preference was greater in kids than in lambs, especially in the first two periods. We did not observe a greater preference for SF in P animals, which was even higher in NP animals in periods 1 and 2. In period 3, all groups (P kids, NP kids, P lambs and NP lambs) expressed similar SF preference. In the operant-conditioning trial, no higher motivation to get the SF reward was revealed in P animals, especially when the reward decreased.

The results of this experiment support some of our hypotheses in that (1) goats are more willing than sheep to consume tanniferous feeds, and (2) P animals increased SF intake through time. However, a curative self-meditative behavior was not highlighted as the moderate amplitude of these evolutions never led to a greater SF intake and preference, nor to a greater motivation to get SF when available in a restricted quantity, in P than in NP animals, whatever the species. This is in contrast with some previous results and some explanations are presented.

Keywords: Sainfoin; Tannins; Gastrointestinal nematodes; Small ruminants; Motivation; Self-medication; Operant conditioning; Behaviour

1. Introduction

Gastrointestinal nematodes (GINs) are one main issue in outdoors small ruminants' production, because of the consequences on production losses (poor growth rates, reduction in milk production, death) but also on animal health and welfare (Taylor et al., 2007). For more than 50 years, the conventional way to control this constraint has been the use of chemical anthelmintics (AH) (Min et al., 2004). However, after a few decades, this quasi-exclusive use of chemical molecules has been challenged because of the constant development and diffusion of resistance to the main, wide spectrum, AH families (Kaplan, 2004; Coles et al., 2006; Jackson et al., 2012; Peña-Espinoza et al., 2014). This increasing phenomenon of resistances makes difficult even sometimes impossible to control GINs in farms, especially in situation of multiresistant strains (Van Wyk et al., 1997; Cezar et al., 2010). Moreover, the increasing societal demand of consumers to reduce the use of chemical compounds had led to promote the use of natural products in agriculture and livestock husbandry. Therefore, research has focused on finding new solutions to control GIN infections in sheep or goat breeding, such as forages containing high values of condensed tannins (CTs), and used as nutraceuticals (Andlauer et Fürst, 2002; Hoste et al., 2006).

Tannins are plant secondary metabolites (PSMs) located in the vacuoles of the plant. Condensed tannins are polyphenolic compounds of the flavonoid species (Mueller-Harvey and McAllan, 1992).

In vitro and *in vivo* assays with tanniniferous legumes such as sainfoin (SF - *Onobrychis viciifolia*) (Paolini et al., 2005; Heckendorn et al., 2007), sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) (Shaik et al., 2006; Kommuru et al., 2015) or sulla (*Hedysarum coronarium*) (Niezen et al., 1998) have shown promising results and confirmed the observed anthelmintic effects (Hoste et al., 2012; 2015).

To make the conservation and stability of CTs-rich forages easier, to control the quality of the PSMs, and to export this kind of plant, industry has focused on possible processes to dehydrate the plants. Some recent studies performed with sericea lespedeza or SF pellets reported promising results on the reduction of infection by *Haemonchus contortus* (a blood-sucking worm causing anemia), especially by reducing faecal egg counts (FECs) (Terrill et al., 2007; Girard et al., 2013; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015; Gaudin et al., 2016a) and by improving the blood packed cell volume (e.g: improved resilience of the host) (Hoste et al., 2015).

CTs-rich forages have a great interest in grazing sheep systems, but even more in grazing goats, because their immune responses against parasites are very low compared to sheep (Hoste et al., 2010). In addition, the feeding strategies of goats and sheep are different as goats prefer to feed on the shrub layer (Hofmann, 1989), often rich in secondary compounds, with a lower risk of presence of infective larvae, while sheep prefer to feed on the grass layer with high risk of intake of infective larvae (Hofmann, 1989). These differences taken together led to the consideration in the literature of two different strategies to control parasites, based on the development of an immune response in sheep (fight strategy) and on feeding behavior in goats (flight strategy) (Hoste et al., 2010).

Small ruminants, and more generally herbivores, have been shown to be able to modify their diet preferences according to a reduction in nutrients imbalance (Wang and Provenza, 1996; Villalba and Provenza, 1999) or with the avoidance of toxic compounds (du Toit et al. 1991; Ginane et al., 2005), via an associative learning process (Provenza, 1995). Diet selection then could be seen, as proposed by Provenza and Villalba (2006), as the "constant quest for substances in the external environment that provide a homeostatic benefit to the internal environment". In that way, herbivores may have the ability to select a feed rich in secondary metabolites to alleviate a malaise (Villalba and Provenza, 2007). Previous experiments have highlighted such abilities in sheep (Provenza and Villalba, 2006), including when the malaise was due to the presence of gastrointestinal nematodes (Juhnke et al., 2012; Amit et al., 2013). These experiments generally involved concentrate feeds enriched with quebracho tannins, or tropical legumes or shrubs characterized by naturally high concentrations of condensed tannins (e.g. 8% in Juhnke et al., 2012). The question is whether such self-meditative behavior can be observed when using a temperate fodder legume (sainfoin) with natural but more moderate content in secondary compounds and with herbivores that display different feeding and adaptative strategies to combat parasites.

The general objectives of the current study were thus to evaluate and compare the feeding behavior of sheep and goats and their ability to self-select a tannin-rich forage because of its anthelmintic properties. The specific hypotheses were:

- 1) The selection and motivation to get the tannin-rich forage would be greater in goats, due to their capacity to eat plant secondary metabolites in the shrub layer ;
- 2) The selection and motivation to get the tannin-rich forage would be greater in infected animals, especially for goats because of their reduced resistance against parasites ;
- 3) The intake of the tannin-rich forage would increase over time in infected animals once they would have experienced the beneficial effects of tannin consumption.

2. Materials and methods

The experiment was conducted indoors, in the facilities of the UE1414 Experimental Unit of INRA “Auvergne-Rhône-Alpes” in central France (45°42’N, 03°30’E). The protocol was examined and validated by the regional ethical committee “*Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale d’Auvergne*” and approved by the French Research Ministry, under the n°2015121609019762.

2.1 General procedure

The experiment was conducted from February to mid-July 2016. It involved five successive phases which are presented on figure 1: (i) a ‘*Growth phase*’ from birth to the experimental infection at 2.5 month-old, (ii) a ‘*Parasitic development*’ phase of 35 days for the development of infective L3 larvae into adult nematodes with negative impact on animals, (iii) the ‘*Cafeteria trial*’ representing the first experimental phase where animals had a free choice on a daily scale between two fodder legumes varying in their tannin content (sainfoin and alfalfa) during 24 d, (iv) a 8 days ‘*Transition*’ phase between the two experimental phases, and (v) the ‘*Operant-conditioning trial*’ (11 d), i.e. the second experimental phase. This consisted in a constrained choice on the short-term (few minutes) using an operant conditioning procedure to test the animals’ motivation to get the tannin-rich food depending on their parasitic status.

2.2 Animals

Twenty female goat kids (Alpine breed) and twenty ewe lambs (Romane breed) were involved in the study. Birth dates ranged from 16th January to 10th February for kids and between 26th January to 12th February for lambs. From few days after birth, animals were fed artificial milk to ensure they all had similar feeding experiences before the experiment. They were housed in a ventilated building, in the same room (designed as the ‘breeding room’), but in two adjacent pens (one per species). The pens were bedded with sawdust and animals had free access to fresh water and minerals. The building was artificially lighted between 7:00 am to 8:00 pm.

Animals were weighed for the first time on the 5th of March, which will be considered as Day 0 (D0) for the experiment. At that date, the average live weight of lambs was 14.27 ($\pm$ 2.22 kg [mean $\pm$ SEM]) and the weight of kids was 9.68 ($\pm$ 1.49 kg [mean $\pm$ SEM]). The animals were weaned on D13 (18th March).

An egg counting control was performed on D39 on all animals to check their parasitic status. This test confirmed that the animals were free from gastrointestinal nematodes. On D46, animals of each species were stratified according to body weight (BW) and packed cell volume (PCV), and assigned to two groups per species (n=10 per group). ‘Parasitized’ animals (P) received a single dose of third stage larvae of a susceptible strain of *Haemonchus contortus* at the dose rate of 170 L3/kg of BW (mean weight of kids at the day of infection = 18.0 kg, e.g 3050 L3 and mean weight of lambs at the day of infection = 24.6 kg, e.g 4620 L3); ‘Non parasitized’ animals (NP) remained uninfected and composed control groups. Each pen was then divided in two equal smaller pens to finally host the four groups separately.

The L3 larvae were obtained from feces of donor sheep, kept indoors and infected monospecifically with an AH susceptible strain of *Haemonchus contortus*. The facilities hosting the animals and trial performance met French ethical and welfare rules (agreement SSA n°115, December 15, 2014). Coproculture were maintained for 12 days at 23°C to obtain the third-stage larvae. Larvae were then recovered from feces using the Baermann technique (Baermann, 1917) and stored at 4°C in a horizontally vented cap flask. Animals were 2-month-old on the day of infection.

2.3 Experimental feed and feeding management

We used two main experimental feeds which were pellets of two fodder legumes: sainfoin (*Onobrychis viciifolia*- SF_EXP) and alfalfa (*Medicago sativa*- ALF_EXP), which were isonitrogenous (Table 1). The SF_EXP pellets were chosen based on their tannin content and on their biological activity assessed both *in vitro* and *in vivo* in previous assays (Gaudin et al., 2016b). Samples were collected and analyzed for crude protein (Dumas' method, Cunniff, 1995), neutral- and acid-detergent fiber (Goering and Van Soest, 1970), gross energy, and tannin concentration (HCl-Butanol method, Grabber et al., 2013) (Table 1).

Additionally to these experimental feeds, animals received other feeds, either as basal diet during the non-experimental phases, or as a complement of the legume pellets during the experimental phases.

During the 'Growth' and 'Parasitic development' phases, animals received artificial milk until weaning, then pasture hay *ad libitum* (Crude Protein: 66-77 g/kg Dry Matter; Neutral Detergent Fiber: 607-699 g/kg DM) complemented with a commercial concentrate for lamb growth (CP: 160 g/kg DM; NDF: 215 g/kg DM; 1 kg/ lamb and 0.8 kg/ kid).

From the fourth week of the 'Parasitic development phase' animals were moved into the device used for the cafeteria trial (see section 2.4.2) for habituation. We made a feeding transition with the type of feed they will receive as their main diet component during the trial, i.e. legume pellets. However, to avoid that animals get too much experience with the experimental feeds before the start of the trial, we offered them another pelleted alfalfa (ALF_HAB) and pelleted sainfoin (SF_HAB) (Table 1). To encourage consumption of the legume pellets within the troughs, and until transition was completed, we mixed concentrate (250 g / animal) with the pellets. We also provided small amounts of straw to ensure digestive comfort. Then, during the cafeteria trial, they only received the legume pellets (*ad libitum*) complemented with small amounts of hay (200 g) instead of straw, which was not ingested. The hay was offered in a bucket placed within the pen.

During the transition phase between the cafeteria and the operant-conditioning trials, animals progressively returned to a diet based on hay offered *ad libitum* complemented with the commercial concentrate and barley (150 g / animal).

Finally, during the operant-conditioning trial, the basal diet (when the animals were not on test) was composed of hay complemented with a mixture of 50:50 SF_EXP and ALF_EXP (w/w basis) in amounts corresponding to 40% of daily intakes recorded during the cafeteria trial.

This quantity aimed to lowering the risk that animals would be so motivated by the legume pellets in the test arena that they would just eat the most accessible one without making a discriminative choice. The amounts of hay were adjusted regularly according to refusals (amounts offered ranged from 0.8 to 1.2 kg per lamb, and from 0.5 to 0.9 kg per kid). The animals were fed 100 g of hay per animal at 12:00. The rest of the hay was given at 4:45 pm, together with the mix of legume pellets. The refusals were removed and measured at 8:00 am every morning.

2.4 Sampling procedures and measurements

2.4.1 Patho-physiological measurements

During the experiment, individual blood samples were collected by jugular venipuncture weekly for determination of PCV, using a micro-hematocrit centrifuge and reader. We monitored the evolution of PCV as it is an indicator of anemia, which is supposed to be affected by the haematophagic action of *Haemonchus contortus* in infected animals.

2.4.2 Parasitological monitoring

From two weeks after infection (D59), individual fecal samples were collected rectally weekly to measure fecal egg count (FEC), using the modified McMaster procedure (Raynaud, 1970). Data are expressed as number of eggs per gram of feces.

2.4.3 Growth supervision

At the same occasions of blood and feces sampling, animals were weighted for supervision of their growth, using an electronic scale.

2.5 Experimental trials

2.5.1 Training of the animals for the operant-conditioning trial

The training of individuals occurred during the ‘Growing’ and ‘Parasitic development’ phases (D24 – D65), over 20 days. This aimed to familiarize the animals with the test arena, then to teach them the principle of the test. Animals were first introduced in the arena (see description in section 2.5.3) for about 5 minutes by small groups (3-5 individuals) then by pairs randomly selected, especially for the lambs which are more reluctant than goats to eat in isolation (Sibbald and Hopper, 2004). Kids and lambs were tested individually after 3 and 9 training days, respectively (Table 2). Animals were first reinforced only with concentrate as the reward. After 15 days, alfalfa was added, and after 19 days, sainfoin with low content in tannins (SF_HAB) was used instead of concentrate. All animals had learnt the principle of the test before the start of the cafeteria trial.

Finally, during the transition phase between the cafeteria and the operant-conditioning trials (D107 – D114), another training session of 4 days was performed with the experimental feed to remind animals the principle of the test. All animals performed well.

2.5.2 Cafeteria trial

Three weeks after infection (D66), animals were transferred to the structure where the cafeteria trial will take place, to habituate them to the device for 14 days. This device had to allow individual measurements of daily feed intakes. It consisted in another room of the building composed of two lines of 12 individual pens, each one being provided with two adjacent troughs associated with an electronic recording of ingestion. During habituation, animals were housed by pair in each pen (3 m²) and had access to two troughs. Then, during the cafeteria trial, because of the restricted number of pens available, each group of ten animals was split in two subgroups for the measurements. Each subgroup stayed in the device for a period of four consecutive days while the other subgroup returned in the breeding room. In the cafeteria device, animals were then penned individually and had access to two troughs, one filled with ALF_EXP and the other one with SF_EXP (sides changing every day), offered *ad libitum* from 9:00 am to 4:00 pm. During those days, the animals that returned to the breeding room were fed the same feed in two separated racks. The two subgroups then alternated in the cafeteria device every 4 days. This was repeated 3 times (3 periods of 8 days (4 per subgroup)) over 24 days. The animals stayed in this device until D107.

2.5.3 Operant-conditioning trial

The principle of the trial is to impose a moving constraint to the animal to test its motivation to get a reward (Dumont et al., 1998; Ginane et al., 2002; Catanese et al., 2016). The testing arena consisted in a U-shape corridor (4.45 x 2.80 m) surrounded by grid panels of 1 m high, with an entrance door at both ends (Fig. 2). The middle part was made of wooden panels of 2 m high. Adjacent to the test arena, there was a buffer zone to isolate the tested animal just before and just after the test. Two waiting pens completed the device, one for the animals before being tested, and the other one for the animals after being tested.

At each entrance of the test arena, the animal had access to two bowls in each side where the feeds were provided. One of the bowl was filled with restricted small amounts of SF-EXP (10 or 25 g depending on the session, see below) as we wanted to test animals' motivation to get the tannin-rich food, while the other bowl was filled with 200g of ALF_EXP (considered as an *ad libitum* quantity for a 5 minutes' test). The amounts of 10 and 25 g of the SF reward available on a limited quantity were chosen to be within the shift zone (*i.e.* where the animal selects or rejects the feed) for the lowest quantity, and above this threshold for the highest quantity, according to a previous study (Catanese et al., 2016). When a kid or lamb entered the test arena, the four bowls were filled and the animal could choose between feeds. When the reward of SF was eaten, the animal had the choice between consuming ALF or walking through the arena to get another reward of sainfoin. As soon as the animal started to consume one of the feeds on one side of the arena, the operator removed the eventual refusals of sainfoin on the opposite side, and refilled the sainfoin bowl with a new reward. Food was provided by one operator, through a trapdoor within the panel that made him not visible by the animals. Only two operators, familiar for the animals, ran the trial. Animals were individually tested during 5 minutes from the moment they went through one entrance door (the entrance was on a different side each day). After the 5 minutes, the animals were gently driven to the exit.

We performed three consecutive sessions. On the first two sessions, the animals had a choice between SF_EXP and ALF_EXP. Two amounts of SF reward (10 g and 25 g) were tested using a crossover design to avoid carry-over effects. Consequently, half of the animals of each group were tested in session 1 for the 25 g SF reward and the other half for the 10 g SF reward. In session 2, the subgroups were reversed. Sessions 1 and 2 lasted for four days. On d1, only the SF reward was offered to make animals aware of the amount proposed.

On d2, d3 and d4, animals were tested for the choice between SF and ALF, with the sainfoin reward remaining stable.

In session 3, only SF_EXP was proposed, both in the reward bowl (25 g) and in the bowl where alfalfa used to be. This aimed to compare lambs and kids in their propensity to move in the arena independently of the feed presented, in order to take it into account in the analysis of their behavior in this trial (behavioural variables measured in this last session were included as covariate in the statistical analysis). Session 3 lasted for three days, one day with only the reward bowls filled and two days with both types of bowls filled.

The tests were performed from 8:45 am to 4:45 pm, 5 days a week, with two groups being tested on the morning and the remaining ones on the afternoon. The passage order of each group over days changed daily in a determined way according to a Latin square design. In return, the passage order of the animals within a group was based on animals' will to go to the test arena, to avoid stress due to sorting animals within the waiting pen. Animals' behaviors were recorded with two video cameras positioned over each entrance door. We used the "The ObserverTM software (XT12 version 12.5, Noldus, The Netherlands)" to analyse the videos by encoding the following behaviors: feeding and sniffing at the bowls, walking, idling, exploring, and number of laps. This allowed us to calculate the times spent feeding and walking, the walking speed to get the reward and intake rates of each feed.

We also recorded the number of sainfoin rewards distributed and we weighed all refusals to assess intakes of sainfoin and alfalfa for each individual test.

2.5 Statistical analysis

All data were analyzed using the SAS software (SAS Enterprise Guide, v5.1) and the mixed procedure (PROC MIXED). The residuals normality was checked and we proceeded to variable transformation when needed. Intake data were expressed relative to metabolic weight ($BW^{0.75}$) to account for differences in body weight between animal species.

Data relative to animals' body weight, parasitic status (FEC) and PCV were analysed for the effects of species (kid vs lamb), parasitic status (NP vs P, except for FEC where only infected animals were considered), experimental day and their interactions. The individual animal was considered as the random factor and the repeated statement with the autoregressive covariance structure was used to account for the measurements being made on the same animals on each date. Fecal egg counts data were submitted to a square-root transformation.

For the analyses of the cafeteria trial, we only considered the last two days of each period and averaged intakes over these days, considering the first two ones as a period of re-habitation to the device. We analyzed the daily dry matter intakes of SF, ALF, total intake and SF preference, expressed as the ratio of SF intake divided by total intake. The factors tested were the species, parasitic status and period. The subgroup and the individual animal were considered as random factors, and the period as the repeated one. Additionally, we performed a Student t test to assess whether SF preference was different from the 0.5 value of no preference.

For the operant-conditioning trial, we analyzed intakes of SF, ALF, total intake, SF preference (expressed as the ratio of intakes), SF intake rate (at the bowls, i.e. without considering the walking time), number of laps (number of laps that the animal did to get new sainfoin reward), walking speed (mean walking time/length of the path), and the time spent toward feed (time spent to eat, smell the feed or walk to get the feed) in the 5-min tests. These variables were tested for the effects of species, parasitic status, amount of reward (10 vs 25 g) and their interactions. We also included in the model the effect of the session and the data obtained in session 3 as a covariate. Random factors were the individual animal nested in the sequence of presentation of reward (10 and 25 g). The sainfoin preference expressed as ratio of intakes was submitted to angular transformation (arcsinus).

3. Results

3.1 Animal performance and parasitic loads

The infection with nematodes did not have any effect on animal's growth ($P=0.93$) (Fig. 3). We noticed an effect of the species on the animal weight: the lambs were heavier than kids ($P<0.0001$) all along the experiment. Both species showed similar growth patterns with an average daily weight gain of 195 ± 25 g in lambs and 148 ± 17 g in kids.

Globally, the experimental infection worked well as all infected animals showed excretion of parasite eggs, while no excretion was recorded in NP animals at all dates (Fig. 4). Overall, except on 03 May (14 d after infection) because of no excretion for both species, lambs had higher FEC values than kids (Species x Day, $P<0.0001$). Parasitized lambs started to excrete eggs from three weeks after infection and excretion increased quickly to reach a peak at five weeks after infection. Excretion was quite stable during the cafeteria trial with a significant decrease during the first week of this trial ($P<0.01$). Finally, we observed an increase of the FEC values until the end of the experiment ($P=0.001$).

For kids, the kinetics of excretion seem staggered compared to lambs. The start of excretion and the peak were reached one week later than for the lambs. The peak was observed one week after the starting of the cafeteria trial. It was followed by a decrease ($P=0.002$), but overall, the egg output was stable over the cafeteria trial (no different FEC on D80 and D108, $P=0.59$). Finally, we did not observe in kids the sharp increase in FEC observed in lambs on the last part of the experiment.

Concerning PCV, data were affected by host species, parasitic status and day (3-way interaction, $P=0.018$). At the day of infection, lambs showed higher PCV values than kids ($P=0.01$) and this pattern was maintained throughout the experiment (Fig. 5). From D66 (3 weeks after infection), NP animals started to show higher PCV values than P animals, and this persisted until the end of the experiment ($P<0.001$). In NP animals, the blood PCV was stable all along the experiment, with a mean PCV value on the whole period of 37.4% in lambs and 34.4% in kids. In contrast, the PCV values of P animals dropped after infection. The mean PCV value of the P lambs was 33.0% [$\pm 1.6\%$] and the mean PCV value of the P kids was 30.8% [$\pm 2.2\%$].

3.2 Cafeteria trial

Sainfoin intake (g DM / kg metabolic weight) was higher in kids than in lambs ($P=0.002$), independently of their parasitic status (+ 30% on average) (Fig. 6A; Table 3). The evolution of SF intake through periods was different in P and NP animals ($P=0.037$) as it was stable in NP animals whereas it increased in P ones from the first period to the last one (+22%, $P=0.002$). This made the difference observed between P and NP animals in period 1 ($P<NP$, $P=0.05$) disappear in later periods.

Alfalfa intake was greater in P than in NP animals, independently of the host species with mean intakes of 57 g and 69 g DM /kg BW^{0.75} for the kids and lambs, respectively ($P=0.02$) (Fig. 6B; Table 3). The evolution of ALF intakes through periods was different for lambs and kids ($P=0.008$). The lambs consumed similar amounts between periods 1 and 2 and then tended to decrease ALF intake in period 3 ($P=0.056$). At the same time, kids increased their ALF intake between period 2 and 3 (+29%, $P=0.009$). Thus, the difference observed between species in periods 1 and 2 (greater intake in lambs, $P=0.01$) disappeared in period 3 ($P=0.99$).

The preference for SF was higher in kids than in lambs in the first two periods (2-way interaction, $P=0.006$): kids had a 57.5% and 61.5% preference for SF in periods 1 and 2, respectively, whereas lambs had, at the same time, preferences of 44.5% and 42% (Fig. 6C; Table 3). This comes from the higher SF intake in kids combined with the higher ALF intake in lambs at these periods. However, in period 3, this difference was no more present (56% vs 51% in kids and lambs, respectively; $P=0.25$) because of an increase in lambs' preference between periods 2 and 3 ($P=0.005$), while kids maintained their preference.

We did not observe a greater SF preference in P animals. On the contrary, this preference was greater in NP animals in periods 1 and 2 ($P=0.02$). This difference was no longer observed in period 3 ($P=0.9$) because P animals increased their preference between periods ($P=0.03$), in contrast to NP animals which maintained their SF preference throughout the 3 periods ($P>0.05$).

Concerning the results of Student t-tests that compared SF preference to the value of no preference (0.5), it appeared that the SF preference of P kids and NP lambs was not different from 0.5. In NP kids, SF preference was greater than indifference in periods 2 and 3. In period 1, there was only a tendency ($P=0.063$) due to the high variability among individuals according to the subgroup. In P lambs, SF preference was lower from indifference in periods 1 and 2, then at indifference level in period 3.

Finally, the total daily feed intake was only affected by period ($P=0.04$), with an increase between the last two periods ($P=0.014$) (Fig. 6D; Table 3). Thus, we did not observe any decrease in feed intake associated with the presence of parasites.

3.3 Operant-conditioning trial

During this trial, the time that the animal spent on doing test (with no other behaviors not related to the feed) averaged 295s (over the 300s of test duration) for all groups, reward levels and sessions ($P>0.2$ for all variables). This observation indicates that animals had an activity directed towards feed for almost all the test duration, and validates the tests (Fig. 8A; Table 4).

SF intake within tests was only affected by the reward ($P=0.0001$), with a greater intake when the reward was 25 g than 10 g (Fig. 7A; Table 4).

Conversely, when the level of the reward increased, the ALF intake decreased ($P=0.023$) (Fig. 7B; Table 4). Three groups showed close patterns, but the NP kids ingested twice as much ALF as the other animals. ALF intake increased between sessions ($P=0.008$).

The same pattern was observed for total intake (Fig. 7D; Table 4) with the NP kids showing a greater intake than the other groups. There was no effect of the reward level ($P>0.05$), but there was an increase in total intake between sessions 1 and 2 ($P=0.0043$).

The SF preference was different than the one obtained in the cafeteria trial as we did not observe a greater preference for SF in kids than in lambs (Fig. 7C; Table 4). The specific behavior of NP kids (high ALF intake) made their preference for SF lower than the one of P kids ($P=0.05$) but this was not due to a greater SF intake. In lambs, a trend was observed for a higher SF preference for NP lambs ($P=0.10$). SF preference increased with the reward level whatever the group ($P=0.0001$).

Intake rate of SF at the bowls was similar between species and parasitic status ($P>0.05$). The only significance was for the reward level with a greater intake rate with the largest reward ($P=0.0002$) (Fig. 8B; Table 4).

Finally, the number of laps per test and the walking speed were not different between groups and sessions (Fig. 8C and 8D; Table 4).

4. Discussion

In this experiment, we hypothesized that 1) the selection and motivation to get the tannin-rich feed would be greater in goats, due to their capacity to eat plant secondary metabolites in the shrub layer; 2) the selection and motivation to get the tannin-rich feed would be greater in infected animals, especially for the goats because of their reduced resistance against parasites; 3) the intake of the tannin-rich feed would increase over time in infected animals once they would have experienced the tannin consumption.

The effectiveness of experimental infection

In terms of infection, we made the choice of administering larvae relative to body weight to take into account the differences in body weight between lambs and kids. This may be consistent with assumed differences in larvae ingestion at pasture due to different intakes in animals of different body weights (lambs were 6 kg heavier than kids at the infective day, resulting in 1000 L3 more). The *Haemonchus contortus* infective larvae were given at the rate of 170L3/kg of body weight, in order to obtain an infection with clinical signs (diarrhea for example) but without causing significant negative impacts on animal health (anorexia for example).

This kind of infection (by kg of BW) was already used in other studies with infective doses of 100L3/kg and 200L3/kg (Khan et al., 2011; 2012) and was done to provide moderate establishment and a low level of exposure to parasites, leading to a sub-clinical parasitism. The 100L3/kg did not provide sub-clinical signs (Khan et al., 2011), that is why the infective dose of 170L3/kg was used.

Infections worked well as all treatment animals were infected, with egg output of mean FEC values between 3000 and 5000 eggs per gram at the peak of infection. However, a difference in infection level was observed between lambs and kids, probably due to the lower number of larvae administered to kids.

PCV values confirmed the infected status and worms' activity in P animals as we observed a clear drop in PCV values 3 to 4 weeks after infection. This drop was similar in both lambs and kids (5 points on average) despite the differences in FEC between species. PCV values were greater in lambs than in kids throughout the whole study. This was also observed by Mengistu et al. (2016 and 2017) and Burke et al. (2007).

Despite the clinical signs of infection aforementioned, no effect of infection on animals' growth nor on daily feed intakes were observed, contrary to what is often observed in the literature: infection with *Haemonchus contortus* often leads to clinical signs such as anemia, anorexia and production losses such as a delayed growth rate of kids and lambs (Urquhart et al., 1996; Charlier et al., 2014; Mavrot et al. 2015; Besier et al., 2016). Animals would have optimized nutrient intake of sainfoin and alfalfa, for their growth, more than selected tannins from SF for the AH properties.

Due to the high FEC values obtained all along the experiment and due to the non-modified daily feed intake or the non-effect on the growth rate, we can conclude that the infection was effective and moderate.

Fight and flight strategies

These strategies would lie on that sheep are quite resistant to parasites but reluctant to consume feed rich in secondary compounds (the response in sheep would be based on the development of an immune response), while goats are not resistant but appreciate feeds and plants rich in secondary compounds (the response in goats would be based on feeding behaviour) (Hoste et al., 2010). The hypothesis that goats would be more efficient in self-medication than sheep is based on these fight and flight strategies.

In terms of resistance to parasites, the duration of the study (3 months between infection and end of the experiment), was probably too short to allow an effective development of immunity in lambs. Two types of immune response can explain the host resistance against gastro-intestinal nematodes: innate immunity and acquired immunity (Andronicos et al., 2010). The immune response relies on the ability of the host to regulate gastro-intestinal nematode populations by non-specific mechanisms, from the approximate age of 6-months old (Guedes et al., 2010). With repeated parasite exposures, small ruminants can develop protective immunity to subsequent *H. contortus* infections (Nisbet et al., 2016) and our experiment was probably too short to develop an acquired immunity.

Consistently, FEC still increased by the end of the experiment (after the cafeteria trial). The results obtained on the FEC values, especially for the lambs, were in line with those obtained on the PCV data: decrease in the PCV values during the three weeks following the infection, then stabilization and increase at the end of the cafeteria study, then decrease at the end of the study.

When we compared lambs' and kids' behavior in the cafeteria trial, we observed a preference for SF globally higher in kids than in lambs, due to a greater SF intake and a lower ALF intake in kids, especially for the NP kids. This is consistent with the hypothesis that the selection of a tannin-rich food would be greater in goats, due to a less immune response and a greater propensity to eat plant secondary metabolites (Hoste et al., 2010). Concerning the ability to self-medicate and the hypothesis that selection and motivation to get the tannin-rich food would be greater in infected animals, we considered curative self-medication with the associated learning process allowing the animal to associate the ingestion of one given food to post-ingestive consequences (Hart, 2005; Villalba et Provenza, 2007). The hypothesis was that ruminants would be able to make the association for medicinal benefits in a feed as they can do for nutritional benefits (increase in intake) or detrimental toxic consequences (decrease in intake) (Wang and Provenza, 1996; Ginane et al., 2005; Villalba and Landau, 2012).

In the cafeteria trial, we did not observe any greater preference for SF in P than in NP animals; it was even the reverse in periods 1 and 2. Nevertheless, we observed an evolution through periods which is consistent with our hypothesis that P animals increased their intake of SF while NP counterparts did not. In lambs, it was associated with a slight decrease in ALF intake which led to a slight increase in SF preference. This was not observed in P kids, which increased intakes in SF and ALF at the same time, leading to a stability of SF preference.

These increases in SF intakes were not negligible (+240 g DM and +260 g DM between periods 1 and 3 in kids and lambs, respectively). However, the importance of the result is lowered because it did not lead, after 24 days of cafeteria procedure, to a clear preference for SF (ratio not different from 0.5), nor to greater SF intakes in P than in NP animals, whatever the species.

Furthermore, in the Operant-conditioning trial, results were not conclusive. In lambs, there was no difference in SF preference nor in SF intake between P and NP individuals. In kids, one result may seem interesting as SF preference was greater in P than in NP animals, but this was due to a greater intake of ALF in NP kids rather than in a greater SF intake in P ones; as for lambs, SF intakes were similar in NP and P kids.

Also, if P animals have been more motivated to get SF than NP counterparts, when the SF reward decreased from 25 g to 10 g, we could have expected at least one the following responses: a greater SF intake rate at the bowls, an increased number of laps, or an increased walking speed to obtain the maximum of rewards within the 5 minutes. However, none of these behaviours have been recorded: we did not find any differences in term of numbers of laps nor of walking speed, and the sainfoin intake rate was lower with the 10 g reward. One hypothesis to explain the increase in sainfoin intake with the biggest reward could be an “opportunistic effect”, *i.e.* when the reward was offered in a great quantity, the animals ate more and faster. The smallest reward weighted 10 g and this quantity may have been too small and the animals could have given up the reward. However, in a recent study, the 10 g reward seemed to be in the zone where the shift was taking place between the two rewards but not below this threshold (Catanese et al., 2016).

In summary, we did not observe curative self-medication in this experiment. We did not either observe a greater self-medication ability in kids than in lambs. Indeed, it would be rather lambs that showed some signs in the sense of self-medication with an increase in both SF intake and SF preference in P lambs through the cafeteria trial, though this did not lead to greater SF intake nor preference in P lambs compared to NP ones. This is in contrast with other studies where a differential intake was observed (sheep (Villalba et al., 2010; Juhnke et al., 2012), goats (Amit et al., 2013)), suggesting that the parasitic burdens influenced the consumption of tannins and that the animals felt the benefits of the tannins against parasites (Butter et al, 2000; Lisonbee et al., 2009).

No clear evidence of curative self-medication – possible explanations

SF efficacy against parasites

In the literature, tannin concentration associated with effects on parasites but with no negative effects on animal health ranged from 4% to 10% (Min et al., 2003; Mc Sweeney et al., 2008). The SF used in the study contained 3.82% of tannins (HCl-Butanol method), so we are at the lower range to improve FEC or blood parameters relative to the infection.

Recently, industry has focused on dehydration processes of sainfoin, in order to control the quality of the plant compounds before use and to facilitate the distribution of sainfoin in farms. Some recent studies performed with such dehydrated pellets reported promising results, affecting the dynamics of infection by *Haemonchus contortus* (Girard et al., 2013; Gaudin et al., 2016a). In our experiment, we have seen beneficial effects of SF pellets on the host and these results can confirm other studies proving the anthelmintic efficacy of sainfoin (Paolini et al., 2003, 2005; Heckendorn et al., 2006; Manolaraki et al., 2010). Though we did not consider an infected control group that would have not received SF to compare parasitic loads evolutions and to explore the hypothesis of intake and nutrient optimization, the pattern of FEC, notably in sheep, seems to be correlated with the experimental phases. One week after the start of the cafeteria trial (associated with quite high SF intakes), we observed a clear drop of FEC in P lambs, then a stabilization. Once the cafeteria trial was completed, we observed a new increase in FEC. The drop observed after 7 days of important intakes of SF is consistent with bibliography (Min et al., 2004, 2005; Martinez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010; Luginbuhl et al., 2013).

In kids, this pattern is less clear though we observed as well a decrease in FEC during the cafeteria trial (between D87 and D94). In addition, the PCV results showed a little improvement in P animals within the cafeteria trial before a deterioration up to the end of the experiment, even if these patterns appeared again more correlated to the experimental phases in lambs than in kids. Consequently, even if we cannot strictly attribute these evolutions to the condensed tannins of SF, we can consider that the absence of self-medication is not due to a lack of efficacy of SF.

Perception by the host of the beneficial effects of SF

Ruminants are able to perceive the post-ingestive effects of feed, these being either positive or negative, and to modify their diet selection accordingly (Provenza et al., 1995; Wang and Provenza, 1996; Ginane et al., 2009; Estell, 2010). For this process to occur, a necessary point is that the animal perceives the consequence of the food he has ingested. When we consider the medicinal consequences of foods, such as anthelmintic consequences, some points can be highlighted, as detailed by Hart in his review published in 2005.

First, the nature of the beneficial effects on the host. Tannins can affect the biology of adult nematodes mainly in two ways: by decreasing females' fertility (Paolini et al., 2005; Manolaraki et al., 2010; Martínez-Ortíz-De-Montellano et al., 2010) and/or by decreasing worms' lifetime (Heckendorn et al., 2006, 2007). For the infected herbivores, this may make great difference. Indeed, the total worm burden should be crucial for the host's perception of his parasitic load as, if the number of active worms would maintain, the associated detrimental effects would maintain as well.

Second, the similarities between feeds. The two feeds used in this experiment were two pelleted legumes with contents in proteins that we voluntarily chose as closest as possible. This aimed to make the content in condensed tannins the main difference between experimental feeds, but this may have also impaired the ability of the animals to discriminate them. Previous experiments have shown that ruminants can have good discrimination abilities. Hence, sheep were shown to be able to discriminate alfalfa and sainfoin when offered as fresh plants (Ginane and Dumont, 2011). More recently, sheep were also able to discriminate two pelleted sainfoin differing by their content in condensed tannins (Costes-Thiré et al., 2016). So, it is unlikely that the absence of self-medication came from a problem of discrimination between feeds. In return, our experimental feeds were both of good nutritional values, notably in terms of proteins. Infections with gastro-intestinal nematodes induce damage along the digestive tract, such as losses in proteins (Knox et al., 2006; Nnadi et al., 2009). Improving the nutritional status of the host by providing feed with high content in protein can also be a way to control the gastro intestinal parasitism (Torres-Acosta et Hoste, 2008). In that case, the alfalfa diet, chosen to compare two legumes with similar levels of proteins, could have improved as well the host resistance against the infection with *H. contortus*, reducing by this way the perception of the animal of a difference between feeds.

Third, the inertia of changes - or the delay between behavior (ingestion) and reinforcement (consequence) (Hart, 2005). It is well known that the closer the consequence is relative to the behavior, the more probable are the formation and learning of the association (Kronberg et al., 1993; Provenza et al., 1993; Schwartz and Robbins, 1995). In the case of parasitism, it has been shown that several days of quite important intakes of tannin-rich food are necessary to reach sufficient tannin concentrations in the infected digestive organs for an AH effect to occur (Burke et al., 2012; Hoste et al., 2016). This may greatly impair the learning process.

Finally, the choice situation. It is known that the association between a consequence and the specific food is made more difficult when the animal ingests more than one feed at a time (Duncan and Young, 2002; Favreau et al., 2010). Consistently with this, the self-medication experiments in ruminants that showed expression of self-meditative behaviors involved a “conditioning” period where the tannin-rich feed was proposed to animals alone for a given period of time (Villalba et al., 2010; Fernández et al., 2012; Juhnke et al., 2012). In previous studies, animals increased their consumption of feed rich in PSMs after having experienced the tannins intake, meaning that a “conditioning” period is often mandatory (Egea et al., 2014). We also observed in another experiment an increase in preference for a tannin-rich SF after animals (in that case both P and NP) had the opportunity to experience the post-ingestive consequences of ingesting the forage as the sole feed for 3 weeks (Costes-Thiré et al., 2016). If we decided in the present work not to propose such a conditioning period, it was to test whether sheep and goats would be able to disentangle the consequences of each feed by themselves. Our results agree with previous studies in that a conditioning period seems important for the animals to perceive the consequences of the feeds. Lastly, a phenomenon that could be involved and would help animals in their choices, is the modification of sensorial preferences, e.g. taste, for the feed rich in secondary compounds, when an animal is infected. This has been shown in other animal species such as insects (Bernays et Singer, 2005), but not yet in ruminants to our knowledge.

Conclusion

This study did not show clear evidence of a curative self-medication ability in infected animals with pelleted sainfoin. Kids showed greater intakes and preferences for sainfoin than lambs, but only in the cafeteria trial and without sign of a greater ability to self-medicate.

Parasitized lambs and kids increased their intake of sainfoin through the cafeteria trial but only lambs increased preference and this never led to greater intakes or preference for sainfoin in parasitized than non-parasitized animals.

We focused on curative self-medication and did not consider preventive self-medication. However, for an herbivore, ingesting large amounts of a given nutritious plant, even when it possesses anthelmintic properties, does not evidence preventive self-medication. Nevertheless, these large intakes of sainfoin and the associated effects on parasitic loads, suggest that with a moderate level of tannins, this forage represents an interesting option in the use of feeding strategies to control GIN infections in small ruminants.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support the STReP project of the INRA metaprogram focused on the integrated management of animals' health (GISA), the Phase INRA department (Auvergne region) for the PhD thesis of Ms Morgane Costes-Thiré and the French Agency for Research (ANRt) for the CIFRE PhD thesis 2013/1480 of Ms Elodie Gaudin. The help of the following persons is particularly acknowledged: Mr Mickaël Bernard, Aline Cercy and Bruno Viallard for taking care of the animals and MG2MIX for having provided the sainfoin pellets.

References

- Amit, M. Cohen, I., Marcovics, A., Muklada, H., Glasserd, T.A., Ungar, E.D., Landau, S.Y., 2013. Self-medication with tannin-rich browse in goats infected with gastro-intestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 198, 305-311.
- Andlauer, W., Fürst, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res. Internat.* 35, 171-176.
- Andronicos, N., Hunt, P., Windon, R., 2010. Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*, 40, 417–429.
- Baermann, G., 1917. Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (nematoden) larven in erdproben. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië*, 57, 131-137.
- Bernays, E.A., Singer, M.S., 2005. Taste alteration and endoparasites. *Nature* 436, 476.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. Chapter four – The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Adv. Parasit.*, 93, 95-144.
- Burke, J.M., Kaplan, R.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., Getz, W.R., Mobini, S., Valencia, E., Williams, M.J., Williamson, L.H., Vatta, A.F., 2007. Accuracy of the FAMACHA system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. *Vet. Parasitol.* 147, 89-95.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., and Terrill, T.H., 2012. Use of a mixed sericea lespedeza and grass pasture system for control of gastrointestinal nematodes in lambs and kids. *Vet. Parasitol.* 186, 328-336.
- Butter, N.L., Dawson, J.M., Wakelin, D., Buttery, P.J., 2000. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. *J. Agr. Sci.* 134, 89–99.
- Catanese, F., Distel, R.A., Fernández, P., Villalba, J.J., 2016. How the foraging decisions of a small ruminant are influenced by past feeding experiences with low-quality food. *Behav. Proc.*, 12-20.
- Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S.F., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 173, 157-160.
- Charlier, J., Morgan, E.R., Rinaldi, van Dijk, J., Demeler, J., Hoglund, J., Hertzberg, H., Van Ranst, B., Hendrickx, G., Vercruysse, J., 2014. Practices to optimize gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Vet Rec.*, 175, 250-255.

- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167-185.
- Costes-Thiré, M., Villalba, J., Hoste, H., Ginane, C., 2016. Increased intake of tannin-rich sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets by parasitized and non-parasitized sheep after a period of conditioning. Presented at ASAS ADSA WSASAS CSAS Joint Annual Meeting, Salt Lake City, USA (2016-07-19 - 2016-07-23).
- Cunniff, P., 1995. Official methods of analysis of AOAC international. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Dumont, B., Dutronc, A., Petit, M., 1998. How readily will sheep walk for a preferred forage? *J. Anim. Sci.* 76, 965-971.
- Duncan, A.J., Young, S.A., 2002. Can goats learn about foods through conditioned food aversions and preferences when multiple food options are simultaneously available? *J. Anim. Sci.* 80, 2091-2098.
- Du Toit, J.T., Provenza, F.D., Nastis, A., 1991. Conditioned taste aversions: how sick must a ruminant get before it learns about toxicity in foods? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 30, 35-46.
- Egea, A.V., Hall, J.O., Miller, J., Spackman, C., Villalba, J.J., 2014. Reduced neophobia: A potential mechanism explaining the emergence of self-meditative behavior in sheep. *Physiol. Behav.* 135, 189-197.
- Estell, R.E., 2010. Coping with shrub secondary metabolites by ruminants. *Small. Rumin. Res.* 94, 1-9.
- Favreau, A., Baumont, R., Duncan, A.J., Ginane, C. 2010. Sheep use pre-ingestive cues as indicators of post-ingestive consequences to improve food learning. *J. Anim. Sci.* 88, 1535-1544.
- Fernández, H.T., Catanese, F., Puthod, G., Distel, R.A., Villalba, J.J., 2012. Depression of rumen ammonia and blood urea by quebracho tannin-containing supplements fed after high-nitrogen diets with no evidence of self-regulation of tannin intake by sheep. *Small Rum. Res.* 2015, 126-134.
- Gaudin, E., Simon, M., Quijada, J., Schelcher, F., Sutra, J-F., Lespine, A., Hoste, H., 2016a. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Vet. Parasitol.* 227, 122-129.
- Gaudin, E., Quijada, J., El Korsó, R., Ramsay, A., Gerfault, V., Ginane, C., Hoste, H., 2016b. Effect of length of distribution and dietary concentrations on the anthelmintic effects of tannin-containing pellets against gastro intestinal nematodes in goats. In: 12th International Conference on Goats, IGA 2016, Antalya, Turkey, 25-30th September 2016.
- Ginane, C., Dumont, B., Petit, M., 2002. Short-term choices of cattle vary with relative quality and accessibility of two hats according to an energy gain maximization hypothesis. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 75, 269-279.

- Ginane, C., Duncan, A.J., Young, S.A., Elston, D.A., Gordon, I.J., 2005. Herbivore diet selection in response to simulated variation in nutrient rewards and plant secondary compounds. *Anim. Behav.* 69, 541-550.
- Ginane, C., Baumont, R., Duncan, A.J., 2009. Diet learning through post-ingestive consequences in sheep: the case of starch and casein variously combined in the same foods. *Animal* 3, 135-142.
- Ginane, C., Dumont, B., 2011. Do sheep (*Ovis aries*) categorize plant species according to botanical family? *Anim. Cogn.* 14, 369-376.
- 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. In: 64th EAAP Nantes, 26th-30th August 2013, Page 506.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage analyses. *Agriculture Handbook* 379. Agric. Res. Serv. U.S. Dept. of Agriculture.
- Grabber, J., Zeller, W.E., Mueller-Harvey, I., 2013. Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in *Lotus* species by the butanol-HCl-iron assay. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2669-2678.
- Guedes, M.T., Zacharias, F., Couto, R.D., Portela, R.W., Santos, L.C.S., Santos, S.C.O., Pedroza, K.C., Peixoto, A.P.C., López, J.A., Mendonça-Lima, F.W., 2010. Maternal transference of passive humoral immunity to *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 136, 138–143.
- 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. *Vet. Parasitol.* 191, 51-58.
- Hart, B.L., 2005. The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. *Anim. Behav.*, 70, 975-989.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lamb. *Vet. Parasitol.* 142, 293-300.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123-134.
- Hofmann, R.R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, 443-457.
- 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, 253-261.

- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I., 2010. Goat–Nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol.* 26, 376-381.
- Hoste, H., Martínez-Ortíz-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 infection. *Vet. Parasitol.* 186, 18-27.
- 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.
- 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. Chapter seven – Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Adv. Parasit.*, 93, 239-351.
- Huffman, M.A., 1997. Current evidence for self-medication in primates: a multidisciplinary perspective. *Yearb. Phys. Anthropol.* 40, 171–200.
- Jackson, F., Varady, M., Bartley, D.J., 2012. Managing anthelmintic resistance in goats-can we learn lessons from sheep ? *Small Rumin. Res.* 103, 3-9.
- Janzen, J., 1978. Complications in interpreting the chemical defenses of trees against tropical arboreal plant-eating vertebrates. In: Montgomery, G. (Ed.), *The Ecology of Arboreal Folivores*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 73–84.
- 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*. *Vet. Parasitol.* 188, 104-114.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20, 477-481.
- Khan, F.A., Sahoo, A., Dhakad, S., Pareek, A.K., Karim, S.A., 2011. Effect of trickle infection with *Haemonchus contortus* on pathophysiology and metabolic responses in growing lambs. *Indian. J. Anim. Sci.* 81, 1005-1009.
- Khan, F.A., Sahoo, A., Sonawane, G.G., Karim, S.A., Dhakad, S., Pareek, A.K., Tripathi, B.N., 2012. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. *Livest. Prod. Sci.* 150, 143-151.
- Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., 2006. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, 139, 385-393.
- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Parasitol.* 205, 170-175.

- Kronberg, S.L., Muntifering, R.B., Ayers, E.L., 1993. Feed aversion learning in cattle with delayed negative consequences. *J. Anim. Sci.* 71, 1767-1770.
- Lisonbee, L.D., Villalba, J.J., Provenza, F.D., Hall, J.O., 2009. Tannins and self-medication: Implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behav. Processes.* 82, 184-189.
- Luginbuhl, J-M., Glennon, H.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., 2013. Grazing and pasture management. *Proceedings of the American Consortium for Small Ruminant Parasite Control 10th Anniversary Conference*, May 20-22, 2013, Fort Valley, GA, pages 63-67.
- 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.
- Martínez-Ortíz-De-Montellano, C., Vagars-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* 172, 283-290.
- Mavrot, F., Hertzberg, H., Torgerson, P., 2015. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* 8, 557-568.
- Mc Sweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., Seawright, A.A., 2008. A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 158-171.
- Mengistu, U.L., Puchala, R., Sahlu, T., Gipson, T.A., Dawson, L.J., Goetsch, A.L., 2016. Comparison of different levels and lengths of restricted drinking water availability and measurement times with Katahdin sheep and Boer and Spanish goat wethers. *Small Rumin. Res.* 144, 320-333.
- Mengistu, U.L., Puchala, R., Sahlu, T., Gipson, T.A., Dawson, L.J., Goetsch, A.L., 2017. Conditions to evaluate differences among individual sheep and goats in resilience to high heat load index. *Small Rumin. Res.* 147, 89-95.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., Mc Nabb, 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.* 106, 3-19.
- Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahlu, T., 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Rumin. Res.* 51, 279-283.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Cell. Mol. Biol. Plants.* 1, 151-217.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet. Parasitol.*, 80, 15-27.

- Nisbet, A.J., Meeusen, E.N., González, J.F., Piedrafita, D.M., 2016. Chapter eight – Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. *Adv. Parasit.*, 93, 353-398.
- Nnadi, P.A., Kamalu, T.N., Onah, D.N., 2009. The effect of dietary protein on the productivity of West African Dwarf (WAD) goats infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 161, 232-238.
- Paolini, V., Frayssines, A., De-La-Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.* 34, 331-339.
- Paolini, V., De-La-Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 127, 277-283.
- Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S.M., Demeler, J., Enemark, H.L., 2014. Field efficacy of four anthelmintics and confirmation of drug-resistant nematodes by controlled efficacy test and pyrosequencing on a sheep and goat farm in Denmark. *Vet. Parasitol.* 206, 208-215.
- Provenza, F.D., Nolan, J.V., Lynch, J.J., 1993. Temporal contiguity between food ingestion and toxicosis affects the acquisition of food aversions in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 38, 269-281.
- Provenza, F. D. 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *J. Range Manage.* 48:2-17.
- Provenza, F. D., Villalba, J.J., 2006. Foraging in domestic vertebrates: Linking the internal and external milieu. Pages 210-240 in *Feeding in Domestic Vertebrates: From Structure to Function*. V. L. Bels, ed. CABI Publ., Oxfordshire, UK.
- 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 (Paris)*, 45, 321-342.
- Schwartz, B., Robbins, S. J. 1995. *Psychology of Learning and Behavior*. 4th edn. New York: W.W. Norton.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. Sericea lespedeza hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150-157.
- Sibbald, A.M., Hooper, R.J., 2004. Sociability and the willingness of sheep to move away from their companions in order to graze. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 51-62.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. The epidemiology of parasitic diseases. In: *Veterinary Parasitology (3rd Edition)*, Blackwell (Ed.), Oxford, pp. 764-769.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117-122.

- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Res.*, 77, 159–173.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd ed., Oxford, 307 p.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111-122.
- Villalba, J. J., Provenza, F. D., 1999. Nutrient-specific preferences by lambs conditioned with intraruminal infusions of starch, casein, and water. *J. Anim. Sci.* 77, 378–387.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., 2007. Self-medication and homeostatic behaviour in herbivores: learning about the benefits of nature's pharmacy. *Animal* 1, 1360-1370.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., Hall, J.O., Lisonbee, L.D., 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infections. *J. Anim. Sci.* 88, 2189-2198.
- Villalba, J.J., Landau, S.Y., 2012. Host behavior, environment and ability to self-medicate. *Small Rum. Behav.* 103, 50-59.
- Wang, J., Provenza, F.D., 1996. Food preference and acceptance of novel foods by lambs depend on the composition of the basal diet. *J. Anim. Sci.* 74, 2349-2354.

Figure captions

Fig. 1: Chronology of experimental phases and events. Stars indicate the time of blood and faeces sampling and analysis.

Fig. 2: Schematic overhead view of the experimental arena for the operant-conditioning trial. “SF” represents the bowl filled with SF_EXP (experimental sainfoin) and “ALF” represents the bowl filled with ALF_EXP (experimental alfalfa). Dotted lines represent openwork fences while solid lines represent solid fences.

Fig. 3: Evolution of body weight (kg) of parasitized (P) and non-parasitized (NP) lambs and kids, throughout the experiment (lsmeans $\pm$ S.E.M.).

Fig. 4: Effect of species (lambs; kids) and parasitic status (P: parasitized; NP: non-parasitized) on fecal egg count (eggs / g faeces) throughout the experiment. Means are back transformed lsmeans (square root transformation). Errors are S.E.M. of rough data. The grey square represents the time of the cafeteria trial.

Fig. 5: Effect of species (lambs; kids) and parasitic status (P: parasitized; NP: non-parasitized) on blood packed cell volume (%), lsmeans $\pm$ S.E.M.). The grey square represents the time of the cafeteria trial.

Fig. 6: Cafeteria trial – Effect of species (lambs; kids) and parasitic status (P: parasitized; NP: non-parasitized) on (A) daily sainfoin (SF_EXP) intake, (B) alfalfa (ALF_EXP) intake, (C) sainfoin preference, and (D) total intake (lsmeans $\pm$ S.E.M.), according to the period (P1 to P3). Intakes are expressed per kg of metabolic weight. Sainfoin preference represents the ratio of SF intake over total intake. For figure (C), "ns" means no difference relative to the value of no preference (0.5), " * " means difference at $P < 0.05$, and " ** " means difference at $P < 0.01$ (Student t-test). DM=dry matter; BW=body weight.

Fig. 7: Operant-conditioning trial – Effect of species (lambs; kids) and parasitic status (P: parasitized; NP: non-parasitized) on (A) short-term sainfoin (SF_EXP) intake, (B) alfalfa (ALF_EXP) intake, (C) sainfoin preference, and (D) total intake, according to the SF reward (10 vs. 25 g). Intakes are expressed per kg of metabolic weight. Sainfoin preference represents the ratio of SF intake over total intake. For (A), (B) and (D), values are lsmeans $\pm$ S.E.M. For (C), values are back transformed lsmeans (arcsinus transformation) and errors are S.E.M. of rough data. DM=dry matter; BW=body weight.

Fig. 8: Operant-conditioning trial – Effect of species (lambs; kids) and parasitic status (P: parasitized; NP: non-parasitized) on (A) time directed toward food within tests, (B) short-term sainfoin intake rate (at the bowl), (C) walking speed, and (D) number of laps in 5 min (lsmeans $\pm$ S.E.M.), according to the SF reward (10 vs. 25 g). DM=dry matter.

Figures

Figure 1

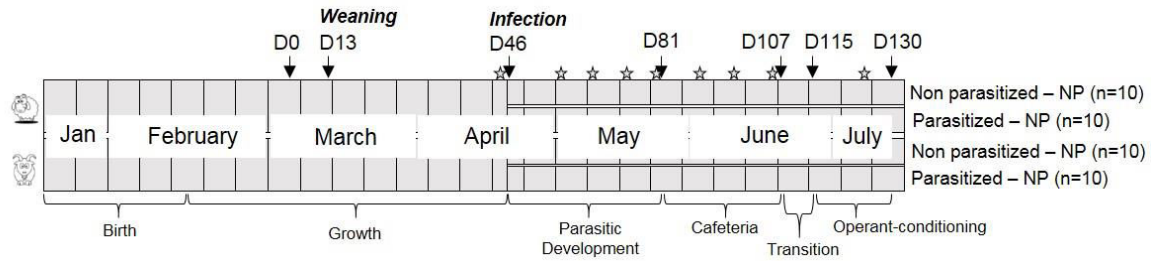


Figure 2

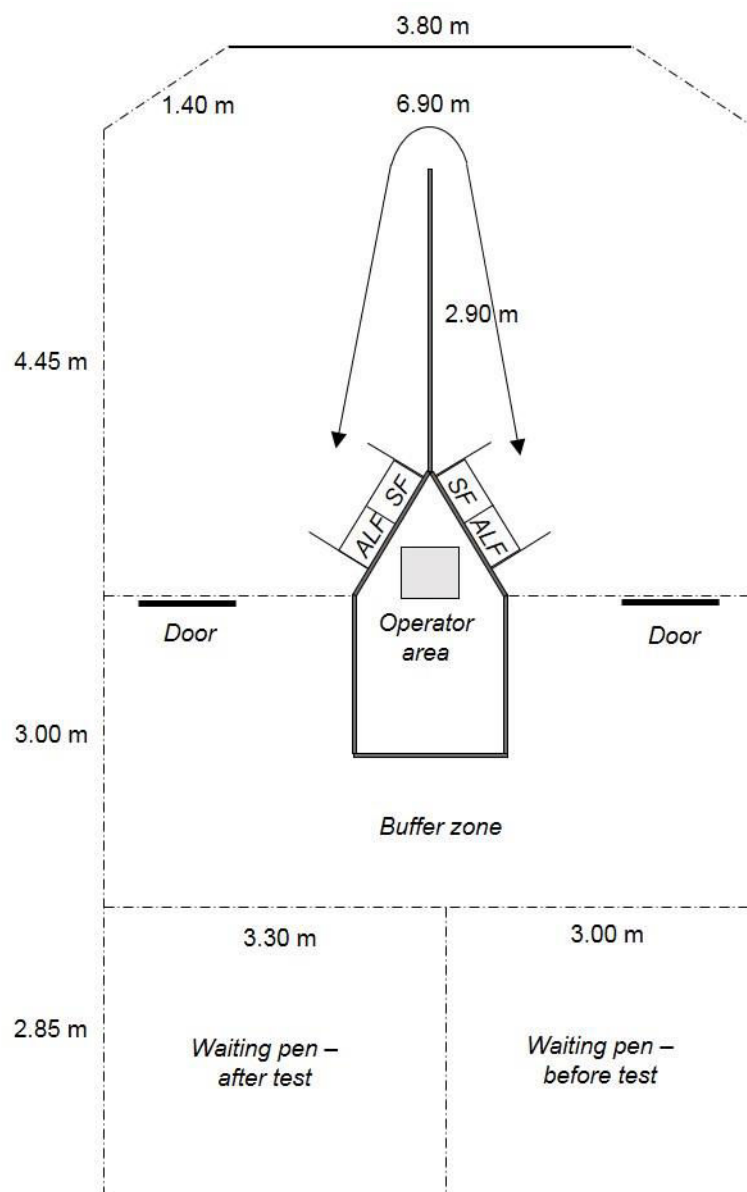


Figure 3

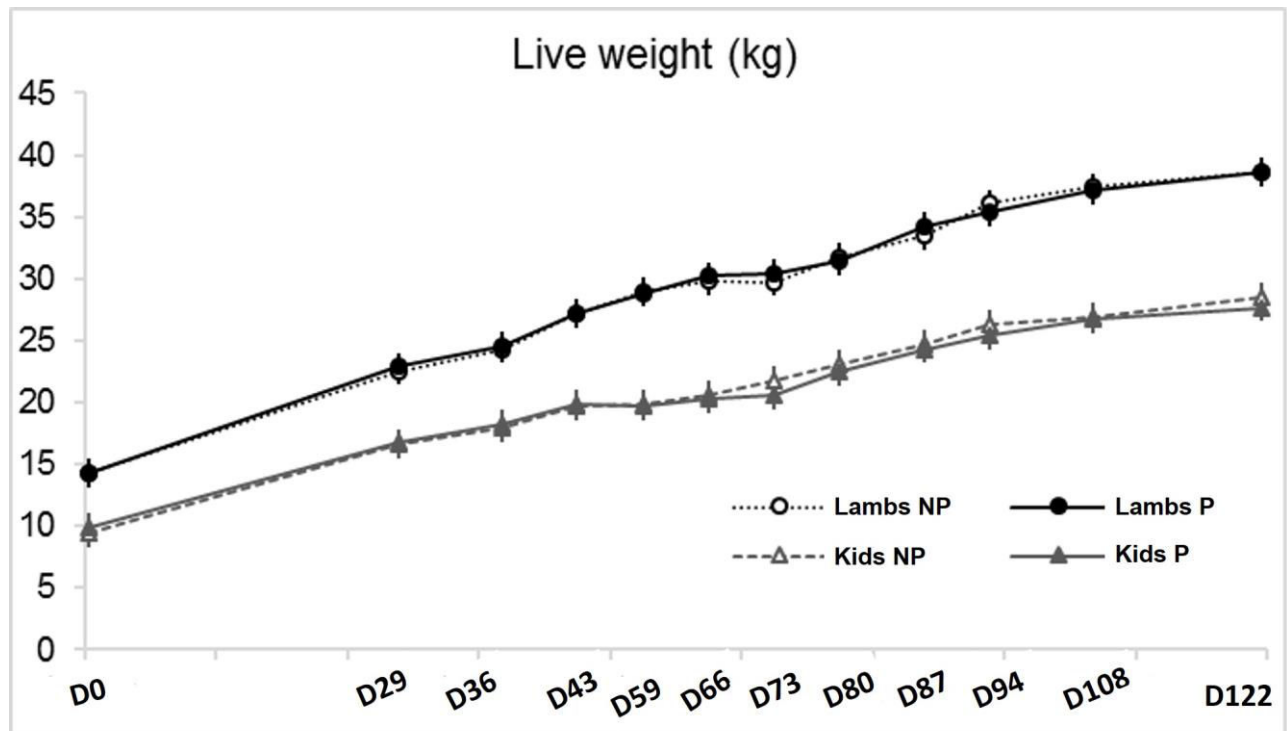


Figure 4

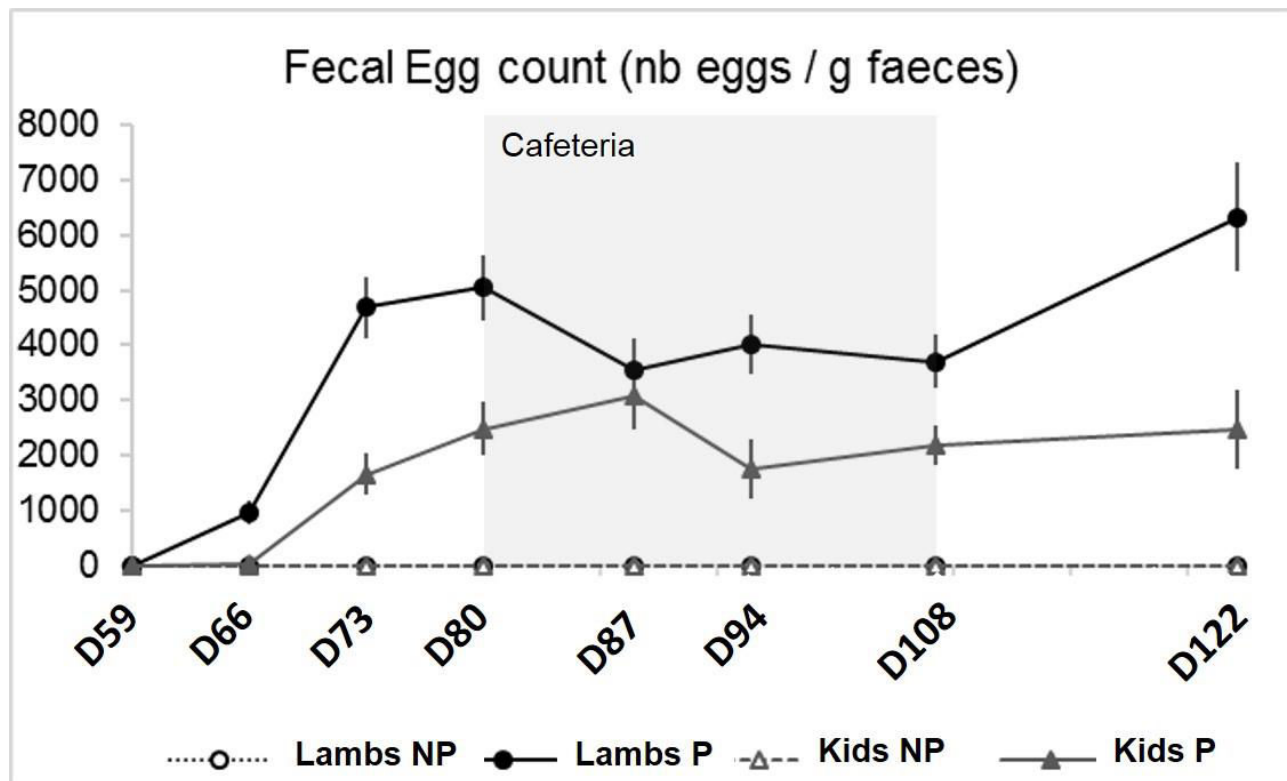


Figure 5

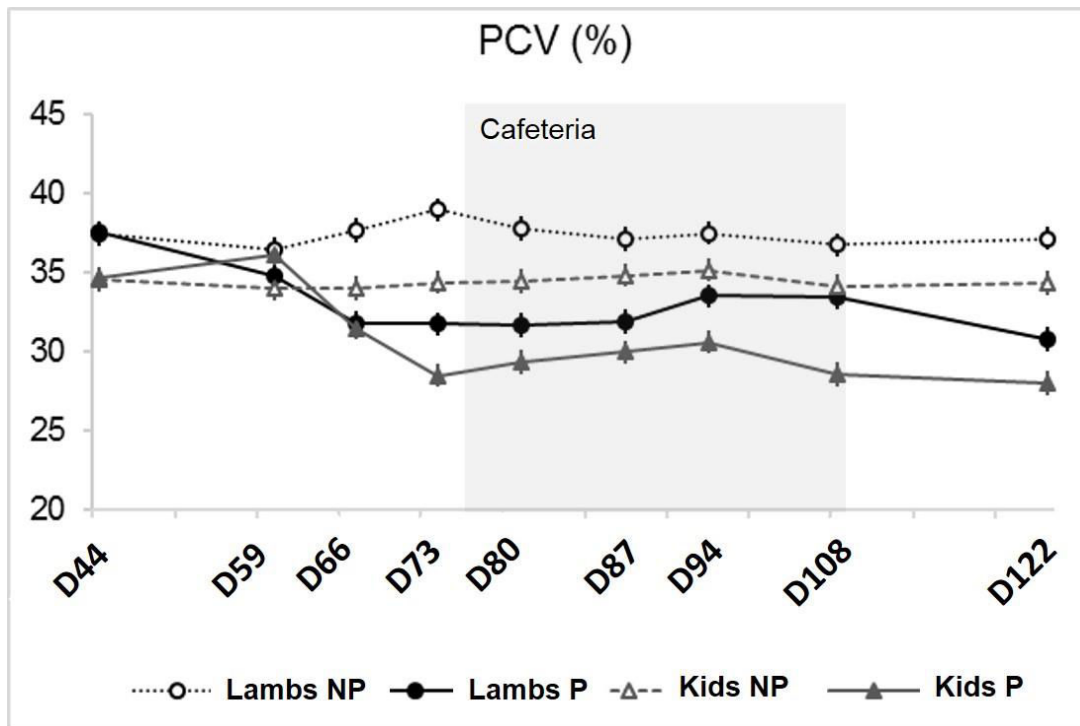


Figure 6

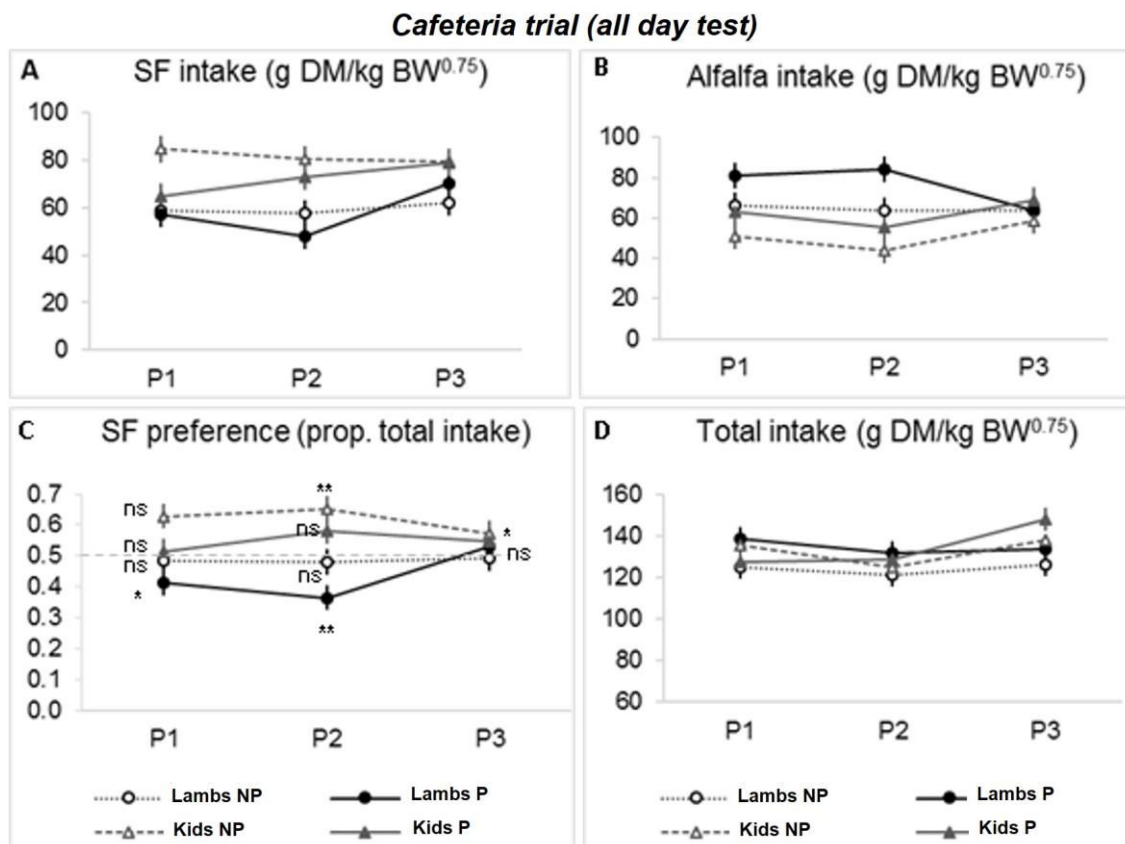


Figure 7

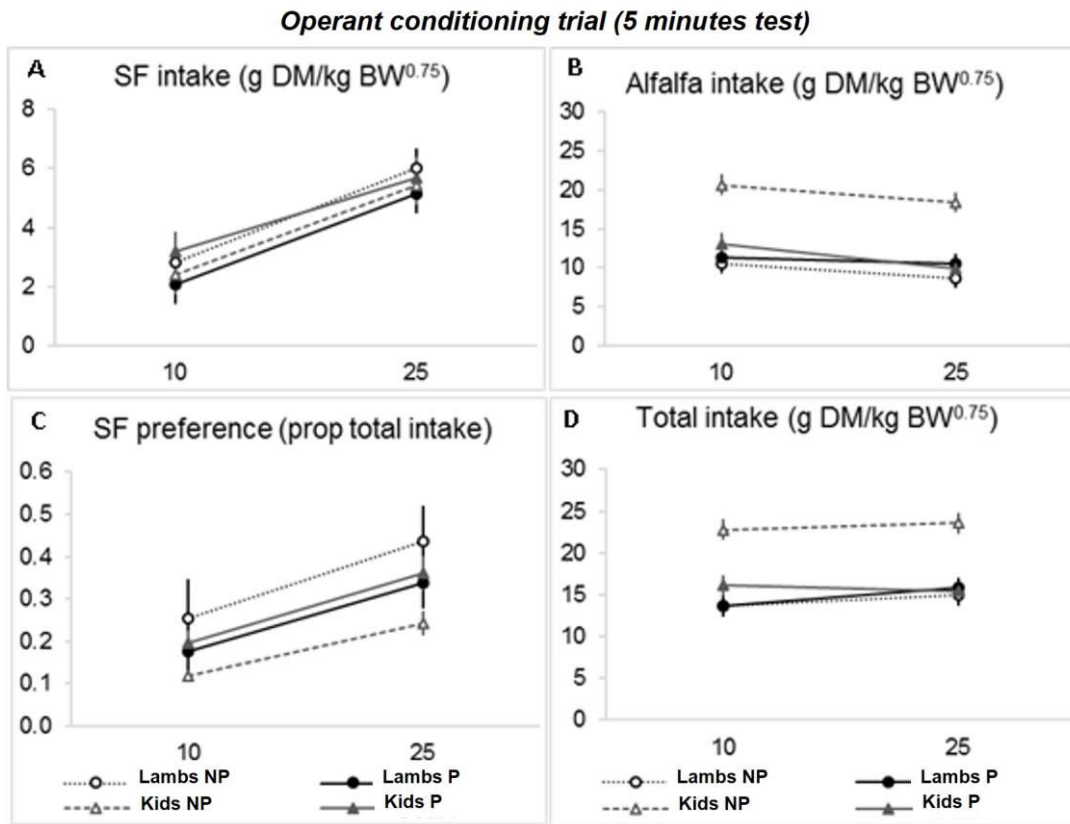
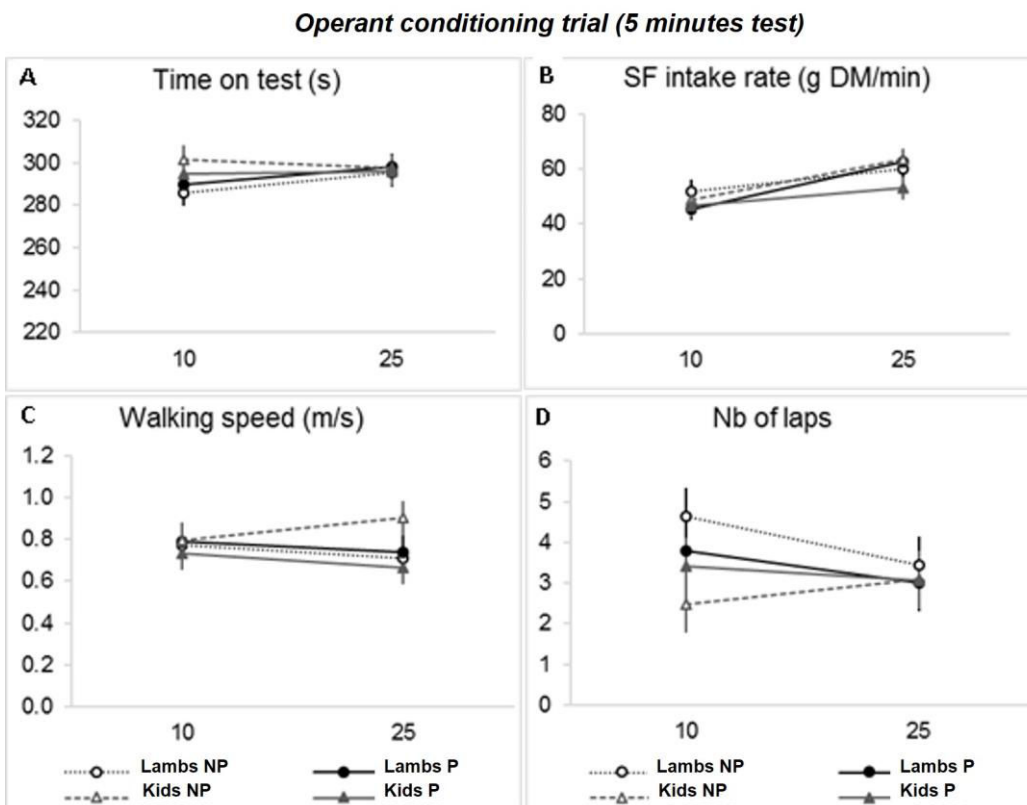


Figure 8



Tables

Table 1: Chemical composition of the experimental feeds

	Sainfoin SF_EXP	Alfalfa ALF_EXP	SF_HAB	ALF_HAB
Dry Matter (g/kg fresh matter)	906	936	-	-
Crude Protein (g/kg DM)	158.8	156.9	167.0	153.0
NDF (g/kg DM)	360.6	460.2	441.0	340.0
ADF (g/kg DM)	248.8	292.4	-	-
Gross Energy (kcal/kg DM)	4478	4292	-	-
Total tannin (% DM)	3.82	0.0	2.39	0.0

NDF = Neutral Detergent Fiber; ADF= Acid Detergent Fiber; DM= dry matter

Table 2: Training sessions done by species

	Before the cafeteria study				After the cafeteria study
	By groups of 5 or 10	By groups of 3	By pairs	Individual	Individual
Kids	1	1	1	14	4
Lambs	1	2	6	11	4

Table 3: Cafeteria trial – Significance of the effects of species (Spe: lamb vs. kid), parasitic status (Sta: parasitized vs. non-parasitized), period (Per: P1, P2, P3) and their interactions.

	Species	Status	Period	Spe*Sta	Spe*Per	Sta*Per	Spe*Sta*Per
SF intake	0.0002	0.22	0.0253	0.36	0.18	0.0371	0.23
ALF intake	0.0063	0.0201	0.64	0.96	0.0076	0.31	0.41
SF preference	0.25	0.11	0.0414	0.26	0.16	0.72	0.32
Total intake	0.0007	0.0711	0.54	0.76	0.0060	0.0485	0.44

Intakes (g DM/kg BW^{0.75}), SF preference (proportion of total intake in DM). SF=sainfoin; ALF=alfalfa; DM=dry matter; BW=body weight.

Table 4: Operant-conditioning trial – Significance of the effects of species (Sp: lamb vs. kid), parasitic status (St: parasitized vs. non-parasitized), SF reward (Re: 10 vs. 25 g) and their interactions, session (1 and 2) and the covariate (Cov from session 3).

	Species	Status	Reward	Sp*St	Sp*Re	St*Re	Sp*St*Re	Session	Cov
SF intake	0.76	0.75	0.0001	0.15	0.69	0.73	0.85	0.99	0.0001
ALF intake	0.0002	0.0003	0.0226	0.0001	0.43	0.97	0.55	0.0082	0.0001
SF preference	0.12	0.82	0.0001	0.0120	0.84	0.93	0.89	0.26	0.0001
Total intake	0.0001	0.0001	0.26	0.0001	0.28	0.87	0.45	0.0043	0.0002
Time on test	0.29	0.99	0.46	0.37	0.27	0.86	0.68	0.99	0.15
SF intake rate	0.49	0.19	0.0002	0.45	0.70	0.93	0.14	0.82	0.0001
Walk. speed	0.69	0.29	0.75	0.14	0.51	0.50	0.43	0.79	0.0032
Nb laps	0.22	0.85	0.36	0.25	0.24	0.77	0.48	0.14	0.0001

Intakes (g DM/kg BW^{0.75}), SF preference (proportion of total intake in DM), SF intake rate (at the bowl, g DM/min). SF=sainfoin; ALF=alfalfa; DM=dry matter; BW=body weight.

Discussion Générale

1. Synthèse des principaux résultats en lien avec les objectifs de la thèse

Dans un contexte de recherche croissante d'alternatives pour compléter l'emploi des anthelminthiques (AHs) de synthèse et pour freiner le développement des résistances à ces molécules au sein des populations de nématodes gastro-intestinaux (NGIs), l'attente portant sur des substances naturelles et notamment des ressources employées comme nutricaments, combinant vertus nutritionnelles et propriétés médicinales, est de plus en plus importante. Dans ce contexte, être capable 1) de qualifier rapidement les ressources exploitées, 2) de définir les meilleures conditions d'utilisation et 3) de consommation de ces ressources par les animaux, sont trois types d'informations nécessaires pour utiliser les nutricaments de la façon la plus adéquate possible.

Un nutricament est un aliment de la ration des animaux, ayant une valeur nutritionnelle et un intérêt sanitaire (Andlauer et Fürst, 2002; Hoste et al., 2006). Cette notion de nutricament à base de plantes peut être comparée aux remèdes de phytothérapie ou d'aromathérapie (huiles essentielles) consistant en des préparations de plantes ou d'extraits de plantes administrées à faible dose et de manière ponctuelle (de 1 à 3 jours) et forcée, dans un but premier thérapeutique. Le concept de nutricament correspond pour sa part à une ressource nutritionnelle, proposée aux animaux sur une période prolongée (au moins 7 jours) et dont le but sanitaire premier est plutôt préventif. Le terme de nutricament est légalement défini par le règlement (CE) n°767/2009 (Journal officiel de l'Union Européenne) et répond à l'appellation d'aliments complémentaires pour animaux. Selon l'article 10 de la Directive (CE) n°39:2008, les animaux auxquels ils peuvent être donnés, ainsi que leur intérêt sanitaire, doivent être précisés.

Le modèle de nutricament choisi dans cette thèse a été celui des plantes contenant des polyphénols dotées de propriétés AHs et notamment le sainfoin, une légumineuse riche en TCs. En effet, en Europe, le sainfoin est un modèle d'étude privilégié parmi les légumineuses contenant des tanins condensés, comme en témoignent les deux projets Healthy Hay et Legume Plus [<http://legumeplus.eu/>].

La première forme d'exploitation de ressources contenant des tanins comme nutriment a été le pâturage ou l'exploitation de parcours végétatifs (Niezen et al., 1995; 1998; Min et al., 2005; Valderrábano et al., 2010; Silué et al., 2016). Cependant, cette modalité impose de trouver la plante la mieux adaptée aux conditions pédoclimatiques d'une région donnée. Par exemple, en se limitant aux seules légumineuses contenant des tanins, nous retrouvons sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) aux USA (Terrill et al., 2009), le sulla (*Hedysarum coronarium*) autour de la Méditerranée (Aissa et al., 2016) et le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) ou le lotier corniculé (*Lotus corniculatus*), en fonction de la nature des sols, en Europe.

Le sainfoin a été le modèle de nutriment exploré dans cette thèse. Par rapport au pâturage direct, les formes conservées comme le foin ou l'ensilage, donnent aux éleveurs une plus grande facilité de stockage et de flexibilité d'utilisation des fourrages bio-actifs, avec peu d'impact sur la qualité des TCs liés aux processus de préparation (Paolini et al., 2003; Heckendorn et al., 2006; Lüscher et al., 2014; Wang et al., 2015). Cependant, ces deux formes de préservation demeurent des modes d'utilisation très locales et peu exportables.

En comparaison, la production de granulés déshydratés offre la possibilité de cultiver le sainfoin en conditions optimales, notamment sur des surfaces aux sols basiques (calcaires) avec, en conséquences, des rendements de production améliorés, (Azuhwi, 2012; Demdoun, 2012; Malisch, 2016). Les granulés permettent également de transporter et de stocker le sainfoin facilement, de l'inclure dans les aliments, de le caractériser aisément avant distribution, rendant ainsi son utilisation plus aisée en élevage, malgré une possible dégradation des composés bioactifs de la plante après deshydratation (Lorenz et Udén, 2011). En revanche, ces choix en terme d'exploitation des nutriments sous forme de granulés deshydratés se font au détriment de l'autonomie des élevages.

L'originalité de notre travail a été de se focaliser sur des granulés déshydratés de sainfoin. Récemment, en France, une structure appelée Multifolia, gérée par la coopérative Sainfolia et conseillée par la firme service MG2MIX, a été créée afin d'organiser la filière de production de sainfoin, depuis la sélection et production en masse de semences jusqu'à la déshydratation sous forme de granulés du sainfoin récolté chaque année, sur divers sites en France, notamment dans le Grand Est.

Le travail de cette thèse CIFRE (thèse partenariale privée-publique, à visée industrielle) avait pour objectif général d'étudier et de définir les conditions d'application des granulés déshydratés de sainfoin comme modèle de nutriment dans la lutte contre les NGIs des petits ruminants.

Les objectifs spécifiques ont été de 1/ de développer et d'utiliser des méthodes simples de dosage des tanins (et tanins condensés (TCs)) contenus dans des granulés de sainfoin, notamment en évaluant l'intérêt de la méthodologie de spectroscopie en infra-rouge proche (SPIR) qui devient un outil industriel répandu, et 2/ de déterminer le mode d'utilisation du sainfoin en élevage (la durée de distribution, la concentration dans la ration et l'utilisation concomitante ou non avec un AH de synthèse, la sélection possible par les animaux).

Quatre expérimentations ont été réalisées pour explorer ces divers objectifs.

Le premier volet d'expérimentations a comparé diverses méthodes d'analyse simples en se fondant sur l'analyse de plus de 300 échantillons de sainfoin, variables selon des paramètres de culture (variété, site de production) et de procédés de déshydratation. Les quatre méthodes d'analyse ont été : 1) une méthode biochimique de référence de dosage des phénols et tanins totaux (Folin-Ciocalteu) ; 2) une méthode évaluant le degré de complexation des tanins avec les protéines (diffusion radiale) ; 3) une méthode *in vitro* évaluant l'activité anthelminthique d'un échantillon ("Larval Exsheathment Inhibition Assay", LEIA), et enfin 4) la spectroscopie en milieu infra-rouge proche (SPIR) pour en explorer l'intérêt et la pertinence par rapport aux méthodes précédentes plus complexes à mettre en œuvre .

Les corrélations entre les diverses mesures montrent des valeurs positives et significatives entre la quantité de TCs et l'activité AH, et soulignent l'intérêt de la méthode SPIR pour caractériser les différentes sources de sainfoin (granulés déshydratés et fourrages) (Figure 22).

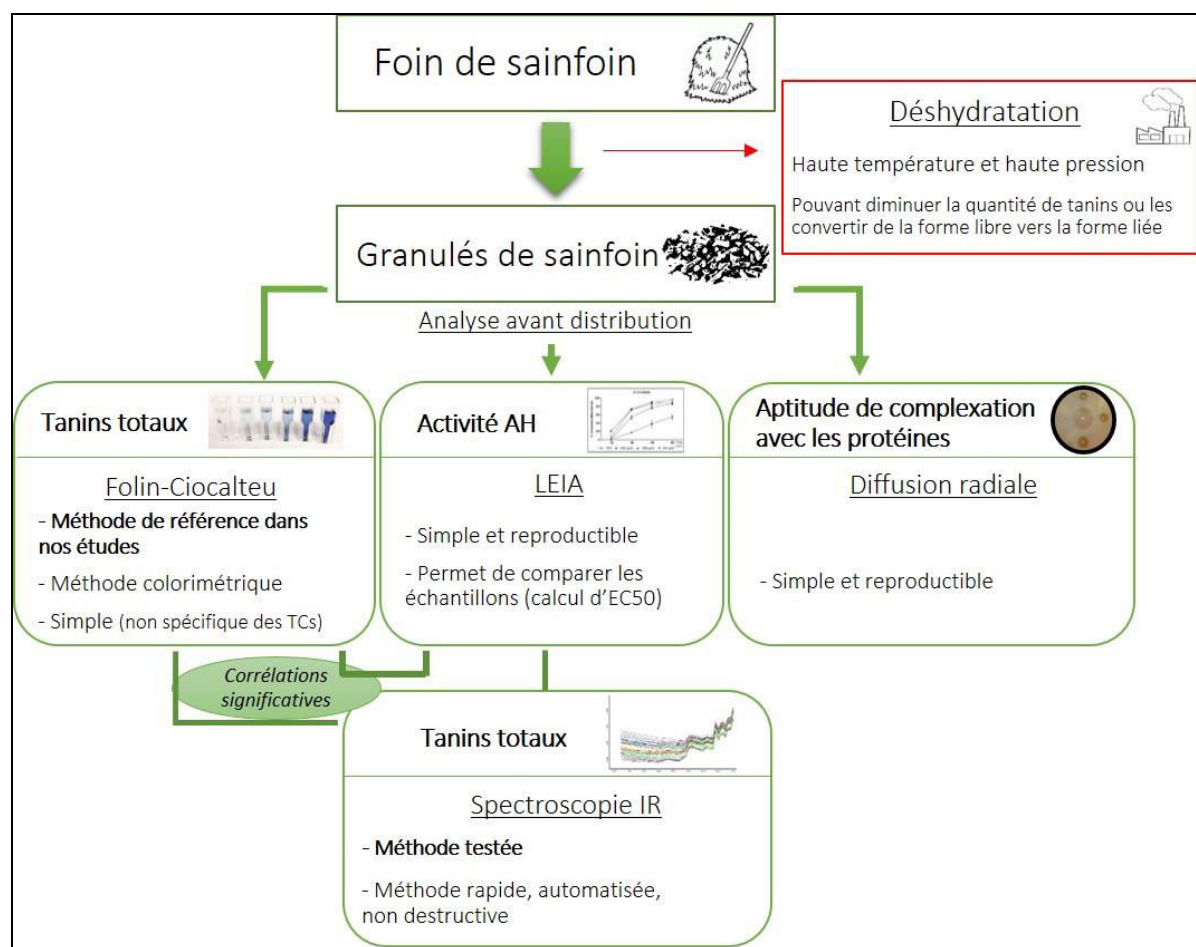


Figure 22: Synthèse des résultats obtenus sur l'application de méthodes d'analyse simples des tanins et des activités antiparasitaire et de complexation avec les protéines de granulés de sainfoin

La deuxième expérimentation visait à déterminer les conditions optimales d'utilisation du sainfoin en élevage. Cette étude visait en particulier à établir le rôle respectif des facteurs « durée de distribution » et « concentration de tanins dans la ration » chez des petits ruminants infestés par *H. contortus* et *T. colubriformis*. Deux stades de NGIs correspondant à deux étapes clefs du cycle biologique ont été au coeur de ces études : 1) les larves infestantes de stade L3, leur établissement et leur développement chez l'hôte ; et 2) les vers adultes, l'excrétion des œufs par les vers femelles et la contamination résultante du pâturage.

La troisième expérimentation a étudié l'utilisation conjointe d'un AH de synthèse (ivermectine par voie orale) et d'un régime à base de sainfoin, chez de jeunes ovins, infestés avec une souche d'*H. contortus* multi-résistante aux AHs pour explorer d'éventuelles interactions et fournir des recommandations en élevage.

Les résultats de ces deux études (Figure 23) suggèrent, en terme d'utilisation des granulés déshydratés, 1/ qu'un seuil minimum de TCs dans la ration est à atteindre et une période minimale de 15 jours de distribution est nécessaire pour altérer la biologie des nématodes (notamment la fertilité des vers femelles de *T. colubriformis* et l'établissement des larves L3 d'*H. contortus*) ; 2/ que la consommation de sainfoin s'avère efficace sur des souches de nématodes multi-résistantes aux AHs de synthèse et 3/ que sur la base des résultats acquis suggérant des interactions négatives, il est préférable de dissocier la consommation de sainfoin et l'application d'un AH de synthèse (ivermectine par voie orale).

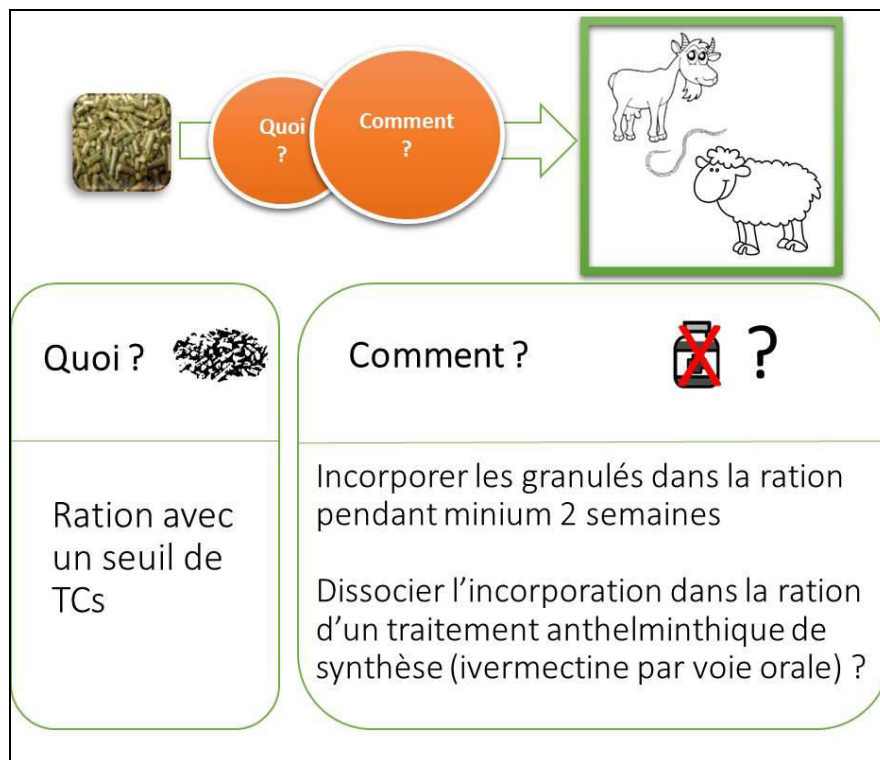


Figure 23: Synthèse des résultats obtenus sur le mode d'utilisation des granulés de sainfoin en élevage

Enfin, la quatrième et dernière expérimentation visait à vérifier et comparer l'aptitude à l'automédication chez les ovins et caprins, c'est-à-dire à sélectionner le sainfoin et les tanins contenus, lorsqu'ils sont parasités.

Les résultats de cet essai dans une situation de libre choix pendant la journée entre du sainfoin et de la luzerne, ont montré 1/ que les caprins ont une préférence pour le sainfoin plus marquée que les ovins, et 2/ une augmentation de consommation de sainfoin au cours du temps chez les animaux parasités, sans toutefois devenir supérieure à celle des animaux sains. En revanche, ni les animaux parasités, ni les caprins n'ont montré de motivation plus importante pour accéder au sainfoin dans un test de conditionnement opérant (Figure 24).

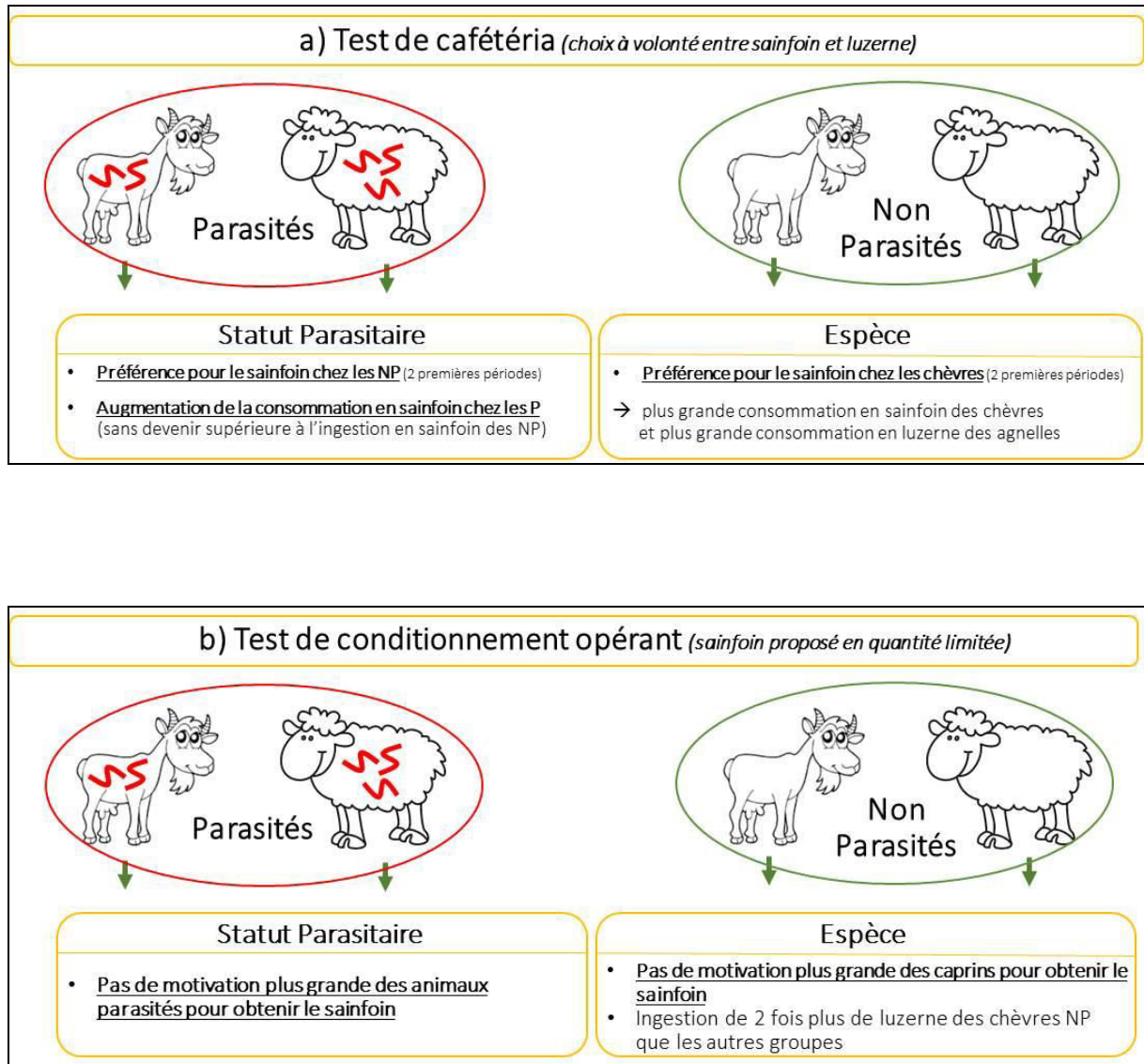


Figure 24: Synthèse des résultats obtenus sur la comparaison du comportement alimentaire d'ovins et caprins et leur capacité d'automédication (P = parasitées / NP = non-parasitées).

Figure a) = Test de libre choix (granulés de sainfoin et luzerne proposés à volonté).

Figure b) = Test de conditionnement opérant (granulés de sainfoin proposés en quantité limitée et granulés de luzerne proposés à volonté).

2. Interprétation critique des résultats

2.1 Chapitre 1 : Méthodes simples d'analyse du sainfoin

Pour cette étude, plus de 300 échantillons de sainfoin ont été utilisés, présentant des différences dans : 1/ la forme (échantillons de foin et granulés) ; 2/ la variété (Perly et Perlix) ; 3/ les conditions environnementales correspondant à quatre années de récolte (2012, 2013, 2014 et 2015) ; 4/ la coupe (1, 2 et 3) ; 5/ la qualité (Standard et AOP) et 6/ la provenance. Tous ces facteurs ont été identifiés comme responsables de variations en termes de quantité de tanins et d'activité antiparasitaire associées (Manolaraki, 2011).

La déshydratation est un process technologique réalisé à haute température et haute pression. Comme tous les process incluant de la chaleur (Wolfe et al., 2008), elle peut altérer les composants de la plante, et notamment une diminution de la quantité de tanins (Terrill et al., 1992), une altération des capacités de complexation avec les protéines (Terrill et al., 2007) ou une conversion des tanins de la forme libre vers la forme liée aux protéines (Minnée et al., 2002; Lorenz et Udén, 2011).

Dans nos études, la déshydratation a eu un impact négatif et significatif sur la quantité de TCs (moyenne de 3.07 % de TCs (% de la matière sèche) pour les fourrages vs. 2.73 % de TCs (% MS) pour les granulés, soit -11 %). En revanche, malgré la perte de TCs, les résultats AHs observés avec des granulés déshydratés confirment certains effets observés avec du foin de sainfoin sur la réduction de la fertilité des vers femelles (Article 2 – Partie 2) (Paolini et al., 2005) ou sur la réduction du nombre de vers (Article 2 – Partie 1) (Heckendorn et al., 2006; 2007). Le processus de déshydratation semble donc loin d'affecter gravement les propriétés AHs du sainfoin. De tels résultats obtenus à la suite des processus de déshydratation sous forme de granulés ont été observés avec d'autres légumineuses riches en TCs comme sericea lespedeza (Terrill et al., 2007; Gujja et al., 2013; Kommuru et al., 2015) et aussi avec du sainfoin (Girard et al., 2013).

Le choix des diverses méthodes de mesures biochimiques des tanins et de leur activité biologique choisies dans la suite de l'étude repose sur les deux hypothèses suivantes :

- 1) Les tanins sont les principaux composés bioactifs responsables des effets AHs du sainfoin. Ce rôle a notamment été déterminé à l'aide d'inhibiteurs de tanins comme le PEG ou le PVPP (Brunet et al., 2008, Hoste et al., 2012). Le dosage des tanins via la méthode de Folin-Ciocalteu a donc été corrélé avec la méthode de dégagement larvaire afin de vérifier cette hypothèse.
- 2) L'activité AH des TCs est expliquée par leur capacité générale de se fixer aux protéines. Il est supposé que cette propriété concerne aussi les principales protéines présentes dans la gaine des larves L3, et dans la cuticule des vers adultes ou dans leur tube digestif (Brunet et al., 2011; Martínez-Ortiz-de-Montellano et al., 2013), expliquant en partie leurs effets AHs (Hoste et al., 2006). L'activité AH serait liée à la complexation des TCs sur les protéines des NGIs (Hoste et al., 2012). C'est pourquoi la méthode de diffusion radiale a été utilisée dans nos études.

Tous les échantillons ont donc été évalués et comparés par référence en terme biochimique à la méthode de Folin-Ciocalteu (Folin et Denis, 1915). Cette méthode est utilisée dans le dosage des tanins totaux (Makkar, 2000; Mueller-Harvey, 2006; Rover et Brown, 2013). En revanche, elle n'est pas spécifique des tanins condensés : le réactif de Folin Ciocalteu mesure tous les composés phénoliques. Pour être plus spécifique des tanins et des flavonoïdes, le dosage se fait en deux temps (dosage des phénols totaux puis utilisation du PVPP pour doser les composés non-tanniques) (Schofield et al., 2001). Dans le sainfoin, tous les tanins présents sont supposés être des tanins condensés. Donc, le dosage des tanins totaux revient en fait à déterminer la teneur en TCs. Cette méthode est donc moins spécifique que d'autres évoquées dans l'introduction mais elle répond à la problématique de cette thèse à savoir exploiter des méthodes de dosage simples et peu coûteuses en laboratoire (Mueller-Harvey, 2006).

La méthode de diffusion radiale (Hagerman, 1987) est utilisée pour évaluer le niveau de complexation des tanins présents dans un échantillon avec les protéines (Theodoridou et al., 2011b). Le modèle de protéines utilisées dans notre essai était des BSA (Bovine Serum Albumin), d'origine animale. D'autres études évaluent le degré de complexation des TCs avec des protéines végétales comme le Rubesco (Lorenz et al., 2012). Néanmoins, la BSA a été choisie car elle est la source de protéines la plus standardisée dans la diffusion radiale et facilite les comparaisons avec d'autres études. La BSA est aussi la protéine de référence pour cette méthode dans notre propre laboratoire. Enfin, il a été remarqué que la complexation entre les protéines et les TCs diminuait rapidement avec des degrés de polymérisation de l'échantillon supérieurs à 8 (Ropiak et al., 2017). La gamme moyenne de degré de polymérisation du sainfoin se trouve entre 5 et 8 (Koupai-Abyazani et al., 1993). Ainsi, le risque d'avoir sous-estimé des complexes TCs-protéines lors des tests de diffusion radiale avec des extraits de sainfoin reste limité.

Le test d'inhibition du dégagement larvaire (LEIA) a été utilisé comme référence pour mesurer l'activité AH *in vitro*. Ce test est fréquemment utilisé pour étudier l'activité AH de plantes contenant des polyphénols. Ce test LEIA a été choisi pour vérifier l'activité AH car 1/ il est un des tests les plus simples, rapide à réaliser, reproductible, et ne nécessitant qu'un minimum d'équipement ; 2/ il permet le calcul de concentration efficace 50% et permet donc de comparer des échantillons entre eux (Jackson et Hoste, 2010; Quijada et al., 2015).

Les valeurs issues de la calibration SPIR ont été comparées aux références de valeurs biochimiques obtenues par la méthode de Folin-Ciocalteu, déjà été utilisée comme méthode biochimique de référence dans le développement de calibrations estimant la quantité de TCs d'écorces de pin (*Pinus caribaea*) (Derkyi et al., 2011) ou de sorgho (*Sorghum*) (Dykes et al., 2014).

Pour valider les calibrations SPIR, il est important de disposer d'un nombre conséquent de mesures : selon les matériaux, une centaine d'échantillons sont requis pour obtenir des calibrations robustes (CIRAD, 2007; Derkyi et al., 2011 ; Dykes et al., 2014). La fiabilité de la calibration s'améliorera à chaque ajout d'échantillons. Pour conforter la calibration, il est préférable aussi que les échantillons présentent une forte variabilité.

Dans notre étude plus de 300 échantillons diversifiés ont été utilisés. Les équations SPIR pourront par la suite être améliorées par l'ajout d'autres échantillons de sainfoin (si possible avec des teneurs plus faibles et plus élevées en TCs, afin d'élargir la gamme d'échantillons) ou d'autres ressources contenant des TCs (par exemple, d'autres légumineuses ou des co-produits industriels contenant des tanins), afin de potentiellement prédire les teneurs en tanin d'une plus grande variabilité de ressources.

La variété a eu un impact sur la teneur en TCs des échantillons : la variété Perlix de Suisse contient plus de TCs que la variété Perly ($P < 0.05$). Cependant, il y a un effet de confusion entre la variété et la localisation de culture. Le choix d'utiliser la variété Perly pour les granulés de sainfoin s'est fait car c'est une variété de sainfoin double, sélectionnée en France (Sainfolia cultive uniquement cette variété) et qui a déjà montré des résultats intéressants sur la réduction du parasitisme (Girard et al., 2013; Werne et al., 2013; Campidonico et al., 2016).

L'année de récolte et les conditions météorologiques variables en découlant ont eu un effet significatif sur la teneur en TCs ($P < 0.05$). Chaque récolte se fait sur des saisons variables (Bumb et al., 2016; Medjekal, 2016). Les années ensoleillées avec de faibles précipitations semblent liées à davantage de TCs dans la plante.

Le nombre de coupes, qui correspond à un phénomène de stress répété pour la plante, a été significativement et positivement corrélé ($P < 0.05$) à une augmentation de la teneur en tanins, confirmant de précédents résultats (Mueller-Harvey et McAllan, 1992; Azuhni et al., 2011), et permettant une première orientation dans la sélection des lots à propriétés antiparasitaires.

2.2 Chapitres 2 et 3 : Essais *in vivo*

2.2.1 Conditions optimales d'utilisation des granulés de sainfoin

- Le schéma expérimental

Pour des raisons principalement économiques, nous avons choisi d'étudier seulement les effets de la consommation de ressources contenant des TCs sur l'infestation par des NGIs, sans groupes témoins non-infestés qui auraient permis de mesurer les conséquences zootechniques de la consommation de ressources contenant des TCs (Amit et al., 2013). Ce type de paramètres zootechniques sera plutôt suivi au cours d'essais actuels ou futurs réalisés en élevages.

- Animaux et souches de nématodes

Idéalement, il aurait été souhaitable que les essais explorant les interactions entre les deux facteurs « temps de distribution » et « concentration en tanins » sur l'établissement des L3s infestantes et sur les vers adultes se déroulent dans les conditions expérimentales les plus proches possibles. Les mêmes espèces (et souches) de nématodes ont été employées dans les 2 essais. La décision d'infestation conjointe par une espèce abomasale et une espèce intestinale a été un choix justifié, afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de réponse aux TCs entre espèces de NGIs à localisation différentes comme mentionnées dans plusieurs études *in vivo* précédentes (Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2003; 2005; revue Hoste et al., 2015). Par contre, plusieurs différences sont notables entre les 2 expériences : **1/** l'espèce hôte (ovins ou caprins) et l'animal lui-même dû à la variabilité individuelle de réponse des animaux en terme d'infestation parasitaire ; **2/** l'âge de l'animal (agneaux de 3 mois ou chèvres de réforme) ; et **3/** les ressources alimentaires, notamment en termes de complément au sainfoin (lots de granulés de sainfoin avec différentes teneurs en tanins ; ajout d'endocarpes de noisette dans le premier essai, d'endocarpes de châtaigne dans le second).

Cette thèse avait pour objectif d'utiliser des granulés de sainfoin disponibles suites aux différentes récoltes réalisées au cours des trois ans. Ainsi, la teneur en tanins a été variable entre les lots et c'est pourquoi nous avons parfois ajouté artificiellement des co-produits afin d'augmenter la quantité de tanins. Le choix de ces co-produits s'est premièrement porté sur la noisette en raison de résultats favorables antérieurs *in vitro* et *in vivo* avec ce co-produit (Desrues et al., 2012) et nous en connaissons la composition en tanins condensés. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé des co produits de la châtaigne pour des raisons pratiques (impossibilité d'approvisionnement en endocarpes de noisettes pour la suite des essais).

- Les ressources contenant des tanins

Afin d'augmenter artificiellement la quantité de TCs présents dans les granulés déshydratés et pour explorer de futures voies de formulations, des co-produits de l'alimentation humaine riches en TCs (endocarpes de noisette ou de châtaigne) ont été ajoutés aux granulés. La raison du choix différencié de ces ressources a été exposé précédemment. Ces ressources agro-industrielles diffèrent du sainfoin en termes de concentration en tanins et de qualité des TCs.

Les granulés de sainfoin exploités dans les lots contenaient 1.9 % ou 2.1 % de TCs (méthode Folin Ciocalteu). Qualitativement, ils sont caractérisés par 70 % de prodelphinidines (PDs) et 30 % de procyanidines (PCs). Les PDs possèdent un groupement OH supplémentaire comparé aux PCs, ce qui leur donne une forte affinité pour les protéines (Aerts et al., 1999; Schofield et al., 2001). Les PDs ont ainsi montré des effets AHs plus importants que les PCs (Brunet et Hoste, 2006; Quijada et al., 2015).

Les endocarpes de noisette contenaient 5.0 % de tanins, dosés par la méthode Folin-Ciocalteu. Ces TCs sont majoritairement riches en PCs (80 % de PCs vs. 20 % de PDs) (Quijada et al., 2015). Ils ont aussi la particularité d'être galloylatés, ce qui semble augmenter les propriétés AHs (Brunet et Hoste, 2006). Cependant, même si la noisette possède majoritairement des PCs, des études antérieures menées avec cette ressource ont permis de mettre en avant un effet de ce co-produit industriel sur la réduction de l'infestation ou de l'excrétion des œufs (Desrues et al., 2012; Girard et al., 2013).

Les endocarpes de châtaigne incorporés pour créer un différentiel de teneur en tannins entre les lots S et SC (Article 2 – Partie 1) contenaient 9.1 % de TTs, dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Dans tous les essais, deux précautions ont été prises :

- Une période de transition alimentaire a été incluse afin que les animaux s'adaptent progressivement aux granulés de sainfoin proposés dans les rations. Cette période d'environ une semaine dans la plupart des essais, a été estimée suffisante car les animaux recevaient le même foin avant et pendant la mise en place des essais.
- Nous avons veillé à ce que les régimes soient iso-protéiques pour permettre d'interpréter les résultats en fonction de la teneur en tanins condensés. Un effet de la teneur de la ration en protéines sur les infestations parasitaires a été largement démontré et conceptualisé (Coop and Kyrizakis, 1999, 2001), notamment sur la base de résultats obtenus dans nos régions tempérées, où la teneur en protéine est le principal facteur limitant dans la ration. Enfin, il n'a pas été possible d'obtenir des régimes iso-énergétiques, due à la forte variation entre les lots, notamment par l'ajout des co-produits industriels.

- Résultats obtenus

1) L'ingestion

La période de transition et les teneurs modérées en tanins dans les essais (comprises entre 1.9 % et 5.0 % de TCs (% MS)) ont conduit à une très bonne ingestion du sainfoin par tous les animaux avec des refus quasi nuls.

2) Effets sur les populations de vers

Sur les deux modèles d'infestation réalisés dans ces études, les deux parasites se sont bien installés : entre 5.6 % $\pm$ 6.0 et 29.6 % $\pm$ 10.0 selon les lots pour *H. contortus* et entre 15.7 % $\pm$ 4.9 et 31.9 % $\pm$ 1.2 selon les lots pour *T. colubriformis* (pourcentage calculé avec le nombre de larves infestantes administrées à l'animal lors de l'infestation et le nombre de vers comptés après autopsie).

L'hypothèse formulée était qu'une gradation des effets serait observée en fonction du temps. Par exemple, il était supposé qu'une réduction des OPG observée serait d'abord liée à un effet des tanins sur la fertilité des vers adultes femelles avec la plus courte durée de distribution (Paolini et al., 2005; Costa-Júnior et al., 2014; Kommuru et al., 2015) puis à une réduction du nombre de vers avec la plus longue période de distribution (Heckendorn et al., 2006; 2007). Cependant, dans notre cas, aucun effet significatif n'existait après cinq jours de consommation de tanins avant infestation ou bien trois semaines après infestation (durée de distribution les plus courtes) sur le nombre de vers.

Nos résultats mettent aussi en avant la variabilité des effets des TCs en fonction des différentes espèces de nématodes, intestinales et abomasales (Athanasiadou et al., 2001; Shaik et al., 2006), mais aussi en fonction des différents stades de nématodes (L3s vs. vers adultes) (Tzamaloukas et al., 2005).

2.2.2 Interactions entre un AH de synthèse et la distribution de sainfoin

Cette étude a mis en avant un effet du sainfoin sur une souche d'*H. contortus* multi-résistante aux AHs, confirmant les effets obtenus avec du sainfoin sur des souches sensibles (Paolini et al., 2005; Brunet et al., 2008; Hoste et al., 2016). L'étude suggère une interaction négative entre le sainfoin et l'ivermectine par voie orale, *a contrario* de l'hypothèse initiale formulée (une possible synergie entre composés polyphénoliques et une lactone macrocyclique par action sur des les polyglycoprotéines (PGP)). Notre résultat *in vivo* a été conforté par une étude *in vitro* qui explorait l'hypothèse d'une chélation de l'ivermectine par les tanins du sainfoin et de la noisette.

Il s'agit ici d'une première étude analysant l'interaction entre le sainfoin et une ivermectine administrée par voie orale. Les résultats de cette étude sont à l'opposé de résultats précédents suggérant une amélioration de l'efficacité de l'ivermectine par voie sous-cutanée avec la consommation de genévrier (*Juniperus pinchotti*) (Armstrong et al., 2013; Whitney et al., 2013). La comparaison de ces résultats soulignent la nécessité d'explorer plus avant ces interactions par des études impliquant d'autres ressources contenant des TCs (noisette, chataignes) et/ou d'autres AHs ou une ivermectine par voie injectable par exemple, afin de proposer des recommandations claires en élevages.

2.2.3 Capacité d'automédication des petits ruminants

Les ovins et caprins sont infestés par les mêmes espèces de NGIs. Pour l'essai sur l'automédication, la décision de travailler sur les deux espèces de petits ruminants a été un choix volontaire afin de comparer leur comportement alimentaire vis-à-vis du sainfoin chez des animaux infestés ou non.

Dans cet essai, le mode d'infestation choisi a été l'administration d'une dose de larves infestantes calculée au pro-rata du poids de l'animal. Le but de ce mode d'infestation était de limiter la variabilité due à la différence de poids entre les agnelles et les chevrettes et d'imiter les conditions naturelles d'infestation, en partant de l'hypothèse que les animaux les plus lourds consomment plus d'herbe et ont donc une plus grande probabilité d'ingérer des larves L3s. Une infestation réalisée sur plusieurs jours et non en une dose unique aurait cependant permis d'imiter davantage les conditions d'infestations naturelles (les animaux consomment de l'herbe chaque jour et l'infestation se fait par ingestion de larves cumulée sur plusieurs jours) (Khan et al., 2011; 2012). Pour des raisons pratiques (quantité de larves infestantes limitée, durée de l'expérimentation) cela n'a pas été possible. En revanche, le succès des infestations a été souligné par des valeurs d'OPG comprises entre 3000 et 5000.

Le modèle d'automédication choisi dans l'étude comportementale a été l'automédication curative, mise en place après apprentissage. Dans le cas du parasitisme par les NGIS, plusieurs jours de consommation des TCs sont nécessaires pour atteindre une concentration suffisante en TCs dans le système digestif (Burke et al., 2012ab; Hoste et al., 2016) et observer les effets: la conséquence de la consommation des TCs (= réduction de l'excrétion des œufs) n'intervient donc pas juste après l'ingestion (Schwartz et Robbins, 1995). Dans notre étude, la décision de ne pas faire de période de conditionnement a été prise afin de vérifier si les ovins ou caprins pourraient distinguer les conséquences de chaque aliment par eux-mêmes et de vérifier si cette ingestion sera liée à leur charge parasitaire.

3. Perspectives d'exploitation des granulés déshydratés de sainfoin en élevage

Un nutricament est un aliment qui a des valeurs nutritionnelles intéressantes pour les animaux de rente, doublé d'un intérêt sanitaire (ici anthelminthique). Son efficacité sur les vers dépend de l'ingestion par les animaux et suppose une durée suffisante de distribution ainsi qu'une concentration minimale dans la ration (Andlauer et Fürst, 2002; Hoste et al., 2006, 2015).

L'utilisation d'un nutricament en élevage nécessite de caractériser la ressource avant usage, notamment en terme de valeurs nutritionnelles mais également en terme de teneur en tanins condensés, composés bioactifs supposés à l'origine des effets AHs. Un des objectifs de notre thèse était aussi d'explorer l'intérêt de méthodes adaptées à l'industrie comme la spectroscopie en milieu infra-rouge proche, déjà appliquée sur de nombreux aliments (Roberts et al., 2004 ; Adu-Amankwa et al., 2011 ; Mancilla-Leytón et al., 2014).

3.1 Possibilité d'analyses rapides des lots de sainfoin pour qualifier leur valeur en tant que « nutricament » avant usage

La corrélation significative et positive entre les résultats obtenus par la méthode de Folin-Ciocalteu et les résultats EC50 du test LEIA confirment la relation dose-dépendante existante entre la quantité de tanins et l'activité anti-parasitaire (Hoste et al., 2015) et confirment l'intérêt de doser les TCs (ici assimilé, en raison de la méthode, par les tanins totaux) dans la caractérisation future des lots de sainfoin.

Cette information permettra de classer les lots de sainfoin, soit pour une seule exploitation nutritionnelle (exemple : récoltes de 1^{ère} coupe) soit pour une plus value en étant identifiés comme alicaments (exemple : récoltes de 3^{ème} coupe avec des teneurs en tanins plus importantes).

La méthode de spectroscopie infra-rouge (SPIR) pour caractériser les granulés déshydratés de sainfoin avant usage offre plusieurs avantages à l'échelle industrielle pour l'analyse quantitative et qualitative de produits. Elle demande peu de préparation des échantillons, l'aliment peut être réutilisable après analyse, les coûts d'analyse sont réduits, les analyses sont précises, rapides, automatisées et non destructives et faciles à mettre en place (Bertrand et Dufour, 2000). Après une étape de calibration consolidée, cette méthode permet l'analyse de composants nutritionnels majeurs des aliments (exemple : matière sèche, protéines), mais également le dosage de composés plus spécifiques comme des métabolites secondaires, et notamment les tanins.

Les premiers essais d'utilisation de la SPIR en milieu agricole ont été répertoriés avec des fourrages (Norris et al., 1976). La valeur des constituants les plus souvent analysés et prédits sont aujourd'hui l'humidité et les protéines (Roberts et al., 2004). Cependant, depuis plus de 20 ans, des calibrations SPIR ont été développées afin de prédire la teneur et même la composition en TCs (en terme de ratios procyanidines/prodelphinidines et de leur conformation *cis/trans*) pour des légumineuses comme le lotier corniculé (*Lotus corniculatus*) (Roberts et al., 1993), sericea lespedeza (Wheeler et al., 1996) ou différentes espèces de saules (*Salix* spp.) (Klongsiriwet et al., 2013; Lavin et al., 2015).

En revanche, peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation de la SPIR pour prédire des activités biologiques. Cela a déjà été mis en place dans la prédiction de l'activité antioxydante de maïs (Redaelli et al., 2016) ou de miels de différentes origines botaniques (Tahir et al., 2016), et montre ainsi des perspectives d'utilisation de la SPIR dans la prédiction d'autres activités biologiques de plantes comme l'activité AH d'échantillons de plantes (Mueller-Harvey et al., 2011). Ce dernier point a été confirmé par la corrélation significative et positive entre les teneurs en TCs obtenues via la calibration SPIR et les résultats EC50 obtenus par le LEIA.

De plus, des résultats préliminaires obtenus avec d'autres légumineuses contenant des polyphénols (le lotier (*Lotus pedunculatus* et *corniculatus*), la coronille (*Coronilla*), et d'autres variétés d'*Onobrychis*) suggèrent que les applications de la calibration SPIR développée sur le sainfoin pour prédire les teneurs en TCs (et les propriétés AH associées) pourraient, dans l'avenir, être élargies, en termes d'applications industrielles, à d'autres ressources.

3.2 Vers des indications pour une exploitation optimisée en élevage

Le principal objectif des études de cette thèse était d'aboutir à des préconisations pratiques et de définir un cadre de références, pour préciser les conditions d'applications répondant au concept de nutriment. Il s'agissait notamment de spécifier 1) la concentration seuil en tanins dans les granulés de sainfoin et dans la ration, pour être suffisamment efficace contre les nématodes gastro-intestinaux, et 2) la durée minimale nécessaire pour inclure ces granulés dans la ration. Par ailleurs, la façon dont cette ressource est perçue puis ingérée par les ovins ou caprins, a été évaluée dans le chapitre 3 de la thèse.

- Durée de distribution

Un temps minimal d'incorporation du sainfoin dans la ration a été estimé à 15 jours (Article 2 – Partie 2) afin d'assurer une imprégnation suffisante en TCs des divers organes digestifs parasités (Hoste et al., 2016). Au cours des deux expérimentations de l'article 2 de thèse, la durée de distribution a eu un effet significatif sur la réduction de l'infestation par les nématodes (durée de distribution qui a eu un effet significatif sur la réduction de la fertilité des vers femelles de *T. colubriformis*). Cette durée de 15 jours, déterminée dans l'article 2, a permis de limiter l'installation des larves de stade L3 ou de réduire l'excrétion des œufs par les vers adultes d'espèces abomasales comme *H. contortus* ou intestinales comme *T. colubriformis*. Cette donnée est concordante avec la littérature où la durée minimale durant laquelle introduire des plantes riches en TCs, notamment sericea lespedeza, a été estimée à 7 jours chez des chèvres (Min et al., 2005; Luginbuhl et al., 2013) et entre 14 et 35 jours chez des agneaux (Burke et al., 2012ab).

- Concentration en tanins

Une concentration minimale de TCs apportée dans la ration paraît nécessaire pour observer des effets AHs. Les résultats d'une méta-analyse ont suggéré une teneur minimale de 3 % de TCs dans la MS totale de la ration pour obtenir des effets AHs (Min et Hart, 2002).

Cependant, l'interprétation de ces chiffres est difficile car elle dépend également 1/ de la qualité des tanins présents dans la matière première, 2/ de la méthode de quantification des TCs et 3/ de la présence d'autres métabolites secondaires polyphénoliques bioactifs comme des flavonoïdes (Brunet et Hoste, 2006) et des interactions possibles entre les composés bioactifs (Lyman et al., 2008; Vargas-Magaña et al., 2014; Klongsiriwet et al., 2015).

Dans le cas de la méta-analyse citée, la valeur indiquée était basée sur des analyses réalisées avec la méthode au Butanol-HCl. Dans les études de cette thèse, exception faite de l'article 4 où la méthode de Butanol-HCl a été réalisée au sein du laboratoire dans lequel cet essai s'est déroulé, la méthode de Folin-Ciocalteu a été préférée.

A titre d'exemple, un calcul sommaire basé sur les résultats de l'Article 3 permet de donner une estimation de la concentration en tanins à apporter dans la ration. Il a été estimé que les agneaux, d'environ 30 kg, consommaient 3 % de leur poids sous forme de MS, soit 900 g. Le foin était proposé *ad libitum*. Les agneaux du lot sainfoin ont consommé 580 g de granulés de sainfoin / jour contenant 90 % de MS et 3.5 % de TCs sur la base de la MS, soit 18 g de TCs dans la ration journalière. Ainsi, sur la base d'une ingestion de MS totale de 900 g/j, la teneur en TCs était voisine de 2 % (en % de la MS totale de la ration). Dans une autre étude (Girard et al., 2013), un calcul similaire a conduit à une évaluation de 1.3 % de TCs en % de la MS totale de la ration. Dans les deux cas, des effets significatifs sur l'excrétion des œufs ont été observés. Enfin, il est aussi à noter qu'avec une concentration de 1.9% de tanins totaux dans les granulés de sainfoin (Article 2 –Partie 1), un effet AH notable a été remarqué sur l'installation d'*H. contortus*. Cependant, il est possible que les seuils de concentration minimale varient en fonction des stades parasites.

Les études réalisées avec sericea lespedeza, où la teneur en tanins condensés est plus forte que dans le sainfoin, ont montré des effets sur la réduction de l'infestation avec des teneurs en TCs de 9.8 % de TCs (% MS) dans du fourrage (Terrill et al., 2009) et 5.7 % de TCs (% MS) dans des granulés (Kommuru et al., 2015), valeurs obtenues par la méthode de dosage butanol-HCl dans les deux cas.

Pour augmenter la teneur en TCs dans le sainfoin (variété Perly), plusieurs voies peuvent être envisagées. Premièrement, la sélection de variétés avec des teneurs plus importantes en TCs (comme Buciansky ou Hampshire (Manolaraki, 2011), Esparcette (Malisch et al., 2015) ou encore Perlix (Article 1)) pourrait fournir des lots de sainfoin avec un potentiel d'activités AHs supérieures par rapport à la variété Perly. Avant d'être utilisées en élevage, de telles variétés nécessiteront un travail de sélection génétique pour augmenter la teneur moyenne en TCs. Cependant, comme évoqué au paragraphe 2.1, la variété Perly a été utilisée car elle est sélectionnée en France et les semences sont disponibles. Deuxièmement, utiliser seulement des feuilles, organe contenant majoritairement les TCs (Malisch et al., 2015), lors de la déshydratation permettrait d'éviter de diluer la quantité de tanins. Cela a été réalisé avec *sericea lespedeza* (Kommuru et al., 2015). Une 3^{ème} option serait de stresser la plante, comme par exemple en réduisant la quantité d'eau offerte ou la quantité de fertilisants, pour augmenter la teneur en TCs (Zhang et al., 2012; Morshedloo et al., 2017). Enfin, une dernière option consisterait à ajouter des co-produits riches en TCs lors de la déshydratation pour accroître la quantité de TCs des granulés. Quelques études *in vivo* précédemment réalisées sur petits ruminants afin d'évaluer l'effet de ces co-produits seuls (Desrues et al., 2012) ou en combinaison avec le sainfoin (Girard et al., 2013), ont permis de confirmer l'efficacité AH de ces co-produits.

- Utilisation avec un anthelminthique de synthèse

Sur la base de notre étude et des résultats obtenus pour le moment avec de l'ivermectine par voie orale, il paraît préférable de dissocier l'incorporation du sainfoin dans la ration et un traitement AH, et de réfléchir aux recommandations vers les professionnels de l'élevage en ce domaine. Pour le moment, 1/ le nutricament pourrait être utilisé en prévention et 2/ l'AH de synthèse pourrait être utilisé en curatif, en cas de besoin. Ceci dans le but de ne pas altérer l'absorption digestive du médicament, de par une possible chélation de l'ivermectine dans le rumen par les tanins. Cela permettrait de préserver l'efficacité de l'ivermectine en maintenant des valeurs plasmatiques suffisantes et en évitant le sous-dosage, et le risque associé de sélection de résistances aux AHs (Besier et al., 2016b).

- Capacité d'automédication et consommation du sainfoin

Par comparaison aux deux autres chapitres, l'objectif général du chapitre 3 était plus à visée cognitive et donc conduisant moins directement à des possibilités d'applications en élevage. Toutefois, certains enseignements peuvent en être tirés.

Les essais ont été réalisés sur ovins et caprins. Cette prise en compte de l'espèce hôte nous semblait importante dans l'interprétation des résultats, en raison de leur comportement alimentaire différent (cueilleur ou brouteur), qui pourrait influencer sur leur propension à consommer des ressources contenant des métabolites secondaires des plantes, et notamment des tanins. Les ovins sont principalement identifiés comme des brouteurs, inféodés à l'herbe. Ils ont donc une moindre propension à ingérer des tanins. Leur régulation des parasites digestifs semble surtout reposer sur une réponse immunitaire plus efficace que chez les caprins. A l'inverse, lorsque l'environnement est propice, les caprins consomment davantage d'espèces arbustives contenant des TCs pouvant avoir un impact sur les vers (Hoste et al., 2010). Certaines études ont aussi suggéré l'existence de mécanismes d'adaptations physiologiques chez les caprins qui seraient absents chez les ovins, comme par exemple une augmentation de la sécrétion de protéines salivaires ayant une affinité pour complexer les tanins (Paolini, 2004; Alonso-Díaz et al, 2010).

Même si les résultats confirment que les caprins consomment davantage le sainfoin que les ovins lorsqu'il était proposé à volonté en parallèle avec de la luzerne, les analyses statistiques des préférences chez les deux espèces de petits ruminants n'ont pas été différentes de 0.5, soulignant qu'agneaux comme chevreaux ont très bien ingéré le sainfoin.

Dans les diverses études de ce travail de thèse, quelles que soient la nature des granulés offerts et la quantité de tanins associée, aucun refus n'a été observé. Il n'a donc pas été possible d'examiner la problématique de compromis (trade-off) entre effets anti-nutritionnels des tanins à forte concentrations et effets AH favorables chez les animaux infestés. Dans le cas de travaux futurs s'orientant vers des teneurs en tanins plus fortes dans les granulés (par la sélection de variétés de sainfoin, par l'utilisation des organes de la plante contenant majoritairement les tanins lors de la déshydratation, ou par l'ajout de sources de tanins extérieures), la question de ces compromis entre effets anthelminthiques et effets anti-nutritionnels méritera d'être posée, de même que celle de problèmes éventuels d'acceptabilité et de consommation (Ginane et al., 2005; Mc Sweeney et al., 2008).

A l'inverse d'autres études mettant en évidence une association entre la consommation de TCs par les petits ruminants et une réduction de l'infestation parasitaire (Lisonbee et al., 2009; Juhnke et al., 2012; Amit et al., 2013), aucune capacité d'automédication n'a été mise en évidence dans notre essai chez les deux espèces de petits ruminants. Toutefois, dans l'expérience de cafétéria, les agneaux ou chevreaux parasités ont montré une augmentation modérée de la consommation de sainfoin et des TCs au cours du temps d'observation.

Sur la base de ces résultats, il paraît difficile de considérer que l'animal pourra gérer par lui-même son parasitisme, en lui laissant l'accès à un nutriment contenant des tannins. Cependant, il s'agit ici d'une unique étude i/ sans apprentissage préalable (Fernández et al., 2012) ii/ et dans laquelle le nutriment proposé avait une bonne valeur nutritionnelle et contenait des teneurs modérées en tanins. La comparaison de nos résultats avec ceux de la bibliographie citée suggère qu'une période de conditionnement où l'animal « apprend » à associer la plante à ses conséquences anthelminthiques peut s'avérer nécessaire. Cette période peut aussi aider l'animal à accepter l'aliment dans les cas où la présence de tanins induit une aversion sensorielle initiale (Costes-Thiré et al., 2016).

Les études menées ont fourni un certain nombre de résultats appliqués permettant de proposer des recommandations pour optimiser l'exploitation des granulés déshydratés de sainfoin comme nutriment en élevage de petits ruminants :

- Dans la gamme des teneurs en TCs testés (jusque 5%), les granulés de sainfoin ont été bien acceptés par les ovins et les caprins ;
- Un seuil minimal de concentration de TCs dans la MS de la ration est à apporter pour obtenir des effets antiparasitaires. Sur la base de la méthode Folin Ciocalteu, ce seuil est estimé à environ 2% ;
- Une durée minimale de 15 jours de distribution dans la ration semble nécessaire ;
- L'association avec un traitement par une ivermectine par voie orale semble à éviter. Les recommandations concernant ce volet sont à diffuser avec précaution.

Conclusion / Perspectives

L'objectif général de ce travail de thèse CIFRE visait à valider l'utilisation de granulés déshydratés de sainfoin en élevage et de proposer/définir les conditions optimales pour les exploiter comme modèle de nutricaments dans la lutte contre les NGIs des caprins et ovins, de par ses bonnes valeurs nutritionnelles (Légumineuse, avec environ 15% de protéines) et en raison de sa teneur en tanins condensés. Cette thèse s'inscrit dans la démarche générale pour conforter des options participant à une gestion intégrée des nématodes gastro-intestinaux pour s'affranchir du recours aux seuls AHs de synthèse et ainsi chercher des solutions au phénomène de résistance des populations de NGIs à ces molécules de synthèse.

L'étude *in vitro* menée au fil de l'eau de cette thèse (chapitre 1) a montré que **des méthodes simples permettent d'analyser rapidement les lots de granulés avant usage**. Elle a également montré **l'intérêt de la méthodologie SPIR dans l'analyse rapide des TCs** présents dans le sainfoin et **de l'activité anthelminthique associée**.

Des données antérieures avaient suggéré que des teneurs en TCs comprises **entre 2% et 5% de la MS** seraient un seuil nécessaire pour associer valeur nutritionnelle et favorable sur la santé (effet AH). Les résultats des études *in vivo* de cette thèse confirment ces données (**concentration minimale en tanins condensés de 2 %** de la MS totale de la ration). Ils mettent aussi en évidence une **durée minimale de distribution dans la ration de 15 jours**. En revanche, peu de données étaient disponibles sur les conséquences d'une utilisation combinée du sainfoin (modèle de nutricament) et d'un AH de synthèse (ivermectine par voie orale dans notre cas). Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent qu'une **utilisation disjointe serait préférable**.

Les **caprins ont consommé davantage le sainfoin que les ovins**, mais les deux espèces **ont très bien ingéré le sainfoin**. En revanche, contrairement à des études recensées dans la bibliographie, les **ovins et caprins n'ont pas montré de capacité d'automédication** avec les granulés de sainfoin.

Au vu des résultats des divers chapitres de cette thèse, plusieurs perspectives de recherche et d'applications peuvent être envisagées.

1) *Etendre les possibilités d'application de la méthodologie SPIR*

Les corrélations significatives obtenues entre les valeurs de calibration SPIR, les teneurs en TCs et une activité biologique associée (ici l'évaluation des effets AH), indiquent que le développement de ces calibrations devrait permettre d'identifier les lots de sainfoin avant usage et d'orienter leur préconisation comme aliment (pour la nutrition quotidienne des animaux) ou comme alicament (qui pourra être distribué aux périodes maximales de risque d'infestation parasitaire).

Les résultats obtenus sur ce modèle soulignent l'intérêt de la méthodologie SPIR pour développer des calibrations validées et étendues visant à caractériser :

- Soit d'autres ressources contenant des TCs pour des activités AH, comme le suggèrent des résultats préliminaires obtenus avec d'autres légumineuses contenant des polyphénols (le lotier, la coronille, et d'autres variétés d'*Onobrychis*), ou avec des co-produits industriels riches en TCs (comme les endocarpes de noisette ou de châtaigne), pouvant augmenter les teneurs en tanins des granulés de sainfoin.
- Soit des granulés déshydratés de sainfoin contenant des TCs pour valider d'autres activités biologiques, comme une activité anti-coccidienne qui a été évoquée avec certains tanins (Saratsis et al., 2012).

Par ailleurs, la formation de complexes entre les TCs et les protéines peut avoir des conséquences sur la capacité des TCs à limiter la dégradation des protéines dans le rumen (Theodoridou et al., 2010; Niderkorn et al., 2012; Copani et al., 2015). Il serait intéressant à l'avenir de se pencher sur l'intérêt de la méthode de diffusion radiale pour évaluer la capacité à limiter les dégradations ruminales des protéines et en conséquence la production de gaz à effet de serre.

2) Compléter les résultats du chapitre 2

La mise en place d'études systémiques pour préciser les conditions de distribution des granulés déshydratés sera nécessaire pour répondre à plusieurs questions :

- Comment les distribuer : en continu ou sous forme de cures régulières ?
- A quelle fréquence ?
- Quand les placer lors de la saison de pâturage ?

Le but général étant d'utiliser les nutricaments en prévention pour préserver au maximum les AHs de synthèse, disponibles à des fins curatives.

Enfin le volet sur les interactions possibles entre nutricaments et les lactones macrocycliques méritera d'être exploré plus avant, notamment dans le cadre d'études *in vivo* incluant une forme injectable ou en intégrant des co-produits *in vivo* dans la ration des animaux (comme la noisette) qui ont montré *in vitro* une forte aptitude à bloquer l'activité de l'ivermectine.

Références

- Adu-Amankwa, B., Sekyere, D., Darkwa, N.A., 2011. Rapid prediction of extractives and polyphenolic contents in *Pinus caribaea* bark using near infrared reflectance spectroscopy. *IJAS* 2, 1-11.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., Mc Nabb, W.C., 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 75 (1-2), 1-12.
- Aissa, A., Manolaraki, F., Ben Salem, H., Hoste, H., Kraiem, K., 2016. *In vitro* assessment of the anthelmintic activity of *Hedysarum carnosum* Desf. at different phenological stages and from six locations in Tunisia. *Parasitol.* 143, 778-786.
- Albers, G.A.A., Gray, G.D., Piper, L.R., Barker, J.S.F., Le Jambre, L.F., Barger, I.A., 1987. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. *Int. J. Parasitol.*, 17, 1355-1363.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008a. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet. Parasitol.* 153, 313-319.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008b. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* 153, 187-192.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2010. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe ? *Small Rumin. Res.*, 89, 164-173.
- 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*. *Vet. Parasitol.* 181, 360-364.
- Amit, M. Cohen, I., Marcovics, A., Muklada, H., Glasserd, T.A., Ungar, E.D., Landau, S.Y., 2013. Self-medication with tannin-rich browse in goats infected with gastro-intestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 198, 305-311.
- Andlauer, W., Fürst, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res. Int.* 35, 171-176.
- Andronicos, N., Hunt, P., Windon, R., 2010. Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*, 40, 417-429.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 212-227.
- Armstrong, S.A., Klein, D.R., Whitney, T.R., Scott, C.B., Muir, J.P., Lambert, B.D., Craig, T.M., 2013. Effect of using redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* *in vitro* motility and increase ivermectin efficacy. *Vet. Parasitol.* 197, 271-276.
- 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* 2014, 21-71.
- 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. *Vet. Parasitol.* 99, 205-219.
- Aufrère, J., Theodoridou, K., Baumont, R., 2013. Valeur agronomique et alimentaire du sainfoin. *Fourrages* 213, 63-76.
- Ayres, M.P., Clausen, P.H., Maclean, S.F., Redman, A.M., Reichart, P.B., 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 78, 1696-1712.
- Azuhnwi, B.N., Boller, B., Martens, M., Dohme-Meier, M., Ampuero, S., Günter, S., Kreuzer, M., Hess, H.D., 2011. Morphology, tannin concentration and forage value of 15 Swiss accessions of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) as influenced by harvest time and cultivation site. *Grass Forage Sci.* 66, 474-487.
- Azuhnwi, B.N., 2012. Cultivar differences in nutritional and anthelmintic potential of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) in ruminants. PhD. 130 p.
- Azuhnwi, B.N., Boller, B., Dohme-Meier, F., Hess, H.D., Kreuzer, M., Stringano, E., Mueller-Harvey, I., 2013a. Exploring variation in proanthocyanidin composition and content of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *J. Sci. Food. Agric.* 93, 2102-2109.
- Azuhnwi, B.N., Hertzberg, H., Arrigo, Y., Gutzwiller, A., Hess, H.D., Mueller-Harvey, I., Torgerson, P.R., Kreuzer, M., Dohme-Meier, F., 2013b. Investigation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) cultivar differences on nitrogen balance and fecal egg count in artificially infected lambs. *J. Anim. Sci.* 91, 2343-2354.
- Baker, R.L., Mwamachi, D.M., Audho, J.O., Aduda, E.O., Thorpe, W., 1998. Resistance of Galla and Small East African goats in the sub-humid tropics to gastrointestinal nematode infections and the peri-parturient rise in faecal egg counts. *Vet. Parasitol.*, 79, 53-64.
- Barbehenn, R.V., Jones, C.P., Hagerman, A.E., Karonen, M., Salminen, J.-P., 2006. Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: potential impact on caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 32, 2253-2267.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A., 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitol. Today* 11, 56-63.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, 131, 531-538.
- Bate-Smith, E. 1973. Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry*, 12, 1809-1812.
- Baumont, R., 1996. Palatabilité et comportement alimentaire chez les ruminants. *INRA Prod. Alim.* 9, 349-348.
- Bengone-Ndong, T., Alvinerie, M., 2004. Macrolides antiparasitaires : propriétés pharmacologiques générales et recommandations d'usage dans le contexte vétérinaire africain. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 57, 49-58.

- Bennick, A., 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13, 184-96.
- Bernays, E.A., Singer, M.S., 2005. Taste alteration and endoparasites. *Nature*, 436, 476.
- Bertrand, D., Dufour, E., 2000. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Collection sciences et technique agroalimentaires, édition Tec et Doc, 566 p.
- Besier, B., 2007. New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends Parasitol.* 23, 21-24.
- Besier, R.B., Smith, W.D., 2014. A new approach to the control of barbers pole worm. In: *Proc. Conf. Aust. Sheep Veterinarians* (Perth, Australia, May 2014), pp. 11-16.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016a. Chapter four – The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Adv. Parasit.*, 93, 95-144.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016b. Chapter six – Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Adv. Parasit.*, 93, 181-238.
- Bishop, S.C. and Morris, C.A., 2007. Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Res.*, 70, 48-59.
- Bisset, S.A., Morris, C.A., 1996. Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *Int. J. Parasitol.* 26, 857-868.
- Bricarello, P.A., Amarante, A.F.T., Rocha, R.A., Cabral Filho, S.L., Huntley, J.F., Houdijk, J.G.M., Abdalla, A.L., Gennari, S.M., 2005. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. *Vet. Parasitol.*, 134, 99–109.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, L., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet, S., 2008. Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. Thèse de doctorat en sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bio ingénieries. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 246 p.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008a. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783-790.
- Brunet, S., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H., 2008b. Effect of the consumption of *Lysiloma latissiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet. Parasitol.* 157, 81-88.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in third-stage larvae of parasitic nematodes of ruminants treated with a sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* 60, 419-424.

- Bruneton, J., 2009. Tanins. In: Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Lavoisier (4th edition), Paris, 458-461.
- Bumb, I., Garnier, E., Bastianelli, D., Richarte, J., Bonnal, L., Kazakou, E., 2016. Influence of management regime and harvest date on the forage quality of rangelands plants: the importance of dry matter content. *AoB Plants* 8.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., 2012a. Grazing sericea lespedeza for control of gastrointestinal nematodes in lambs. *Vet. Parasitol.* 186, 507-512.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., and Terrill, T.H., 2012b. Use of a mixed sericea lespedeza and grass pasture system for control of gastrointestinal nematodes in lambs and kids. *Vet. Parasitol.* 186, 328-336.
- Butter, N.L., Dawson, J.M., Buttery, P.J., 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. In: Secondary Plant Products. Nottingham-University-Press, Nottingham, 51-70.
- Cabaret, J., 2003. Animal health problems in organic farming: subjective and objective assessments and farmers' actions. *Livest. Prod. Sci.* 80, 99-108.
- Cabaret, J., Bouihol, M., Mage, C., 2002. Managing helminths of ruminants in organic farming. *Vet. Res.* 33, 625-640.
- Calderón-Quintal, J.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Alonso- Díaz, M.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A., 2010. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Arch. Med. Vet.* 42, 165-171.
- Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers-Schonberg, G., Jacobs, T.A., 1983. Ivermectin: a potent new anthelmintic agent. *Science* 221, 823-828.
- Campidonico, L., Toral, P.G., Priolo, A., Luciano, G., Valenti, B., Hervas, G., Frutos, P., Copani, G., Ginane, C., Niderkorn, V., 2016. Fatty acid composition of ruminal digesta and longissimus muscle from lambs fed silage mixtures including red clover, sainfoin, and timothy. *J. Anim. Sci.* 94, 1550-1560.
- Carrai, V., Long, E., Paul, A., Glendinning, J. I. 2003. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self-medication in prosimians? *Primates* 44(1), 61-66.
- Castella, G., Chapuisat, M., Christe, P., 2008. Prophylaxis with resin in wood ants. *Anim. Behav.* 75, 1591-1596.
- Cc-Repab-F, 2000. Cahier des charges concernant le mode de production et de préparation Biologique des animaux définissant les modalités d'application du règlement CEE n°2092/91 modifié du Conseil et/ou complétant les dispositions du règlement CEE n°2092/91 modifié du conseil. Journal Officiel de la République Française du 30/08/2000.
- Cenci, F.B., Louvandini, H., McManus, CM., Dell'Porto, A., Cosat, D.M., Araujo, S.C, Minho, A.P, Abdalla, A.L., 2007. Effects of condensed tannins from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminths. *Vet. Parasitol.* 144, 132-137.
- Cezar, A.S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L.A., Ribas, H.O., Vogel, F.S.F., 2010. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 173, 157-160.

- Chagas, A.C., Vieira, L.S., Freitas, A.R., Araujo, M.R., Araujo-Filho, J.A., Aragao, W.R., Navarro, A.M., 2008. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes (R) in Morada Nova sheep. *Vet. Parasitol.* 151, 68-73.
- Chandrawathani, P., Yusoff, N., Wan, L.C., Ham, A., Waller, P.J., 2004. Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. *Vet. Res. Comm.* 28, 1-11.
- Charlier, J., Morgan, E.R., Rinaldi, van Dijk, J., Demeler, J., Hoglund, J., Hertzberg, H., Van Ranst, B., Hendrickx, G., Vercruysse, J., 2014. Practices to optimise gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Vet Rec.*, 175, 250-255.
- Chartier, C., Reche, B., 1992. Gastrointestinal helminths and lungworms of french dairy goats: prevalence and geographical distribution in Poitou-Charentes. *Vet. Res. Com.*, 16, 327-335.
- Chartier, C., Hoste, H., 1994. Anthelmintic treatments against digestive-tract nematodes in grazing dairy goats with high or low levels of milk production. *Vet. Parasitol.* 25, 450-457.
- Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit C., Bernard, N., 1998. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in western France. *Small Rumin. Res.* 29, 33-41.
- Chartier, C., Itard, J., Morel, P., Troncy, P., 2000. *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*, Paris, édition Tec et Doc, 774 p.
- Chartier, C., Soubiarc, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., Cabaret, J., 2001. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *J. Helminthol.* 75, 325-330.
- Chartier, C., Pors, I., Rehby, L., Kerboeuf, D., 2007. Anthelmintic resistance survey in French dairy goat nematodes in four main breeding areas. In: *Proceedings of the 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, 19-23 August, 2007, Gent, Belgium, p. 213.
- Choisy, M., de Roode, C., 2014. The ecology and evolution of animal medication: genetically fixed response versus phenotypic plasticity. *Am. Nat.* 184, S31-46.
- Christe, P., 2014. Les animaux sauvages se traitent-ils aux antibiotiques naturels ? In: Morand, S., Moutou, F., Richomme, C. - *Faune sauvage, biodiversité et santé, quels défis ?* Eds Quae, pp. 75-86
- Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G., 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Techn.* 9, 168-175.
- Chung, Y.H., Mc Geough, E.J., Acharya, S., Mc Allister, T.A., Mc Ginn, S.M., Harstad, O.M., Beauchemin, K.A., 2013. Enteric methane emission, diet digestibility, and nitrogen excretion from beef heifers fed sainfoin or alfalfa. *J. Anim. Sci.* 91, 4861-4874.
- CIRAD, 2007. *La spectroscopie dans le proche infrarouge*. Laboratoire d'alimentation animale du Cirad. Plaquette de présentation.
- Clark, L., Russel Masson, J., 1985. Use of nest material as insecticidal and anti-pathogenic agents by the European starling. *Oecologia*, 67, 169-176.

- Clayton, D.H., Wolfe, N.D., 1993. The adaptative significance of self-medication. *Trends Ecol. Evol.* 8, 60-63.
- Coles, G.C., 2002. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: Why so few cases? *Vet. Res.* 33, 481-489.
- Colvin, A.F., Walkden-Brown, S.W., Knox, M.R., Scott, M.J., 2008. Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. *Vet. Parasitol.* 153, 219-227.
- Commission des Communautés Européennes, 1980. La déshydratation des fourrages verts dans la CE – Etude technico-économique. Informations sur l’agriculture 69, 383 p.
- Coop, R.L., Holmes, P.H., 1996. Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 26, 951–962.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 1999. Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84, 187-204.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.*, 17, 325-330.
- Copani, G., 2015. PhD. Benefit of including bioactive legumes (sainfoin, red clover) in grass-based silages on ruminant production and pollutant emissions. Thèse de doctorat en sciences de la vie, santé, agronomie et environnement. Université Clermont-Ferrand 2, Clermont-Ferrand, France, 140 p.
- Copani, G., Ginane, C. Le Morvan, A., Niderkorn, V. 2015. Patterns of *in vitro* rumen fermentation of silage mixtures including sainfoin and red clover as bioactive legumes. *An. Feed Sci. Techn.*, 208, 220-224.
- Costa-Júnior, L.M., Costa, J.S., Lôbo, T.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. *Vet. Parasitol.* 205, 725-729.
- Costes-Thiré, M., Villalba, J., Hoste, H., Ginane, C., 2016. Increased intake of tannin-rich sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets by parasitized and non-parasitized sheep after a period of conditioning. Presented at ASAS ADSA WSASAS CSAS Joint Annual Meeting, Salt Lake City, USA (2016-07-19 - 2016-07-23).
- Crook, E.K., O’Brien, D.J., Howell, S.B., Storey, B.E., Whitley, N.C., Burke, J.M., Kaplan, R.M., 2016. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of *in vivo* and *in vitro* detection methods. *Small. Rumin. Res.*, 143, 89-96.
- da Cruz, D.G., da Rocha, L.O., Arruda, S.S., Palieraqui, J.G.B., Cordeiro, R.C., Santos Junior, E., Molento, M.B., de Paula Santos, O.C., 2010. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 170, 340-343.
- Danburry, T.C., Weeks, C.A., Chambers, J.P., Waterman-Pearson, A.E., Kestin, S.C., 2000. Self-selection of the analgesic drug carprofen by lame broiler chickens. *Vet. Rec.*, 307-311.
- Deepak, M., Dipankar, G., Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A., Venkataraman, B.V., 2002. Tribulosin and beta-sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine* 9, 753-756.
- De la Chevrotière, C., Moreno, C., Jacquet, P., Mandonnet, N., 2011. La sélection génétique pour la maîtrise des strongyloses gastro-intestinales des petits ruminants. *INRA Prod. Anim.* 24, 221–234.

- Del Rio, D., Calani, L., Dall Asta, M., Brighenti, F., 2011. Polyphenolic composition of hazelnut skin. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9935-9941.
- Demdoun, S., 2012. Caracterización agronómica, genética y composición química de una colección de variedades de esparceta. Tesis Doctoral. 202 p.
- Demeler, J., Kleinschmidt, N., Küttler, U., Koopmann, R., von Samson-Himmelsterjerna, G., 2012. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitol. Int.* 61, 614-618.
- Derkyi, N.S.A., Adu-Amankwa, B., Sekyere, D., Darkwa, N.A., 2011. Rapid prediction of extractives and polyphenolic contents in *Pinus caribaea* bark using near infrared reflectance spectroscopy. *Int. J. Appl. Sci.* 2, 1-11.
- De Roode, J., Lefèvre, T., Hunter, M.D., 2013. Self-medication in animals. *Science.* 340, 150-151.
- Derouault, J., 1994. In : *Advances in Practical Spectroscopy, Proceedings of ESIS*. Lachenal, G., Siesler, H.W., eds. UCB, Lyon, France, 41.
- Desrues, O., Vargas-Magaña, J.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 hazel-nut peels be used to control gastrointestinal nematodes in goats? 11th International Goat Conference. Las Canarias, Sept 2012.
- Desrues, O., Peña-Espinoza, M., Hansen, T.V., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M., 2016a. Anti-parasitic activity of pelleted sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Parasit. Vectors* 9, 329.
- Desrues, O., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Mueller-Harvey, I., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M. 2016b. Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on *in vitro* anthelmintic activity against bovine nematodes. *Parasitology*, 143, 444-454.
- Desrues, O., Mueller-Harvey, I., Pellikaan, W.F., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M. 2017. Condensed tannins in the gastrointestinal tract of cattle after sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) intake and their possible relationship with anthelmintic effects. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1420-1427.
- Douch, P.G., Green, R.S., Morris, C.A., Mceewan, J.C., Windon, R.G., 1996. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int. J. Parasitol.*, 26, 899-911.
- Durmic, Z., Blache, D., 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 176, 150-162.
- Dykes, L., Hoffmann, L. Jr., Portillo-Ridriguez, O., Rooney, W.L., Lloyd W.R., 2014. Prediction of total phenols, condensed tannins, and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. *J. Cereal Sci.* 10, 1-4.
- Engel, C., 2006. Livestock Self-medication. In: *Alternatives health practices for livestock*, Morris, T.F., Keilty, M.T. (eds), Blackwell Publishing, pp. 54-61.
- Engström, M.T., Päljärvi, M., Fryganas, C., Grabber, J.H., Mueller-Harvey, I., Salminen, J.-P., 2014. Rapid qualitative and quantitative analysis of proanthocyanidin oligomers and polymers by UPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3390-3399.
- Erzen, N.K., Kolar, N.K., Flajs, V.C., Kuzner, J., Irena, M., Pogacnik, M., 2005. Degradation of Abamectin and Doramectin on sheep grazed pasture. *Ecotoxicology* 14, 627-635.

- Etter, E., Chartier, C., Hoste, H., Pors, I., Lefrileux, Y., Broqua, C., Vallade, S., Goudeau, C., 2000. Parasitisme par les nématodes du tube digestif et utilisation du pâturage: Epidémiologie de l'infestation dans les troupeaux caprins laitiers en France. *Epidémio. Santé Anim.*, 37, 75-86.
- Euzéby, J., 1963. Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine, Paris, 473 p.
- Falzon, L.C., Menzies, P.I., Shakya, K.P., Jones-Bitton, A., Vanleeuwen, J., Avula, J., Jansen, J.T., Peregrine, A.S., 2013. A longitudinal study on the effect of lambing season on the periparturient egg rise in Ontario sheep flocks. *Prev. Vet. Med.*, 110, 467–80.
- Fatela, L., 2012. Utilisation de la spectroscopie proche infrarouge comme un outil PAT pour la quantification de substances en solution. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Grenoble, 95 p.
- Fauth, P.T., Krementz, D.G., Hines, J.E., 1991. Ectoparasitism and the role of green nesting material in the European starling. *Oecologia*, 88, 22-29.
- Favreau-Peigné, G., 2010. PhD. Les caractéristiques sensorielles des aliments : quels rôles jouent-elles dans les aspects qualitatifs et quantitatifs du comportement alimentaire des ovins. Thèse de doctorat en sciences de la vie, santé, agronomie et environnement. Université Clermont-Ferrand 2, Clermont-Ferrand, France, 182 p.
- Fernández, H.T., Catanese, F., Puthod, G., Distel, R.A., Villalba, J.J., 2012. Depression of rumen ammonia and blood urea by quebracho tannin-containing supplements fed after high-nitrogen diets with no evidence of self-regulation of tannin intake by sheep. *Small Rum. Res.* 2015, 126-134.
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E., 1997. Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black Forest. *Tree Physiology*, 17, 335–340.
- Feucht, W., Treutter, D., 1999. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*, PRESS et BOCA RATON (Eds.), 307-338.
- Folin, O., Denis, W., 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22, 305-308.
- Fontanges, C., Chauchard, F., 2009. Introduction à l'apport des techniques proche infrarouge pour le contrôle des procédés de l'industrie pharmaceutique et démarche PAT. *Spectra Analyse* 269, 27-35.
- Foo, L.Y., Jones, W.T., Porter, L.J., Williams, V.M., 1982. Proanthocyanidins polymers of fodder legumes. *Phytochemistry*, 21, 933-935.
- Foo, L.Y., Newman, R., Waghorn, G., Mc Nabb, W.C., Ulyatt, M.J., 1996. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry*, 41, 617-624.
- Foo, L.Y., Lu, Y., Mc Nabb, W.C., Waghorn, G., Ulyatt, M.J., 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry*, 45, 1689-1696.
- Gárate-Gallardo, L., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Cámara-Sarmiento, R., Canul-Ku, H.L., 2015. Comparing different maize supplementation strategies to improve resilience and resistance against gastrointestinal nematode infections in browsing goats. *Parasite* 22, 19.

- Gaudin E., Chan-Pérez I., Castañeda G.S., González Pech P.G., Torres-Acosta J.F., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Mathieu C., 2016. *In vitro* anthelmintic activity of leaf and husk extracts of three *Theobroma cacao* varieties against two isolates of *Haemonchus contortus*. 8th Conference Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock, Belem, Brazil.
- Geary, T.G., Conder, G.A., Bishop, B., 2004. The changing landscape of antiparasitic drug discovery for veterinary medicine. *Trends Parasitol.* 20, 449-455.
- Gerwert, S., Failing, K., Bauer, C., 2002. Prevalence of levamisole and benzimidazole resistance in *Oesophagostomum* populations of pig-breeding farms in North Rhine-Westphalia, Germany. *Parasitology Research* 88, 63-68.
- Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., di Regalbono, A.F., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Vanimisetti, H.B., Bartram, D.J., Denwood, M.K., 2015. Anthelmintic resistance to ivermectine and moxidectine in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 163-171.
- Ginane, C., Duncan, A.J., Young, S.A., Elston, D.A., Gordon, I.J., 2005. Herbivore diet selection in response to simulated variation in nutrient rewards and plant secondary compounds. *Anim. Behav.* 69, 541-550.
- Giordanengo, T., Charpentier, J.P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J.M., Chaix, G., Robin, C., Mourey, N., 2009. Oakscan: procédé de mesure rapide et non destructive des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie. *Revue française d'œnologie*, 10-15.
- 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. In: 64th EAAP Nantes, 26th-30th August 2013, 506.
- Girard, M., Dohme-Meier, F., Wechsler, D., Goy, D., Kreuzer, M., Bee, G., 2015. Ability of 3 tanniferous forage legumes to modify quality of milk and Gruyère-type cheese. *J. Dairy Sci.* 99, 1-16.
- 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. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1923-1933.
- 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, 308-320.
- Givens, D.I., Deaville, E.R., 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 1131-1145.
- González-Pech, P.G., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval Castro, C.A., 2014. Adapting a bite coding grid for small ruminants browsing a deciduous tropical forest. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 17, 63-70.
- Goodchild, A.V., El Haremein, F.J., El Moneim, A. Abd., Makkar, H.P.S., Williams, P.C., 1998. Prediction of phenolics and tannins in forage legumes by near infrared reflectance. *J. Near Infrared Spectrosc.* 6, 175-181.
- Gordon, H. Mc. L., 1961. Thiabendazole: a highly effective anthelmintic for sheep. *Nature* 191, 1409-1410.

- Gossen, B.D., Horton, P.R., Wright, S.B.M., Duncan, C.H., 1994. Field response of alfalfa to harvest frequency, cultivar, crown pathogens, and soil fertility: I. Survival and yield. *Agron. J.* 86, 82-88.
- Grabber, J., Zeller, W.E., Mueller-Harvey, I., 2013. Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in *Lotus* species by the butanol-HCl-iron assay. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2669-2678.
- Grabber, J.H., Riday, H., Cassida, K.A., Griggs, T.C. Min, D.H., MacAdam, J.W., 2014. Yield, morphological characteristics, and chemical composition of European- and Mediterranean-derived birdsfoot trefoil cultivars grown in the colder continental United-States. *Crop Sci.* 54, 1893-1901.
- Gradé, J.T., Tabuti, J.S., Van Damme, P., 2009. Four footed pharmacists indications of self-Medicating livestock in karamoja. *Uganda Econ. Bot.* 63, 29–42.
- Guedes, M.T., Zacharias, F., Couto, R.D., Portela, R.W., Santos, L.C.S., Santos, S.C.O., Pedroza, K.C., Peixoto, A.P.C., López, J.A., Mendonça-Lima, F.W., 2010. Maternal transference of passive humoral immunity to *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 136, 138–143.
- 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. *Vet. Parasitol.* 191, 51-58.
- Gwinner, H., Oltrogge, M., Trost, L., Nienaber, U., 2000. Green plants in starling nests: effects on nestlings. *Anim. Behav.*, 59, 301-309.
- Hagerman, A.E., 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J. Chem. Ec.* 13, 437-449.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1991. Tannins and lignins. In: Rosenthal, G.A. and Berenbaum, M.R. (Eds), *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, 2E, volume 1, The Chemical Participants, New York, Academic Press, 355-387.
- Hagerman, A.E., 2002. Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae).
- Hagerman, A.E., 2012. Fifty years of polyphenol-protein complexes. In: *Recent advances in polyphenol research*. 1st Edition. Cheynier, V.; Sami-Machado, P.; Quideau, S. Eds. Publisher: Wiley-Blackwell & sons, Oxford, UK. Vol. No. 3. 364 p.
- Haile, A., Tibbo, M., Baker, R.L., Rege, J.E.O., 2007. Effects of non-genetic factors on responses to gastro-intestinal nematode infections in Ethiopian sheep. *Trop. Anim. Health Prod.*, 39, 411-417.
- Hart, B.L., 2005. The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. *Anim. Behav.*, 70, 975-989.*
- Hayot-Carbonero, C., Mueller-Harvey, I., Brown, T.A., Smith, L., 2011. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 9, 70-85.
- Heckendorn, F., 2007. The control of gastrointestinal sheep, nematodes with taniferous forage plants. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switerland, 90 p.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lamb. *Vet. Parasitol.* 142, 293-300.

- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123-134.
- Hernández-Villegas, M.M., Borges-Argaez, R., Rodriguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F.J., Mendez-Gonzalez, M., Caceres-Farfan, M., 2011. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 179, 100-106.
- Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., Wanner, M., 2002. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*, 125, 65-70.
- Hofmann, R. R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, 443-457.
- Holmes, P.H., 1993. Interactions between parasites and animal nutrition - the veterinary consequences. *Proc. Nut. Soc.* 52, 113-120.
- Hosking, B.C., Kaminsky, R., Sager, H., Rolfe, P.F., Seewald, W., 2010. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol. Res.* 106-529-532.
- Hoste, H., Chartier, C., 1993. Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high- and low-producing dairy goats. *Am. J. Vet. Res.*, 54, 1886-1893.
- Hoste, H., Huby, F., Mallet, S., 1997. Strongyloses gastro-intestinales des ruminants : conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Point Vét.*, 28 (Parasitologie des ruminants), 53-59.
- Hoste, H., Chartier, C., 1998. Response to challenge infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in dairy goats. Consequences on milk production. *Vet. Parasitol.*, 74, 43-54.
- Hoste, H., Le Frileux, Y., Pommaret, A., Gruner, L., Van Quackebeke, E., Koch, C., 1999. Importance du parasitisme par des strongles gastro-intestinaux chez les chèvres laitières dans le Sud-Est de la France. *INRA Prod. Anim.*, 12, 377-389.
- Hoste, H., Leveque, H., Dorchies, P., 2001. Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: relations with the feeding behaviour. *Vet. Parasitol.*, 101, 127-135.
- Hoste, H., Paolini, V., Paraud, C., Chartier, C., 2004. Gestion non-chimique du parasitisme par les nématodes chez les petits ruminants. *Bulletin G.T.V. (Hors-série Parasitologie des ruminants laitiers)*, 131-135.
- Hoste, H., Gaillard, L., Le Frileux, Y., 2005. Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Ruminant Res.* 59, 265-271.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 32, 253-261.

- Hoste, H., Brunet, S., Paolini, V., Bauhauud, D., Chaveau, S., Fouraste, I., Lefrileux, Y., 2009. Compared *in vitro* anthelmintic effects of eight tannin-rich plants browsed by goats in the southern part of France. In: Papachristou, T.G., Parissi, Z.M., Ben Salem, H., Morand-Fehr, P. (Eds.), *Nutritional and Foraging Ecology of Sheep and Goats*. Zaragoza: CIHEAM/FAO/NAGREF. CIHEAM/FAO/NAGREF, Zaragoza, pp. 431–436.
- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I., 2010. Goat–Nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol.* 26, 376–381.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet. Parasitol.*, 180, 144–154.
- Hoste, H., Martínez-Ortíz-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 infection. *Vet. Parasitol.* 186, 18–27.
- 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.
- 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. Chapter seven – Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Adv. Parasit.*, 93, 239–351.
- Houdijk, J.G.M., 2012. Differential effects of protein and energy scarcity on resistance to nematode parasites. *Small Ruminant. Res.*, 103, 41–49.
- Hounzangbe-Adote, S., 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin. 184 p.
- Huemmer, W., Schreier, P., 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 25, 1381–1398.
- Huffman, M.A., Seifu, M., 1989. Observations of illness and consumption of a possibly medicinal plant *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*, 30, 51–63.
- Huffman, M.A., Page, J.E., Sukhdeo, M.V.K., Gotoh, S., Kalunde, M.S., Chandrasiri, T., Towers, G.H.N., 1996. Leaf-swallowing by chimpanzees: a behavioral adaptation for the control of strongyle nematode infections. *Int. J. Primatol.* 17, 475–503.
- Huffman, M.A., 1997. Current evidence for self-medication in primates: a multidisciplinary perspective. *Yearbook of Physical Anthropology*, 40, 171–200.
- Huffman, M.A., 2003. Animal self-medication and ethnomedicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. *P. Nutr. Soc.*, 62, 371–381.
- Hutchings, M.R., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Gordon, I.J., 2003. Can animals use foraging behaviour to combat parasites ? *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 361–370.
- Hutchings, M.R., Judge, J., Gordon, I.J., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., 2006. Use of trade-off theory to advance understanding of herbivore–parasite interactions. *Mammal Rev.* 36, 1–16.

- Huyen, N.T., Desrues, O., Alfreink, S.J.J, Zandstra, T., Verstegen, M.W.A., Hendriks, W.H., Pellikaan, W.F., 2016. Inclusion of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage in dairy cow rations affects nutrient digestibility, nitrogen utilization, energy balance, and methane emissions. *J. Dairy Sci.* 99, 3566-3577.
- IFOAM, 1998. Basic standards for organic production and processing. IFOAM Tholey-Theley, Germany.
- Irum, S., Ahmed, H., Mukhtar, M., Mushtaq, M., Mirza, B., Donskow-Lysoniewska, K., Qayyum, M., Simsek, S., 2015. Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritima* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet. Parasitol.* 212, 451-455.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120, 95-97.
- Jackson, F., Greer, A.W., Huntley, J., McAnulty, R.W., Bartley, D.J., Stanley, A., Stenhouse, L., Stankiewicz, M., Sykes, A.R., 2004. Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an *in vitro* direct challenge method using abomasal tissue explants. *Vet. Parasitol.* 124, 73-89.
- Jackson, F., Miller, J. 2006. Alternative approaches to control-quo vadit? *Vet. Parasitol.*, 139, 371–384.
- 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.E.; Makkar, H.P.S.; Schlink, A.C. (Eds.), *In vitro* screening of Plant Resources for Extra Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies, FAO/IAEA Springer Edition, 24-45.
- Jackson, F., Varady, M., Bartley, D.J., 2012. Managing anthelmintic resistance in goats-can we learn lessons from sheep ? *Small Rumin. Res.* 103, 3-9.
- Jacquiet, P., Cabaret, J., Dia, M.L., Cheikh, D., Thiam, E., 1996. Adaptation to arid environment: *Haemonchus contortus* in dromedaries of Saharo-Sahelian areas of Mauritania. *Vet. Parasitol.* 66, 193-204.
- Jacquiet, P., 1997. Les strongles digestifs des ruminants. *Point Vét. (Parasitologie des ruminants)*, 28, 20-22.
- Janzen, J., 1978. Complications in interpreting the chemical defenses of trees against tropical arboreal plant-eating vertebrates. In: Montgomery, G. (Ed.), *The Ecology of Arboreal Folivores*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 73–84.
- Jean-Blain, C., 1998. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Méd. Vét.*, 149, 911-920.
- Jensen, J., Henning Krogh, P., Sverdrup, L.E., 2003. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere* 50, 437-443.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takagaki, T., Nozaki, H., Tada, T., T Hirota, M., Irie, R., Huffman M.A., Nishida, T. Kajie, M., Koshimizu, K., 1992. Bitter steroid glucosides, vernoniosides A1, A2 and A3, and related B1 from a possible medicinal plant, *Vernonia amygdalina*, used by wild chimpanzees. *Tetrahedron*, 48, 625-632.
- Jones, W.T., Broadhurst, R.B., Lyttleton, J.W., 1976. The condensed tannins of sainfoin of pasture legume species. *Phytochemistry* 15, 1407-1409.

- Jones, W.T., Mangan, W.T., 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. J. Sci. Food Agric. 28, 126-136.
- Journal officiel de l'Union Européenne, 2009. Règlement (CE) n°767/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 13 juillet 2009. 28 p.
- 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*. Vet. Parasitol. 188, 104-114.
- 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., Maser, P., 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. Nature, 452, 176–181.
- Kaplan, R.M, 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol. 20, 477-481.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. Vet. Parasitol. 186, 70-78.
- Karanu, F.N., Mc Guire, T.C., Davis, W.C., Besser, T.E., Jasmer, D.P., 1997. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. Parasite Immunol. 19, 435-445.
- Kazuk, R.W., 2010. An investigation of sainfoin condensed tannin dynamics in manured perennial forage production, these, Department of Plant Science, University of Manitoba, Canada, 164 p.
- Kelly, P., Good, B., Hanrahan, J.P., Fitzpatrick, R., de Waal, T., 2009. Screening for the presence of nematophagous fungi collected from Irish sheep pastures. Vet. Parasitol. 165, 345-349.
- Kelly, G.A., Kahn, L.P., Walkden-Brown, S.W., 2013. Measurement of phenotypic resilience to gastrointestinal nematodes in Merino sheep and association with resistance and production variables. Vet. Parasitol. 193, 111-117.
- Kenyon, F., Jackson, F., 2012. Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. Vet. Parasitol. 186, 10-17.
- Khan, F.A., Sahoo, A., Dhakad, S., Pareek, A.K., Karim, S.A., 2011. Effect of trickle infection with *Haemonchus contortus* on pathophysiology and metabolic responses in growing lambs. Indian. J. Anim. Sci. 81, 1005-1009.
- Khan, F.A., Sahoo, A., Sonawane, G.G., Karim, S.A., Dhakad, S., Pareek, A.K., Tripathi, B.N., 2012. Effect of dietary protein on responses of lambs to repeated *Haemonchus contortus* infection. Livest. Prod. Sci. 150, 143-151.
- Kidane, A., Houdijk, J., Athanasiadou, S., Tolkamp, B., Kyriazakis, I., 2010. Nutritional sensitivity of periparturient resistance to nematode parasites in two breeds of sheep with different nutrient demands. Br. J. Nutr., 104, 1477–1486.
- Klongsiriwet, C., Karp, A., Hanley, S., Barnes, R., Falchero, L., Mueller-Harvey, I., 2013. Near infrared spectroscopy (NIRS) for screening condensed tannins in a willow germplasm collection. Planta Med. 79, 26.

- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, R.A., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int. J. Parasitol. Drugs and Drug Resistance* 5, 127-134.
- Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., 2006. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, 139, 385-393.
- Koivisto, J.M., Lane, G.P.F., 2001. Sainfoin-worth another look, Cirencester, UK-Royal Agricultural College, <http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/docg-1base/AddInfo/sainfoin.pdf>.
- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Vet. Parasitol.* 205, 170-175.
- 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, 1065-1080.
- Kotze, A.C., Prichard, R.K., 2016. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. In: Gasser, R., Samson-Himmelstjerna, G.V. (Eds), *Haemonchus contortus* and haemonchosis past, present and future trends. Vol. 93, 397-428.
- Koupai-Abyazani, M.R., Muir, A.D., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Gruber, M.Y., 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry*, 34, 113-117.
- Krief, S., Hoste, H., 2014. Les animaux pratiquent-ils la médecine par les plantes ? In: Morand, S., Moutou, F., Richomme, C. - Faune sauvage, biodiversité et santé, quels défis ? Eds Quae, pp. 75-86
- Kyriazakis, I., Oldham, J.D., 1993. Diet selection in sheep: the ability of growing lambs to select a diet that meets their crude protein (nitrogen x 6.25) requirements. *Brit. J. Nutr.* 69, 617-629.
- 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. *Vet. Parasitol.*, 61, 297-313.
- Kyriazakis, I., Houdijk, J., 2006. Immunonutrition: Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Res.*, 62, 79-82.
- 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. Thèse de doctorat en sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bio ingénieries. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 234 p.
- Landau, S., Azaizah, H., Muklada, H., Glasser, T., Ungar, E.D., Baram, H., Abbas, N., Markovics, A., 2010. Anthelmintic activity of *Pistacia lentiscus* foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browse. *Vet. Parasitol.* 173, 208-286.
- Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metab. Rev.*, 25, 235-279.
- Lavin, S.R., Sullivan, K.E., Wooley, S.C., Stone, K., Russell, S., Valdes, E.V., 2015. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) analyses of nutrient composition and condensed tannin concentrations in Carolina willow (*Salix caroliniana*). *Zoo Biol.* 34, 576-582.

- Leathwick, D.M., Hosking, B.C., Bisset, S.A., McKay, C.H., 2009. Managing anthelmintic resistance: is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? *N.Z. Vet. J.* 57, 181-192.
- Leathwick, D.M., Besier, R.B., 2014. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia – strategies and experiences. *Vet. Parasitol.* 204, 44-54.
- Lees, G.L., Hinks, C.F., Suttill, N.H., 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big U trefoil (*Lotus uliginosus Schkuhr*). *J. Sci. Food Agric.* 65, 415-421.
- Lefèvre, T., Oliver, L., Hunter, M.D., De Roode, J.C., 2010. Evidence for trans-generational medication in nature. *Ecology Letters*, 13, 1485-1493.
- Lisonbee, L.D., Villalba, J.J., Provenza, F.D., Hall, J.O., 2009. Tannins and self-medication: Implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behav. Processes.* 82, 184-189.
- Little, P.R., Hodge, A., Watson, T.G., Seed, J.A., Maeder, S.J., 2010. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 58, 121-129.
- Lorenz, M. M., Udén, P., 2011. Influence of formic acid and dry matter on protein degradation in the tanniniferous legume sainfoin. *Anim. Feed Sci. Tech.* 164, 217–224.
- Lorenz, M. M., Carbonero, C.H., Smith, L., Udén, P., 2012. *In vitro* protein degradation of 38 sainfoin accessions and its relationship to tannin content by different assays. *J. Agr. Food Chem.* 60, 5071-5075.
- Lozano, G.A., 1998. Parasitic stress and self-medication in wild animals. *Adv. Stud. Behav.* 27, 291-317.
- Luginbuhl, J-M., Glennon, H.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., 2013. Grazing and pasture management. *Proceedings of the American Consortium for Small Ruminant Parasite Control 10th Anniversary Conference*, May 20-22, 2013, Fort Valley, GA, pages 63-67.
- Lumaret, J.P., Errouissi, F., 2002. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Vet. Res.* 33, 547-562.
- Lumaret, J.P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J., Wardhaugh, K., 2012. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1004-1060.
- Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J.F., Rees, R.M., Peyraud, J.L., 2014. Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe. *Grass For. Sci.* 69, 206-228.
- Lyman, T.D., Provenza, F.D., Villalba, J.J., 2008. Sheep foraging behaviour in response to interactions among alkaloids, tannins and saponins. *J. Sci. Food Agric.* 88, 824–831.
- Mahieu, M., Aumont, G., 2009. Effects of sheep and cattle alternate grazing on sheep parasitism and production. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 229-239.
- Makkar, H.P., Dawra, R.K., Singh, B., 1991. Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *J. Sci. Food Agric.*, 54, 513- 519.

- Makkar, H.P., Blummel, M., Becker, K., 1995. Formulation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. Br. J. Nutr., 73, 897-913.
- Makkar, H.P., 2000. Quantification of tannins in tree foliage: Working document. In: FAO/ IAEA, Vienna.
- Malisch, C.S., Lüscher, A., Baert, N., Engström, M.T., Studer, B., Fryganas, C., Suter, D., Mueller-Harvey, I., Salminen, J.-P., 2015. Large variability of proanthocyanidin content and composition in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). J. Agric. Food Chem., 63, 10234-10242.
- Malisch, C.S., 2016. Agronomic and bioactive potential of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) for sustainable agriculture. PhD.
- Malisch, C. Suter, D., Luscher, A., Studer, B., 2016. Growing sainfoin. In: Ortiz, M.M., Smith, L., 2016. Sainfoin Surprising Science Behind a Forgotten Forage. Wilkinson, I. and Mountain, F., Eds, Cambridge, UK, 13-26.
- 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. Ann. Rech. Vet., 18, 275-278.
- Mancilla-Leytón, J.M., Joffre, R., Vicente, A.M., 2014. Effect of grazing and season on the chemical composition of Mediterranean shrub species in Donana Natural Park, Spain. J. Arid. Environ. 108, 10-18.
- Mandonnet, N., Aumont, G., Arquet, R., Gruner, L., Bouix, J., Khang, J., 2001. Assessment of genetic variability of resistance to gastrointestinal parasites in Creole goats. J. Anim. Sci. 79, 1706-1712.
- Mandonnet, N., Menendez-Buxadera, A., Arquet, R., Mahieu, M., Bachand, M., Aumont, G., 2006. Genetic variability in resistance to gastro-intestinal strongyles during early lactation in Creole goats. Anim. Sci., 82, 283-287.
- 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.
- Manolaraki, F., 2011. PhD. Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse de doctorat en sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bio ingénieries. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 185 p.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). J. Agric. Food Chem., 48, 3440-3447.
- Marley, C.L., Cook, R., Barrett, J., Keatinge, R., Lampkin, N.H., 2006. The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Chicorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration. Vet. Parasitol. 138, 280-290.
- Martínez-Ortíz-De-Montellano, C., Vagars-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol. 172, 283-290.

- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Arroyo-Lopez, 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 plants under in vivo and in vitro conditions. *Exp. Parasitol.* 133, 281–286.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Hoste, H., Torres Acosta, J.F.J., Fourquaux, I., 2015. Scanning and Transmission electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich materials in goats. 16th Int. Scientific Congress 2015. National Center for Scientific Research. La Habana, Cuba. EIN-O-015.
- Mc Arthur, C., Hagerman, A.E., Robbins, C.T., 1991. Physiological strategies of mammalian herbivores against plant defense. In: Plant defenses against mammalian herbivory, PALO et ROBBINS (Eds.), Boston, London, pp. 103-114.
- Mc Graw, R.L., Marten, G.C., 1986. Analysis of primary spring growth of four pasture legume species. *Agron. J.* 78:704-710.
- Mc Kellar, Q.A. 1997. Ecotoxicity and residues of anthelmintic compounds. *Vet. Parasitol.*, 72, 413-435.
- Mc Kenna, P.B., 2010. Update on the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 58, 172-173.
- Mc Sweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., Seawright, A.A., 2008. A review of anti-antinutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 158-171.
- Mederos, A.E., Ramos, Z., Banchero, G.E., 2014. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites Vectors* 7, 598.
- Medjekal, S., 2016. Effet de la saison de collecte sur la valeur nutritive, la production de méthane et de tannins condensés d'arbustes fourragers locaux. Essai de contrôle *in vitro* de la méthanogénèse ruminale d'ovins par l'utilisation de plantes médicinales. Thèse de doctorat en sciences biochimiques et microbiologiques appliquées. Université des Frères Constantine 1, Constantine, Algérie.
- Merlin, A., 2017. Optimisation de l'usage des antiparasitaires chez la génisse laitière en vue de prévenir le risque d'émergence de populations de strongles digestifs résistants : développement d'une stratégie de traitement sélectif. Thèse de doctorat en biologie, médecine et santé. Université Bretagne Loire, Nantes, 217 p.
- Messner, E.J., Wrangham, R.W., 1996. *In vitro* testing of the biological activity of *Rubia cordifolia* leaves on primate Strongyloïdes species. *Primates*, 37, 105-108.
- Milan, N.F., Kacsoh, B.Z., Schlenke, T.A., 2012. Alcohol consumption as self-medication against blood-borne parasites in the fruitfly, *Current Biology*, 22, 488-493.
- Min, B.R., Hart, S.P., 2002. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.*, 81, 102-109.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., Mc Nabb, 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.* 106, 3-19.
- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahlu, T., 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Vet. Parasitol.*, 130, 105–113.

- Minnée, E.M.K., Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Laboyrie, P.G., 2002. The effect of ensiling forage legumes on condensed tannins. *Agron. N. Z.*, 32/33, 117-119.
- Molan, A.L., Alexander, R.A., Brookes, I.M., McNabb, W.C., 2000. Effects of an extract from sulla (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.*, 60, 21–25.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2002. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, 33, 1691–1698.
- Molan, A.L., Sivakumaran, S., Spencer, P. A., Meagher, L.P., 2004. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. *Res. Vet. Sci.*, 77, 239–243.
- Molan, A.L., 2014. Effect of purified condensed tannins from pine barks on larval motility, egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda, Trichostrongyloidea). *Folia Parasitol.* 61, 371-376.
- Morel, C., 2015. Suivi de l'infestation par des strongles chez un troupeau de tarpans dans le cadre d'une étude pilote à propos de l'automédication chez le cheval. Thèse vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France, 143 p.
- Morris, C.A., Wheeler, M., Watson, T.G., Hosking, B.C., Leathwick, D.M., 2005. Direct and correlated responses to selection for high or low faecal nematode egg count in Perendale sheep. *N. Z. J. Agric. Res.*, 48, 1-10.
- Morshedloo, M.R., Craker, L.E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H., Maggi, F., 2017. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiol. Biochem.* 111, 119-128.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Cell. Mol. Biol. Plants.* 1, 151-217.
- Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 3-20.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2010–2037.
- Mueller-Harvey, I., Martin Lorzeno, M., Stringano, E., Barnes, R., Oliver, J., Theodoridou, K., Aufrère, J., Hatew Chuko, B., Pellikan, W., Manolaraki, F., Hoste, H., Hayot Carbonero, C., Smith, L., 2011. NIR spectroscopy for predicting the nutritional, anthelmintic and environmental effects of sainfoin. In: 8th Int. Symposium on Nutrition of Herbivores, Aberystwyth Univ., 6th-9th September 2011, 265.
- Mupeyo, B.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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164, 8–20.
- Niderkorn, V., Mueller-Harvey, I., Le Morvan, A., Aufrère, J., 2012. Synergistic effects of mixing cocksfoot and sainfoin on *in vitro* rumen fermentation. Role of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 178, 45-56.

- Niderkorn, V., Pellikaan, W., Dohme-Meier, F., Bee, G., 2016. Why Feed Sainfoin to Ruminants? A Forage of a Good Feeding Value. In: Sainfoin as a Forage, Ortiz, M.M., Smith, L., 2016. Sainfoin Surprising Science Behind a Forgotten Forage. Wilkinson, I. and Mountain, F., Eds, Cambridge, UK, 13-26.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C., 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J. Agric. Sci. 125, 281–289.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M., 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. Int. J. Parasitol., 26, 983-992.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. Vet. Parasitol., 80, 15-27.
- Nisbet, A.J., Meeusen, E.N., González, J.F., Piedrafita, D.M., 2016. Chapter eight – Immunity to *Haemonchus contortus* and vaccine development. Adv. Parasit., 93, 353-398.
- Nnadi, P.A., Kamalu, T.N., Onah, D.N., 2009. The effect of dietary protein on the productivity of West African Dwarf (WAD) goats infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 161, 232-238.
- Norris, K.H., Barnes, R.F., Moore, J.E., Shenk, J.S., 1976. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. J. Anim. Sci. 43, 889-897.
- Novobilský, A., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2011. Condensed tannins act against cattle nematodes. Vet. Parasitol., 182, 213–220.
- Novobilský, A., Stringano, E., Hayot Carbonero, C., Smith, L.M.J., Enemark H.L., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2013. *In vitro* effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against cattle nematodes. Vet. Parasitol. 196, 532–537.
- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. Vet. Parasitol., 142, 1-15.
- Ogle, D., Cane, J., Fink, F., St. John, L., Stannard, M., Dring, T., 2007. Plants for pollinators in the Intermountain West. Natural Resources Conservation Service. Idaho Technical Note 2, Boise, Idaho, 21 p.
- Ohigashi H., Huffman, M.A., Izustu, D., Koshimizu, K., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Kirby, G.C., Warhust, D.C., Allen, D., Wright, C.W., Phillipson, J.D., Timmon-David, P., Delnas, F., Elias, R., Balansard, G., 1994. Towards the chemical ecology of medicinal plant use in chimpanzees: the case of *Vernonia amygdalina* (Del.). A plant used by wild chimpanzees possibly for parasite-related diseases. J. Chem. Ecol., 20, 541-553.
- Ojeda-Robertos, N., Manolaraki, F., Theodoridou, K., Aufrère, J., Halbwirth, H., Stich, K., Regos, I., Treutter, D., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2010. The anthelmintic effect of sainfoin (silage, hay, fresh) and the role of flavonoid glycosides. In: EAAP Meeting Heraklion, Greece 20–24th August 2013, p. 73.
- Oliveira, L.M.B., Macedo, I.T.F., Vieira, L.S., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Tome, A.R., Sampaio, R.A., Louvandini, H., Bevilaqua, C.M.L., 2013. Effects of *Mimosa tenuiflora* on larval establishment of *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol. 196, 341-346.

- Ortiz, M.M., Smith, L., 2016. Sainfoin Surprising Science Behind a Forgotten Forage. Wilkinson, I. and Mountain, F., Eds, Cambridge, UK, 43 p.
- Paolini, V., Frayssines, A., De-La-Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. Vet. Res. 34, 331-339.
- Paolini, V., 2004. Thèse de doctorat en parasitologie. Université de Perpignan, Perpignan, France.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. Parasitology, 129, 69-77.
- Paolini, V., De-La-Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 127, 277-283.
- Paraud, C., Kulo, A., Pors, I., Chartier, C., 2009. Resistance of goat nematodes to multiple anthelmintics on a farm in France. Vet. Rec. 164, 563–564.
- Paraud, C., Marcotty, T., Lespine, A., Sutra, JF., Pors, I., Devos, I., 2016. Cross-resistance to moxidectine and ivermectine on a meat sheep farm in France. Vet. Parasitol. 226, 88-92.
- Pathak, A.K., Dutta, N., Banerjee, P.S., Pattanaik, A.K., Sharma, K., 2013. Influence of dietary supplementation of condensed tannins through leaf meal mixture on intake, nutrient utilization and performance of *Haemonchus contortus* infected sheep. Asian Australas. J. Anim. Sci. 26, 1446-1458.
- Peel, M.D., Asay, K.H., Johnson, D.A., Waldron, B.L., 2004. Forage production of sainfoin across an irrigation gradient. Crop. Sci. 44, 614-619.
- Pellett, F.C., 1947. American Honey Plants, 4th ed. New York: Orange Judd Publ. Co., Inc., 467 p.
- Peña-Espinoza, M., Thamsborg, S.M., Desrues, O., Hansen, T.V.A., Enemark, H.L., 2016. Anthelmintic effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) against gastrointestinal nematode parasites in experimentally infected cattle. Parasitology 143, 1279-1293.
- Pérez, J., Zafra, R., Buffoni, L., Hernandez, S., Camara, S., Martinez-Moreno, A., 2008. Cellular phenotypes in the abomasal mucosa and abomasal lymph nodes of goats infected with *Haemonchus contortus*. J. Comp. Pathol. 138, 102-107.
- Perri, A.F., Mejía, M.E., Licoff, N., Lazaro, L., Miglierina, M., Ornstein, A., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I.M., 2011. Gastrointestinal parasites presence during the peripartum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. Vet. Parasitol., 178, 311–318.
- Petersen, J.C., Hill, N.S., Mosjidis, J.A., Windham, W.R., 1991. Screening sericea lespedeza germplasm for herbage quality. Agron. J., 83, 581-588.
- Phillips-Conroy, J.E., 1986. Baboons, diet and diseases : food plant selection and schistosomiasis. In: Current perspectives in primate social dynamics (Ed. By D. M. Taub & F.A. King), 287-304. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Plotkin, M.J., 2000. Medicine quest. In search of nature’s healing secrets. Penguin Putnam Inc., New York, NY, USA.
- Plumlee, K.H., Johnson, B. et Galey, F.D., 1998. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. J. Vet. Diagn. Invest. 10, 263-267.

- Pomroy, W.E., 2006. Anthelmintic resistance in New Zealand: a perspective on recent findings and options for the future. *N. Z. Vet. J.*, 54, 265-270.
- Pomroy, W.E., Adlington, B.A., 2006. Efficacy of short-term feeding of sulla (*Hedysarum coronarium*) to young goats against a mixed burden of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, 136, 363–366.
- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.L., Cartalede, D., Sarni-Machado, P., Vernhet, A., 2006. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20, 687-697.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry*, 1, 223-230.
- Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C.A., Donald, A.D., 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 56, 239-251.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Outounet, M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36, 781-784.
- Provenza, F. D. 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *J. Range Manage.* 48:2–17.
- Provenza, F.D., Burritt, E.A., Perevolotsky, A., Silanikove, N., 2000. Selfregulation of intake of polyethylene glycol by sheep fed diets varying in tannin concentrations. *J. Anim. Sci.* 78, 1206–1212.
- Provenza, F.D., Villalba, J.J., Dziba, L.E., S.B., A., Banner, R.E., 2003. Linking herbivore experience, varied diets, and plant biochemical diversity. *Small Rum. Res.* 49 (3), 257-274.
- Provenza, F. D., Villalba, J.J., 2006. Foraging in domestic vertebrates: Linking the internal and external milieu. In: *Feeding in domestic vertebrates: from structure to function*. V. L. Bels, ed. CABI Publ., Oxfordshire, UK, 201-240.
- 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 structural features of condensed tannins. *J. Agric. Food. Chem.* 63, 6346-6354.
- Quijada, J., 2015. Relation structure / activité de tanins bioactifs contre les nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus*) parasites des petits ruminants. Thèse de doctorat en sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bio ingénieries. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France, 275 p.
- Rahman, W.A., Collins, G.H., 1992. An association of faecal egg counts and prolactin concentrations in sera of periparturient Angora goats. *Vet. Parasitol.*, 43, 85–91.
- Redaelli, R., Alfieri, M., Cabassi, G., 2016. Development of a NIRS calibration for total antioxidant capacity in maize germplasm. *Talanta* 154, 164-168.
- Redshaw, E.S., Mathison, G.W., Milligan, L.P., Weisenburger, R.D., 1986. Near IR reflectance spectroscopy for predicting forage composition and voluntary consumption and digestibility in cattle and sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 66, 103-116.

- Retama-Flores, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Cámara-Sarmiento, R., Canul-Ku, H.L., 2012. Maize supplementation of Pelibuey sheep in a silvopastoral system: fodder selection, nutrient intake and resilience against gastrointestinal nematodes. *Animal* 6, 145-153.
- Richter, C.P., 1943. Total self-regulatory functions in animals and human beings. *Harvey Lect.* 38, 63-103.
- Roberts, C.A., Beuselinck, P.R., Ellersieck, M.R., Davis, D.K., Mc Graw, R.L., 1993. Quantification of tannins in birdsfoot trefoil germplasm. *Crop. Sci.* 37, 281-284.
- Roberts, C.A., Stuth, J., Flinn, P., 2004. Analysis of forages and feedstuffs. In: *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture* Nulber 44 in the series *Agronomy*, Madison Eds., 231-267.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69, 299-322.
- Rodriguez, E., Wrangham, R.W., 1993. Zoopharmacognosy: the use of medicinal plants by animals. In: Downum KR, Romeo JT, Stafford H (editors). *Recent Adv. Phytochem.* 27, 89-105.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1963. The infective stage of nematode parasites and its significance in parasitism. *Adv. Parasit.*, 1, 109-171.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1968. The infectious process and its relation to the development of early parasitic stages of nematodes. *Adv. Parasit.* 6, 327-348.
- Ropiak, H.M., Lachmann, P., Ramsay, A., Green, R.J., Mueller-Harvey, I., 2017. Identification of structural features of condensed tannins that affect protein aggregation. *PLoS ONE*, 12.
- Rover, M.R., Brown, R.C., 2013. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method? *J. Anat. App. Pyrol.*, 104, 366–371.
- Salminen, J.-P., Karonen, M., 2001. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Funct. Ecol.* 25, 325-338.
- 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. *Vet. Parasitol.* 188, 1-9.
- Saratsi, K., Voutzourakis, N., Tzanidakis, N., Saratsis, A., Stefanakis, A., Hoste, H., Thamsborg, S.M., Hadjigeorgio, I., Sotiraki, S., 2015. Effect of carob pod (*Certaonia siliqua*) meal fed in sheep against gastrointestinal nematodes. In: *The 25th International Conference of WAAVP*, Liverpool, UK. p. 172.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 9, 21-40.
- Schwartz, B., Robbins, S. J. 1995. *Psychology of Learning and Behavior*. 4th edn. New York: W.W. Norton.
- 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*. *Vet. Parasitol.* 198, 166-171.

- Sczesny-Moraes, E.A., Bianchin, I., da Silva, K.F., Catto, J.B., Oner, M.R., Paiva, F., 2010. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 30, 229-263.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. Sericea lespedeza hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150–157.
- Shakya, K.P., Miller, J.E., Lomax, L.G., Burnett, D.D., 2011. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. *Vet. Parasitol.*, 181, 239–47.
- Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M., 2002. Near-infrared spectroscopy: Principle, instruments, applications. Wiley-VCH Ed., 361 p.
- Silué, N., Bastianelli, D., Meuret, M., Hassoun, P., Jouven, M., 2016. Functional classification by NIRS of plant parts selected by sheep on a shrubby rangeland. *Options Méditerranéennes*, A, 114.
- Singer, M.S., Mace, K.C., Bernays, E.A., 2009. Self-medication as adaptive plasticity: increased ingestion of plant toxins by parasitized caterpillars. *PLoS One*, 4.
- Smith, W.D., Sherman, D.M., 2009. Goat Medicine. Wiley-Blackwell, 2nd edition, Baltimore, USA, 888 p.
- Stepek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R., 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics ? *Trends Parasitol.* 20, 322-327.
- Stringano, E.C., Hayot Carbonero, C., Smith, L.M., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I., 2012. Proanthocyanidin diversity in the EU “Healthy Hay” sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) germplasm collection. *Phytochemistry*, 77, 197-208.
- Sutherland, I.A., Leathwick, D.M., 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends. Parasitol.* 27, 176-180.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., 1976. Intake and utilization of food by growing lambs with parasitic damage to the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *J. Agric. Sci.*, 86, 507-515.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., 1977. Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. *J. Agric. Sci.*, 88, 671-677.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *Int. J. Parasitol.* 35, 329–335.
- Tahir, H.E., Zou, X.B., Shen, T.T., Shi, J.Y., Mariod, A.A., 2016. Near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid measurement of antioxidant properties and discrimination of Sudanese honeys from different botanical origin. *Food Anal. Method.* 9, 2631-2641.
- Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S., 2008. Epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep managed under traditional husbandry system in Kashmir valley. *Vet. Parasitol.*, 158, 138–43.
- Tedeschi, L.O., Ramirez-Restrepo, C.A., Muir, J.P., 2014. Developing a conceptual model of possible benefits of condensed tannins for ruminant production. *Animal* 8, 1095-1105.

- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., Barry, T.N., 1992. Effects of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci.*, 119, 265-273.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., Mc Nabb, W.C., Barry, T.N., 1994. Assay and digestion of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition*, 72, 467-477.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117-122.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2009. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: Dose titration study. *Vet. Parasitol.* 163, 52-56.
- Theodoridou, K., Aufrere, J., Andueza, A., Pourrat, J., Le Morvan, A., Stringanoe, E., Mueller-Harvey, I., Baumont, R., 2010. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160, 23-38.
- Theodoridou, K., Aufrere, J., Andueza, A., Le Morvan, A., Picard, F., Stringanoe, E., Pourrat, J., Mueller-Harvey, I., Baumont, R., 2011a. Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass Forage Sci.* 66, 402-414.
- Theodoridou, K., Aufrere, J., Niderkorn, V., Andueza, A., Le Morvan, A., Picard, F., Baumont, R., 2011b. *In vitro* study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles? *Anim. Feed Sci. Technol.*, 170, 147–159.
- Torres-Acosta, J.F.J., 1999. Supplementary feeding and the control of gastrointestinal nematodes of goats in Yucatan. The Royal Veterinary College. University of London, London, UK.
- Torres-Acosta, J.F.J., Jacobs, D.E., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C., Cob-Galera, L., 2006. Improving resilience against natural gastrointestinal nematode infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Vet. Parasitol.* 135, 163-173.
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Res.*, 77, 159–173.
- Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schurmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., di Regalbano, A.F., Beraldo, P., Boeckh, A., Cobb, R., 2009. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites Vectors* 2 (Suppl. 2), S2.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *Int. J. Parasitol.* 35, 329–335.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd ed., Oxford, 307 p.
- Vagenas, D., Jackson, F., Russel, A.J.F., Merchant, M., Wright, I.A., Bishop, S.C., 2002. Genetic control of resistance to gastro-intestinal parasites in crossbred cashmere-producing goats: responses to selection, genetic parameters and relationships with production traits. *Anim. Sci.*, 74, 199-208.

- Valderrábano, J., Calvete, J., Uriarte, J., 2010. Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Vet. Parasitol.* 172, 89–94.
- Van-den-Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet. Parasitol.* 209, 278-280.
- Van Houtert, M.F.J., Sykes, A.R., 1996. Implications of nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *Int. J. Parasitol.*, 26, 1151–1167.
- Van Kempen, T., 2001. Infrared technology in animal production. *World's Poul. Sci. J.* 57, 29-48.
- Vargas-Magaña, 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. *Vet. Parasitol.* 206, 322–327.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Gerber, H.M., Regina, M.R., 1987. Two field strains of *Haemonchus contortus* resistant to rafoxanide. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 143-146.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Randles, J.L., 1997. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet. Parasitol.* 70, 111-122.
- Veneziano, V., Rinaldi, L., Caputo, A.R., Fedele, V., Gringoli, G., 2007. Effects of gastrointestinal strongyle parasitism on milk quality. In: *The quality of goat products (IGA-CRA, ed.)*, Bella, Italy, 142-145.
- Vercruysse, J., 1983. A survey of seasonal changes in nematode faecal egg count levels of sheep and goats in Senegal. *Vet. Parasitol.*, 13, 239-244.
- Villalba, J. J., Provenza, F. D., Shaw, R., 2006. Sheep self-medicate when challenged with illness-inducing foods. *Anim. Behav.* 71, 1131–1139.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., 2007. Self-medication and homemstatic behaviour in herbivores: learning about the benefits of nature's pharmacy. *Animal* 1:9, 1360-1370.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D., Hall, J.O., Lisonbee, L.D., 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infections. *J. Anim. Sci.* 87, 2189-2198.
- Von Samson-Himmelsjerna, G.V., 2007. Mode of action of current anthelmintic drug classes. In: *Anthelmintics and resistance : a review*, NOVARTIS (Ed.), Switzerland.
- Waghorn, G., Ulyatt, M.J., John, A., Fisher, M.T., 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus*. *Br. J. Nutr.* 57, 115-26.
- Waghorn, G., 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 116–139.
- Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Miller, C.M., Atkinson, D.S., 2008. Brave or gullible: testing the concept that leaving susceptible parasites in refugia will slow the development of anthelmintic resistance. *N.Z. Vet. J.* 56, 158-163.
- Waller, P.J., 1986. Anthelmintic resistance in Australia. *Parasitol. Today* 7, S16-S18.

- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends Parasitol.*, 20, 493-497.
- Waller, P.J., 2006. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet. Parasitol.* 139, 13-22.
- Wang, J., Provenza, F.D., 1996. Food preference and acceptance of novel foods by lambs depend on the composition of the basal diet. *J. Anim. Sci.* 74, 2349-2354.
- Wang, T., Van Wyk, J. A., Morrison, A., Morgan, E.R., 2014. Moisture requirements for the migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae out of faeces. *Vet. Parasitol.*, 204, 258–264.
- Wang, Y., Mc Allister, T.A., Acharya, S., 2015. Condensed tannins in sainfoin: Composition, concentration, and effects on nutritive and feeding value of sainfoin forage. *Crop Sci.* 55, 13-22.
- Wardhaugh, K.G., Rodriguez-Menendez, H., 1988. The effects of the antiparasitic drug, Ivermectin, on the development and survival of a dung breeding fly, *Orthelia cornicina* (Fabr.) and the scarabaeine dung beetle, *Copris hispanus* L., *Bubas bubalus* (Olivier) and *Onitis belial* F. *J. Appl. Ent.* 106, 381-389.
- Waterman, P.G., 1999. The tannins - An overview. In: *Tannins in Livestock and Human Nutrition. Proceedings of an International Workshop, BROOKER (Ed.), Adelaide, Australia*, 10-13.
- Werne, S., Perler, E., Maurer, V., Probst, J.K., Hoste, H., Drewek, A., Heckendorn, F., 2013. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and faba bean (*Vicia faba*) on the periparturient rise in ewes infected with gastrointestinal nematodes. *Small Ruminant Res.* 113, 454-460.
- Wheeler, R.A., Chaney, W.R., Johnson, K.D., Butler, L.G., 1996. Leucaena forage analysis using near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 2-9.
- Whitney, T.R., Wildeus, S., Zajac, A.M., 2013. The use of redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* fecal egg counts and increase ivermectin efficacy. *Vet. Parasitol.* 197, 182-188.
- Williams, A.R., Karlsson, L.J.E., Palmer, D.G., Vercoe, P.E., Williams, I.H., Greeff, J.C., Emery, D.L., 2010. Relationships between faecal dry matter, worm burdens and inflammatory mediators and cells in parasite-resistant Merino rams. *Vet. Parasitol.*, 171, 263–72.
- Williams, A.R., Ropiak, H.M., Fryganas, C., Desrues, O., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2014. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasites & Vectors* 2014b, 7:518.
- Williams, A.R., Peña-Espinoza, M.A., Boas, U., Simonsen, H.T., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M., 2016. Anthelmintic activity of chicory (*Cichorium intybus*): *in vitro* effects on swine nematodes and relationship to sesquiterpene lactone composition. *Parasitology* 143, 770-777.
- Windham, W.R., Fales, S.L., Hoveland, C.S., 1988. Analysis for tannin concentration in *Sericea lespedeza* by near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop. Sci.* 28, 705-708.
- Windham, W.R., Hill, N.S., Stuedemann, J.A., 1991. Ash in forage esophageal and fecal samples analyzed using near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* 31, 1345-1349.

- Wolfe, R.M., Terrill, T.H., Muir, J.P., 2008. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *J. Sci. Food Agr.* 88, 1060-1067.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends parasitol.*, 20, 469-476.
- Wood, I.B., Amara, N.K. I, Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone Jr., J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.*, 58, 181-213.
- Wrangham, R.W., 1977. Feeding behavior of chimpanzees in Gombe National Park, Tanzania. In: Clutton-Brock, T.H. (Ed), *Primate Ecology: studies of feeding and ranging behaviour in lemurs, monkeys and apes*, New-York Academic Press, New-York, USA, 503-538.
- Wrangham, R. W., Nishida, T., 1983. *Aspilia* spp. leaves: a puzzle in the feeding behavior of wild chimpanzees. *Primates*, 24, 276-282.
- Wrangham, R.W., 1995. Leaf-swallowing by chimpanzees and its relationship to tapeworm infection. *A. J. Primatol.*, 37, 297-304.
- Wright, C., 2015. The effects of phytochemical tannin-containing diets on animal performance and internal parasite control in meat goats. MSc thesis, Tuskegee University, Tuskegee, Alabama, USA.
- Yadav, A.K., Tandon, V., 1989. Gastro-intestinal nematode parasite infections of goats in a sub-tropical and humid zone of India. *Vet. Parasitol.* 33, 135-142.
- Zeller, W.E., Ramsay, Ropiak, H.M., Fryganas, C., Mueller-Harvey, I., Brown, R.H., Drake, C., Grabber, J.H., 2015. ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectroscopy for estimating procyanidin/prodelphinidin and *cis/trans* flavanols ratio of condensed tannin fractions: correlation with thiolytic. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1967-1973.
- Zhang, L.H., Shao, H.B., Ye, G.F., Lin, Y.M., 2012. Effects of fertilization and drought stress on tannin biosynthesis of *Casuarina equisetifolia* seedlings branchlets. *Acta Physiol. Plant.* 34, 1639-1649.
- Zimmer, N., Cordesse, R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.* 9, 167-179.

Liste des publications et communications issues de ce travail de thèse

Publications

Gaudin E., Simon M., Quijada J., Schelcher F., Sutra J.-F., Lespine A., Hoste H., 2016. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multiresistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Vet. Parasitol.* 227, 122-129.

Quijada J., Drake C., **Gaudin E.**, El-Korso R., Hoste H., Mueller-Harvey I. Condensed tannin changes along the digestive tract in lambs fed with sainfoin pellets or hazelnut skins. *Soumis à Vet. Research* (2017).

Communications

Gaudin E., Simon M., Quijada J., Varady M., Lespine A., Schelcher F., Hoste H. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets on a multi-resistant strain of *Haemonchus contortus* in lambs. In : 25th WAAVP Conference, Liverpool, UK, 16-20th August 2015.

Gaudin E., Chan-Pérez I., Castañeda G.S., González Pech P.G., Torres-Acosta J.F., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Mathieu C. *In vitro* anthelmintic activity of leaf and husk extracts of three *Theobroma cacao* varieties against two isolates of *Haemonchus contortus*. Résumé accepté à la 8ème Conference Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock, Belem, Brésil (août 2016).

El Korso R., Manolaraki, F., **Gaudin E.**, Hoste H., 2016. Targeted selective treatment against parasitic nematodes: results of a participative approach in collaboration with farmers to implement TST strategy in dairy goat flocks. In: 12th International Conference on Goats, IGA 2016, Antalya, Turkey, 25-30th September 2016.

Posters

Gaudin E., Quijada J., El Korso R., Ramsay A., Gerfault V., Ginane C., Hoste H., 2016. Effect of length of distribution and dietary concentrations on the anthelmintic effects of tannin-containing pellets against gastro intestinal nematodes in goats. In: 12th International Conference on Goats, IGA 2016, Antalya, Turkey, 25-30th September 2016.

Gaudin E., Simon M., Quijada J., Varady M., Lespine A., Schelcher F., Hoste H. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets on a multi-resistant strain of *Haemonchus contortus* in lambs. In : 25th WAAVP Conference, Liverpool, UK, 16-20th August 2015.

Elaboration d'un poster présentant la thèse lors du SPACE (salon international de l'élevage), Rennes, Septembre 2014 et 2015.

Diffusions des résultats vers les professionnels de l'élevage ou de l'industrie agroalimentaire

Articles de vulgarisation

Gaudin E., Mueller-Harvey I., Quijada J., Torres-Acosta J.F.J., Hoste H., 2015. Les nutricaments contenant des tanins condensés: Une alternative aux anthelminthiques de synthèse pour gérer les strongyloses gastro intestinales ? Le Nouveau Praticien Vétérinaire Elevage et Santé. 30, 8-13.

Gaudin E., Gerfault V., Gombault P., Quijada J., Hoste H., 2015. Des granulés de sainfoin, une solution au parasitisme ? La chèvre N° spécial Parasitisme 327, p 28-29.

Communications

Présentation détaillée de la thèse aux acteurs de la filière lors des Journées MULTIFOLIA, Viâpres-Le-Petit, Juin 2014.

Présentation de la thèse et des premiers résultats lors d'un Comité de Programmation et d'Orientation Unité Mixte de Recherche (Petits Ruminants), Toulouse, Juin 2014 et Janvier 2015. Unité reliant l'INRA à l'Institut de l'Elevage sur des thématiques appliquées.

Présentation de la thèse lors d'un séminaire du métaprogramme Gestion Intégrée de la Santé des Animaux (GISA) de l'INRA (Projet Envergure STReP : drastic and Sustainable Treatment Reduction against Parasitism in livestock), Nantes, Décembre 2014.

Hoste H., Mueller-Harvey I., **Gaudin E.**, Quijada J., Jean G.H., Sampedro R., Vilarem G., Mathieu C., 2014. Des ressources riches en tannins : une alternative aux traitements chimiques pour gérer les vers parasites des ruminants ? Club Agroraffinerie et Multidébouchés, Agen, Décembre 2014.

Participation à Ma Thèse en 180 secondes lors des Journées des Doctorants de l'UMR 1213 Herbivores, Theix, Janvier 2015.

Participation à l'atelier Table Ronde : « Médicaments et alimentation animale : solutions alternatives ou produire autrement, quelle vision pour les entreprises ? » aux Rencontres de l'Institut Carnot en Santé Animale, Chambre d'agriculture de Rennes, Mars 2015.

Présentation de la filière sainfoin à des éleveurs lors d'une restitution d'un projet sur le traitement sélectif, afin de proposer des essais terrains, Toulouse, Avril 2015.

Participation à un atelier-débat scientifique à l'Exposition Universelle et rédaction d'une Charte de la jeunesse scientifique, Milan, Mai 2015.

Présentation de la filière sainfoin dans un séminaire reliant l'Unité Mixte de Recherche (Petits Ruminants) et l'Observatoire Régional des Maladies Caprines (OMACAP) à La Maison du Lait, Paris, Septembre 2015.

Gombault P., Routier M., Gerfault V., **Gaudin E.**, Niderkorn V., Hoste H., 2016. Le sainfoin ré-inventé : le bio-contrôle par la gestion intégrée de la santé en élevage. Rencontres Agriculture-Innovation 2025, Salon International de l'Agriculture, Paris, Mars 2016.

Présentation des principaux résultats obtenus avec lors d'essais réalisés avec du sainfoin à des fabricants d'aliment et des éleveurs utilisant le sainfoin, Sommet de l'Elevage, Clermont-Ferrand, Septembre 2016.

Hoste H., El Korso, R., **Gaudin E.**, Panisse A., Le Frileux Y., Octobre 2016. Gérer les strongyloses gastro intestinales des chèvres sans anthelminthiques de synthèse efficaces ou disponibles ? Réunion Unité Mixte de Recherche (Petits Ruminants) et OMACAP, Paris.

Participation à Ma Thèse en 180 secondes lors de l'Assemblée Générale de l'UMR IHAP, Toulouse, Janvier 2017.

Diffusion des résultats pour la formation d'étudiants

Présentation des objectifs et résultats de la thèse à des étudiants de Master 2 Elaboration de la Qualité et Sécurité Alimentaire, Toulouse, Novembre 2015.

Présentation de la thèse et des résultats obtenus vers des étudiants en formation BTS au Lycée d'Enseignement Général et Technique Agricole de Castelnaudary, Mars 2016.

AUTHOR : Elodie Gaudin

TITLE : Dehydrated sainfoin : a model of nutraceutical for the control of parasitic infections of small ruminants

PHD DIRECTORS : Dr. Hervé Hoste, Dr. Cécile Ginane, Dr. Vincent Gerfault

DATE AND PLACE OF PHD DEFENSE : Toulouse, May, 16th, 2017 – Under confidentiality

ABSTRACT :

The parasitic infections by gastro intestinal nematodes represent a major constraint in small ruminant field breeding. The widespread resistance to anthelmintic (AH) treatments imposes to find alternative solutions. Among those, the use of sainfoin, a legume rich in condensed tannins, can be used on dehydrated pellet form in farms.

This thesis permitted to validate simple and repeatable analytic *in vitro* methods to analyze the tannin content and AH activity in the pellets (near infra-red spectroscopy for example) and this optimal use in farm (no use with a chemical anthelmintic, minimum of condensed tannins in the feed and minimum of 15 days in the diet).

Young sheep and goats did not highlight self-medication behavior with sainfoin.

KEYWORDS :

Sainfoin ; Nematode ; Anthelmintic ; Tannin ; Pellet ; Self-medication

FIELD OF STUDY :

SEVAB Doctoral School: Pathology, Toxicology, Genetic and Nutrition

LABORATORY :

UMR 1225 INRA/ENVIT Interactions Hôtes-Agents Pathogènes

23 chemin des Capelles

31076 Toulouse cedex 3

France

AUTEUR : Elodie Gaudin

TITRE : Le sainfoin déshydraté : un modèle de nutriment dans la lutte contre les nématodes parasites des petits ruminants

DIRECTEURS DE THÈSE : Dr. Hervé Hoste, Dr. Cécile Ginane, Dr. Vincent Gerfault

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, 16 mai 2017 – Sous clause de confidentialité

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS :

Les infestations parasitaires par des nématodes gastro intestinaux sont une contrainte majeure de l'élevage des ruminants au pâturage. Le développement de résistances face aux molécules de synthèse contenues dans les traitements impose de trouver de nouvelles solutions, comme l'utilisation de plantes riches en métabolites secondaires. Le sainfoin, riche en tanins condensés, peut être utilisé sous forme de granulés en élevage dans cet optique. Cette thèse a permis de valider des méthodes simples d'analyse du sainfoin (notamment par spectroscopie infra-rouge), ainsi que son mode d'utilisation en élevage (utilisation dissociée d'un anthelminthique de synthèse, minimum de tanins à introduire dans la ration et cures de minimum 15 jours). Enfin, de jeunes ovins et caprins parasités n'ont pas montré de comportement d'automédication vis-à-vis du sainfoin.

MOTS-CLÉS :

Sainfoin ; Nématode ; Anthelminthique ; Tanin ; Granulé ; Automédication

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :

Ecole Doctorale SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 1225 INRA/ENVIT Interactions Hôtes-Agents Pathogènes
23 chemin des Capelles
31076 Toulouse cedex 3