



41<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine  
Jeudi 12 mars 2015

## Quelle efficacité d'un apport de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) ou d'un excès d'azote de courte durée dans l'alimentation du cheval pour lutter contre les strongles digestifs ?

Par

C. Collas<sup>1, 2, 3</sup>, G. Salle<sup>4</sup>, B. Dumont<sup>2, 3</sup>, J. Cabaret<sup>4</sup>, J. Cortet<sup>4</sup>, W. Martin-Rosset<sup>2, 3</sup>, L. Wimel<sup>1</sup>, G. Fleurance<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> IFCE, Direction des Connaissances et de l'Innovation, Saumur, France

<sup>2</sup> INRA, UMR1213 Herbivores, Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>3</sup> VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, Lempdes, France

<sup>4</sup> INRA et Université François Rabelais Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France

### Résumé

L'émergence de résistances aux anthelminthiques chez les nématodes nécessite de développer des solutions alternatives de lutte contre le parasitisme. Nous avons testé l'efficacité d'une cure de sainfoin, plante riche en tanins, et d'une suralimentation azotée de courte durée chez des poulains parasités. 3 lots de 10 poulains ont reçu pendant 18j un régime soit : (i) « témoin » : 100% des besoins énergétiques (UFC) et protéiques (MADC), (ii) « azote » : 100% UFC, 230% MADC, (iii) « sainfoin » : 100% UFC, 230% MADC, 3,6%MS de tanins condensés. Aucun effet des régimes n'a été mis en évidence sur le nombre d'œufs de strongles excrétés. Toutefois, les coprocultures réalisées à partir du mélange des fèces de chaque lot ont suggéré un plus faible taux de développement des œufs de strongles en larves L3 dans le lot « sainfoin » en fin d'expérimentation (8,1% vs. 30,5% : « azote » et 22,6% : « témoin ») sans que cette différence puisse être testée statistiquement. Des tests conduits *in vitro* ont confirmé les effets du sainfoin sur l'éclosion des œufs ( $P < 0,05$ ) et leur développement en L3 ( $P < 0,001$ ). D'autres études sont nécessaires pour confirmer l'effet du sainfoin *in vivo* et préciser ses conditions d'utilisation pour limiter l'infestation des pâtures par les strongles.

**Mots clés : poulains, plante riche en tanins, azote, strongles digestifs, résistance**

### Summary

The spread of anthelmintic resistance in nematodes has become a major problem, so that there is an urgent need to develop alternatives for parasite control. Here, we investigated the efficacy of a short-term consumption of sainfoin, a tannin rich plant, or of extra proteins in naturally infected horses. 3 groups of 10 individuals received for 18 days either (i) a 'control' diet: 100% of UFC and MADC requirements, (ii) a 'protein-rich' diet: 100% UFC, 230% MADC, (iii) a 'sainfoin' diet: 100% UFC, 230% MADC, 3.6%DM of condensed tannins. Faecal egg counts did not reveal any difference between the three feeding regimes. However, coprocultures from the faeces pooled in each group at the end of the experiment suggested a lower rate of larval development in the 'sainfoin' group (8.1% vs. 30.5%: 'protein-rich' and 22.6%: 'control'). *In vitro* tests using sainfoin extracts confirmed the influence of the secondary metabolites on egg hatching ( $P < 0.05$ ) and their development into L3 ( $P < 0.001$ ). Further work is needed to confirm the results *in vivo* and to determine how to use sainfoin in the diet of horses to reduce pasture contamination with strongyle larvae.

**Key-words: growing horses, tannin-rich plant, nitrogen, strongyles, resistance**



## Introduction

L'émergence de résistances aux anthelminthiques chez les nématodes des équins, en particulier chez les petits strongles, nécessite de développer des solutions alternatives pour un contrôle durable de ces parasites. Les parasitologues s'accordent sur le fait que seules des approches intégrées, basées sur une combinaison de principes d'action, sont appropriées. Les trois principaux principes d'action permettant d'affecter le cycle des nématodes consistent à : (i) réduire le contact entre l'hôte et les larves infestantes, (ii) stimuler la résistance de l'hôte, (iii) éliminer les vers dans l'hôte. A partir des connaissances des processus pathophysiologiques associés aux infections par les nématodes, Coop & Kyriazakis (1999) ont avancé l'hypothèse selon laquelle l'amélioration de la nutrition, en particulier protéique, pourrait accroître la capacité d'un hôte infesté à lutter contre le parasitisme. Ceci a été confirmé par certains travaux conduits chez les petits ruminants qui ont montré qu'une complémentation protéique apportée à des femelles autour de la mise bas permettait de limiter le phénomène de relaxation de l'expression immunitaire généralement observé à cette période (e.g. Houdijk *et al.* 2000). Plus récemment, le rôle anthelminthique de plantes bioactives contenant des métabolites secondaires comme les tanins a été mis en évidence chez des ovins et des caprins. En particulier, des études conduites *in vitro* mais également *in vivo* rapportent les propriétés antiparasitaires du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Chez le cheval, l'impact de la nutrition sur le parasitisme gastro-intestinal est très peu connu puisqu'une seule étude récente rapporte l'effet d'extraits de plantes australiennes sur des larves de cyathostomes *in vitro* (Payne *et al.* 2013). Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était : (i) d'évaluer *in vivo* l'efficacité d'une suralimentation azotée ou d'un apport de sainfoin de courte durée pour réduire l'excrétion d'œufs de strongles chez des poulains parasités, (ii) d'analyser *in vitro* l'effet des métabolites secondaires du sainfoin sur l'éclosion des œufs de strongles et leur développement en larves infestantes.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Expérimentation *in vivo*

L'essai *in vivo* a été conduit du 29 novembre au 16 décembre 2013 à la station expérimentale de l'IFCE (Chamberet, Corrèze). 30 poulains de selle (AA et SF, 1 à 3 ans), naturellement infestés par des strongles au pâturage, ont été rentrés en boxes le 5 novembre et répartis en 3 groupes de 10 individus destinés à recevoir pendant 18j de test soit (i) un régime « témoin » visant à couvrir 100% des besoins énergétiques (mesuré en UFC) et protéiques (mesuré en MADC), (ii) un régime « azote » : 100% des besoins UFC, 230% des besoins MADC, (iii) un régime « sainfoin » : 100% des besoins UFC, 230% des besoins MADC, dont 3,6% MS de tanins condensés (dosage avec la méthode HCl-butanol-acétone). Du 5 au 21 novembre, tous les animaux ont été nourris selon leurs besoins avec un régime de transition composé de 60% de foin, de 10% de paille de blé et de 30% de concentrés. Du 22 au 28 novembre, chaque animal a reçu une proportion croissante des aliments correspondant à son régime expérimental en remplacement du régime de transition. Le régime « témoin » comportait 45% d'orge, 25% de granulés (29% maïs, 55% paille blé, 6% huile de soja, 5% mélasse de canne et 5% carbonate de calcium) et 30% de paille de blé ; le régime « azote » comportait 52% de granulés de ray-grass italien, 18% de tourteau de lin et 30% de paille de blé ; le régime « sainfoin » comportait 70% de granulés de sainfoin et 30% de paille de blé. Les animaux recevaient leur régime en 2 distributions par jour, matin et soir. Les refus étaient pesés chaque matin. Lorsqu'un animal laissait 5 à 10% de refus sur 3j consécutifs, sa ration était réduite de 5% ainsi que celle de 2 de ses pairs dans les 2 autres lots afin de respecter les écarts d'apports entre lots. Lorsque chacun des 3 animaux constituant le trio réalisait moins de 5% de refus sur 3j consécutifs, les quantités distribuées initialement étaient restaurées. Le nombre d'œufs de strongles excrétés par gramme de fèces a été mesuré sur chaque animal le 5 novembre, pour équilibrer les lots d'animaux, puis pendant la période d'habituation aux régimes et en début et fin d'application des régimes. Les échantillons de fèces collectés durant la période d'habituation aux régimes et en fin d'expérimentation ont été mélangés au sein de chaque traitement et mis en culture pour déterminer ultérieurement les espèces présentes à partir des larves infestantes (L3).

### 1.2. Expérimentation *in vitro*

Suite aux résultats obtenus *in vivo*, deux expérimentations ont été conduites en avril 2014 pour tester *in vitro* les effets du sainfoin sur le développement des œufs de strongles en larves de type L3 d'une part, et sur la phase d'éclosion des œufs d'autre part. Pour l'essai de développement des œufs en L3, différentes proportions de granulés de sainfoin réhydratés ont été mélangées avec 130g de fèces issus de chevaux parasités (n'ayant pas participé au protocole *in vivo*) de sorte que le sainfoin représente 0, 6, 12 ou 29% du mélange. 6 réplicats ont été réalisés pour chaque proportion et chaque échantillon a été incubé à 25°C pendant 14j. Pour l'essai d'éclosion des œufs, ceux-ci ont été extraits des fèces des mêmes chevaux par

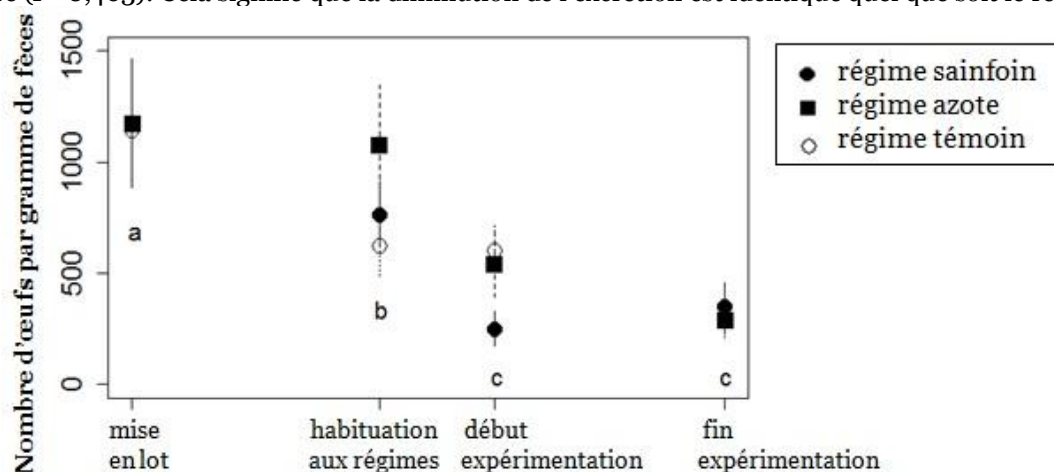


tamisages puis mis en suspension dans une solution d'eau distillée. Un extrait de sainfoin a été préparé à partir de granulés broyés et dilués dans une solution à 0,5% de diméthylsulfoxyde (DMSO). 4 concentrations (30, 15, 7,5 et 3,6 mg.mL<sup>-1</sup>) ont été testées face à la solution contrôle 0,5% DMSO (5 réplicats). 50µL de chaque concentration ont été ajoutés à 100µL d'une solution contenant approximativement 100 œufs de strongles et mis à incuber à 20°C pendant 48h. Suite à l'incubation, le nombre de larves au 1<sup>er</sup> stade (L1) a été déterminé.

## 2. Résultats

### 2.1. Expérimentation *in vivo*

Comme attendu, les 3 régimes étaient iso-énergétiques (94% des besoins UFC,  $P=0,180$ ) et les régimes « azote » et « sainfoin » étaient iso-protéiques (227% des besoins MADC,  $P=0,699$ ) et plus riches en azote que le régime « témoin » (93% des besoins MADC,  $P<0,001$ ). Une diminution du nombre d'œufs de strongles excrétés de 1165 à 313 opg a été observée entre la mise en lots des animaux et la fin de l'expérimentation ( $P<0,001$ , Figure I). Toutefois, le nombre d'œufs excrétés n'a pas été affecté par le régime (« témoin » :  $667\pm190$ , « azote » :  $770\pm227$ , « sainfoin » :  $635\pm205$ ,  $P=0,722$ ) ni par l'interaction entre le régime et la date de mesure ( $P=0,463$ ). Cela signifie que la diminution de l'excrétion est identique quel que soit le régime.



**Figure I :** Evolution du nombre d'œufs de strongles excrétés par les 10 chevaux de chaque régime (moy ± e.s.) (régime:  $P>0,05$ , date:  $P<0,05$ , régime × date:  $P>0,05$ ). Les moyennes avec des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes à  $P<0,05$ .

*Figure I: Changes in the faecal egg counts of the 10 individuals per group (mean ± s.e.) (diet:  $P>0,05$ , sampling date:  $P<0,05$ , diet × sampling date:  $P>0,05$ ). Means with different letters (a, b, c) are significantly different at  $P<0,05$ .*

Les coprocultures réalisées à partir du mélange de fèces collectés dans chaque groupe ont mis en évidence un taux de développement des œufs en L3 inférieur pour le lot « sainfoin » à la fin de l'expérimentation (« témoin » : 22,6%, « protéines » : 30,5%, « sainfoin » : 8,1%) ce qui n'était pas observé au moment de la phase d'habitude des animaux aux régimes (« témoin » : 26,7%, « protéines » : 23,7%, « sainfoin » : 25,2%). Néanmoins, l'absence de réplicats ne nous a pas permis de tester statistiquement cette différence.

### 2.2. Expérimentation *in vitro*

L'ajout d'extraits de granulés de sainfoin au matériel fécal a réduit le taux de développement des œufs de strongles en L3 (-82%) lorsque le sainfoin représentait 29% du mélange (Figure II,  $P<0,001$ ).

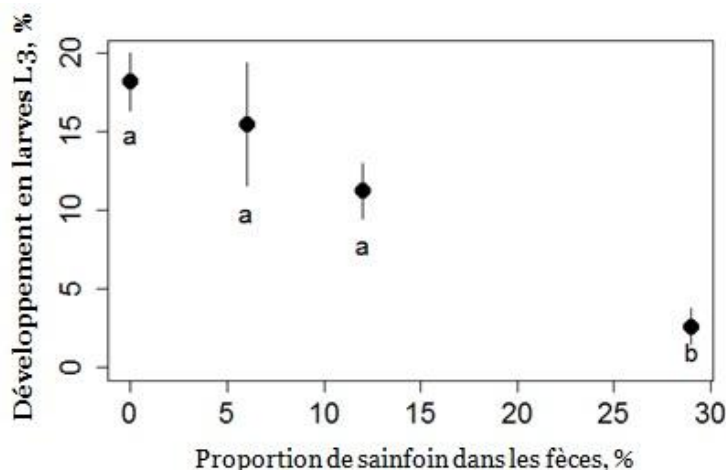
Nos résultats montrent également que la phase d'éclosion des œufs est significativement affectée, avec une diminution de 37% de l'éclosion pour des concentrations en extraits de sainfoin  $>7,5$  mg.mL<sup>-1</sup> ( $P<0,05$ ).

## 3. Discussion

Notre étude révèle que le sainfoin affecte le développement des œufs de strongles équins en larves infestantes en conditions *in vitro*. Plusieurs études conduites *in vitro* sur les nématodes spécifiques des petits ruminants ont également rapporté des effets d'extraits de sainfoin sur différentes phases du cycle des parasites (e.g.



Brunet *et al.* 2007). Les résultats obtenus *in vivo* sont généralement moins nets mais des études rapportent une diminution de la fertilité ou de la survie des nématodes chez les ovins et les caprins ayant consommé du sainfoin (e.g. Heckendorn *et al.* 2006). Chez le cheval, d'autres essais sont nécessaires pour confirmer l'effet pressenti *in vivo* et préciser les conditions d'utilisation du sainfoin qui pourraient contribuer à réduire l'infestation des pâtures. Nos résultats ne valident pas l'hypothèse d'un effet bénéfique d'un excès protéique, au moins de courte durée, sur la régulation du parasitisme gastro-intestinal chez le poulain. Cette conclusion est peut être liée au fait que le niveau d'infestation des animaux par les strongles n'était pas suffisamment important pour placer les chevaux dans une situation limitante de disponibilité en protéines. Chez les ruminants, les effets positifs d'une complémentation protéique sur la résistance de l'hôte ont été observés chez des femelles en période *pérupartum* dont les besoins sont élevés et pour lesquelles il est classiquement observé une relaxation de l'expression immunitaire à cette période (e.g. Houdijk *et al.* 2000).



**Figure II :** Pourcentage d'œufs de strongles ayant produit des larves L3 *in vitro*, selon la proportion d'extraits de granulés de sainfoin mis en présence des fèces (moy±e.s.). Les moyennes avec des lettres différentes (a, b) sont significativement différentes à  $P < 0,05$ .

*Figure II:* Percentage of strongyle eggs developed in L3 larvae *in vitro*, according to the proportion of sainfoin in faeces (mean ± s.e.). Means with different letters (a, b) are significantly different at  $P < 0.05$ .

## Remerciements

La thèse de C. Collas a été financée par l'Ifce et le département PHASE de l'INRA. Cette étude a été financée par l'IFCE et le méta-programme GISA de l'INRA. Nous remercions la société Multifolia et la firme en nutrition animale Mg2Mix de nous avoir fourni gracieusement les granulés de sainfoin. Nous sommes reconnaissants envers P. Dupuy, C. Dubois, J. Boulanger, C. Larry, J. Bellonie et P. Paucard de l'Ifce ; A. Le Morvan et A. Quereuil de l'INRA UMR1213 ; et la stagiaire H. Macé pour leur aide technique.

## Références

- Brunet, S., Aufrère, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H. 2007. The kinetics of exsheathment of infective larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 1999. Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology* 84, 187-204.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W. 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Houdijk, J.G., Kyriazakis, I., Jackson, F., Huntley, J.F., Coop, R.L., 2000. Can an increased metabolizable protein intake affect the periparturient relaxation of immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? *Veterinary Parasitology* 91, 43-62.
- Payne, S.E., Kotze, A.C., Durmic, Z., Vercoe, P.E., 2013. Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins *in vitro*. *Veterinary Parasitology* 196, 153-160.