



Etude *in vitro* de l'effet des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* sur la migration des larves infestantes de *Haemonchus contortus*.

P. A. OLOUNLADÉ^{1,2,3*}, M. S. HOUNZANGBÉ-ADOTÉ¹, E. V. B. AZANDO^{1,4},
T. B. TAM HA², S. BRUNET⁴, C. MOULIS³, N. FABRE³, I. FOURASTE³, H. HOSTE⁴
et A. VALENTIN³

¹Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou – Bénin.

²Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paul Sabatier, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.

³Pharma-Dev-UMR 152 / Faculté de Pharmacie, Université de Toulouse III, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, Cedex 9 France.

⁴UMR 1225 INRA/ ENVT, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex France.

*Auteur correspondant, E-mail : abioudouno@yahoo.fr ; BP 1402 Abomey-Calavi, Bénin,
Tel. : (+229) 97 08 54 68 / 94 27 9310

RESUME

Dans le but d'aborder le mécanisme d'action des extraits acétoniques et éthanoliques de *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae), leur effet inhibiteur a été évalué *in vitro* sur la migration larvaire de *Haemonchus contortus*. Le test d'inhibition de la migration larvaire (LMI) a été appliqué sur les larves infestantes (L₃), âgées de 2 à 3 mois incubées avec des extraits végétaux à différentes concentrations : 150, 300, 600 et 1200 µg/mL mis ou non en contact avec la polyvinylpyrrolidone (PVPP). Un témoin négatif (tampon PBS) a été inclus dans chaque test. L'observation sous microscope et le dénombrement des L₃ ayant migré par rapport au nombre total de larves déposées dans l'insert ont permis de calculer le taux de la migration larvaire. Les extraits de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloides* inhibent *in vitro* la migration larvaire de *Haemonchus contortus*. Cet effet est dose-dépendant (p<0,001). Les extraits hydroéthanoliques ont eu plus d'effet surtout aux fortes doses. Le contact des extraits des plantes avec la polyvinylpyrrolidone (PVPP) annule tout ou une partie de l'effet anthelminthique des extraits. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration larvaire est en partie due à l'action des tanins. Le pourcentage d'inhibition dû aux tanins est de 28,60% quel que soit la plante et quel que soit le solvant d'extraction.

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Haemonchus contortus*, migration larvaire, tanins, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Newbouldia laevis*, Bénin.

INTRODUCTION

Dans de nombreux pays ouest africains, l'avènement de la médecine moderne et ses progrès avaient conduit les populations à se

détourner quelque peu de la médecine traditionnelle, essentiellement basée sur la phytothérapie (Dramane et al., 2010). Cependant, depuis ces dernières décennies,

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v5i4.8>

l'usage des plantes médicinales connaît un regain d'intérêt. Selon les estimations de l'OMS (2002), plus de 80% de la population africaine utilisent encore la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins de soins de santé et à ceux des animaux. Ceci est lié à la toxicité des produits de synthèse, au coût élevé de ces médicaments, à la malfaçon et la contrefaçon de ces médicaments, à l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé humaine et animale surtout en milieu rural, qui limitent une prise en charge véritable des problèmes de santé publique (Fajimi et Taiwo, 2005). De même les éleveurs ne confient leurs animaux aux vétérinaires qu'en cas d'insuccès (Hammond et al., 1997).

Par ailleurs, la maîtrise des affections parasitaires devient complexe du fait de l'émergence de parasites résistants à de nombreux anthelminthiques conventionnels. De nombreux cas de parasites résistants sont rapportés dans le monde et ont pris une importance considérable dans les pays tropicaux (Jabbar et al., 2006). En Afrique du Sud, plus de 90% des élevages ovins sont confrontés à ce phénomène (Van Wyk et Malan, 1988). Certains élevages ovins ont été éliminés pour des raisons économiques. Pourtant, les affections parasitaires sont comptées parmi les maladies opportunistes les plus dangereuses pour les sujets vulnérables tels que les jeunes animaux et les femelles gestantes (Dramane et al., 2010).

Au Bénin, les enquêtes parasitologiques effectuées chez les petits ruminants ont mis en évidence l'existence d'un polyparasitisme à strongles au sens large (Salifou, 1996). Les taux de prévalences aux strongles digestifs sont élevés et varient entre 4,4 et 92,6% (Salifou, 1996). La faune parasitaire du tractus digestif des animaux (ovins et caprins) est dominée par des strongles, notamment *Haemonchus contortus* hématophage par sa fréquence et par son intensité. Selon Salifou (1996), comparés aux caprins, les ovins ont les plus fortes prévalences.

Face à ces problèmes de santé animale, les plantes médicinales pourraient apporter une réponse thérapeutique adaptée aux moyens

financiers et à l'environnement socioculturel des populations. Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc une voie prometteuse pour le développement de médicaments traditionnels améliorés. Pour cette raison, des études descriptives ethnobotaniques (Adjanohoun et al., 1989) d'évaluation des propriétés biologiques et chimiques (Hounzangbé-Adoté, 2000 ; Lagnika , 2005), ont été menées sur la flore béninoise.

Le contrôle des strongyloses gastro-intestinales des ruminants domestiques a reposé, pendant de nombreuses années, sur l'emploi de molécules anthelminthiques de synthèse. Dans les pays en voie de développement, ces produits coûtent chers et ne sont pas disponibles tant en quantité qu'en qualité. Aussi, la prévalence de la résistance des nématodes aux anthelminthiques est particulièrement élevée (Jackson et Coop, 2000; Kaplan, 2004) et la demande de réduction d'emploi de produits chimiques en élevage dans le contexte de l'agriculture durable est de plus en plus forte. Ces éléments ont conduit à envisager de nouvelles méthodes de lutte antiparasitaire. Parmi les solutions alternatives de lutte contre les strongyloses, une approche prometteuse repose sur l'exploitation de plantes dotées de propriétés anthelminthiques. Il existe une gamme variée de plantes utilisées comme anthelminthiques dans la pharmacopée vétérinaire (Hammond et al., 1997; Enwerem et al., 2001; Alawa et al., 2003). Des travaux précédents ont révélé que certaines plantes médicinales riches en tanins auraient les mêmes actions que les vermifuges classiques : empêcher l'éclosion des œufs, tuer les vers adultes ou réduire leur prolificité (Hounzangbé-Adoté et al., 2004), immobiliser les larves infestantes (L₃) (Hounzangbé-Adoté, 2004) ou empêcher leur dégainement (Brunet et Hoste, 2006).

In vitro, les extraits alcooliques (60%) de feuilles sèches de deux espèces de plantes tropicales, *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae) et *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae) communément appelé Fagara, cités par les éleveurs comme ayant des propriétés antiparasitaires (Hounzangbé-Adoté, 2000) ont

limité l'éclosion des œufs, la migration larvaire et la viabilité des vers adultes de *Haemonchus contortus* (Hounzangbé-Adoté et al., 2005).

Ce travail a été entrepris afin d'évaluer *in vitro* l'effet des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* sur la migration des larves infestantes de *Haemonchus contortus*.

MATERIEL ET METHODES

Récolte des plantes

Les feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Fagara), de *Newbouldia laevis*, ont été récoltées matures et authentifiées à l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi. *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* (Lam.) Zepernick & Timler de la famille des Rutaceae est identifié sous le numéro AA 6301 /HNB et *Newbouldia laevis* (P.Beauv.) Seemann ex Bureau de la famille des Bignoniaceae est identifié sous le numéro AA 6302 / HNB. Elles ont été séchées en salle climatisée (20 °C) pendant 7 jours et sont ensuite réduites en poudre dans un broyeur ultracentrifugeuse de type ZM/RETSH. La poudre de feuilles ainsi obtenue est conservée dans un bocal hermétique à la température ambiante.

Extraction de plantes

Extraction hydroéthanolique

50 grammes de poudre de feuilles ont été extraits avec 500 ml de mélange éthanol : eau dans les proportions 70:30 pendant 1 heure à reflux avec agitation (T=50 °C). Après filtration, l'éthanol a été évaporé sous pression réduite à la même température. La solution aqueuse obtenue a été lavée trois fois au dichlorométhane pour éliminer les pigments et des lipides. Enfin, l'extrait a été congelé (-70 °C), puis lyophilisé. Le lyophilisat a été pesé pour chiffrer le ratio extrait/drogue (m/m).

Extraction hydroacétonique

50 grammes de poudre de feuilles ont été extraits avec 500 ml de mélange acétone:eau dans les proportions 70:30 pendant 1 heure à reflux avec agitation (T=50 °C). Après filtration, l'acétone a été évaporée sous pression réduite à la même température. La

solution aqueuse obtenue a été lavée trois fois au dichlorométhane pour éliminer les pigments et des lipides. Enfin, l'extrait a été congelé (-70 °C), puis lyophilisé et le ratio extrait/drogue (m/m) a été chiffré.

Dosage des tanins par la méthode de la Pharmacopée Européenne (2011)

Pour le dosage des tanins dans les plantes testées (*Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et *Newbouldia laevis*), selon la méthode décrite par la Pharmacopée Européenne, l'extraction aqueuse de 1 g de poudre de plante séchée dans 150 mL d'eau distillée chauffée au bain-marie a été faite pendant 30 minutes. Après filtration, les polyphénols totaux et les polyphénols non absorbés sur la poudre de peau ont été dosés. Pour le dosage des polyphénols totaux, 2 ml de l'extrait dilué au 1/5^e a été mis en présence de 1 mL de réactif phosphomolybdotungstique et 10 mL d'eau distillée et ajusté à 25 mL avec du carbonate de sodium à 290 g/L. Après 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 760 nm avec l'eau distillée comme liquide de compensation (A₁).

Pour le dosage des polyphénols non absorbés par la poudre de peau, 10 mL du filtrat ont été ajoutés à 0,1 g de poudre de peau puis mis sous agitation pendant 1 heure. Après filtration et dilution au 1/5^e, 2 ml de l'extrait dilué ont été mis en présence de 1 mL de réactif phosphomolybdotungstique et 10 mL d'eau distillée, et ajusté à 25 mL avec du carbonate de sodium à 290 g/L. Après 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 760 nm (A₂).

Parallèlement aux extraits de plante, une solution de 50 mg de Pyrrogallol dissous dans 100 mL d'eau distillée puis diluée à 1/20^e dans le même solvant a été utilisée comme témoin positif selon la méthode décrite précédemment (A₃). La teneur en tanins des plantes, exprimée en pyrrogallol, a été calculée selon la formule :

$$Te = \frac{62,5 (A_1 - A_2) m_2}{A_3 \times m_1}$$

Te= teneur en tanins

A₁ = absorbance des polyphénols totaux

A₂ = absorbance des polyphénols non absorbés par la poudre de peau

A₃= absorbance des pyrogallol

m₁ = masse de poudre de plante testée en grammes

m₂ = masse de pyrogallol en grammes

Préparation des larves

Les larves infestantes ont été obtenues par coproculture à partir de matières fécales de chèvres préalablement infestées artificiellement par des souches pures de parasites (*Haemonchus contortus*), laissées en culture à température ambiante pendant 10 jours. Les larves ont ensuite été extraites de la masse fécale par le dispositif de Baermann dont le principe repose sur l'hygrotopisme des larves.

Inhibition de la migration larvaire (L₃)

Le test appliqué repose sur la mesure du taux de migration des larves de parasites à travers une membrane après contact avec les extraits à tester. Le pourcentage de larves ayant traversé la membrane permet de calculer l'inhibition de la migration larvaire (LMI) associée aux extraits de plantes (Rabel et al., 1994). Une quantité connue de larves L₃ (1000 L₃/mL) est mise en contact pendant 3 heures à 20 °C avec chaque extrait de plante à tester à différentes concentrations (1200, 600, 300 et 150 µg/mL) à raison de 4 répétitions par concentration. Un témoin négatif (tampon PBS, pH 7 et 0,15 M) a permis d'évaluer la migration des larves en absence de plantes. Les larves L₃ sont ensuite rincées 3 fois et centrifugées (Micro centrifugeuse Hettich EBA 12R ; 4 500 RPM, 5 min, 20 °C), puis laissées en migration à travers des mailles de 20 µm de diamètre pendant 3 heures à une température de 23 °C. Les larves ayant migré sont reprises dans un volume de 1,5 mL. Le nombre de larves est alors compté dans 200 µL. Le pourcentage d'inhibition de la migration larvaire (LMI = Larval Migration Inhibition) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$LMI = \frac{T - M}{T} \times 100 \text{ où } T \text{ est le nombre}$$

total de L₃ ayant été en contact du PBS et M le nombre de L₃ en contact avec les extraits.

Mise en évidence de l'effet des tanins

Pour mettre en évidence l'effet des tanins dans la migration larvaire, les extraits ont été mis en contact pendant 2 heures dans un rapport de 1 : 50 avec la polyvinylpyrrolidone (PVPP) qui a la propriété de capter les molécules de tanins, bloquant ainsi leur action (Makkar, 2006). Les solutions ont ensuite été centrifugées (4500 RPM, 5 min, 20 °C) avant d'être mises en contact avec des larves.

Analyse statistique des données

Le logiciel Excel a servi à calculer les moyennes, les écarts types de la migration larvaire et à générer les graphiques d'illustration. Les comparaisons entre les divers traitements et l'analyse de l'importance d'un effet dose ont été effectuées à l'aide du modèle GLM (Systat 9 Ltd). L'effet dose-réponse a été déterminé en considérant le niveau statistique de signification à P < 0,05.

RESULTATS

Ratio extrait sec/drogue (m/m)

Le ratio extrait sec/drogue (m/m) est estimé à 13% pour *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et pour *Newbouldia laevis* pour l'extraction hydroéthanolique alors que le ratio extrait sec/drogue (m/m) est estimé à 9,8% pour *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* et à 5,3% pour *Newbouldia laevis* pour l'extraction hydroacétonique.

La teneur en tanins des plantes

La méthode de la Pharmacopée Européenne nous a permis de montrer que dans 100 g de poudre de feuilles de *Newbouldia laevis*, il y a 0,045 g de tanins exprimés en pyrogallol tandis que dans 100 g de poudre de feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* il y a 0,5 g de tanins exprimés en pyrogallol. Ces résultats mettent en évidence que les feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* sont 11 fois plus riches en tanins que les feuilles de *Newbouldia laevis*.

Inhibition de la migration larvaire

Les extraits de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes* inhibent *in vitro* la

migration larvaire de *Haemonchus contortus* (Figure 1). Cet effet varie en fonction de la dose de traitement ($p < 0,001$) et du solvant d'extraction (acétone-eau ou éthanol-eau). Les extraits hydroéthanoliques semblent avoir plus d'effet surtout aux fortes doses.

Le contact des extraits de plantes avec la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) annule totalement l'effet de l'extrait hydroacétonique de *Z. zanthoxyloides* et réduit partiellement l'effet de l'extrait hydroéthanolique de la même

plante sur *H. contortus* (Figure 2). Avec *N. laevis*, la PVPP ne réduit que très partiellement l'effet de la plante quel que soit le solvant d'extraction (acétone-eau ou éthanol-eau). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration larvaire est en partie due à l'action des tanins et qu'en dehors de ceux-ci, les extraits des deux plantes contiendraient d'autres métabolites secondaires perturbant la migration des larves L₃.

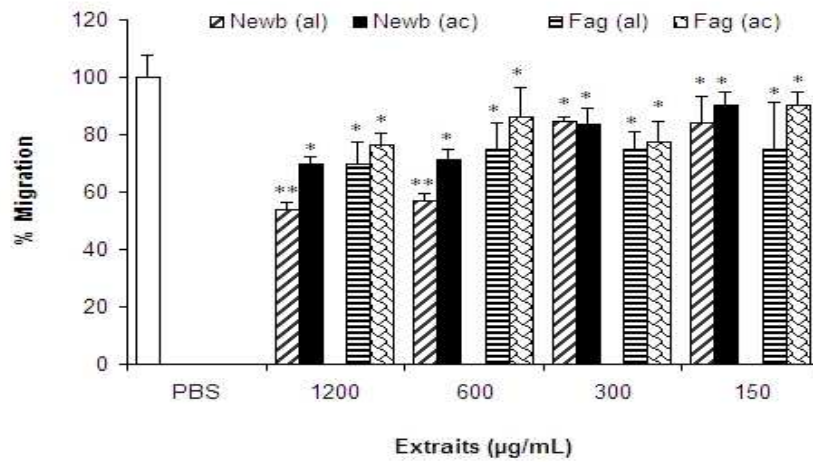


Figure 1 : Variation de la migration larvaire de *Haemonchus contortus* en fonction des extraits de plantes : *N. laevis* (Newb), *Z. zanthoxyloides* (Fag), alcoolique (al), acétonique (ac).

*P<0,05 ; ** P<0,01

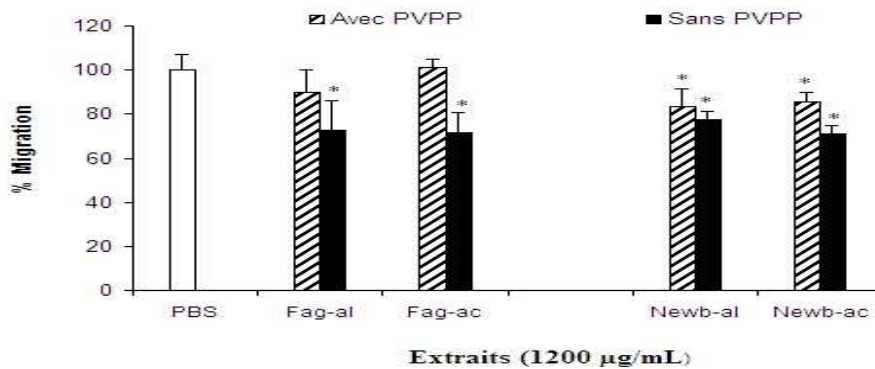


Figure 2 : Variation de l'effet des extraits de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloides* en présence (Avec) ou non (Sans) du PVPP sur la migration larvaire de *Haemonchus contortus*.

*P<0,05 .

DISCUSSION

L'objectif de l'étude est de montrer l'importance des tanins de *Newbouldia laevis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*, deux plantes tropicales, sur la migration larvaire de *Haemonchus contortus*, hématophage, parasite gastro-intestinal des petits ruminants. L'acétone et l'éthanol ont été choisis comme solvant d'extraction car ils extraient les composés polaires des plantes, sont miscibles avec des solvants organiques et aqueux et sont non toxiques pour des organismes utilisés lors des tests (Eloff, 1998). L'acétone et l'éthanol extraient de plus grandes quantités de composés de végétaux comparativement au dichlorométhane et à l'hexane (Bizimenyera et al., 2005). Le contrôle des parasitoses gastro-intestinales par les plantes réside entre autres dans la capacité de celles-ci à agir sur la viabilité ou la fertilité des vers adultes, à réduire l'excrétion des œufs ou à limiter l'installation des larves par leur immobilisation ou l'inhibition de leur dégagement bloquant ainsi le cycle de vie des parasites. La diminution de la migration larvaire est due à leur immobilité ou à leur mortalité. L'espèce abomasale *Haemonchus contortus* a eu un pourcentage de migration moins important après contact avec les extraits de plantes tropicales. Cette inhibition de la migration larvaire varie en fonction de la concentration des différents extraits de plantes.

Les extraits hydroacétoniques et hydroéthanoliques de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* inhibent donc *in vitro* la migration des larves infestantes de *H. contortus* et les tanins y jouent un rôle essentiel. Brunet et al. (2007) ont montré que l'extrait de sainfoin, une plante riche en tanins, affecte la cinétique de dégagement des L₃ de *H. contortus* et que cet effet inhibiteur dépend de la concentration en extrait. De même, Bahuaud et al. (2006) avaient montré que certaines plantes plus ou moins riches en tanins pouvaient inhiber partiellement ou complètement la migration *in vitro* des larves L₃. Mais l'efficacité de ces tanins dépendrait de leur structure et de la nature des monomères comme l'ont montré les travaux de Brunet et Hoste (2006). Les plantes doivent ces propriétés anthelminthiques à leur

composition phytochimique et les résultats de l'inhibition tannique suggèrent l'activité d'autres métabolites secondaires. On soupçonne entre autres les alcaloïdes mais d'après Barreau et al. (2005) des flavonoïdes pourraient aussi expliquer les propriétés anthelminthiques des plantes bio actives. *N. laevis* renferme selon Olounladé (2005) des familles des composés tels que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les anthocyanes, les dérivés quinoniques, les saponosides, les mucilages, les stéroïdes et les triterpénoïdes. Cette plante est également riche en quinones telle la newbouldiquinone (Eyong et al., 2006) ou céramide (Eyong et al., 2005) et en alcaloïdes associés à des pigments. Plusieurs molécules d'alcaloïdes (Tringali, 2001; Diéguez-Hurtado et al., 2003), de flavonoïdes, de terpénoïdes et de coumarines (Mara et al., 1992) ont été isolées des différents organes d'espèces appartenant au genre *Zanthoxylum*.

Par ailleurs, Brunet et al. (2008) ont observé des lésions structurelles sur des L₃ ayant été en contact avec des extraits de sainfoin. Outre l'inhibition de la migration larvaire, *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* induiraient probablement sur les larves infestantes des altérations structurelles et fonctionnelles sur lesquelles il serait intéressant de faire la lumière. Une inhibition dose-dépendante de la migration des larves L₃ de *H. contortus* a été mise en évidence par Hounzangbé-Adoté (2004). La présence des tanins dans ces deux plantes tropicales, *N. laevis* et *Z. zanthoxyloïdes* pourrait justifier les propriétés anthelminthiques observées. Toutefois, les molécules responsables de leur effet anthelminthique sont encore mal connues et restent à identifier. Les flavonoïdes et les tanins contenus dans la fraction polaire de *Leuceana leucocephala* (Adémola et al., 2005) et les glycosides de flavonols dans le sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) (Barrau et al., 2005) ont montré un effet sur la migration des larves L₃ de *H. contortus*. Les tanins contenus dans nos extraits de plantes sont probablement des tanins condensés. En effet, on connaît des tanins condensés (composés polyphénoliques) qui exercent une activité anthelminthique sur les

différents stades du cycle parasitaire des nématodes lors des tests *in vivo* chez des moutons et des chèvres (Bahuaud et al., 2006; Hoste et al., 2006).

Conclusion

Les résultats de la présente étude ont révélé la part des tanins de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* dans l'inhibition de la migration des larves L₃ de *H. contortus*. L'utilisation traditionnelle des feuilles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes* par des éleveurs comme anthelminthique semble être justifiée. Cependant il serait nécessaire de réaliser des essais toxicologiques *in vivo* et des études parasitologiques pour considérer le facteur de polyparasitisme dans le bétail et le métabolisme des extraits dans le tube digestif de l'animal. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la nature exacte des tanins présents dans les extraits des feuilles de *N. laevis* et de *Z. zanthoxyloïdes*.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le gouvernement français à travers les responsables du projet CORUS 6040 (Coopération pour la Recherche Universitaire et Scientifique), de l'AUF (Agence Universitaire de la Francophonie) et du projet AHRES (Appui à la Restructuration et à l'Harmonisation de l'Enseignement Supérieur) pour leur appui financier.

REFERENCES

- Adémola IO, Akanbi AI, Idowu SO. 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fraction of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm. Biol.*, **43**: 599-604.
- Adjanonhoun EJ, Adjakidje V, Ahyim RA, Ake AL. 1989. *Contribution aux Etudes Ethnobotaniques et Floristiques en République du Bénin (Médecine Traditionnelle et Pharmacopée)*. Agence de coopération culturelle et technique (ACCT) : Paris.
- Alawa CBI, Adamu AM, Gefu JO, Ajanusi OJ, Abdu PA, Chiezey NP, Alawa JN, Bowman DD. 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology*, **113**: 73 – 81.
- Bahuaud D, Martinez-Ortiz De Montellano C, Chauveau S, Prevot F, Torres-Acosta F, Fouraste I, Hoste H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, **132**: 545-554.
- Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. 2005. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, **131**: 531-538.
- Bizimenyera ES, Swan GE, Chikoto H, Eloff JN. 2005. Rationale for using *Peltophorum africanum* (Fabaceae) extracts in veterinary medicine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **76**: 54-58.
- 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, Aufrère J, Elbabili F, Fourasté 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*, **135**: 1-10.
- Brunet S, Hoste H. 2006. Les monomères des tanins condensés affectent le dégainement des larves des nématodes parasites des ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 7481-7487.
- Craplet C, Thibier M. 1984. Pathologie de la gestation. In *Le Mouton* (4^e ed). Vigot: Paris.
- Dieguez-Hurtado R, Garrido G, Prieto Gonzalez S, Iznaga Y, Gonzalaz L, Molina TJ, Curini M, Epifano F, Marcotullio MC. 2003. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. *Fitoterapia*, **74**: 384-386.

- Dramane S, Witabouna KM, Kagoyire K. 2010. Evaluation of antimicrobial and free radical scavenging activities of some bioactive taxons from Côte D'ivoire. *Eur. J. Sci. Res.*, **40**: 307-317.
- Eloff JN. 1998. Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol.*, **60**:1-8.
- Enwerem NM, Okogun JI, Wambebe CO, Okorie DA, Akah PA. 2001. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, Betulinic acid. *Phytomed.*, **8**: 112 -114.
- Eyong KO, Folefoc GN, Kuete V, Beng PV, Krohn K, Hussain H, Nkengfack EA, Saefel M, Sarite SR, Hoerauf A. 2006. Newbouldiaquinone A: Un naphthoquinone-anthraquinone éther couplé pigment, comme un agent antimicrobien et antipaludiques potentiels de *Newbouldia laevis*. *Phytochimie*, **67**(6): 605-609.
- Eyong KO, Krohn K, Hussain H, Folefoc GN, Nkengfack AE, Schulz B, Hu Q. 2005. Newbouldiaquinone et newbouldiamide: un nouveau-anthraquinone couplé pigment naphthoquinone et un céramide occasion à partir de *Newbouldia laevis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**(6): 616-619.
- Fajimi AK, Taiwo AA. 2005. Herbal remedies in animal parasitic diseases in Nigeria: a review. *African Journal of Biotechnology*, **4**: 303-307.
- Hammond JA, Feiling D, Bishop SC. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Comm.*, **21**: 213 – 228.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.*, **22**: 253-261.
- Hounzangbé-Adote MS, Paolini V, Fouraste I, Moutairou K, Hoste H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three stages of the parasitic nematodes, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, **78**: 155-160.
- Hounzangbé-Adoté MS. 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Thèse doctoract , Université d'Abomey-Calavi, Bénin, p.240.
- Hounzangbe-Adote MS. 2000. La pharmacopée en médecine vétérinaire au sud Bénin (cas des ovins et caprins). Colloque Européen d'Ethnopharmacologie. Société Française d'ethnopharmacologie. Metz du 11 au 13 mai 2000.
- Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M. 2006. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci.*, **79**: 2413-2431.
- Jackson F, Coop RL. 2000. The development of Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, **120**: 95-107.
- Kaplan RM. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.*, **20**: 477-481.
- Lagnika L. 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'Université de Louis Pasteur France, et de l'Université d'Abomey-Calavi, Bénin, p.248.
- Makkar HPS. 2006. Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. In *Herbivores, Assessment of Intake, Digestibility and the Roles of Secondary Compounds*. Nottingham University Press: Nottingham; 235-249.
- Mara SP, Arruda JB, Fernandes PC, Viera M, Fatima Das GF, Da Silva JRP. 1992. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*. A new secofuraquinoline alkaloids. *Biochem. System Ecol.*, **20**: 173-178.
- Olounladé AP. 2005. Effets anthelminthiques des feuilles de *Newbouldia laevis* testées *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) chez les moutons Djallonké. DEA, Université de Lomé, Togo, p.65.

- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002, Genève, p.65.
- Pharmacopée européenne. 2011. 7.0-Tom1 (2.8.14) EDQM. Conseil de l'Europe Strasbourg, France.
- Rabel B, McGregor R, Dough PGC. 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintic on nematode larval migration. *Int. J. Parasitol.*, **24**: 671-676.
- Salifou S. 1996. Nématodes et nématodose du tube digestif des petits ruminants du Sud Bénin : Taxonomie, Epidémiologie et les facteurs de variation. Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, p.162.
- Tringali C, Carmela C, Valeria Cali V, Simmonds MSJ. 2001. Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Fitoterapia*, **72**: 538-543.
- Van Wyk JA; Malan FS. 1988. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Veterinary Record*, **123**: 226-228.