

Evaluation *in vitro* du potentiel anthelminthique de la graine de lupin, *Lupinus spp.*

DUBOIS O. (1, 2), SALLÉ G. (1, 2), FÉVRIER H. (1, 2), CORTET J. (1, 2), MAGNIN-ROBERT J.B. (3), HARZIC N. (4), BOUDESOCQUE-DELAYE L. (1, 2)

(1) INRA UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 NOUZILLY

(2) Université François Rabelais UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 TOURS

(3) INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle GEAPSI, BP 86510, F-21000 DIJON,

(4) Jouffray-Drillaud, La Litière, F-86600 ST SAUVANT

RÉSUMÉ

Le lupin, protéagineux déjà utilisé en nutrition animale, contient des alcaloïdes qui pourraient avoir des vertus anthelminthiques. Notre étude s'attache à valider et quantifier ces propriétés par des tests *in vitro* exposant *Haemonchus contortus*, strongle parasite de ruminants, à différents extraits de deux variétés, riche (amère) ou pauvre (douce) en alcaloïdes. L'analyse des alcaloïdes présents a révélé une teneur plus élevée dans la variété amère (3.3% contre 0.04% dans la variété douce), mais une diversité supérieure dans la variété douce (n=5 contre 3 dans la variété amère). Les différents extraits des variétés testées ont paralysé significativement les stades larvaires et inhibé le développement des œufs en larves. Les fractions alcaloïdiques extraites ont eu un effet plus marqué que l'extrait total de graine, en faveur de l'hypothèse de travail, et ont également permis de contrôler un isolat parasitaire multi-résistant aux anthelminthiques disponibles en France. Ces résultats placent le lupin comme un nouvel alicament potentiel.

In vitro evaluation of anthelmintic properties of the lupine seed, *Lupinus spp.*

DUBOIS O. (1, 2), SALLÉ G. (1, 2), FÉVRIER H. (1, 2), CORTET J. (1, 2), MAGNIN-ROBERT J.B. (3), HARZIC N. (4), BOUDESOCQUE-DELAYE L. (1, 2)

(1) INRA UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 NOUZILLY

SUMMARY

Lupine seed is used in animal nutrition for its high protein content, but it also contains alkaloids that may have anthelmintic properties. Our study was aimed at validating and quantifying these properties through *in vitro* testing of seed extracts from alkaloid-rich or –poor varieties against *Haemonchus contortus*, a parasitic strongyle of ruminants. Chemical analyses revealed a higher alkaloid content in the alkaloid-rich (3.3% vs 0.04% in the alkaloid-poor) but a lower diversity than in the alkaloid-poor variety (n=3 vs 5 respectively). Aqueous extracts of both varieties could significantly control infective larval stages and inhibited egg development. Extracted alkaloid fractions exhibited a stronger inhibitory effect, corroborating the working hypothesis, and could also control a multi-resistant isolate. These results are in favor of nutraceutical properties of lupine seed.

INTRODUCTION

Les strongles digestifs, notamment *Haemonchus contortus*, entraînent des pertes majeures dans l'élevage des petits ruminants. Ces pertes sont d'autant plus prégnantes que les populations de parasites sont de plus en plus résistantes aux anthelminthiques. Une des solutions de gestion durable de ces parasites serait d'avoir recours à un alicament, c'est-à-dire une plante possédant des qualités nutritives et thérapeutiques, préventives ou curatives (Hoste and Torres-Acosta, 2011). Le lupin est un protéagineux contenant des alcaloïdes qui ciblent les récepteurs nicotiques des mammifères (Green *et al.*, 2013). L'activation prolongée de ces récepteurs chez *H. contortus* provoque une paralysie du vers qui conduit à son élimination par l'hôte. Les variétés actuelles de lupin ont été sélectionnées pour ne contenir qu'une quantité résiduelle d'alcaloïdes afin de prévenir tout risque de toxicité chez l'hôte. Cependant les quantités résiduelles d'alcaloïdes pourraient conférer à la graine un pouvoir anthelminthique. Le lupin pourrait alors être utilisé comme alicament en élevage. Cette étude *in vitro* vise à tester l'activité du lupin sur *H. contortus* afin de valider son effet anthelminthique supposé.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 MATERIELS BIOLOGIQUE

Onze variétés de graines de lupin (fournies par Jouffray-Drillaud et le Pôle GEAPSI-CRG Protéagineux INRA Dijon) ont été testées en première intention. Ces variétés regroupent :

- six variétés de lupin blanc (*L. albus*): trois douces (CLOVIS, ORUS et ÉNERGY) et trois amères (EGY 014, EGY100 et E063) ;
- Deux variétés de lupin bleu (*L. angustifolius*) : une douce, LANG172 et une amère, LANG061 ;
- Deux variétés de lupin jaune (*L. luteus*) : une douce, LL049 et une amère, LL151 ;
- une variété amère de lupin andin (*L. mutabilis*) LM261

Deux isolats de *H. contortus* ont été utilisés pour les tests biologiques. L'isolat Weybridge qui est sensible à tous les anthelminthiques et l'isolat Kokstad qui est résistant aux trois classes d'anthelminthiques de synthèse disponibles en France (ivermectine, lévamisole et benzimidazole).

1.2 METHODES

Macération aqueuse

Les graines de lupin ont été broyées au broyeur à couteaux. La farine obtenue a été mise à macérer dans de l'eau distillée dans un rapport de 1/4 (m/v), pendant 48 heures à température ambiante (20 ± 2 °C). La macération a ensuite été filtrée sur coton, congelée et lyophilisée pour enfin obtenir la macération brute aqueuse.

Extraction des alcaloïdes

Afin d'isoler les fractions actives de la macération aqueuse, la fraction alcaloïdique de la graine a été extraite et séparée de la fraction non-alcaloïdique. Après broyage, une extraction solide/liquide a été réalisée sous ultrasons et à l'acide chlorhydrique à 0,5 mol·L⁻¹ dans un rapport de 5/12 (m/v). Après centrifugation de la solution aqueuse obtenue, le

surnageant est alcalinisé à pH 12 par de l'hydroxyde de sodium (30%), avant une triple extraction au dichlorométhane 30/2 (v/v). Les phases organiques ont été séchées sur MgSO₄ puis évaporées à sec sur évaporateur rotatif. Les alcaloïdes ont été repris dans 60 ml de CH₂Cl₂ puis extraits trois fois avec 20 ml d'HCl à 0,05 mol·L⁻¹. Les phases aqueuses ont été rassemblées, le CH₂Cl₂ a été éliminé sur évaporateur rotatif, puis les phases ont été congelées avant lyophilisation.

U-HPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

Les analyses UHPLC ont été réalisées à l'aide d'une chaîne DIONEX UHPLC U3000RS system (ThermoFisher SA, Voisins le Bretonneux, France). Les extraits sont dissouts dans de l'eau distillée à 1 mg/ml. Le volume d'injection est de 5µl. Les analyses UHPLC analytiques ont été faites avec un gradient ACN/H₂O (+0,1% de TFA) de 0 à 100 % d'ACN avec un débit de 0,8ml/min sur une durée de 20 minutes à 40°C.

Test d'inhibition de la migration larvaire (Kotze *et al.*, 2006)

Afin d'évaluer l'effet des solutions d'intérêt, un test d'inhibition de la migration larvaire (TIML) a été réalisé sur des larves infestantes d'*H. contortus*. Les larves ont été exposées à une solution d'hypochlorite de sodium à 0,48% durant 5 min à 38°C afin de provoquer le dégainement, c'est-à-dire la sortie active de leur gaine protectrice. Après trois rinçages successifs, la solution de larves a été mise en contact avec la solution à tester sous agitation (250L3/mL final). Un volume de 100 larves a été déposé dans chaque puits d'une plaque 96 puits munis d'un tamis de 20 µm amovible. Après migration durant 2h à 38°C, la migration a été arrêtée, et les larves ayant migré ont été dénombrés à la loupe binoculaire (x25). Pour chaque solution testée, six réplicats ont été réalisés. Le résultat est exprimé comme le rapport entre le nombre de larves exposées à la solution testée et ayant migré, et le nombre de larves exposées à la solution témoin ayant migré négatif (eau).

Test de développement larvaire (TDL)

Dans un tube à hémolyse en verre, 100 œufs ont été mis en présence d'*E. coli* et d'amphotéricine B (Hubert et Kerboeuf, 1992). Après 48h d'incubation à 20°C, les larves de stade 2, ont été mises en présence de 50 µl de l'extrait à tester (alcaloïdes, macération, témoin...) et 20 µl de solution de Earle. Après une semaine d'incubation à 20°C, les nombres de larves au stade 2 et stade 3 ont été dénombrés au microscope inversé. Pour chaque extrait testé, le pourcentage de développement a été exprimé comme le nombre de larves de stade 3 divisé par le nombre total de larves dénombrés par tube. Chaque test est réalisé en six réplicats et le résultat final est exprimé en pourcentage de développement relatif au témoin négatif (eau).

Pour chacun des deux tests (TIML et TDL), les différents extraits (macérations aqueuses ou les extraits alcaloïdiques) ont été testés à une concentration de 5 mg/ml. Les macérations aqueuses ont été filtrées sur une membrane de 0,20 µm.

Détermination de l'IC50 des extraits alcaloïdiques

Afin de déterminer l'IC50 des fractions alcaloïdiques des deux variétés vis-à-vis des deux isolats parasites, un TIML a été réalisé avec cinq concentrations différentes. Pour l'extrait alcaloïdique d'ÉNERGY, les concentrations testées sont 0, 2, 4, 6 et 8 mg/mL et pour l'extrait alcaloïdique d'E063 les concentrations sont : 0, 2,5, 5, 7,5 et 10 mg/mL. Chaque concentration a été testée en six réplicats.

Tests statistiques

Pour les macérations brutes de lupin et les extraits alcaloïdiques qui ont été testés pour une concentration unique, l'effet des extraits sur le pourcentage de migration larvaire ou le développement larvaire a été estimé par une régression linéaire (fonction lm(), R) de type :

$$\% \text{ migration} = \mu + \text{extrait} + \text{souche} + \text{extrait} * \text{souche} + e$$

La significativité des différences entre extraits (entre variétés et par rapport au témoin) et entre souches a été objectivée par le test de Tukey (fonction glht() du package multcomp, R).

Les valeurs d'IC₅₀ (valeurs inhibitrices médianes) ont été estimées à partir des pourcentages de migration mesurés pour la gamme de concentrations définie en appliquant une régression logistique à quatre paramètres (package drc, R) de type :

$$f(x) = c + \frac{(d - c)}{(1 + e^{(b \cdot \log(x) - \log(e))})}$$

Où *b* représente la pente de la courbe, *c*, l'effet limite minimum, *d*, l'effet limite maximum et *e*, l'IC₅₀.

2. RESULTATS

2.1. MACERATIONS AQUEUSES

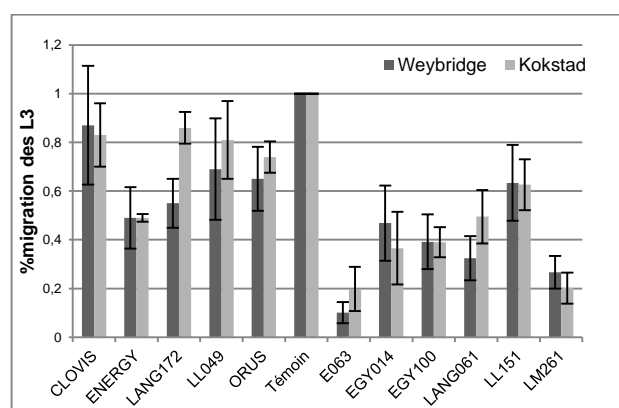


Figure 1 : Résultat du test de migration larvaire sur *H. contortus* pour onze variétés de lupin

Les macérations de onze variétés de lupin (douces et amères) ont été criblées. Le réactif de Dragendorff, le réactif de Neu et la ninhydrine ont permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de protéines. À partir de ces macérations, des tests de migration larvaire sur des larves sensibles (Weybridge) et résistantes (Kokstad) de *H. contortus* ont été effectuées. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 1.

L'ensemble des macérations a impacté négativement la migration larvaire. Néanmoins, les macérations issues des variétés amères ont un effet inhibiteur plus important puisque le pourcentage d'inhibition moyen est de 63% (± 8%) contre 30% (± 8%) pour les variétés douces.

Même si toutes les variétés amères ont inhibé significativement la migration larvaire, la variété E063 a montré un effet maximal (85% ± 8%, p < 0.001).

Parmi les variétés douces, ÉNERGY est la seule variété dont la macération a eu un impact significatif sur la migration larvaire (50% ± 10%). L'effet de la macération de la variété ORUS était en limite de significativité (p=0.06) et l'effet des autres macérations variétés douces n'ont pas pu être différenciés de l'effet du témoin.

Suite à ces tests, la variété ÉNERGY, seule variété douce efficace, a été retenue pour préciser son effet en comparaison de la variété amère E063. Ces variétés appartiennent toutes deux à l'espèce *L. albus*. Les alcaloïdes de ces deux variétés ont été extraits.

2.2. EXTRAITS ALCALOÏDIQUES

Après extraction des alcaloïdes, la plus forte teneur en alcaloïdes de la variété E063 a été confirmée, avec 3,305% d'alcaloïdes totaux dans les graines contre 0,043% pour la

variété ENERGY. Dans les deux cas, des analyses chromatographiques ont été menées sur les extraits alcaloïdiques. Ces analyses ont révélé la prépondérance de la lupanine (ÉNERGY : 31% ; E063 : 73%). En revanche, ces mêmes analyses ont également mis en évidence une diversité supérieure des alcaloïdes dans la variété douce ENERGY (n=5 alcaloïdes majoritaires) par rapport à la variété amère E063 (n=3). L'extrait alcaloïdique d'ÉNERGY est par ailleurs nettement plus complexe que celui d'E063.

Afin de préciser l'effet inhibiteur des graines, un test de migration a été réalisé sur deux isolats de *H. contortus*, mis en présence des macérations, de la fraction alcaloïdique et de la fraction non alcaloïdique. Une comparaison vis-à-vis du lévamisole à 10mmol/L a été également réalisée. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 2 et le tableau 1.

Les extraits alcaloïdiques ont montré un effet inhibiteur significatif variant entre 62 et 50% de la mobilité larvaire par rapport au témoin négatif (tableau 1), sans qu'aucune différence n'ait été observée entre les isolats ($p=0,28$ et $0,53$ pour les variétés ENERGY et E063 respectivement). Dans le cas de la souche résistante, une paralysie 1,5 à 2 fois supérieure à celle obtenue avec le lévamisole a été observée après contact avec les fractions alcaloïdiques d'E063 et ENERGY respectivement (tableau 1).

Aucune différence significative d'effet n'a été observée entre la macération et l'extrait alcaloïdique pour l'isolat résistant Kokstad (figure 2, tableau 1). Dans les deux cas et pour les deux variétés de lupin testées, une inhibition d'environ 50% a été obtenue.

En revanche, pour la souche sensible Weybridge, la fraction alcaloïdique d'ENERGY était plus active que la macération aqueuse correspondante ($p=0,002$). Au contraire, la macération d'E063 est plus active que son extrait alcaloïdique ($p=0,004$).

L'IC50 des fractions alcaloïdiques des deux variétés sur la mobilité larvaire a été déterminée. L'IC50 de la variété ENERGY était plus faible ($p=0,04$) sur la souche Weybridge (4,54 mg/ml) que la souche résistante (5,59 mg/ml). Pour la variété E063, des IC50 similaires ont été obtenues sur la souche Weybridge (9,30 mg/ml) et sur la souche Kokstad (8,38 mg/ml).

La fraction non alcaloïdique d'ÉNERGY n'a pas d'effet significatif par rapport au témoin négatif sur la migration larvaire des deux isolats de *H. contortus*. La fraction non alcaloïdique d'E063 a un effet significatif sur la migration larvaire par rapport au témoin négatif (Weybridge $p<0,001$; Kokstad $p=0,02$) mais son effet reste moindre que celui de la fraction alcaloïdique ($p<0,05$).

Tableau 1 : Effet inhibiteurs des différents extraits de lupin sur la migration larvaire de *H. contortus* (en % du niveau de migration des témoins négatifs ; EA: extraits alcaloïdiques, FNA: fractions non alcaloïdiques, M: macération, LEV: lévamisole)

	ÉNERGY			E063			LEV
	EA	M	FNA	EA	M	FNA	
Weybridge	0,38 $p<10^{-4}$	0,67 $p<10^{-4}$	0,91 NS	0,54 $p<10^{-3}$	0,35 $p<10^{-3}$	0,71 $p<10^{-3}$	0,08 $p<10^{-3}$
Kokstad	0,46 $p<10^{-4}$	0,48 $p<10^{-4}$	1,36 NS	0,51 $p<10^{-3}$	0,50 $p<10^{-3}$	0,77 $p<10^{-3}$	0,70 $p<10^{-3}$

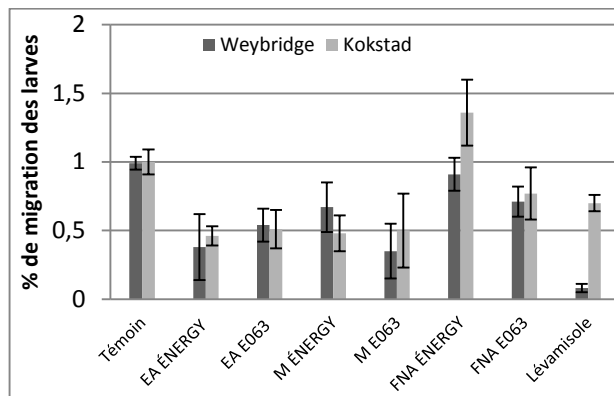


Figure 2 : Influence des différents extraits de lupin sur la migration larvaire de *H. contortus*

2.3. DEVELOPPEMENT LARVAIRE

L'effet inhibiteur des macérations et des extraits alcaloïdiques a également été testé sur le développement larvaire des isolats Weybridge et Kokstad. Les résultats obtenus sont présentés par la figure 3 et le tableau 2.

Les macérations aqueuses ont montré des effets contrastés en fonction de l'isolat parasitaire. Très efficaces sur l'isolat résistant avec des pourcentages d'inhibition du développement larvaire entre 99% et 84% pour E063 et ENERGY respectivement (tableau 2), leurs effets se sont avérés plus faibles sur l'isolat sensible (48% d'inhibition pour E063, et 16% seulement pour ENERGY ; tableau 2).

L'extrait alcaloïdique d'ENERGY en revanche a montré un effet sans équivoque en inhibant totalement le développement larvaire des deux isolats, tout comme le lévamisole (tableau 2). Cet effet s'est avéré supérieur à celui de la variété amère E063, dont l'extrait n'a pas permis d'inhiber significativement le développement de l'isolat résistant Kokstad (tableau 2).

Il est à noter que le développement de l'isolat résistant a été significativement inhibé par le lévamisole (4% de développement, $p<10^{-3}$).

Tableau 2 : Effet inhibiteurs des différents extraits de lupin sur le développement larvaire de *H. contortus* (en % du niveau de développement des témoins négatifs ; EA: extraits alcaloïdiques, M: macération, LEV: lévamisole)

	ÉNERGY		E063		LEV
	EA	M	EA	M	
Weybridge	0 $p<10^{-3}$	0,84 NS	0,01 $p<10^{-3}$	0,52 $p<10^{-2}$	0,07 $p<10^{-3}$
Kokstad	0 $p<10^{-3}$	0,16 $p<10^{-3}$	0,68 NS	0,004 $p<10^{-3}$	0,04 $p<10^{-3}$

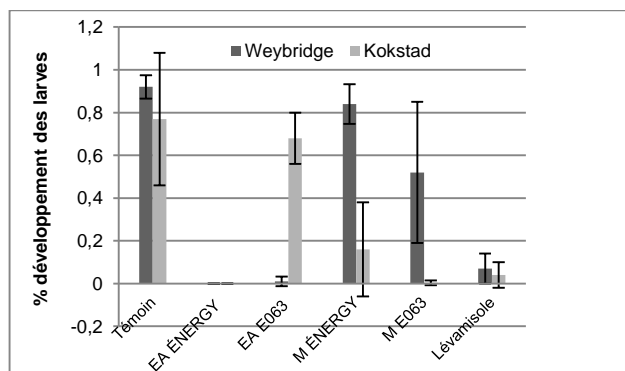


Figure 3 : Influence des différents extraits de lupin sur le développement larvaire de *H. contortus*

3. DISCUSSION

Un premier criblage de macérations aqueuses de différentes variétés de lupin a permis de mettre en évidence le potentiel anthelminthique des variétés amères et de la variété douce ÉNERGY. L'effet inhibiteur d'une variété douce, ENERGY, est un résultat majeur et indispensable pour l'utilisation du lupin comme alicament. En effet, seules les variétés douces peuvent être commercialisées.

Les effets inhibiteurs supérieurs des variétés amères par rapport aux variétés douces appuient l'hypothèse que ce sont les alcaloïdes qui sont porteurs de l'activité anthelminthique. Pour vérifier cette hypothèse, les alcaloïdes des deux variétés de lupin ont été extraits et testés sur la migration des larves ainsi que leur macération correspondante et leur fraction non alcaloïdique. Les extraits alcaloïdes et les macérations ont aussi été testés sur le développement des larves.

Les extraits alcaloïdiques des deux variétés ont montré des effets significatifs sur la migration larvaire des deux isolats. En considérant uniquement les extraits alcaloïdiques, l'IC50 d'ENERGY est significativement plus faible que celle obtenue pour E063 dans le TIML suggérant une efficacité plus importante du cocktail alcaloïdique de cette variété. Cette meilleure efficacité est par ailleurs confirmée par le TDL, où les extraits alcaloïdiques d'ENERGY ont montré une efficacité redoutable.

Les chromatogrammes ont révélé que l'extrait d'ENERGY est plus diversifié en alcaloïdes (5 alcaloïdes majoritaires) que celui d'E063 (3 alcaloïdes majoritaires). L'isolat Kokstad, bien que résistant aux anthelminthiques, semble être autant affecté que l'isolat sensible par les alcaloïdes d'ENERGY. Des tests sur des récepteurs nAChR recombinants exprimés en œufs de xénope pourraient être réalisés afin de déterminer les mécanismes d'action sur les récepteurs du parasite.

Sur l'isolat résistant Kokstad, les macérations et les extraits alcaloïdiques des deux variétés ont montrés une activité similaire pour le TIML. La macération d'E063 est étonnamment plus active que son extrait alcaloïdique sur l'isolat sensible Weybridge. L'hypothèse d'une molécule active autre qu'alcaloïde sur la migration présente dans la macération d'E063 n'est pas à exclure. Par ailleurs, la fraction non alcaloïdique d'E063 présente un effet significatif sur la migration larvaire par rapport au témoin ce qui irait dans le sens de cette théorie, de même que seule la macération d'E063 a un effet sur l'isolat résistant pour le TDL.

La présence de flavonoïdes a été mise en évidence dans les macérations par le réactif de Neu, des tests complémentaires pourraient être réalisés afin d'évaluer leur impact sur les larves de Kokstad. La lupanine est déjà identifiée dans les deux extraits alcaloïdiques, mais bien qu'il soit largement prépondérant dans l'extrait de la variété E063 celle-ci n'est pas la plus active, l'hypothèse de l'impact d'un autre alcaloïde chez la variété ÉNERGY est à vérifier. Par la suite, l'identification structurale des alcaloïdes présents dans l'extrait alcaloïdique d'ENERGY est à réaliser.

Des essais supplémentaires sur d'autres espèces parasitaires sont en cours afin de généraliser nos résultats.

Ces résultats restent toutefois à confirmer *in vivo* par une administration contrôlée de graines de lupin à des animaux infestés. Outre la validation de l'utilisation pratique finale, ce test permettra d'envisager l'effet des graines sur les stades parasitaires adultes, dont la survie *in vitro* n'est que très limitée. De plus, le système *in vivo* pourrait également annuler les effets observés. La digestion des graines pourrait modifier leurs propriétés, et/ou la concentration en alcaloïdes à laquelle

seront exposés les parasites, limitée notamment par la quantité de graines ingérée, pourrait être trop faible.

Cette étude sera également l'occasion de comparer l'effet du lupin par rapport à d'autres plantes aux vertus anthelminthiques. Le sainfoin, par exemple, a fait l'objet de nombreuses études (Hoste and Torres-Acosta, 2011) et constituera une référence. L'impact économique de la complémentation en lupin sera également considéré, en estimant notamment l'impact sur les performances d'agneaux en croissance et chèvres en lactation infestés artificiellement. Un essai au champ sera mené afin d'évaluer l'impact sur une saison de pâturage.

CONCLUSION

Le lupin se révèle être un bon candidat alicament dans la prévention des infestations par *H. contortus*. Les alcaloïdes de la variété ÉNERGY donnent des résultats très prometteurs sur l'inhibition de la mobilité des larves ainsi que sur leur développement, aussi bien sur la souche sensible que sur la souche résistante.

Des essais complémentaires sur d'autres espèces parasitaires sont en cours et une validation *in vivo* démarrera en 2016.

Ce projet bénéficie d'un financement de la région Centre (projet LUPINEMA).

Green BT, Welch KD, Panter KE, Lee ST (2013) Plant Toxins That Affect Nicotinic Acetylcholine Receptors: A Review. *Chemical Research in Toxicology* **26**: 1129–1138

Hubert J, Kerboeuf D (1992) A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* **130**:442-446

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.

Kotze AC, Le Jambre LF, O'Grady J (2006) A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology* **137**: 294–305