UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV)

EQUIPE Multirésistances et pouvoir Pathogène des Nématodes UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, INRAE Centre Val de Loire

THÈSE présentée par :

Joshua MALSA

soutenue le : **27 novembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Identification et caractérisation de plantes bioactives pour la gestion des petits strongles chez les chevaux

THÈSE dirigée par :	
M. NEVEU Cédric	Directeur de recherche, INRAE Val de Loire
THÈSE co-encadrée par :	
Mme FLEURANCE Géraldine	Ingénieur de recherche, IFCE, INRAE Clermont Auvergne Rhône-Alpes
RAPPORTEURS :	
M. JACQUIET Philippe	Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA Georg	Professeur, Institut de parasitologie et de médecine tropicale de Berlin

JURY :	
Mme. BOUDESOCQUE-DELAYE Leslie	Professeure, Université de Tours (présidente de jury)
M. BOURGOIN Gilles	Enseignant-Chercheur, VetAgroSup– CampusVétérinaire de Lyon
Mme. FLEURANCE Géraldine	Ingénieur de recherche, IFCE, Ingénieur de recherche, INRAE Clermont Auvergne Rhône-Alpes
Mme. GINANE Cécile	Chargée de recherche, INRAE Clermont Auvergne Rhône-Alpes
M. GUABIRABA Rodrigo	Chargé de recherche, INRAE Val de Loire
M. JACQUIET Philippe	Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. NEVEU Cédric	Directeur de recherche, INRAE Val de Loire
M. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA Georg	Professeur, Institut de parasitologie et de médecine tropicale de Berlin
INVITE :	
M. SALLE Guillaume	Ingénieur de recherche, INRAE Val de Loire

À mon grand-père décédé en 2023

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier mes encadrants de thèse, Guillaume Sallé et Géraldine Fleurance pour leurs investissements, disponibilités et soutiens durant ces trois années de travail. Je tiens également à remercier Cédric Neveu qui a pris la relève sur la fin de la thèse.

Je souhaite spécialement remercier les membres de mon jury de thèse Philippe Jacquiet, Georg Von Samson-Himmelstjerna, Leslie Boudesocque-Delaye, Gilles Bourgoin, Cécile Ginane et Rodrigo Guabiraba qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse, Leslie Boudesocque-Delaye, Marie Delerue, Bertand Dumont, Cécile Ginane, Sonia Lacroix-Lamandé et Andrew Williams, avec qui j'ai pu échanger autour de mon sujet et de mes résultats.

Un MERCI collectif à l'équipe MPN pour les trois années (moins neuf mois) passé à leur côté. Une mention spéciale pour Angélique Chereau qui m'a fortement aidé dans les manips, sans elle et Fabrice Guégnard je n'aurais pas pu obtenir tous les résultats que j'ai eus. Je souhaite également remercier l'équipe PIGH dirigée par Andrew Williams et l'équipe VETPAR dirigée par Stig Milan Thamsborg du département des sciences vétérinaires et animales de Copenhague. Tak til jer alle for jeres velkomst og livsglæde (*Thanks to google translate*).

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer durant ma thèse et qui m'ont apporté un soutien amical ou professionnel dans mon travail. Je pense à Núria Mach. À Fabrice Reigner et toute son équipe. À la plateforme expérimentale de Chamberet. Aux thésards de l'équipe (Morgane Miclon et Michel Boisseau) et de l'unité (Marianne Nicolas, Mégane Fernandez, Marine Pons et Lorna Agapé). Je souhaite également remercier les collègues suivants : Morgane Delavergne, Evelyne Desnoë, Brigitte Lambert, Veronique Legros, Océane Lenhof, Céline Musset, Tiffany Pezier, Stephanie Salmon et Alexandre Vernudachi.

Mention spéciale également pour l'équipe du midi et jeu de société : Marianne, Élise Morgane et Florent M., sans oublier Morgane D, Mégane, Tiffany et Jason.

Je souhaite particulièrement remercier Les pti potes, Lulu et l'équipe de Marseille qui m'ont encouragé et soutenu de toutes les meilleures façons qui soient durant ces trois années.

Je souhaite fortement remercier ma famille, ma mère, mes frères, Jeremy et Gamin, mes belles sœurs, Marie et Ombline, ma nièce et mon neveu, Mémé et Raphou, pour leurs soutiens et leurs encouragements et pour tout ce qu'ils m'apportent aux quotidiens.

Enfin, je souhaite remercier Claire pour le soutien qu'elle m'a apporté et qu'elle m'apportera et surtout pour la patience dont elle a fait preuve durant ces trois années à distance.

Résumé

Les petits strongles ou *Cyathostominae* sont les parasites gastro-intestinaux les plus fréquemment rencontrés chez les chevaux au pâturage. Chez les jeunes animaux, ces parasites sont essentiellement responsables de retards de croissance, mais en cas d'émergence en masse de stades larvaires enkystés dans la muqueuse caeco-colique (*i.e.* cyathostomose larvaire), ils peuvent également conduire à la mort de l'hôte. Le contrôle de ces parasites est actuellement essentiellement basé sur l'utilisation d'antiparasitaires chimiques, dont l'usage intensif a inévitablement conduit à l'émergence d'isolats résistants vis-à-vis de l'ensemble des molécules disponibles. Dans ce contexte, il est urgent de développer de nouvelles approches pour la gestion durable des cyathostomes.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier des plantes bioactives vis-à-vis des cyathostomes et d'étudier leurs modes d'action. Ainsi, les effets anthelminthiques directs (*i.e.* altérant la biologie des cyathostomes) et indirects (*i.e.* stimulant les défenses immunitaires du cheval contre les parasites) de différentes plantes ou de leurs métabolites secondaires (MbS) ont été étudiés.
Dans un premier temps, l'efficacité anthelminthique et d'immunostimulation *in vivo* de trois additifs alimentaires, commercialisés en santé équine et composés soit d'armoise (*Artemisia vulgaris*), d'échinacée (*Echinacea angustifolia*) ou de curcuma (*Curcuma longa*) a été mesurée. Aucun effet n'a été observé sur l'excrétion d'œufs, leur développement en larves infestantes (L3) et sur les paramètres sanguins étudiés. Par la suite, a été évalué l'intérêt de deux modèles de fourrages bioactifs riches en MbS : des tanins condensés pour le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et des sesquiterpènes lactones pour la chicorée (*Cichorium intybus*, cv. Puna II). Ainsi, des poulains ont consommé du sainfoin sous forme de granulés déshydratés (70% MS de leur ration) au cours d'une cure de 21 jours, sans induire d'effets antiparasitaires. Par ailleurs, ce régime a entrainé une diminution significative de la concentration plasmatique de l'ivermectine après traitement, entrainant une réexcrétion d'œufs plus rapide. Contrairement au sainfoin, la chicorée consommée au pâturage par des poulains sur une période de 45 jours a induit une diminution significative d'œufs dans les crottins et une réduction de leur développement en L3. Le régime a montré une efficacité de 85,5% en fin d'étude, comparativement au niveau d'excrétion mesuré dans le groupe contrôle. Par ailleurs, le carvacrol et le cinnamaldéhyde ont été identifiés comme les meilleurs candidats dans le cadre de notre criblage de MbS, du fait de leur activité d'inhibition du développement, de la migration larvaire, et de leur activité d'immunostimulation mesurée sur cellules murines. Des tests sur des cellules équines mononuclées du sang périphérique ont ensuite été réalisés, confirmant leur activité chez le cheval. En parallèle, nous avons étudié pour la première fois le niveau d'expression des gènes après stimulation des monocytes par de l'antigène de larves L3 de cyathostomes. En se référant à la base de données KEGG, nous avons observé que les gènes majoritairement exprimés appartenaient à la voie de signalisation TNFα, TLR ou NF-κB, comme pour une réponse induite par du LPS. Le cinnamaldéhyde et le carvacrol n'ont pas affecté cette réponse. L'effet direct de ces deux MbS sur la diversité en espèces de cyathostomes a également été étudié en utilisant différentes concentrations. Les trois espèces les plus abondantes dans la concentration contrôle (*i.e. Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus. ashworthi* et *Cyathostomum pateratum*) étaient significativement plus abondantes pour les concentrations les plus fortes testées.

Évaluant différentes stratégies d'utilisation des plantes, cette thèse a permis d'identifier des pistes intéressantes d'études pour le développement d'alternatives naturelles pour le contrôle des cyathostomes chez les équins.

Résumé en anglais

Small strongyles or *Cyathostominae* are the most frequently encountered gastrointestinal parasites in grazing horses. In young animals, these parasites are primarily responsible for retarded growth, but in the case of massive emergence of larval stages encysted in the caeco-colic mucosa (*i.e.* larval cyathostominosis), they can also lead to host death. Cyathostomins control has long been achieved mainly through the use of chemical anthelmintics whose intensive use has inevitably led to the emergence of isolates resistant to all drug classes. This context warrants alternative approaches to develop for a sustainable control of cyathostomins.

The aim of this PhD work was to identify bioactive plants towards cyathostomins and to study their modes of action. Thus, the direct anthelmintic effects (*i.e.* altering the biology of cyathostomins) and indirect effects (*i.e.* stimulating the horse's immune defenses against parasites) of different plants or their secondary metabolites (SMs) were studied.
First, the *in vivo* anthelmintic properties and immune system stimulating efficacy of three feed additives composed of a single plant species (*i.e.* mugwort (*Artemisia vulgaris*), echinacea (*Echinacea angustifolia*) or curcumin (*Curcuma longa*)) and marketed for their benefits on equine health was measured. No effect of these treatments was observed on egg excretion, their development into infective larvae (L3) or on the blood parameters studied. Two models of bioactive forage rich in SMs were then evaluated: condensed tannins for sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and sesquiterpene lactones for chicory (*Cichorium intybus*, cultivar Puna II). Horses were fed with dehydrated pellets of sainfoin (70% DM of their diet) over a 21-day period. No antiparasitic effect was observed during this cure. In addition, the sainfoin regime led to a significant decrease in plasma ivermectin concentration after treatment, resulting in faster egg re-excretion. Conversely, chicory consumed by horses at pasture over a period of 45 days led to a lower egg excretion compared to the control group, as well as a reduction in larval development. The chicory diet was associated with a final efficacy of 85.5% compared with the level of excretion measured in control individuals. In addition, , carvacrol and cinnamaldehyde were identified as the best candidates during our SMs screening, due to their inhibitory activity on larval development and migration, and their immunostimulatory activity measured on murine cells. Subsequently, tests were carried out on equine peripheral blood mononuclear cells, confirming their activity in horses. In parallel, we studied for the first time the level of gene expression after stimulation of monocytes with cyathostomins L3 larval antigen. Referring to the KEGG database, we observed that the predominantly expressed genes belong to the TNFα, TLR or NF-κB signaling pathway, as in an LPS-induced response. Cinnamaldehyde and carvacrol did not affect this response. The direct effect of these two SMs on cyathostomins species diversity was also investigated using different concentrations. The three most abundant species in the control concentration group (*i.e. Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus. ashworthi* and *Cyathostomum pateratum*) were significantly more abundant at the highest concentrations tested.

By evaluating different strategies for the use of plants, this PhD identified promising possibilities for the development of natural alternatives for the control of cyathostomins in equines.

Table des matières

Remerciements **1**
Résumé **3**
Résumé en anglais **5**
Table des matières **7**
Liste des abréviations **13**
Liste des figures **15**
Liste des tableaux **17**
Introduction générale **19**
Contexte bibliographique **23**
I. Les cyathostomes 25
A. La phylogénie des petits strongles 25
B. Cycle de vie 30
C. Impact du parasitisme chez les chevaux 32
II. Contrôle des strongyloses par les anthelminthiques de synthèse : atouts et limites 34
A. Les anthelminthiques chimiques 34
a. Les benzimidazoles (BMZ) 35
b. Les tetrahydropyrimidines (PYR) 36
c. Les lactones macrocycliques (LMs) 36
B. Epidémiologie et mécanismes contre les anthelminthiques chimiques 37
a. Historique des résistances aux anthelminthiques 37
b. Les mécanismes de résistance aux benzimidazoles 38
c. Les mécanismes de résistance au pyrantel 38
d. Les mécanismes de résistance aux lactones macrocycliques 39
C. Ecotoxicité des lactones macrocycliques 40
III. Alternatives aux anthelminthiques chimiques actuels : des plantes bioactives aux effets directs 41
A. Les métabolites secondaires des plantes (Mbs) 42

a. Les alcaloïdes 43
b. Les terpènes 44
c. Les composes phénoliques 46
B. Activité directe des plantes en médecine vétérinaire 47
a. Activité antiparasitaire des plantes et de leurs métabolites secondaires contre les NGIs 47
b. L'utilisation des plantes dans la lutte contre les strongles des équidés 49
IV. Stratégies indirectes de gestion du parasitisme 52
A. Gestion du pâturage 52
a. Stratégies « défensives » 52
b. Stratégies « offensives » 53
B. Gestion de l'hôte 54
a. Sélection génétique 54
b. Améliorer la résilience et la résistance grâce à la complémentation nutritionnelle 55
c. Stimulation du système immunitaire 56
V. La réponse immunitaire et sa modulation par les plantes 57
A. La réponse immunitaire de type Th2 57
a. La détection 58
b. Transmission de l'information et induction de la réponse 60
c. Expulsion du parasite et resolution 61
B. La réponse immunitaire contre les nématodes gastro-intestinaux 62
a. Les défenses immunitaires des équidés face aux strongles 62
b. Stratégies d'évasion du système immunitaire de l'hôte 63
C. Activité d'immunostimulation des plantes 63
a. Essais *in vitro* 63
b. Essais *in vivo* 64
Objectifs de la thèse 67
Article 1 : Evaluation of commercial feed additives for equine cyathostomin control 69
I. Résumé 71
II. Article 73

Article 2 : Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on cyathostomin eggs excretion, larval development, larval community structure and efficacy of ivermectin treatment in horses 85

I. Résumé 87

II. Article 89

Article 3 : Chicory (*Cichorium intybus*) reduces cyathostomin egg excretion and development in grazing horses 101

I. Résumé 103

II. Article 105

Article 4 : Carvacrol and cinnamaldehyde potential for cyathostomin control: anthelmintic and immunomodulatory effects 119

I. Résumé 121

II. Article 123

Etude complémentaire : combinaison du chamazulène avec du pyrantel ou de l'ivermectine 157

I. Introduction 159

II. Matériels et méthodes 159

III. Résultats et discussion 160

Discussion / perspectives 163

I. Les plantes entières ou transformées permettent-elles un contrôle des infestations par les strongles chez les équins ? 165

A. Les additifs alimentaires commerciaux testés ne se sont pas révélés efficaces, mais restent-ils tout de même utiles ? 165

B. L'utilisation d'alicament semble pertinente, mais nécessite une exploration holistique de leurs effets biologiques 167

a. Le sainfoin n'a qu'un effet mineur sur l'infestation parasitaire par les cyathostomes et interagit négativement avec l'ivermectine 168

b. Le pâturage de la chicorée, une alternative efficace aux anthelminthiques chimiques 169

C. Limites àl'utilisation des plantes bioactives pour le contrôle des strongles gastro-intestinaux 171

II. Les tests *in vitro* permettent un criblage haut débit, mais illustrent-ils correctement les conditions *in vivo* ? 172

A. Criblage de l'activité immunomodulatrice 172

B. Les limitations des tests parasitologiques *in vitro* pour la prédiction d'une activité anthelminthique *in vivo* 174

C. Les barrières d'une ingestion par voie orale 176

a. Etude préliminaire de l'activité *in vivo* du cinnamaldéhyde et de l'eugénol (Résultats de Léonie Chamoin ; Article 4) 176

b. Difficultés du passage *in vitro* à l'*in vivo* 176

III. Comment améliorer l'efficacité anthelminthique des plantes pour une utilisation optimale chez le cheval ? 178

A. Amélioration des propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique des extraits 178

B. Utilisation de combinaisons de plantes ou de MbS pour limiter le développement de résistances 179

C. Les algues, d'autres ressources de molécules actives 180

Conclusion 181

Références bibliographiques 183

Annexes 215

Tableau S1_Tests *in vitro* d'activité anthelminthique des plantes 216

Tableau S2_Tests *in vitro* d'activité anthelminthique des plantes sur les strongles équins 219

Tableau S3_Tests *in vitro*/*in vivo* d'activité d'immunostimulation des plantes 220

Figure S1_Activité pro-inflammatoire des extraits criblés *in vitro* sur une lignée cellulaire de macrophages murin (RAW 264.7) 221

Figure S2_Activité anti-inflammatoire des extraits criblés *in vitro* sur une lignée cellulaire de macrophages murin (RAW 264.7) 222

Communication orale + article congrès francophone JSIE 2021 223

Communication orale congrès francophone JSIE 2023 224

Communication orale congrès européen EAAP 2023 225

Poster au congrès mondial WAAVP 2021 226

Poster congrès régional FéRi 2022 227

Premier prix short communication aux journées d'animation scientifique du département santé animale 2022 228

Liste des abréviations

BMZ : Benzimidazole

CDs : Cellules dendritiques

CI_{50} : Concentration d'inhibition 50

HE : Huiles essentielles

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IVM : Ivermectine

LMs : Lactones macrocyclique

LSs :Lactones sesquiterpéniques

MbS : Métabolites secondaires

MS : Matière sèche

nAchR : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine

NGIs : Nématodes gastro-intestinaux

OPGs :Œufs par gramme

PYR :Pyrantel

SI : Système immunitaire

TDL : Test de développement larvaire

TML : Test de motilité larvaire

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de base des nématodes illustrée par une femelle (à gauche) et un mâle (à droite) de Rhabditis sp. de Poinar Jr, (2012) 26
Figure 2 : Coupe transversale mettant en évidence l'organisation schématique d'un nématode 27
Figure 3 : Phylogénie des nématodes de (Blaxter and Koutsovoulos, 2015) 28
Figure 4 : Dessins des caractéristiques des Strongylidae sur Coronocyclus coronatus (espèce de cyathostome) de Lichtenfels, (2008) 29
Figure 5 : Cycle de vie des petits strongles 31
Figure 6 : Trois approches de contrôle des nématodes gastro-intestinaux de (Hoste and Torres-Acosta, 2011) 42
Figure 7 : Schéma de la réponse immunitaire Th2, mise en place lors d'une infestation par les nématodes gastro-intestinaux de (Sorobetea et al., 2018) 59
Figure 8 : Courbes dose-réponse d'un test de développement larvaire sur cyathostomes en présence de (A) pyrantel ou (B) ivermectine, en combinaison ou non avec du carvacrol (bleu), du chamazulène (jaune) ou de l'eugénol (vert). 161
Figure 9 : Récapitulatif des différentes études réalisées au cours de la thèse 164

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des principaux nématodes parasites internes des équidés 24
Tableau 2 : Classification des terpènes 44
Tableau 3 : Classification des composés phénoliques 45

Introduction générale

Introduction générale

Les Equidés, comme les autres herbivores domestiques, sont susceptibles d'être contaminés par une grande variété de parasites nématodes gastro-intestinaux (NGIs) (Taylor *et al.*, 2013). Les principaux NGIs infestant les Equidés sont les strongles, les ascaris, et les oxyures (Sallé *et al.*, 2020; Villa-Mancera *et al.*, 2021). C'est au pâturage, et dans une moindre mesure en box que les animaux ingèrent des œufs ou larves infestantes et s'exposent ainsi à des conséquences sanitaires. Ces nématodes parasites provoquent des coliques et des ulcères et réduisent l'assimilation des nutriments par leur hôte (Smets *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 2000b; Peregrine *et al.*, 2006). À la suite d'infestations, des retards de croissance chez les poulains, une baisse de la fertilité chez les poulinières et une baisse de performances chez les chevaux de sport ou de courses ont été observés. Chez les équidés, le contrôle des infestations par les nématodes parasites s'appuie depuis plusieurs décennies sur l'utilisation de différentes molécules chimiques présentant une activité anthelminthique (Lyons *et al.*, 1999). Cependant, l'utilisation massive et insuffisamment raisonnée de ces molécules a engendré l'apparition d'isolats résistants (Lyons *et al.*, 1999; Raza *et al.*, 2019; Nielsen, 2022). Le nombre restreint de molécules permettant un contrôle des infestations, l'existence de résistances croisées à différentes molécules et l'absence de mise sur le marché de nouveaux produits conduisent à une situation d'impasse thérapeutique. De plus, les molécules antiparasitaires majoritairement utilisées aujourd'hui sont toxiques pour les insectes coprophages, qui jouent un rôle essentiel dans l'écologie des prairies (Lumaret *et al.*, 2012). La diminution de l'efficacité des traitements à disposition et les enjeux environnementaux conduisent donc à repenser la gestion du parasitisme.

Dans ce contexte, des stratégies de gestion raisonnée du parasitisme voient le jour. En particulier, les populations parasitaires étant très inégalement réparties au sein d'un troupeau d'équidés (*e.g.* environ 20% des individus excrètent 80% des œufs de strongles), des approches de thérapie sélective, orientées sur les seuls individus dont l'excrétion excède un seuil donné (fonction de l'aire géographique, de la saison et de l'âge des chevaux) sont proposées pour réduire la pression de sélection sur les parasites et ralentir le développement des résistances (Nielsen *et al.*, 2014a). Les conditions optimales de la mise en œuvre de ces approches restent toutefois à préciser, notamment pour en réduire

le coût. Pour les différentes raisons évoquées précédemment, le recours exclusif aux anthelminthiques de synthèse ne constitue pas une solution durable pour contrôler le parasitisme gastro-intestinal des équidés. Parmi les options alternatives envisagées pour perturber le cycle des parasites figurent les plantes bioactives. Ainsi, sont retrouvés dans le commerce différents produits à base de plantes, mettant en avant différentes vertus positives pour la santé des équins, dont des effets antiparasitaires. Toutefois, aucune donnée robuste n'est disponible validant une réelle efficacité de ces produits. L'usage des plantes dans la prévention et le traitement du parasitisme gastro-intestinal des équidés nécessitent donc de développer des études scientifiques pour identifier des plantes candidates, tester leur efficacité et préciser les conditions de leur utilisation.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était d'identifier des plantes entières ou extraits de plantes efficaces vis-à-vis de la gestion des strongyloses digestives et de préciser leurs modes d'action (*i.e*. activité anthelminthique directe et/ou stimulation du système immunitaire de l'hôte).

Contexte bibliographique

Tableau 1 : Classification des principaux nématodes parasites internes des équidés (Taylor* et al.*, 2013)

Phylum	Classe	Super famille	Espèces
Nemathelminthes	Nematoda	Strongyloidae	*Cylicocyclus nassatus**, *Cylicostephanus longibursatus**, *Cylicostephanus minutus**, *Cyathotomum catinatum**, *Cyathostomum pateratum*, *Strongylus vulgarus*, *S. equinus* …
		Trichostrongyloidae	*Trichostrongylus axei*, *Dictyocaulus arnfieldi*
		Ascaridoidae	*Parascaris equorum*
		Oxyuroidea	*Oxyuris equi*, *Probstmayria vivipara*
		Spiruroidea	*Draschia meastoma*, *Habronema microstoma*, *Habronema muscae*, *Thelazia lacrymalis*
		Strongyloidoidea	*Strongyloides westeri*
		Rhabditoidea	*Pelodera strongyloides*
		Filarioidea	*Elaephora bohmi*, *Onchocerca reticulata*, *Parafilaria multipapillosa*, *Setaria equina*
		Trichuroidea	*Trichinella spiralis*
		Dracunculoidea	*Dracunculus medinensis*

Espèces infestant l'appareil digestif, respiratoire, nerveux, circulatoire, le tégument, les muscles.
*Espèces les plus abondantes parmi les petits strongles.

I. Les cyathostomes

Dès leur naissance, les chevaux entrent en contact avec différents parasites appartenant au phyla des *Nemathelminthes* (les vers ronds) et à la classe des *Nematoda* (les nématodes) (Tableau 1). Ces parasites occupent des niches spécifiques, dont une grande partie se situe dans l'appareil digestif. Au sein des nématodes, les *Strongyloidae* (les strongles) et les *Ascaridoidae* (*Parascaris sp)* sont les parasites les plus abondants chez les chevaux adultes (Reinemeyer *et al.*, 1984; Love *et al.*, 1999; Kaplan and Vidyashankar, 2012; Peregrine *et al.*, 2014)) et chez les jeunes chevaux de moins de deux ans (Nielsen *et al.*, 2018a), respectivement. Des enquêtes réalisées récemment à l'échelle mondiale montrent que la prévalence des strongles est bien plus importante (Brésil : 80%, Éthiopie : 67,2 %, Irlande : 52,4 % ou Allemagne : 46,5 %) que celle des *Parascaris sp* (Brésil : 3,4 %, Irlande : 4,22 % ou Allemagne : 4,6 %), tout âges confondus (Alemayehu *et al.*, 2022; Boelow *et al.*, 2023; Elghryani *et al.*, 2023; Carminatti *et al.*, 2023). Par ailleurs, ces enquêtes indiquent que la prévalence d'œufs de strongles dans les crottins est significativement supérieure chez les jeunes chevaux (1 à 5 ans) comparativement aux chevaux adultes. L'infestation en elle-même n'est pas dangereuse pour le cheval, mais lorsqu'elle atteint des niveaux importants, elle peut affecter la santé de l'hôte, voire entraîner sa mort (Giles *et al.*, 1985; Love and Duncan, 1992; Love *et al.*, 1999; Peregrine *et al.*, 2014).

A. La phylogénie des petits strongles

Issue du règne Animalia et du phylum Nemathelminthes, les nématodes sont des vers ronds non segmentés (Fig. 1) (Taylor et al., 2013). Leur taille varie de 0,1-2 mm à plus de 6 m (Blumenthal and Davis, 2004). On les retrouve dans différents habitats, à l'état libre ou en parasitose avec des animaux ou des plantes hôtes (Blaxter and Denver, 2012). Pour leur assurer une protection vis-à-vis du milieu extérieur, ces vers sont entourés d'une cuticule composée de fibres de collagène (Fig. 2). Le corps du nématode est constitué d'une large cavité appelée le pseudocœlome, contenant un fluide sous pression nommé « squelette hydrostatique » qui leur confère une certaine rigidité. Les nématodes ne possèdent pas de muscles circulaires et transversaux, mais présentent deux couches de fibres musculaires (dorsales et ventrales) disposées longitudinalement.

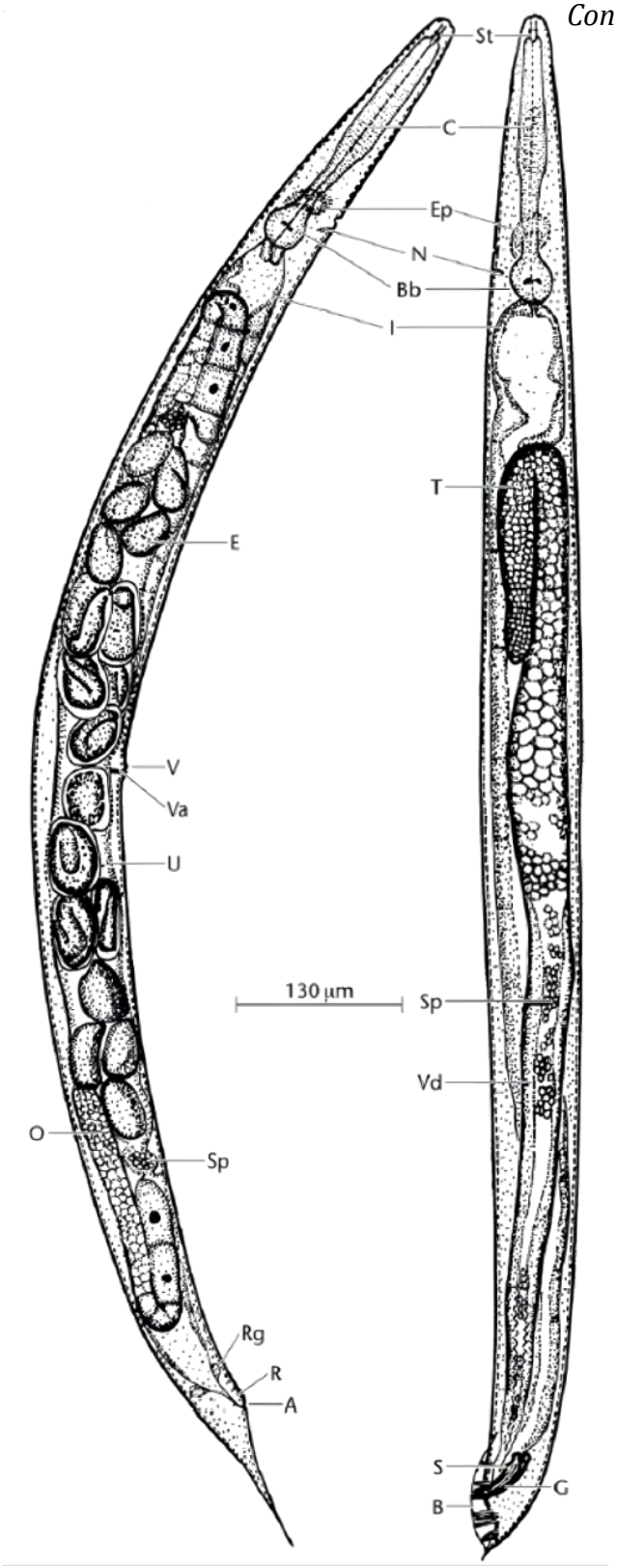


Figure 1 : Anatomie de base des nématodes illustrée par une femelle (à gauche) et un mâle (à droite) de Rhabditis sp. de Poinar Jr, (2012)

A : anus, B : bourse, Bb : bulbe basal du pharynx, C : corpus du pharynx, E : œuf, Ep : pore excréteur, G : gubernaculum, I : intestin, N : anneau nerveux, O : ovaire, R : rectum, Rg : glande rectale, S : spicule, Sp : sperme, St : stomie, T : testicule, U : utérus, V : vulve, Va : vagin, Vd : canal déférent.

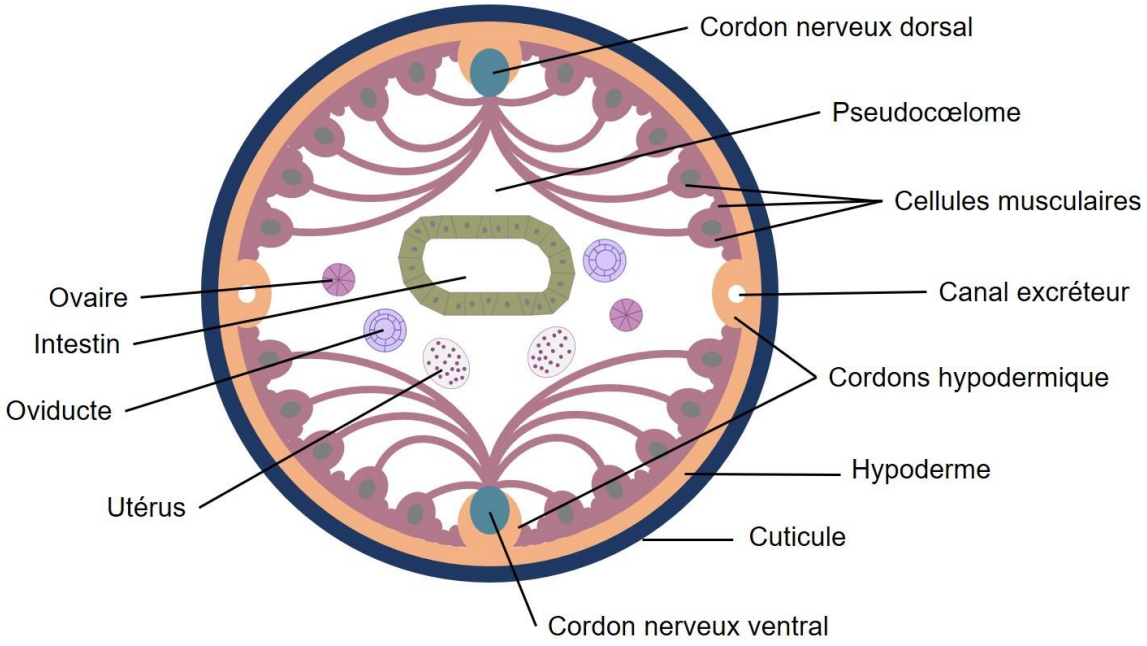


Figure 2 : Coupe transversale mettant en évidence l'organisation schématique d'un nématode

La mobilisation indépendante de ces fibres permet la flexion dorsale ou ventrale, créant un mouvement de sinusoïde, caractéristique de la locomotion des nématodes. Ces parasites disposent également d'un appareil digestif, ouvert aux extrémités antérieures et postérieures par une bouche et un anus. Cet appareil digestif est composé d'un pharynx, d'un œsophage, d'un intestin et d'une zone cloacale/anale. Enfin, ces vers possèdent un système nerveux servant deux fonctions principales : sensorielle et motrice. Ce système nerveux est piloté par un amas de cellules nerveuses appelé « anneau nerveux », situé à la base du pharynx. Les fonctions sensorielles sont assurées par des récepteurs situés à l'extrémité de la tête du nématode prolongés par deux cordons (ventral et dorsal) tout au long du nématode, se rattachant à un anneau nerveux postérieur. La structure corporelle est identique au sein des nématodes, mais cela ne les empêche pas d'être parfaitement adaptés à leurs différents milieux de vie (prairies, canopées, déserts, banquise ou encore les fonds marins) (Blumenthal and Davis, 2004; Caruso et al., 2019; Kiontke and Fitch, 2013; SuSu and Yong, 2019; Yanoviak et al., 2008). Appartenant à l'embranchement des nématodes, les petits strongles, également nommés cyathostomes, sont des parasites de la classe des *Chromadorea*, issus du clade V des *Rhabditina* (Fig. 3). Au sein de ce clade, les cyathostomes (sous-famille des *Cyathostominae*) appartiennent à la famille des *Strongylidae*, comprenant également les grands strongles (*Strongylinae*). La sous-famille des cyathostomes est composée d'un ensemble de 50 espèces organisées en 14 genres infestant les Équidés (*Equidae*), dont 10 espèces sont inféodées spécifiquement au zèbre et à l'âne (Lichtenfels *et al.*, 1998, 2008; Taylor *et al.*, 2013).

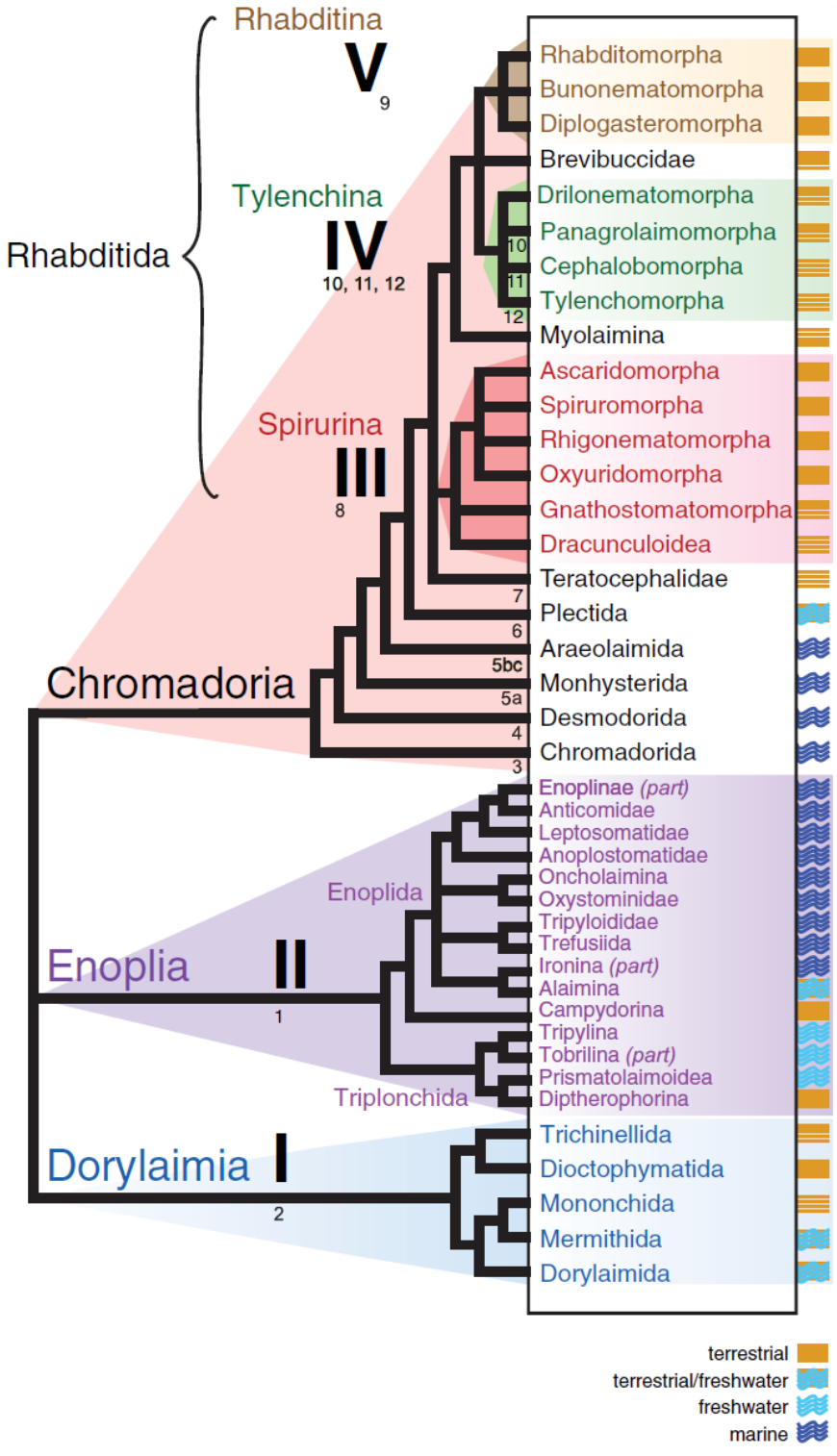


Figure 3 : Phylogénie des nématodes de (Blaxter and Koutsovoulos, 2015)

Parmi ces 50 espèces, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicostephanus minutus* et *Cyathostomum catinatum* sont les espèces les plus prévalentes et les plus abondantes dans le monde (Ogbourne, 1976; Bucknell *et al.*, 1995; Lyons *et al.*, 2000a; Laugier *et al.*, 2003; Kuzmina, 2011). Les cyathostomes sont des espèces mesurant entre 6 et 12 mm de longueur et de 200 à 250 µm de diamètre.

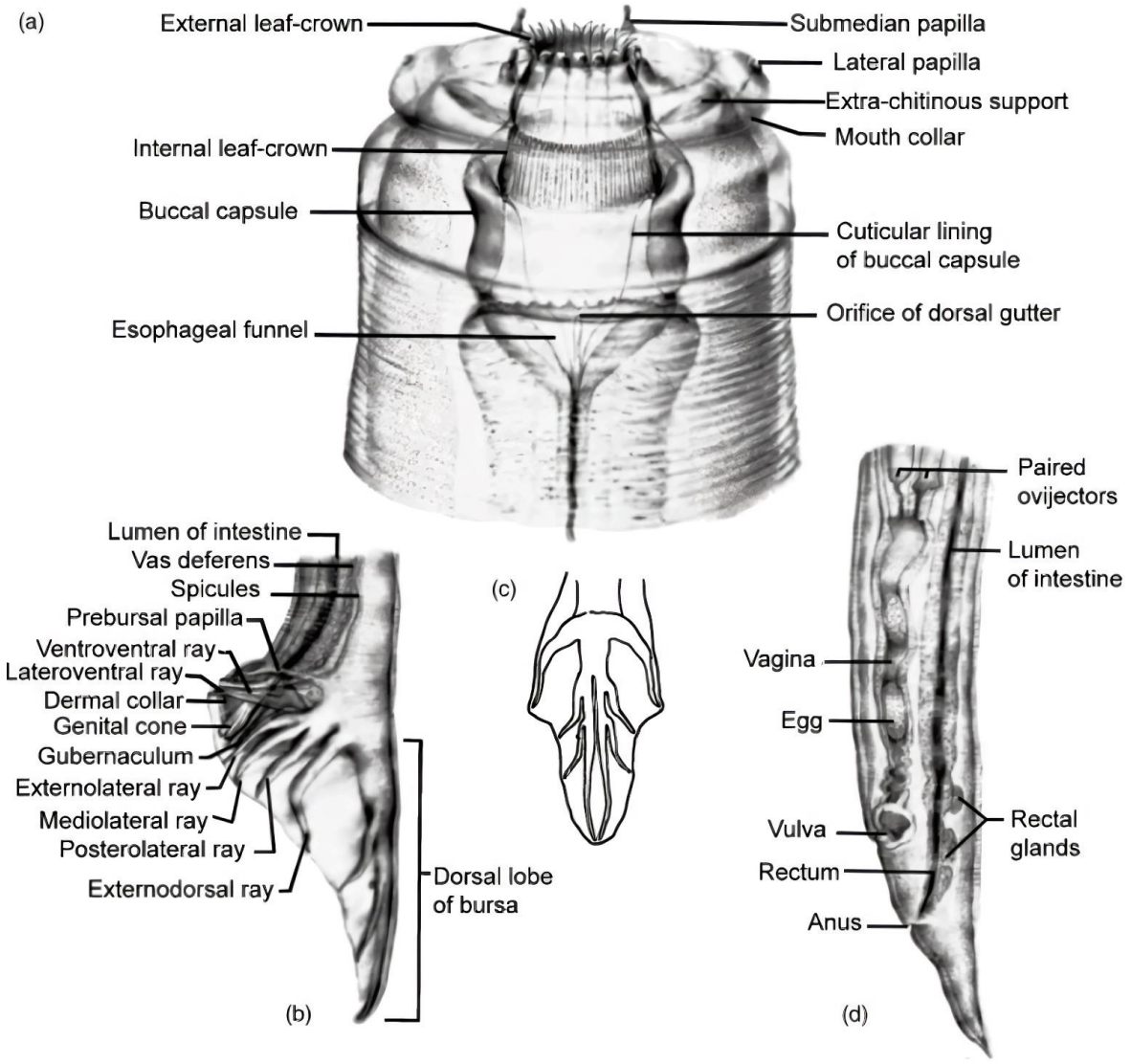


Figure 4 : Dessins des caractéristiques des *Strongylidae* sur *Coronocyclus coronatus* (espèce de cyathostome) de Lichtenfels, (2008)

(a) Tête en vue ventrale. (b) Queue du mâle en vue latérale. (c) Lobe dorsal de la bourse de la queue du mâle en vue dorsale. (d) Extrémité postérieure de la femelle en vue latérale.

Leur différenciation assez difficile repose sur des caractéristiques phénotypiques particulières, présentes au niveau de la tête ou de la partie antérieure. Il convient d'observer la collerette buccale (*mouth collar*), la couronne foliaire interne (*internal leaf-crown*) et externe (*external leaf-crown)*, les supports extra-chitineux (*extra-chitinous support*), la capsule buccale (*buccal capsul*e) et l'entonnoir œsophagien (*esophageal funnel*) (Fig. 4) (Lichtenfels *et al.*, 2008). Les spicules sur la partie postérieure des mâles contribuent également à la distinction entre espèces. Aujourd'hui, l'approche de métabarcoding permet d'identifier les différentes espèces présentes dans un échantillon donné. Le principe consiste à extraire l'ADN de l'échantillon, puis à amplifier par PCR[1] un fragment cible (*i.e*. « un code-barres »), qui est une séquence variable entre espèces mais très conservée au sein d'une même espèce, lui conférant un fort pouvoir discriminant. Les gènes codant pour l'ITS 2 (*internal transcribed spacer-2*) et COI (*cytochrome c oxidase subunit I*) sont des marqueurs qui ont été évalués, avec une meilleure fidélité pour l'ITS 2 malgré des difficultés d'amplification (Hung *et al.*, 1999; Poissant *et al.*, 2021; Courtot *et al.*, 2023).

Des recommandations de traitements systématiques (3 à 4 fois par an) à partir d'anthelminthiques de synthèse ont permis de limiter les infestations à *Strongylus vulgaris* (grands strongles) qui jusqu'aux années 1980, étaient fortement problématiques pour la santé équine. Cependant, l'utilisation massive des traitements a conduit à la sélection d'isolats résistants de cyathostomes. Aujourd'hui, les petits strongles sont les nématodes les plus prévalents chez le cheval (Lyons *et al.*, 1999; Kaplan, 2004).

B. Cycle de vie

Le cycle de vie des cyathostomes se déroule en deux temps comportant une phase de vie libre (hors hôte) et une phase interne (Fig. 5). Durant la phase de vie libre, les œufs se trouvant dans les crottins vont éclore en larve L1. Dans les conditions optimums, c'est-à-dire à une température comprise entre 20 et 30 °C et à un taux d'humidité de 15 à 20 % (Mfitilodze and Hutchinson, 1987), l'éclosion des œufs ainsi que leurs développements en larves L2 durent en moyenne 48 h.

[1]*Polymerase Chain reaction*

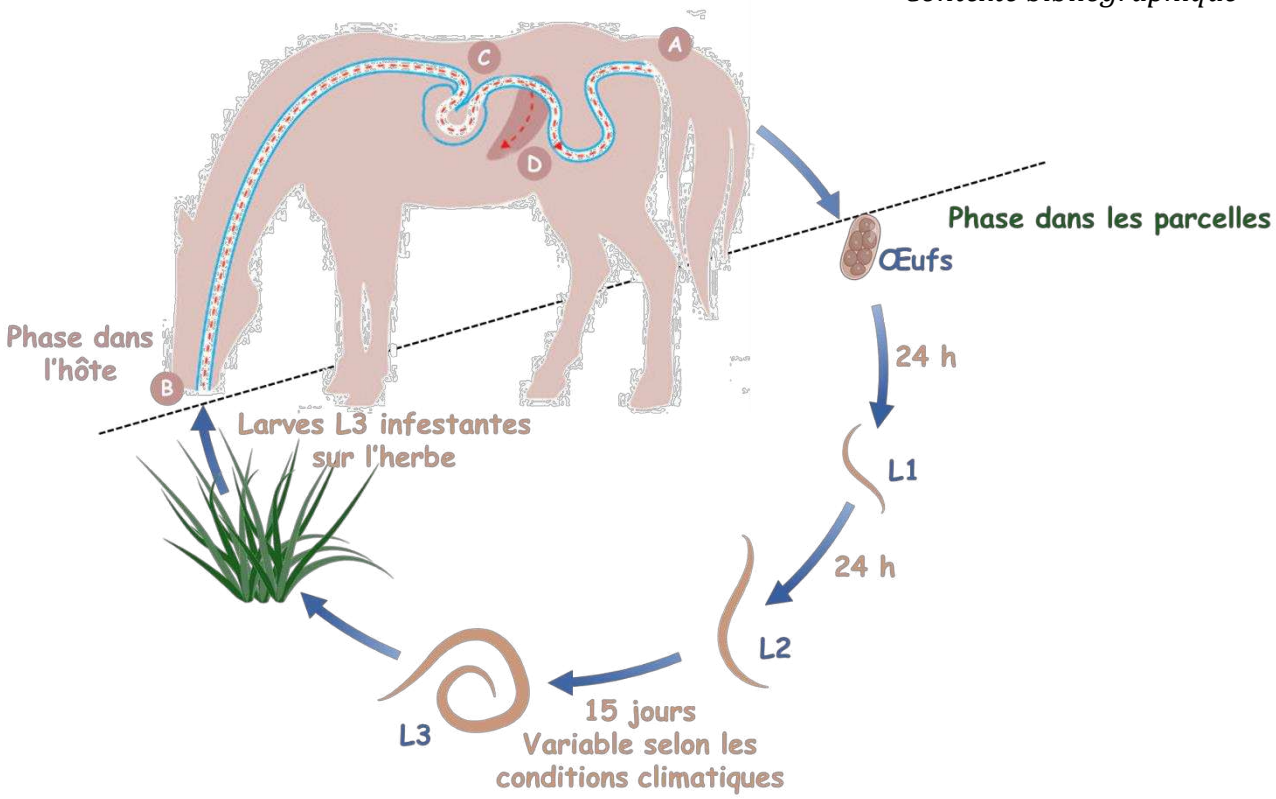


Figure 5 : Cycle de vie des petits strongles

Basé sur le schéma de l'ESCCAP
A : Élimination des œufs dans les crottins, B : Ingestion du stade L3 infestant, C : Migration des larves L3 dans la muqueuse de l'intestin grêle, D : Développement dans la muqueuse et sous-muqueuse du colon et du cæcum, mue en stade L4, migration vers la lumière intestinale et passage au stade adulte
De B à A = période prépatente (minimum 6 semaines)

Le développement en larves L3 infestantes dure quant à lui en moyenne 15 jours. Ce stade larvaire a la capacité de se mouvoir de façon plus importante, c'est lui qui initie la phase dans l'hôte. Lors du pâturage, les chevaux ingèrent des larves L3 qui iront s'enkyster dans la muqueuse du gros intestin. À ce stade, les larves sont appelées Early L3 (Klei and Chapman, 1999; Chapman *et al.*, 2001). Après s'être enkystées, les larves se développeront en L4 puis en adultes qui pondront leurs œufs dans la lumière du gros intestin. Il a été identifié que certaines espèces ont des sites de fixation préférés dans le gros intestin. Par exemple, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus minutus*, *Cylicostephanus calicatus* et *Cyathostomum catinatum* sont les plus répandues dans le côlon ventral, tandis que *Cylicostephanus longibursatus*, *Cylicostephanus goldi* et *Cylicocyclus insigne* sont des espèces davantage présentes dans le côlon dorsal (Ogbourne, 1978; Lyons *et al.*, 2000b). La présence des larves enkystées induit une réaction inflammatoire caractérisée par une hyperplasie des cellules caliciformes, ce dont nous reparlerons en détail dans la partie V

« La réponse immunitaire et sa modulation par les plantes ». Les principaux signes cliniques sont une perte de poids, des diarrhées et des coliques (Love *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 2000b). Ces différents signes sont principalement déclarés chez les jeunes chevaux âgés de 1 à 5 ans, davantage sensibles aux infestations parasitaires en raison d'un système immunitaire (SI) naïf, c'est-à-dire n'ayant pas encore rencontré le parasite afin d'induire une réponse spécifique (Giles *et al.*, 1985).

Le délai entre l'ingestion d'une larve infestante L3 par l'hôte et l'excrétion d'un œuf produit par l'adulte correspondant est d'au minimum 6 semaines ; il peut varier en fonction des espèces, du statut immunitaire de l'hôte ou de la charge parasitaire (Love and Duncan, 1992; Lyons *et al.*, 2000b). Ce délai, appelé « période prépatente » peut également s'allonger si les larves EL3 entrent en hypobiose (Eysker and Mirck, 1986; Klei and Chapman, 1999). Ce mode de vie a été défini par (Gibbs, 1986) comme une pause facultative dans le développement, lors de la période prépatente, visant à faciliter la survie au sein de l'hôte sur de longues périodes, et à augmenter les chances de transmission de l'infestation au moment opportun à un nouvel hôte sensible. Durant cette période, qui se déroule généralement au cours de la période hivernale, le nombre de larves enkystées s'accroît. Lorsque les conditions environnementales deviennent davantage propices au développement (fin d'hiver - début de printemps (Lyons *et al.*, 2000b)), toutes les larves accumulées émergent simultanément (Klei and Chapman, 1999; Chapman *et al.*, 2001), endommageant gravement la muqueuse intestinale ce qui compromet considérablement sa fonction et entraîne une entéropathie protéinique (Giles *et al.*, 1985; Lyons *et al.*, 2000b). Cette émergence simultanée des larves, nommée « cyathostomose larvaire », peut entraîner la mort des individus les plus sensibles. Depuis les années 1990, des taux de létalité d'environ 50 % sont rapportés (Peregrine *et al.*, 2006; Sallé *et al.*, 2020; Walshe *et al.*, 2021), remplaçant les cas de décès causés par *S. vulgaris* à partir des années 2000 en France (Sallé *et al.*, 2020).

C. Impact du parasitisme chez les chevaux

Comme évoqué précédemment, la prévalence des strongles est élevée dans la population équine, en particulier chez les jeunes chevaux (1 à 5 ans) (Klei and Chapman, 1999; Chapman *et al.*, 2003; Alemayehu *et al.*, 2022). Cette classe d'âge présente

également les signes cliniques d'infestation les plus importants (Giles *et al.*, 1985). Les poulains jusqu'à l'âge d'un an voire deux ans sont également infestés par *Parascaris sp* (Fritzen *et al.*, 2010; Kornaś *et al.*, 2010; Relf *et al.*, 2013), dont la prévalence était de 30,5 % en France en 2012 (Laugier *et al.*, 2012). Ce parasite cause des pertes de poids et des coliques induisant de l'anorexie, mais également des obstructions intestinales liées à sa taille importante (*Parascaris univalens*). Du fait du cycle de vie du parasite, les larves de *Parascaris sp* peuvent atteindre les poumons, induisant toux et écoulement nasal (Southwood *et al.*, 1998; Cribb *et al.*, 2006; Tatz *et al.*, 2012). Un traitement chirurgical permet de soigner les poulains des obstructions intestinales, cependant celui-ci présente une incidence élevée en complications, pouvant entraîner des taux de mortalité de 73 à 92 % (Southwood *et al.*, 1998; Cribb *et al.*, 2006; Tatz *et al.*, 2012).

Le développement du SI permet à l'hôte de se défendre naturellement contre les infestations (Love and Duncan, 1992; Klei and Chapman, 1999; Fabiani *et al.*, 2016). Afin de protéger les jeunes chevaux dont le SI est encore naïf, l'AAEP (American Association of Equine Practitioners) recommande un protocole spécifique. Ainsi, les chevaux de moins d'un an doivent être vermifugés pour la première fois entre 2-3 mois, si possible avec un benzimidazole (BMZ) (fembendazole ou oxibendazole), afin de garantir une efficacité contre les ascarides. Un second traitement est préconisé juste avant le sevrage (entre 4 à 6 mois), afin de protéger l'hôte des premières infestations par les strongles. Il est recommandé de réaliser une coproscopie dans le but d'identifier les vers dominants (strongles ou ascarides) et d'adapter le traitement. Enfin, lorsque les poulains atteignent l'âge de six mois, les éleveurs sont encouragés à les traiter tous les trois à quatre mois jusqu'à l'âge de trois ans. Les animaux étant infestés par des petits strongles au cours de cette période, un traitement alterné pyrantel (PYR) et lactones macrocycliques (LMs) est conseillé, ainsi qu'un traitement ciblant les tænias (Nielsen, 2014). La problématique de résistance des parasites à laquelle la filière équine est confrontée aujourd'hui découle donc principalement de la dépendance élevée aux anthelminthiques chimiques garantissant la survie et la bonne santé des jeunes chevaux.

II. Contrôle des strongyloses par les anthelminthiques de synthèse : atouts et limites

Avant le développement de l'utilisation des molécules chimiques, les traitements anthelminthiques étaient basés sur l'utilisation de composés disponibles dans la nature. En 1959, une liste des différentes substances utilisées comme traitements contre les vers chez les chevaux fut rédigée (Poynter, 1959). Sur celle-ci figuraient des minerais (calomel ou antimoine), des végétaux (*e.g.* anis, aloès, réglisse, graines de lin) et certains produits tels que du savon noir. L'huile de la plante chénopode (*Chenopodium anthelminticum*) fut l'un des premiers médicaments utilisés pour traiter des infestations chez les chevaux (Hall *et al.*, 1918).

A. Les anthelminthiques chimiques

Préalablement à l'utilisation des trois principales familles d'antiparasitaires disponibles actuellement (les BMZ, la tétrahydropyrimidine pyrantel et les LMs) (von Samson-Himmelstjerna, 2012), d'autres anthelminthiques chimiques ont été utilisés. Au début des années 1900, différents produits ont été commercialisés pour lutter contre les parasites internes des chevaux (Drudge *et al.*, 1981; Lyons *et al.*, 1990). Le disulfure de carbone fut le premier traitement chimique utilisé dans la lutte contre les gastérophiles et les ascarides, mais pour cause de toxicité forte, son utilisation fut interdite en 1997 (Lyons *et al.*, 1999). Dans les années 1940, furent commercialisées les phénothiazines. En dépit d'effets toxiques de cette molécule sur les équins (Gibson, 1975), celle-ci fut couramment utilisée dans la lutte contre les strongles durant une vingtaine d'années (Habermann *et al.*, 1941; Gibson, 1953). Suite à l'apparition de résistances (Poynter and Hughes, 1958; Gibson, 1960; Drudge and Elam, 1961), le recours aux phénothiazines cessa dans les années 1980. Par la suite, les pipérazines constituèrent la première molécule efficace à la fois sur les ascarides, les petits strongles et les oxyures (Lyons *et al.*, 1999). Afin d'étendre le spectre d'activité aux gastérophiles et aux grands strongles, les pipérazines ont été majoritairement utilisées en combinaison avec le disulfure de carbone et les phénothiazines (Lyons *et al.*, 1999). Appartenant également à la classe des organophosphorées, le dichlorvos sous forme de granulés a été utilisé pour agir sur les petits strongles. Toutefois, le protocole d'administration était compliqué, nécessitait des

restrictions d'eau et les granulés non digérés retrouvés dans les matières fécales étaient toxiques pour les oiseaux. C'est dans le début des 1960 qu'apparaissent les BMZ (thiabendazole) avant l'apparition sur le marché des deux autres classes d'anthelminthiques majoritairement utilisées : tétrahydropyrimidine et les LMs dans les années 1970 et 1980 respectivement.

a. Les benzimidazoles (BMZ)

Le thiabendazole développé par (Drudge *et al.*, 1963) fut le premier benzimidazole commercialisé (1962). Par la suite, furent introduits le cambendazole, le fenbendazole, le mébendazole, l'oxfendazole et l'oxibendazole. Les BMZ constituent la première classe d'antiparasitaires nématicides à spectre large. Grâce à leur efficacité à faible dose, à leur faible toxicité et aux différentes méthodes d'administration, ces molécules ont été largement utilisées. Les BMZ présentent une activité antimitotique par liaison à la tubuline. En effet, leur fixation entraîne une inhibition et une désintégration des microtubules des cellules intestinales des nématodes (McKellar and Scott, 1990; Lacey, 1990). Essentiels à la survie des cellules eucaryotes, les microtubules permettent la formation d'un cytosquelette dynamique, le transport intracellulaire et la division cellulaire (Fletcher and Mullins, 2010). La tubuline et les microtubules sont étroitement maintenus en équilibre par un processus connu sous le nom de « *treadmilling* », au cours duquel les sous-unités de tubuline (hétérodimères α- / βtubuline) circulent entre les deux extrémités du polymère (Whittaker *et al.*, 2017). La dégradation complète des microtubules entraîne une diminution de l'absorption des nutriments et la mort des parasites (McKellar and Scott, 1990; Lacey, 1990). La faible affinité des BMZ pour les tubulines de mammifères permet d'expliquer la toxicité faible de ces molécules sur l'hôte (Gill and Lacey, 1992). Parmi ces différentes molécules, uniquement le fenbendazole (*i.g.* Panacur) est utilisé sur les chevaux (Corning, 2009). Celui-ci est actif sur tous les stades (L3, L4 et adultes) qu'ils soient présents dans la lumière intestinale ou enkystés, et un traitement réalisé sur 5 jours consécutifs permet d'atteindre les stades en hypobiose (Corning, 2009).

b. Les tétrahydropyrimidines (PYR)

Cette classe contient différents sels de PYR, chlorhydrate, pamoate et tartrate. Le tartrate de PYR est actif sur les ascarides, *S. vulgaris*, les petits strongles et les oxyures adultes (Cornwell and Jones, 1968). Le pamoate de PYR présente également une activité sur les ascarides, les petits strongles, *S. vulgaris* et *Strongylus equinus*, mais une efficacité moindre sur les oxyures. Les effets du PYR ont été décrits pour la première fois sur *Ascaris suum* dans les années 1970. Ces composés sont des agonistes cholinergiques produisant une dépolarisation des cellules musculaires du nématode, entrainant une paralysie du ver (Aubry *et al.*, 1970; Aceves *et al.*, 1970). Les vers paralysés sont incapables de se déplacer librement, de se nourrir ou de se reproduire. Ils sont éliminés dans les matières fécales par les mouvements de péristaltisme de l'intestin. Ainsi, le PYR (*i.g.* Strongid) est actif uniquement sur les larves et adultes présents dans la lumière du tube digestif (Corning, 2009). Le lévamisole (classe des imidazothiazoles), dont le mécanisme d'action est relativement similaire, a été commercialisé juste après le PYR. Malgré son efficacité en combinaison à la pipérazine sur les ascarides, *S. vulgaris* et les petits strongles (Lyons *et al.*, 1999), le lévamisole se dégrade en aminorex, molécule à effet dopant chez le cheval (Ho *et al.*, 2009).

c. Les lactones macrocycliques (LMs)

Les LMs (ivermectine (IVM) et moxidectine (MOX)) sont les antiparasitaires actuellement majoritairement utilisés pour le contrôle des petits strongles à travers le monde. Les LMs sont arrivés sur le marché dans les années 1980 avec la commercialisation de l'IVM (Egerton *et al.*, 1981). Tout comme les BMZ, les LMs sont actifs à faible dose et présentent un faible niveau de toxicité pour l'hôte. Toutefois, ils sont également actifs sur les arthropodes (Lyons *et al.*, 1999; Lumaret *et al.*, 2012). Les LMs sont des agonistes des canaux chlorures (GluCls) présents au niveau des neurones et muscles pharyngés des nématodes ainsi que des arthropodes. L'activation des GluCls entraîne une inhibition du pompage pharyngé et la paralysie neuromusculaire (Geary *et al.*, 1993; Cully *et al.*, 1994; Sheriff *et al.*, 2002). L'IVM (*i.g.* Eqvalan) agit sur tous les stades enkystés ou non. La MOX (*i.e.* Equest) agit en plus sur les stades en hypobiose.

En raison de leur grande efficacité, ces molécules ont été utilisées de façon insuffisamment raisonnée conduisant à l'apparition de plus en plus importante d'isolats de petits strongles résistants.

B. Epidémiologie et mécanismes de résistance contre les anthelminthiques chimiques

Bien que de nombreux traitements aient été mis en œuvre, la prévalence des petits strongles reste élevée. Depuis plusieurs années, le nombre de traitements efficaces s'amenuise du fait de la sélection d'isolats résistants chez les vers, et de l'absence de découvertes de nouvelles molécules chez le cheval. Les apparitions de résistances chez les cyathostomes résultent d'une utilisation massive des traitements. Au début des années 1980, un programme nommé « *interval dose system* » conseillait aux propriétaires de traiter leurs chevaux toutes les 6 à 8 semaines afin d'empêcher la maturation des parasites et la contamination ultérieure de l'environnement par les stades infestants (Kaplan *et al.*, 2004). Cela a permis de diminuer la prévalence de *S. vulgaris*, mais ceci s'est fait au profit d'une sélection des cyathostomes. Ainsi, la proportion d'œufs de petits strongles dans les matières fécales représentait quasiment 100 % des œufs retrouvés (Herd *et al.*, 1981; Kaplan *et al.*, 2004).

a. Historique des résistances aux anthelminthiques

Une population de parasites résistante a été définie en 1976 par l'Organisation Mondiale de la Santé comme : « Une population de parasites ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'antiparasitaires habituellement létales pour des individus de cette espèce ». L'acquisition de résistances est un phénomène évolutif et dynamique issu d'une sélection génétique (Laugier and Sallé, 2015). Nielsen et al., (2014) décrit que les mutations générant des résistances surviennent de façon aléatoire, puis sont sélectionnées par la pression de sélection induite par l'utilisation répétée des traitements.

Le premier cas de résistance des petits strongles aux BMZ a été déclaré en 1965, trois ans après la mise sur le marché du thiabendazole (Kaplan, 2004). L'apparition de résistance au PYR a pris plus de temps, près de 22 ans (Chapman *et al.*, 1996). Aujourd'hui,

les LMs montrent des niveaux d'efficacité encore élevés (von Samson-Himmelstjerna, 2012), cependant des réductions d'efficacité pour l'IVM ou la MOX ont été signalées dans différents pays (Nielsen, 2022) : Australie (Edward and Hoffmann, 2008; Abbas *et al.*, 2021), Brésil (Toscan *et al.*, 2012; Canever *et al.*, 2013; Felippelli *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2021; Lignon *et al.*, 2021), Finlande (Näreaho *et al.*, 2011), Italie (Milillo *et al.*, 2009; Traversa *et al.*, 2009), Royaume-Uni (Dudeney *et al.*, 2008; Traversa *et al.*, 2009; Relf *et al.*, 2014), Etats-Unis (Lyons *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2020, 2022), Allemagne (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007), Pays-Bas (Kooyman *et al.*, 2016) et France (Traversa *et al.*, 2012). Ces réductions d'efficacité se traduisent par une vitesse de réapparition des œufs dans les matières fécales plus rapide (*Eggs Reappearance Period* - ERP) après traitement (Peregrine *et al.*, 2014; Nielsen, 2022).

b. Les mécanismes de résistance aux benzimidazoles

Les principaux mécanismes de résistance reposent sur la modification de la cible ou de l'efflux actif. Comme vu précédemment, les BMZ agissent sur la tubuline en entraînant la désintégration des microtubules. La résistance des cyathostomes est induite par la mutation du gène de l'isotype 1 de la β-tubuline (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007; Hodgkinson *et al.*, 2008). Deux SNP (*single nucleotide polymorphisms*) ont été identifiés sur le codon numéro 167 et 200 (TAC). La substitution de l'adénine par une thymine entraîne une mutation dite « faux-sens », modifiant ainsi les acides aminés en position 167 et 200, substituant une phénylalanine à une tyrosine (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007; Hodgkinson *et al.*, 2008; Whittaker *et al.*, 2017). Cela modifie la structure tridimensionnelle de la protéine β-tubuline réduisant l'affinité aux BMZ.

c. Les mécanismes de résistance au pyrantel

En raison d'un cycle de vie du stade libre facile à maintenir en laboratoire, d'une faible dangerosité et d'une sensibilité à l'ensemble des anthelminthiques, *Caenorhabditis elegans* est le nématode modèle couramment utilisé pour l'étude des mécanismes de résistance aux antiparasitaires (Holden-Dye and Walker, 2007). Différentes études réalisées sur *C. elegans* ont ainsi permis d'identifier les mécanismes en jeu dans la résistance au PYR. Des espèces moins sensibles au PYR présentaient des mutations au niveau des récepteurs *unc-29*, *unc-38* ou *unc-63* du récepteur nicotinique de

l'acétylcholine (nAChR) (Sleigh, 2010). Les orthologues de ces gènes étaient également sous-exprimés chez une souche résistante d'*Ancylostoma ceylanicum* (Kopp *et al.*, 2009). Par la suite, les différents récepteurs de sensibilité au PYR des strongles ont été pour la première fois caractérisés chez *Haemonchus contortus* (Boulin *et al.*, 2011). À l'heure actuelle, une seule étude a identifié les potentiels gènes responsables de la résistance au PYR chez les cyathostomes. L'assemblage complet du génome de *C. nassatus* a permis d'identifier sur le chromosome II, la présence de QTL[2] (*Quantitative Trait Locus*) associé à cette résistance (Sallé *et al.*, 2023). Le gène *unc-29*, candidat déjà connu chez *C. elegans* a été observé dans cette région. De plus, plusieurs autres gènes affectant la signalisation cholinergique (*dys-1*, *fer-1*, *dkf-2* et *chaf-1*), ou la fonction des canaux potassiques SLO-1 (*erg-28*) s'y trouvaient également. Les auteurs suggèrent de réaliser des études supplémentaires afin de préciser l'importance relative de chaque gène dans le phénotype de résistance.

d. Les mécanismes de résistance aux lactones macrocycliques

Peu de références sont disponibles concernant les mécanismes de résistances des nématodes aux LMs. Plusieurs études mettent en évidence le rôle des GluCls, d'une part ou des pompes, d'efflux d'autre part, dans l'acquisition de résistances. Ainsi, la répression de gènes codant pour des sous-unités des GluCls a été observée chez différentes espèces d'isolats résistantes : *Cooperia oncophora* (El-Abdellati *et al.*, 2011), *H. contortus* (Blackhall *et al.*, 1998a; b; Rao *et al.*, 2009; Williamson *et al.*, 2011) et *Ostertagia ostertagi* (El-Abdellati *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2013). Il a également été montré que la présence de SNP, dans certaines de ces sous-unités, réduisait l'affinité des LMs pour le récepteur chez *C. oncophora* (Njue *et al.*, 2004) et *H. contortus* (Feng *et al.*, 2002; McCavera *et al.*, 2009; Beech *et al.*, 2011). Concernant le second mécanisme, les résistances sont induites par la surexpression de gènes codant pour des pompes d'efflux appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP-*Binding Cassett*). Ces transporteurs sont essentiels à la cellule car ils permettent leur détoxification en expulsant les composés xénobiotiques (Thomas and Tampé, 2020). Les gènes codant pour des sous-unités, tels que *pgp-11*, *pgp-16* et *mrp-1* chez *C. oncophora* (De Graef *et al.*, 2013; Tydén *et al.*, 2014), *pgp-1*, *pgp-2* et *pgp-9* chez

[2] Région chromosomique sur laquelle sont localisés un ou plusieurs gènes impliqués dans un caractère en question.

H. contortus (Le Jambre *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 2011), *pgp-9* chez *Teladorsagia circumcincta* (Dicker *et al.*, 2011) ou *mrp-1* et *pgp-1* chez *C. elegans* (James and Davey, 2009) sont retrouvés surexprimés chez les souches résistantes aux LMs. Il a également été montré que la combinaison entre un traitement et un inhibiteur des Pgps (*i.e.* la vérapamil), augmentait l'efficacité de l'IVM et de la MOX chez des souches d'*H. contortus* résistantes (Molento and Prichard, 1999; Bartley *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été observés chez les cyathostomes. Ainsi, des L3 résistantes à l'IVM présentaient un nombre de transcrits *pgp-9* significativement plus élevé que des isolats sensibles (Peachey *et al.*, 2017). L'ajout d'un inhibiteur des Pgp a permis d'augmenter l'efficacité de l'IVM, mesurée à partir d'un test de développement larvaire. Ces résultats confirment le rôle des Pgp dans la diminution de l'efficacité de l'IVM chez les cyathostomes.

C. Ecotoxicité des lactones macrocycliques

Les insectes coprophages jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des pâturages. Ces organismes participent à la dégradation des matières fécales des herbivores et constituent un excellent bio-indicateur des effets potentiellement toxiques des traitements administrés aux animaux. Dans le contexte du contrôle des infestations parasitaires par l'utilisation des anthelminthiques chimiques, plusieurs études se sont intéressées aux effets des LMs sur la faune coprophage (Lumaret *et al.*, 2012; Jacobs and Scholtz, 2015). La première étude, réalisée au Royaume-Uni, avait pour objectif d'étudier les conséquences environnementales du traitement des bovins à l'IVM (Wall and Strong, 1987). Ainsi, les auteurs ont observé que les matières fécales du groupe traité (40 µg/kg) contenaient peu de coléoptères et de diptères et qu'elles ne présentaient pas de signe visible de dégradation. D'autres études (Wardhaugh and Rodriguez-Menendez, 1988; Madsen *et al.*, 1990; Fincher, 1992; Lumaret *et al.*, 1993; Strong *et al.*, 1996; Krüger and Scholtz, 1997, 1998a; b; Ridsdill-Smith, 1988; Errouissi and Lumaret, 2010; Römbke *et al.*, 2010; Rosales *et al.*, 2012) ont ensuite cherché à caractériser les effets de l'IVM sur différentes espèces de coléoptères (*Euoniticellus fulvus*, *Euoniticellus intermedius*, *Onthophagus binodis*, *Copris hispanus*, *Bubas bubalus*, *Onitis belial* et *Volinus distinctus*) ou de diptères (*Musca domestica*, *Musca autumnalis* et *Haematobia irritans*), en laboratoire et au pâturage. Aucun effet de la molécule n'a été observé sur la survie des formes adultes,

leur fécondité et sur la présence de boule de couvain[3]. Cependant, il a été rapporté que l'IVM administrée aux herbivores causait la mortalité des pupes et des larves durant les deux semaines post-traitement. Un retard de développement des insectes a également été observé pendant un mois suivant le traitement. Par ailleurs, les différents résultats obtenus ont mis en évidence que les matières fécales des individus traités étaient plus attractives vis-à-vis des insectes. Mahon et Wardhaugh, (1991) ont suggéré que cette plus forte attraction serait due à une modification de la flore intestinale des bovins traités, conduisant à des différences dans les propriétés des matières fécales. En 1994, Bernal et al. ont observé des profils d'acides aminés différents entre des fèces issus de bovins traités ou non, pouvant contribuer à expliquer les différences d'attractivité. Par ailleurs, Dormont et al., (2007) ont émis l'hypothèse d'une modification des composés volatils suite au traitement.

Le développement généralisé de résistances chez les cyathostomes et l'écotoxicité des molécules de synthèse actuellement les plus efficaces, nécessitent donc le développement de nouvelles stratégies de gestion du parasitisme.

III. Alternatives aux anthelminthiques chimiques actuels : des plantes bioactives aux effets directs

Dans un objectif de réduction de l'utilisation des anthelminthiques chimiques, différentes approches de contrôle sont proposées et étudiées visant à perturber le cycle de vie des parasites. Ces approches peuvent être classées en différents objectifs : (1) moduler la biologie des vers (larves ou adultes), (2) réduire le contact entre l'hôte et le stade infestant (L3), et (3) stimuler la réponse ou les défenses de l'hôte (Fig. 6) (Hoste and Torres-Acosta, 2011). Depuis 5000 av. J.-C. (première trace écrite), les plantes étaient couramment utilisées en médecine (Swerdlow, 2000). Cependant, les produits naturels d'origine végétale ont été mis de côté au profit des molécules chimiques de synthèse. Néanmoins, depuis l'apparition de résistances, l'utilisation des plantes retrouve un intérêt

[3] Boule de matières fécales confectionné par l'insecte dans laquelle la femelle pond ses œufs.

grandissant dans l'objectif de les utiliser pour altérer la biologie des parasites (cette partie III) et/ou stimuler la réponse de l'hôte face à l'infestation (partie V).

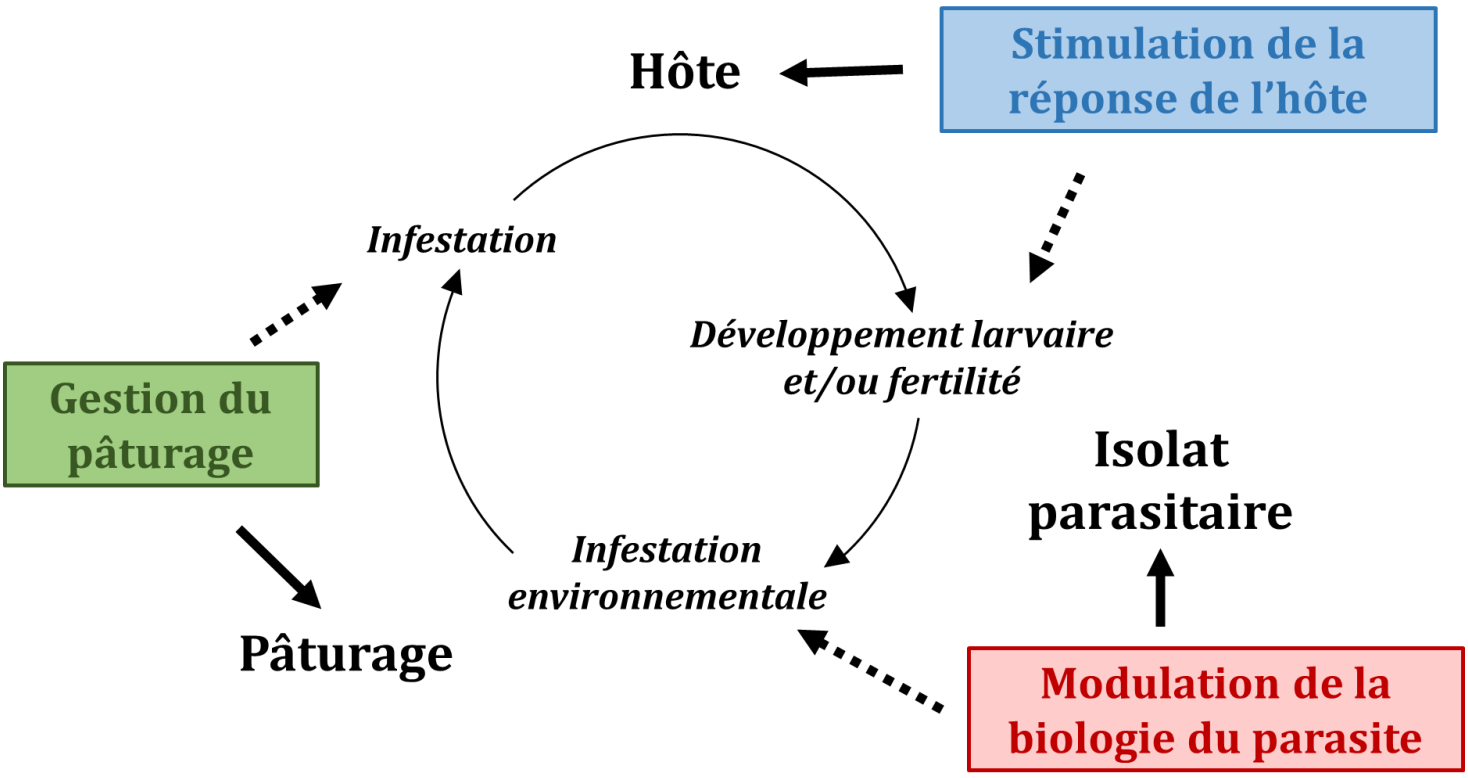


Figure 6 : Trois approches de contrôle des nématodes gastro-intestinaux de (Hoste and Torres-Acosta, 2011)

: cibles directes des actions.

: conséquences indirectes possibles sur le cycle de vie du parasite.

A. Les métabolites secondaires des plantes (Mbs)

Pour répondre aux différents stress abiotiques et aux attaques des prédateurs ou pathogènes (stress biotiques), les plantes synthétisent des métabolites secondaires (MbS) (Bennett and Wallsgrove, 1994; Harborne, 1999; Zaynab *et al.*, 2018; Erb and Kliebenstein, 2020). Les différentes conditions environnementales (UV, intensité lumineuse, température, qualité du sol, ou autre…) conditionnent cette synthèse (Yang *et al.*, 2018), créant ainsi un panel de plantes et de molécules à vertu médicinale (Larousse des plantes médicinales - Andrew Chevallier). Ces molécules sont classées en trois principales familles : les alcaloïdes (ou composés azotés), les terpènes et les composés phénoliques (Harborne, 1999; Bourgaud *et al.*, 2001).

a. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des MbS découverts et utilisés pour la première fois il y a 4000 ans ; ils sont reconnus pour leur richesse thérapeutique (Amirkia and Heinrich, 2014). Il s'agit de molécules très diversifiées de par leur origine botanique et biochimique, mais également sur le plan de leur structure et de leur action pharmacologique (Dey *et al.*, 2020). Retrouvés dans 20% des espèces végétales (Srivastava and Srivastava, 2013), les alcaloïdes peuvent également être présents chez les animaux (Dey *et al.*, 2020; Bhambhani *et al.*, 2021). Du fait de cette importante diversité, ces molécules peuvent être classées selon différents systèmes. Elles sont toutefois généralement classées en fonction de leur précurseur sous trois groupes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes (Aniszewski, 2007; Dey *et al.*, 2020). Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés (L-ornithine, L-lysine, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane ou L-histidine) et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique (Aniszewski, 2007). Il s'agit de substances présentant une grande activité biologique, dont les principales connues sont la cocaïne, la quinine, la dopamine ou la morphine. Les proto-alcaloïdes sont également dérivés d'acides aminés (L-tryptophane et L-tyrosine), mais ne présentent pas d'atome d'azote dans leur hétérocycle. Ce groupe étant le plus petit des trois, est composé de molécules (*i.e.* la yohimbine, la mescaline et l'hordénine) utilisées dans divers troubles de santé tels que les maladies mentales, la douleur et la névralgie (Chini *et al.*, 1992). Enfin, les pseudo-alcaloïdes ne dérivent pas directement d'acides aminés, mais de leur précurseur. Parmi les pseudo-alcaloïdes, nous pouvons retrouver la capsaïcine (molécule active du piment) ou encore la caféine.

Tableau 2 : Classification des terpènes

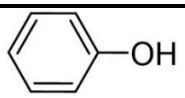
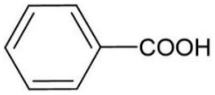
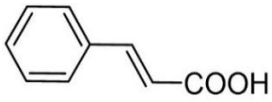
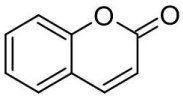
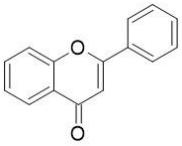
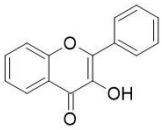
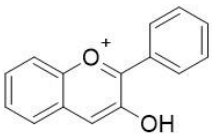
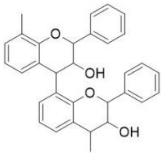
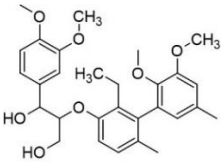
Nom	Formule générale	Exemple de molécules
Isoprènes	C_5H_8	Isoprènes
Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$	Linalol, Limonène, Thymol ...
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	Artémisinine, Chamazulène, Lactucine …
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	Phytol, Stéviol, Taxol …
Sesterpènes	$C_{25}H_{40}$	Leucosceptrine
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	Squalène, Acide ursolique, Acide bétulinique
Tétraterpènes	$C_{35}H_{64}$	Zéaxanthine, Lutéine, β-carotène
Polyterpènes	$(C_5H_8)_n$	

b. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures, c'est-à-dire des composés organiques constitués exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Cependant, la majorité de ces molécules contiennent des groupes fonctionnels (hydroxyle, carbonyle, cétone ou aldéhyde) et sont donc nommées terpénoïdes ou isoprenoides (Paduch *et al.*, 2007). Les appellations terpènes et terpénoïdes sont souvent utilisées de manière interchangeable, même si elles présentent de légères différences (Cox-Georgian *et al.*, 2019). Les terpènes ont différentes fonctions dans la plante, intervenant dans les voies de biosynthèse, comme protecteur thermique, mais aussi dans la pigmentation ou la composition d'arômes et d'odeur permettant de se défendre des prédateurs (Cox-Georgian *et al.*, 2019). Classés sur la base de leur nombre de carbone et d'hydrogène (Tableau 2), les terpènes sont synthétisés par deux voies différentes : la voie mévalonate, réalisée dans le compartiment cytosolique (Bach, 1987) ou la voie Rohmer (non-mévalonate), qui a lieu dans les plastes (Rohmer, 1999). Ces deux voies permettent la synthèse des précurseurs des terpènes (Paduch *et al.*, 2007). En médecine traditionnelle comme en médecine moderne, ces molécules sont utilisées comme antibactériens (Himejima *et al.*, 1992; Bennett and Wallsgrove, 1994) ; elles présentent des propriétés anticancéreuses (Miller *et al.*, 2013; Sobral *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017) et anti-plasmodiales (*e.g.* artémisinine (*Artemisia annua*), lactone sesquiterpénique utilisée initialement en médecine traditionnelle

chinoise (Tu, 2011)). Ces molécules possèdent également une activité nématicide, comme observée sur *C. elegans* (Abdel-Rahman *et al.*, 2013) et une activité *in vivo*, à la suite d'ingestion de chicorée au pâturage (Scales *et al.*, 1995; Marley *et al.*, 2003; Kidane *et al.*, 2010; Peña-Espinoza *et al.*, 2016).

Tableau 3 : Classification des composés phénoliques

Nom	Structure chimique de base	Exemple de molécules
Phénols simples		Catechol, Resorcinol, Vanilline, ...
Acides phénoliques		Acide gallique, Acide salicylique, Acide gentisique, …
Acides hydroxycinnamiques		Acide caféique, Acide coumarique, Acide férulique, …
Coumarines		Scopolétine, Umbelliferone, Esculétine, …
Flavones		Apigénine, Lutéoline, Chrysoériol, …
Flavonoles		Quercetine, Kaempférol, Myricétine, …
Anthocyanines		Cyanidine, Malvidine, Delphinidine, …
Tanins condensés		Procyanidine, Prodelphinidine
Lignines		

c. Les composés phénoliques

Largement répandus dans le règne végétal, les composés phénoliques (CPs) constituent le deuxième groupe de composés organiques le plus abondant, juste derrière la cellulose (Santos-Buelga *et al.*, 2012; de la Rosa *et al.*, 2019). Les CPs sont des molécules colorées et odorantes, jouant un rôle attractif ou répulsif, permettant à la plante d'attirer les pollinisateurs et de se défendre contre les agresseurs (insectes, champignons, bactéries ou virus) (Zepka *et al.*, 2021). Ils protègent également la plante des rayons solaires ultraviolets (UV). Les CPs présentent pour la plupart une forte activité antioxydante (Miguel, 2010; Li *et al.*, 2016; de Lima Cherubim *et al.*, 2020; Lyu *et al.*, 2020). Plusieurs études ont fait état de leurs atouts vis-à-vis de la réduction du risque de maladie coronarienne (Hertog *et al.*, 1993, 1995), et de leurs effets positifs sur les maladies cardiovasculaires (Knekt *et al.*, 1996; McCullough *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Grosso *et al.*, 2017), le diabète de type II (Jacques *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Zamora-Ros *et al.*, 2014; Xiao and Högger, 2015; Tresserra-Rimbau *et al.*, 2016), mais également sur les cancers (Hirvonen *et al.*, 2001; Boffetta *et al.*, 2010; Hui *et al.*, 2013; Zamora-Ros *et al.*, 2014) ou les maladies neuro-dégénératives (Commenges *et al.*, 2000; Letenneur *et al.*, 2007; Devore *et al.*, 2012). Pour ces différentes raisons, les CPs sont fortement plébiscités en santé humaine. Toutes ces molécules sont composées d'au moins un cycle aromatique et sont divisées en deux groupes : les phénols avec un cycle aromatique (les phénols simples et les acides phénoliques) ou les polyphénols (dérivés des phénylpropanoïdes présentent plus d'un cycle phénolique) (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Ces différentes molécules sont principalement synthétisées par le métabolisme des phénylpropanoïdes, impliquant la présence de précurseurs synthétisés par la voie de l'acide shikimique ou de l'acide malonique (Saltveit, 2017; de la Rosa *et al.*, 2019). Le groupe des polyphénols est très diversifié et comprend plusieurs classes bien connues (Tableau 3), comme les coumarines, les flavonols, les anthocyanes ou encore les tannins condensés (Santos-Buelga *et al.*, 2012).

Toutes ces molécules, ainsi que les plantes qui en sont composées, présentent de nombreux bénéfices pour la santé humaine. L'achat de compléments alimentaires à base de plantes a doublé entre les années 2000 et 2017 (Smith *et al.*, 2018), confirmant un intérêt croissant pour la phytothérapie. L'utilisation de traitements à base de plantes en

médecine vétérinaire se développe également (ANSES - Phytothérapie et aromathérapie : adapter l'évaluation des risques en médecine vétérinaire, 2022). Les plantes peuvent être utilisées de différentes façons, en additif alimentaire, ou comme alicament, c'est-à-dire comme source alimentaire principale, alliant nutrition et effet bénéfique pour la santé. Dans un objectif de contrôle des strongyloses équines, l'alimentation des chevaux pourrait inclure ces plantes et molécules.

B. Activité directe des plantes en médecine vétérinaire

Largement utilisées en médecine humaine (Hümer *et al.*, 2010; Sen and Samanta, 2015), les plantes suscitent un intérêt grandissant en médecine vétérinaire. Cependant, leur utilisation pour soigner les animaux destinés à l'alimentation humaine se heurte à des difficultés réglementaires. En effet, le règlement (CE) N°470/2009 de l'ANSES définit, pour chaque médicament, une limite maximale de résidus (LMR) des substances pharmacologiquement actives permise dans les aliments d'origine animale. L'identification de cette limite, en deçà de laquelle la consommation du produit est sans risque pour la santé humaine, est délicate pour les traitements à base de plantes car il est difficile d'identifier des résidus marqueurs pouvant être dosés. Cette difficulté est amplifiée dans le cas des huiles essentielles (HE) du fait du nombre important de molécules chimiques qui les composent. En conséquence, l'ANSES développe des méthodologies d'évaluation de ces produits afin de les légaliser totalement (ANSES - Phytothérapie et aromathérapie chez les animaux producteurs de denrées alimentaires. Proposition d'une méthodologie d'évaluation du risque pour le consommateur). Dans notre contexte de contrôle des infestations chez les équidés, majoritairement non destinés à la production de viande, ces réglementations posent moins de problèmes. Néanmoins, il reste les réglementations concernant les effets dopants (Loi du 2 juin 1891 ayant pour objet de réglementer l'autorisation et le fonctionnement des courses de chevaux) ou affectant le bien-être animal (article 9 à 15 de la loi n° 76-629).

a. Activité antiparasitaire des plantes et de leurs métabolites secondaires contre les NGIs

Le Département de l'Agriculture des États-Unis (USDA) met à disposition une base de données classifiant les MbS de plantes en fonction de leur activité. Celle-ci comporte 57 MbS et 1029 plantes (≥ à 1 MbS) classifiées comme présentant une activité

anthelminthique. Comme évoquée plus tôt, la découverte de l'artémisinine comme antiparasitaire (Tu, 2011) est un excellent exemple de l'utilisation des plantes. Cette molécule a en effet été purifiée à partir d'Armoise chinoise ou Qing Hao (*A. annua*). Un traitement oral ou intramusculaire de Qing Hao réalisé chez des patients infestés par des plasmodies (*Plasmodium falciparum)* a significativement réduit leurs symptômes et le nombre de parasites dans le sang, comparativement à leurs homologues traités par voie orale avec de la méfloquine ou par voie intramusculaire avec de la quinine (Jiang *et al.*, 1982). Différentes études ont été menées afin d'évaluer l'activité antiparasitaire *in vitro* d'extraits de plantes, d'HE ou de MbS (Tableau S1). Parmi ces études *in vitro*, cinq essais ont également évalué l'activité antiparasitaire *in vivo* des composés testés (Carvalho *et al.*, 2012; André *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2016; André *et al.*, 2017; Štrbac *et al.*, 2022). Ainsi, une étude réalisée sur le rat n'a montré aucun effet d'un régime de 250 mg/kg composé d'HE de Lippia (*Lippia sidoides*) ou d'extrait de *Piper tuberculatum* sur les OPGs (Carvalho *et al.*, 2012). Néanmoins, une diminution du nombre de vers adultes a été observée dans le cas de l'administration de *L. sidoides*. Les quatre autres études ont été menées sur des moutons. Une première étude n'a observé aucun effet d'un traitement de 300, 150 ou 75 mg/kg PV d'HE de thym (*Thymus vulgaris*) sur les OPGs excrétés aux jours 0, 6 et 12 post-traitement (Ferreira *et al.*, 2016). Une autre étude a observé une efficacité de 24,4 %, 14 jours après un traitement unique de 100 mg/kg PV d'HE de *T. vulgaris* (Štrbac *et al.*, 2022). Enfin, l'acétate de carvacrol (André *et al.*, 2016), le thymol et l'acétate de thymol (André *et al.*, 2017) ont montré des efficacités de 65,9 % (j16 post-traitement), 59,8 % (j14) et 76,2 % (j14) sur les OPGs respectivement, à la suite de l'administration d'une unique dose de 250 mg/kg. D'autres études *in vivo* ont mis en évidence l'activité anthelminthique de plantes entières utilisées sous forme de fourrage, de foin, d'ensilage ou de granulés. Elles portent en particulier sur la chicorée (*Cichorium intybus*), riche en lactones sesquiterpéniques (Marley *et al.*, 2003; Peña-Espinoza *et al.*, 2016), et sur le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), riche en tannins condensés (Paolini *et al.*, 2003, 2005; Heckendorn *et al.*, 2006; Manolaraki *et al.*, 2010; Whitney *et al.*, 2013; Gaudin *et al.*, 2016).

b. L'utilisation des plantes dans la lutte contre les strongles des équidés

Différents criblages de l'activité antiparasitaire de plantes ont été réalisés sur les strongles des équidés (cheval et âne). Trois types de tests *in vitro* sont employés permettant d'évaluer l'activité inhibitrice des plantes sur l'éclosion des œufs, la migration des larves ou leur développement (Raza *et al.*, 2019). Selon les études, les plantes évaluées ont subi différents traitements afin d'être testées : une extraction à l'eau (Payne *et al.*, 2013; Peachey *et al.*, 2016; Buza *et al.*, 2020) ou au méthanol (Peachey *et al.*, 2015; Flota-Burgos *et al.*, 2017), une utilisation sous forme transformée en granulés (Collas *et al.*, 2018) ou une purification jusqu'à l'obtention du MbS (Payne *et al.*, 2018; Maestrini *et al.*, 2019). Toutes ces études (Tableau S2) ont rapporté des effets antiparasitaires des extraits évalués, mais qui n'affectaient pas nécessairement l'ensemble des stades étudiés. Ainsi, certaines plantes comme le concombre du prophète (*Cucumis prophetarum L*) ou l'*Acacia nilotica (L.) Delile*, testées à une concentration de 10 mg/mL, présentaient une activité sur l'éclosion des œufs mais pas sur la migration des larves (Peachey *et al.*, 2015). Par ailleurs, le solvant utilisé pour l'extraction a pu moduler l'activité de l'extrait. Ainsi, solubilisé dans de l'eau, les extraits d'absinthe (*Artemisia absinthium L*) et de chénopode blanc (*Chenopodium album L*) ont présenté une activité d'inhibition de l'éclosion des œufs et de la migration des larves pour une concentration de 10 mg/mL tandis qu'aucune activité n'a été observée pour une solubilisation dans du DMSO.

Contrairement aux résultats positifs obtenus *in vitro*, sept études *in vivo* rapportent des efficacités variables associées à l'utilisation de plantes. Ainsi, trois études concluent à l'absence d'effets des plantes testées. La première, réalisée sur des ânes, s'est intéressée à évaluer l'efficacité d'un vermifuge Paraxitebio® commercialisé à base de plantes composé de mallotus (*Mallotus philippinensis*), Chardon-Marie (*Carduus marianus*), ortie brûlante (*Urtica urens*), gentiane jaune (*Genziana lutea*) et d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) (Papini *et al.*, 2020). Le traitement a été administré à j0 et à j21 (doses de 8,3g/100 kg PV[4]) à huit individus dont les OPG ont été comparés avec ceux de six individus témoins au cours d'une période de 28 jours. Dans une seconde étude, les auteurs (Buono *et al.*, 2019) ont mesuré l'efficacité de deux régimes intégrant de l'ail (*Allium sativum*) sur des chevaux

[4] Poids vif.

répartis en trois groupes de cinq individus. Un premier groupe a consommé quotidiennement durant 15 jours un additif composé de 40g d'ail en poudre déshydraté, mélangé à 200g d'avoine. Le second groupe a ingéré 40g d'ail frais écrasé, distribué dans les mêmes conditions. Le dernier groupe (contrôle) ne recevait aucun traitement. Aucune de ces deux études n'a observé de réduction du nombre d'OPG dans les groupes traités face aux groupes contrôles. La troisième étude, réalisée par Collas *et al.*, (2018), a évalué l'effet d'une cure de granulés de sainfoin (*O. viciifolia*) dans l'alimentation du cheval. Ainsi, les auteurs ont comparé l'excrétion d'œufs de strongles de jeunes chevaux naturellement infestés recevant pendant 18 jours soit (i) un régime composé à 70% MS de granulés déshydratés de sainfoin riches en tannins (3.6% MS de tanins condensés dans la ration), (ii) un régime enrichi en protéines, (iii) un régime témoin. Les trois régimes étaient iso-énergétiques, couvrant en moyenne 94% des besoins énergétiques des animaux, et les régimes « sainfoin » et « protéines » étaient iso-protéiques et excédents en protéines (227% des besoins protéiques couverts vs. 93% dans le lot témoin), ce qui était acceptable au plan nutritionnel sur la durée de la cure. Cette durée était comparable à celle mise en œuvre dans les études rapportant un effet anthelminthique chez les petits ruminants (Hoste *et al.*, 2012). Les régimes « protéines » et « témoin » ont été comparés pour évaluer l'intérêt d'une suralimentation protéique, tandis que la comparaison des régimes « sainfoin » et « protéines » a permis de tester les effets des métabolites secondaires du sainfoin. Les auteurs n'ont observé aucun effet du régime sur les OPG.

À l'inverse, quatre études *in vivo* ont rapporté des effets positifs des plantes testées sur les cyathostomes. Ainsi, dans l'étude d'Arfuso et al., (2020), 11 ânes ont été traités également avec le Paraxitebio®. Selon les instructions du fabricant, le produit (50 g par âne) a été administré deux fois à quinze jours d'intervalle (j-1 jour du traitement et j14 post-traitement). Le nombre d'OPG et le pourcentage de développement des œufs ont été mesurés à j-1, 7, 14 et 28. Des paramètres hématologiques, ont été mesurés à partir d'une prise de sang réalisée à j-1 et j28. Le traitement n'a eu aucun effet sur le développement des larves. Cependant, une diminution du nombre d'OPG a été observée au 28^{e} jour. Le volume globulaire moyen, les globules blanc, éosinophiles et basophiles ont diminué dans le lot traité, contrairement aux globules rouges et lymphocytes qui ont augmenté. Une diminution du nombre d'OPG dans les matières fécales de dix ânes a également été rapportée suite à un traitement à base de poudre (n = 5) ou d'extrait aqueux (n = 5) brut d'ajowan (*Trachyspermum ammi*) administré à j0 (Imani-Baran *et al.*, 2020). Dans les deux

groupes traités, la réduction a été progressive au cours du temps (j7, j14 et j28) avec une différence significative entre chaque prélèvement. L'effet du traitement a été plus important à la concentration la plus élevée testée (une seule dose à j0 de 1 vs. 3 g/kg PV). Les auteurs de cette étude ont également observé une différence d'excrétion significative par rapport au groupe contrôle. Des réserves semblent néanmoins devoir être émises sur ces résultats car les groupes traités présentaient une excrétion plus faible que le groupe témoin au début de l'expérimentation. Enfin, deux dernières études ont rapporté une forte réduction de l'excrétion d'œufs de strongles chez des animaux soumis soit à un régime intégrant des granulés déshydratés de sainfoin (Grimm *et al.*, 2022), soit à un régime de mélange d'oignon (*Allium cepa*) broyé, de flocons de noix de coco (*Cocos nucifera*) et de muesli (1,2 kg) (Jatzlau *et al.*, 2014). La première étude a évalué les effets d'un régime distribué pendant 28 jours et composé de 17% MS de granulés de sainfoin et de 83% MS de foin de graminées (0,44 % MS de tannins condensés dans le régime). Les auteurs ont rapporté que l'excrétion moyenne d'OPG sur les 28 jours était significativement plus faible dans le groupe recevant des granulés de sainfoin comparativement à celle du groupe contrôle. Ils ont cependant indiqué n'avoir observé aucun effet d'interaction jour × régime ni de variation temporelle d'excrétion ce qui interroge sur leur conclusion mettant en avant l'efficacité du régime testé. Concernant la seconde étude (Jatzlau *et al.*, 2014), les auteurs ont conclu à l'efficacité du régime testé sur 12 chevaux pendant 10 jours alors que ce régime n'a pas été comparé à un groupe contrôle. Ils se sont simplement appuyés sur l'observation d'une diminution du nombre d'œufs et du développement de ces œufs en L3 mesurés à partir de deux échantillons de matières fécales par individu récoltés en fin de traitement (j11) et cinq jours plus tard (j15). Leurs résultats ne comportent, en outre, aucun test statistique.

In fine, les tests *in vitro* permettent d'identifier différentes phases du cycle parasitaire ciblées par les plantes et les MbS qui les composent. Cependant, aucune des études *in vivo* réalisées sur les équins n'a confirmé un effet suffisant justifiant leur utilisation comme vermifuge.

IV. Stratégies indirectes de gestion du parasitisme

Agir directement sur le nématode n'est pas l'unique stratégie permettant le contrôle des infestations. En effet, une gestion spécifique du pâturage permettrait de réduire les contaminations environnementales et l'ingestion de larves par les animaux. L'hôte peut également être la cible d'action visant à améliorer ses défenses contre les parasites (Fig. 6).

A. Gestion du pâturage

Le concept de gestion du pâturage a été introduit par (Michel, 1969, 1976) s'appuyant sur des principes d'hygiène, appliqués aux milieux confinés. L'objectif est d'appliquer des principes similaires dans un environnement dit « ouvert », afin de réduire le contact entre les hôtes sensibles et les stades infestants (L3). La gestion du pâturage comme outil de lutte nécessite d'être adaptée aux conditions épidémiologiques et climatiques (Barger, 1999). Les méthodes utilisées s'appuient sur des stratégies à la fois « défensives » et « offensives ».

a. Stratégies « défensives »

Les stratégies « défensives » consistent à mobiliser l'utilisation de l'espace ou du temps. Ainsi, différents travaux ont mis en évidence l'intérêt de réduire le chargement au pâturage (*i.e*. nombre d'individus présents sur une surface donnée) pour limiter l'infestation parasitaire (Thamsborg *et al.*, 1996; Mahieu, 2013). En effet, en condition de faible chargement, le niveau d'infestation environnementale est réduit, limitant ainsi la réinfestation. Une autre pratique liée à l'utilisation de l'espace consiste à faire pâturer les individus les plus sensibles au parasitisme sur des parcelles peu infestées. Les stratégies basées sur l'utilisation du facteur temporel visent à exploiter différents facteurs environnementaux affectant le développement du parasite. Dans ce cadre, certaines études menées sur des petits ruminants ont rapporté les effets positifs d'un pâturage tournant pour limiter l'infestation. Ainsi, dans un environnement tropical humide (Barger *et al.*, 1994) ou dans un environnement tempéré frais (Colvin *et al.*, 2008), un pâturage tournant sur des parcelles intégrant des périodes suffisamment longues de « repos » au cours desquelles les surfaces infestées ne sont pas re-pâturées a permis de réduire la

charge parasitaire des animaux. L'efficacité de cette pratique dépend néanmoins de la capacité plus ou moins importante de survie des larves dans le milieu extérieur. En milieu tempéré, plusieurs espèces parasitaires dominantes chez les ruminants sont capables de survivre dans les pâturages pendant 70 jours durant les étés chauds et jusqu'à 140 jours l'hiver (*e.g*. *Trichostrongylus sp*. (Andersen *et al.*, 1970)). Des études réalisées en laboratoire rapportent que les larves L3 de strongles équins résistent peu aux températures inférieures à 20 °C et à celles supérieures à 30 °C, ainsi qu'à une humidité inférieure à 20 % (Mfitilodze and Hutchinson, 1987). Toutefois, d'autres études en conditions d'élevage ont montré que les larves L3 étaient capables de survivre dans différentes conditions climatiques, mais avec des pourcentages de développement plus faibles en situations extrêmes (Nielsen *et al.*, 2007). Ceci laisse présager d'une efficacité limitée de cette pratique pour la gestion des strongyloses équines, mais aucune étude en lien avec les stratégies « défensives » n'a été testée sur le cheval. En outre, le pâturage tournant nécessite une gestion fine des lots d'animaux et des surfaces qui peut être compliquée à mettre en œuvre pour les centres équestres ou pour des systèmes d'élevage possédant des lots de faible effectif et des surfaces limitées.

b. Stratégies « offensives »

Les stratégies dites « offensives » consistent à « nettoyer » les parcelles des parasites, par l'utilisation de différents procédés physiques, chimiques ou biologiques. Chez les équidés, le ramassage des fèces a permis de réduire l'infestation des parcelles (Matthee *et al.*, 2002; Corbett *et al.*, 2014). Cependant, cette stratégie est laborieuse et l'efficacité est conditionnée à une fréquence d'intervention élevée. Au Costa Rica, une étude *in vitro* déposant de la sciure de bois, composé de pochot (*Bombacopsis quinata*), de gmelina (*Gmelina arborea*), de cyprès (*Cupressus lusitanica*) et de teck (*Tectona grandis*) sur des matières fécales d'ovins en laboratoire, a permis une réduction des larves de 65 à 98 % par rapport aux groupes contrôles (Víctor Álvarez *et al.*, 2007). Néanmoins, cette méthode semble compliquée à mettre en œuvre au pâturage. Dans le cadre de procédés biologiques, des études se sont penchées sur l'utilisation de champignons nématophages (*i.e*. prédateurs des stades libres des nématodes). En particulier, *Duddingtonia flagrans* présentant une résistance élevée au transit digestif de l'hôte (Larsen *et al.*, 1995). L'objectif est d'administrer des spores aux herbivores, pour qu'elles soient excrétées dans

les matières fécales au contact des stades parasitaires en développement. Une administration quotidienne a montré des résultats encourageants chez le cheval (Braga *et al.*, 2009; Healey *et al.*, 2018; Fausto *et al.*, 2021). Une autre stratégie « offensive » consiste à mobiliser le pâturage mixte. Celui-ci consiste à faire pâturer différentes espèces d'herbivores sur une même parcelle à l'échelle d'une saison de pâturage (alternativement ou simultanément). Cette pratique aiderait à réduire la contamination environnementale par un mécanisme de dilution. En effet, comme les espèces de nématodes sont pour la plupart spécifiques de leur hôte, la consommation de larves infestantes par un animal d'une autre espèce entraîne une rupture du cycle parasitaire. Une étude récente a mis en évidence une réduction du nombre d'œufs de cyathostomes excrétés dans les fèces de chevaux pâturant avec des bovins, comparativement à leurs homologues pâturant seuls (Forteau *et al.*, 2020). Cependant, Fleurance et al., (2022) ont montré que le pâturage mixte ne constituait pas une solution « clé en main ». Une conduite incitant les bovins à pâturer les zones de végétation à proximité des fèces des chevaux est nécessaire, afin de tirer pleinement parti des bénéfices de l'association des deux espèces.

B. Gestion de l'hôte

L'objectif de cette stratégie est de sélectionner des hôtes résistants (*i.e.* capables d'éliminer les parasites) ou de leur permettre de mieux supporter les pathologies induites par les parasites.

a. Sélection génétique

Cette approche vise à sélectionner des individus naturellement résistants, cette résistance étant principalement mesurée par le nombre d'OPG ou par des marqueurs immunitaires. Ces marqueurs peuvent être la quantité d'anticorps (ACs) spécifiques aux nématodes ou le nombre d'éosinophiles, cellules immunitaires participant activement à la réponse anti-NGIs (McRae *et al.*, 2015). Les caractères phénotypiques favorisant la résistance sont, pour la plupart, sous contrôle génétique (Barger, 1989; Stear *et al.*, 1999; Miller and Horohov, 2006). Ainsi, les stratégies de sélection se sont rapidement tournées vers la génétique, dans l'objectif d'identifier des QTL responsables des résistances. Cela a été étudié chez les petits ruminants (Miller and Horohov, 2006; Beraldi *et al.*, 2007; Sallé *et al.*, 2012). Néanmoins, l'identification de ces QTL n'apparaît pas évidente (Sallé *et al.*,

2012, 2021). Premièrement, les phénotypes de résistances basés sur les coproscopies sont mal définis, la corrélation entre les OPG et le niveau de résistance est faible. De plus, il est difficile de disposer d'une taille d'échantillons suffisamment grande (n = 1000 animaux requis), permettant une identification précise des QTLs. De plus, l'acquisition de résistances présente un coup biologique (croissance, nutrition ou reproduction) réduisant les performances de l'animal (Greer, 2008; Douhard *et al.*, 2022; Hayward, 2022). Cet aspect va à l'encontre du système de sélection des chevaux (courses ou sport) par l'industrie équine, se basant principalement sur les performances[5].
À ce jour, une seule étude a été réalisée sur le cheval, corrélant des traits phénotypiques de santé des chevaux (niveau d'OPG, hématocrite et nombre d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes) à l'identification de QTLs associés (Dias De Castro *et al.*, 2022). Réalisé sur 90 individus, 33, 30 et 21 gènes ont été identifiés pour les OPG, les éosinophiles et les neutrophiles, respectivement. Les QTLs associés expliquaient respectivement 2,86, 2,73 et 2,33% de la variation génétique.

De par des contraintes techniques, la sélection génétique est encore difficile à mettre en place pour les chevaux. Actuellement, le dénombrement des OPGs reste le critère utilisé pour identifier des individus résistants en dépit d'une corrélation limitée entre les deux variables.

b. Améliorer la résilience et la résistance grâce à la complémentation nutritionnelle

La présence de NGIs dans le tube digestif est associée à des déficits physiopathologiques légers à sévères, tels qu'une diminution de l'appétit, de la malabsorption et une mauvaise digestion (Corning, 2009; Hoste and Torres-Acosta, 2011). À la suite de différents résultats, une théorie a été établie selon laquelle une complémentation alimentaire, couvrant les manques induits par une infestation, permettrait d'améliorer la capacité de l'hôte à tolérer les effets négatifs des vers (*i.e.* à faire preuve de résilience) voire à mieux résister à l'infestation (Coop and Kyriazakis, 1999). Quelques études ont ainsi évalué l'intérêt d'une complémentation alimentaire vis-à-vis de

[5] La sélection se base sur des indices de performance, mesurés au cours d'une période donnée sur les différents résultats obtenus par un cheval en courses ou en compétitions équestres. Cela permet de comparer les chevaux les uns par rapport aux autres et d'évaluer leur qualité lors d'un achat.

la lutte contre les strongles chez le cheval. Une première étude, évaluant les effets d'un régime hyper-énergétique chez des juments de selle en lactation au pâturage, n'a montré aucun effet sur la quantité d'œufs excrétés (Collas *et al.*, 2014). Une seconde étude évaluant cette fois-ci les effets d'une suralimentation protéique de courte durée (*i.e.* 227% des besoins azotés pendant 18j vs. 93% des besoins azotés couverts chez le groupe témoin) n'a également pas mis en évidence d'effet sur le parasitisme (pas de réduction des OPGs ni du nombre estimé de vers adultes) (Collas *et al.*, 2018). Ces résultats rejoignent ceux de certaines études conduites chez la chèvre (Torres-Acosta *et al.*, 2004, 2006). Ces derniers auteurs ont toutefois observé un effet de la complémentation alimentaire sur la résilience des chèvres, au travers d'une croissance plus importante des animaux supplémentés. D'autres études conduites sur les petits ruminants ont néanmoins rapporté une amélioration de la résistance de l'hôte à la suite d'une supplémentation (Gárate-Gallardo *et al.*, 2015). En particulier, il a été observé qu'une supplémentation en protéines favorisait la résistance d'animaux dont la disponibilité protéique était limitée, telle que des chèvres (Etter *et al.*, 2000) et brebis (Houdijk *et al.*, 2003) productrices de lait, ou des brebis gestantes (Donaldson *et al.*, 2001).

c. Stimulation du système immunitaire

Le SI permet à l'hôte de se défendre seul contre une infestation. Nous avons vu précédemment que certains animaux possédaient des prédispositions génétiques leur attribuant une résistance. Ces prédispositions sont généralement liées à un SI plus réactif (Miller and Horohov, 2006). Stimuler celui-ci permettrait aux animaux non génétiquement prédisposés d'améliorer également leurs défenses. Dans cet objectif, la vaccination pourrait constituer une méthode durable et peu coûteuse pour renforcer l'immunité contre les strongles. Toutefois, les vaccins sont difficiles à mettre en place, et des données expérimentales obtenues chez les ruminants suggèrent que les strongles présentent une plasticité suffisante pour y échapper (Sallé *et al.*, 2018). À l'heure actuelle, seul un vaccin est commercialisé (*i.e.* Australie, Afrique du Sud et au Royaume-Uni) permettant aux petits ruminants de se défendre contre *H contortus* (*i.e.* Barbervax®) (Kebeta *et al.*, 2020). Certains MbS de plantes présentent des propriétés stimulant le SI et permettraient donc d'améliorer les défenses de l'hôte (contrôle indirect des infestations).

V. La réponse immunitaire et sa modulation par les plantes

Les organismes sont constamment menacés par l'attaque d'agents pathogènes. De son étymologie, pathogène est tiré du grec ancien composé de *páthos* « souffrance » et de *génos* « naissance ». Un organisme pathogène est défini dans le Larousse comme un organisme « qui provoque une maladie ». Parmi ces organismes sont retrouvés différents agents biologiques : bactéries, virus, champignons microscopiques et les endoparasites (protozoaires et helminthes) qui nous intéressent ici. Sous la pression de ces menaces, l'hôte a développé diverses stratégies de défense afin d'éviter l'infestation, regroupant plusieurs organes, tissus, cellules et molécules, nommés « système immunitaire ». L'objectif du SI est de préserver l'organisme des agressions externes (du non soi), en neutralisant au maximum les agents et leurs effets nocifs. C'est à la suite d'interactions répétées, que le SI a évolué permettant une défense spécifique adaptée au pathogène (*i.e.* réponse adaptative) (Dybdahl and Lively, 1998; Decaestecker *et al.*, 2007; Vorburger and Perlman, 2018).

Cette partie s'intéresse donc à la réponse spécifique du SI, c'est-à-dire à son mode d'intervention pour défendre l'hôte vis-à-vis des infestations par les NGIs. Du fait d'un nombre limité d'études réalisées sur les équidés, nous nous appuierons premièrement sur le modèle murin, avant de nous intéresser à ce qui est connu chez le cheval. Nous terminerons en abordant l'activité d'immunostimulation des plantes.

A. La réponse immunitaire de type Th2

Les premières études s'intéressant à la réponse immunitaire spécifique aux NGIs ont été réalisées sur un modèle murin (Finkelman *et al.*, 1997), dont l'objectif était de caractériser la réponse immunitaire induite. Pour cela, quatre NGIs des rongeurs ont été utilisés : *Trichuris muris* (clade I, Fig. 1)*, Trichinella spiralis* (clade I, Fig. 1), *Heligmosomoides polygyrus* et *Nippostrongylus brasiliensis.* Ils appartiennent au clade V, et sont donc phylogénétiquement les plus proches des cyathostomes (Fig. 1). Les réponses immunitaires différaient légèrement selon le nématode, mais plusieurs résultats communs ont été observés. Premièrement, les cellules lymphocytes T CD4+, cellules

activatrices du SI, étaient présentes et essentielles à la protection de l'hôte. Deuxièmement, l'interleukine 4 (l'IL-4), cytokine inductrice de la différenciation des lymphocytes T auxiliaires naïfs semblait : (i) être nécessaire à la protection de l'hôte et (ii) limiter la gravité de l'infestation en induisant des mécanismes de protection (Finkelman *et al.*, 1997). L'étude de Finkerman et al (1997) a également mis en évidence que l'invasion de l'intestin par ces parasites était associée à une forte réponse inflammatoire liée à la présence d'éosinophiles et de mastocytes. L'augmentation des mastocytes était induite par la surexpression d'IL-9 permettant également l'accélération de l'expulsion des vers. D'autres observations confirment que les infestations par les helminthes sont typiquement associées à une hyperéosinophilie, une production considérable d'immunoglobuline E (IgE), une mastocytose[6] dans les muqueuses et une hyperplasie des cellules caliciformes (Artis *et al.*, 2004). Les différentes études menées par (Chatelain *et al.*, 1992; Romagnani, 1999; Finkelman *et al.*, 2004; Artis *et al.*, 2004; Voehringer, 2011) ont permis de décrire la réponse immunitaire dite de type Th2 (lymphocytes T helper 2), dont la fonction est d'expulser les nématodes en réparant simultanément les dommages induits. Cette réponse Th2 comprend plusieurs processus biologiques qui servent à perturber la niche parasitaire en renforçant les barrières physiques et en favorisant la réparation des tissus (Sorobetea *et al.*, 2018). Elle peut être divisée en plusieurs étapes : la détection, la transmission de l'information, l'induction de la réponse, l'expulsion du parasite et la résolution.

a. La détection

La détection a lieu une fois les muqueuses de la barrière intestinale franchies (Fig. 7a). Les cellules épithéliales sont les premières cellules de l'hôte à entrer en contact avec les larves. Récemment, des études ont identifié la présence de cellules épithéliales chimiosensorielles appelées « cellules *tuft* » qui, par la production d'IL-25, interviennent dans l'initiation de la réponse Th2 (Fg. 7a) (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016). Les cellules de l'épithélium reconnaissent des antigènes parasitaires et sont indispensables à l'induction de la réponse Th2 intestinale (Zaph *et al.*, 2007; Gerbe *et al.*, 2016).

[6] Accumulation peu courante de mastocytes.

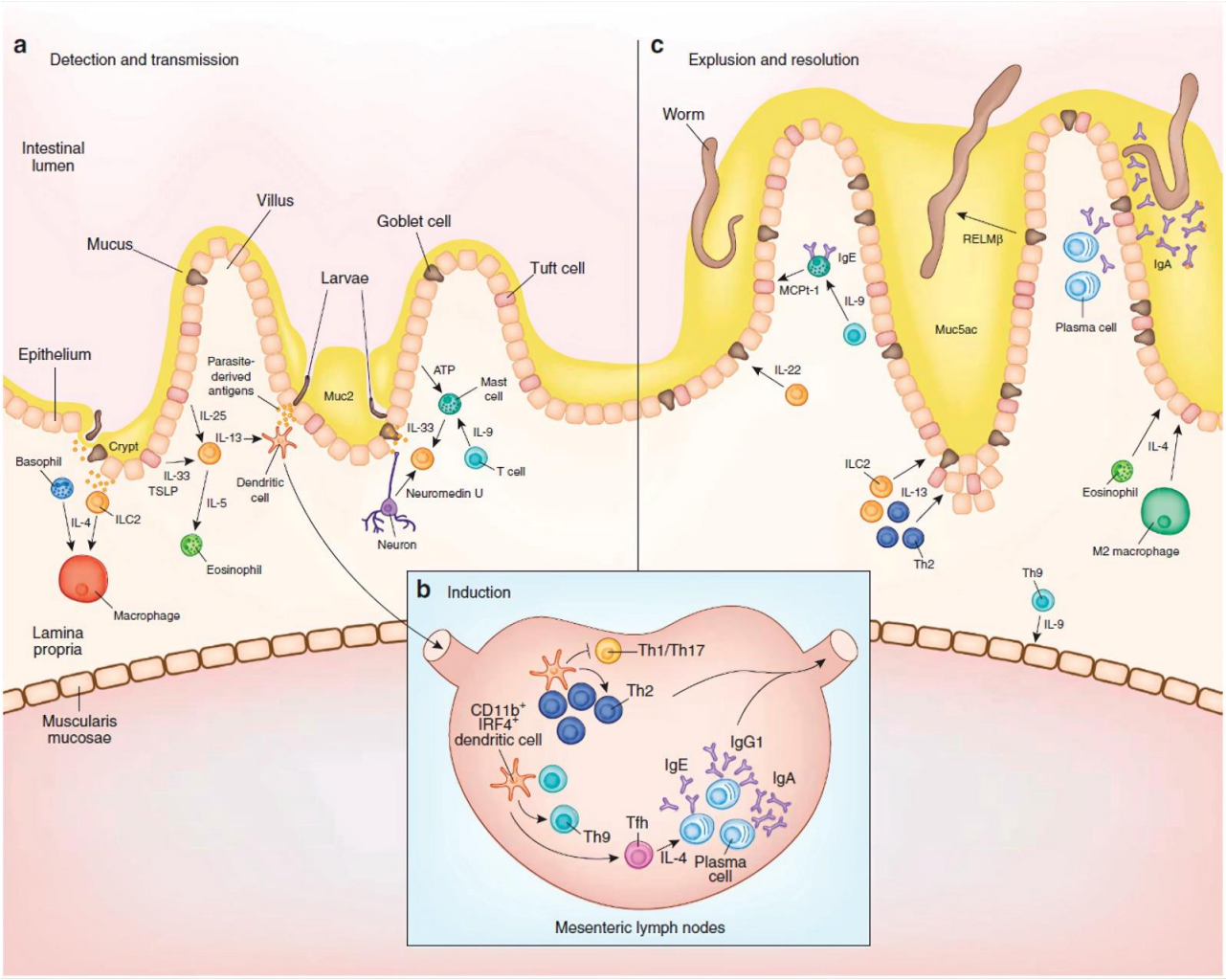


Figure 7 : Schéma de la réponse immunitaire Th2, mise en place lors d'une infestation par les nématodes gastro-intestinaux de (Sorobetea et al., 2018)

(a) Phase de détection et de transmission dans le tissu intestinal. (b) Induction de l'immunité dans le tissu lymphoïde. (c) Expulsion des parasites de l'intestin et résolution de la réponse.

Ces antigènes ne sont pas connus, mais des études relèvent l'implication possible de la chitine, un polysaccharide constitutif des œufs de nématodes et exprimé dans l'appareil sécrétoire des larves et pendant leur mue (Sorobetea *et al.*, 2018). En effet, ces antigènes induisent une forte réponse immunitaire de type 2 dans la muqueuse pulmonaire (Reese *et al.*, 2007; Van Dyken *et al.*, 2014). De plus, il a été observé que de la chitinase acide de mammifère (AMCase) était fortement exprimée par des cellules épithéliales de poumon (Zhu *et al.*, 2004) et intestinales (Ohno *et al.*, 2016) et qu'elles étaient nécessaires à la protection face aux infestations par des nématodes (Vannella *et al.*, 2016). D'autre part, suite aux dommages cellulaires causés par la présence des vers, des alarmines (motifs

moléculaires associés au danger) permettent, en combinaison des antigènes parasitaires, d'induire la réponse Th2 (Hammad and Lambrecht, 2015; Sorobetea *et al.*, 2018).

b. Transmission de l'information et induction de la réponse

Après la détection par les cellules épithéliales, le signal est transmis aux cellules de l'immunité innée (les macrophages, les cellules dendritiques (CDs), les polynucléaires (basophiles et éosinophiles)) afin d'induire une inflammation. Les cellules caliciformes et *tuft* vont produire des cytokines, de l'IL-25, IL-33 et de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) qui vont induire, par le biais des cellules innées lymphoïdes de type 2 (ILC2), la synthèse des cytokines spécifiques de la réponse Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 et de l'IL-13) (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016). Parmi ces cytokines, l'IL-5 et 13 vont provoquer l'expansion des cellules caliciformes et *tuft* et ainsi augmenter la sécrétion d'IL-25 induisant une boucle rétroactive positive. Le signal est alors transmis au ganglion lymphatique mésentérique par les CDs, afin d'engager la réponse immunitaire adaptative (Fig. 7b) (Sorobetea *et al.*, 2018). Les cytokines Th2 migrent également dans les ganglions lymphatiques mésentériques, puis dans les plaques de Peyer et de façon systémique dans la rate (Svetić *et al.*, 1993). En présence des antigènes, d'IL-2 et d'IL-4, les CDs vont induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th2 via la signalisation PRR (les récepteurs de l'immunité innée) et les signaux TSLP (Rouers *et al.*, 2017; Hilligan and Ronchese, 2020). En présence d'IL-6 et d'IL-21, les CDs induisent la différentiation des LT naïfs en lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) (Rouers *et al.*, 2017). Ces cellules provoquent la différenciation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes, cellules productrices d'ACs. En présence de Th2, les plasmocytes produisent des ACs spécifiques à la réponse antiparasitaire (*i.e.* des IgE, IgA, IGg et IgM) (Mosmann and Coffman, 1989; Rouers *et al.*, 2017; Hilligan and Ronchese, 2020). Par la suite, les LT auxiliaires non cytotoxiques (LT *helper*) attirent par chimiotactisme les plasmocytes, les mastocytes des muqueuses (MMC) et les éosinophiles vers l'intestin, où elles prolifèrent et mûrissent, en réponse aux signaux continus des cytokines Th2 et des antigènes parasitaires. Ensemble, ces cytokines Th2 et ces effecteurs contribuent à l'expulsion des vers.

c. Expulsion du parasite et résolution

Après l'initiation de la réponse de l'immunité adaptative, différents mécanismes sont mis en place afin d'expulser les vers, stopper l'inflammation et réparer les dommages cellulaires (Fig. 7c). L'expulsion s'orchestre au travers d'une combinaison de plusieurs mécanismes physiologiques : une sécrétion accrue de mucus, une libération de molécules toxiques pour les vers et l'augmentation du péristaltisme intestinal. Des cytokines de type 2 (IL-4, IL-13) induisent une hyperplasie des cellules caliciformes avec une production de mucus (McKenzie *et al.*, 1998; Herbert *et al.*, 2009) et une augmentation de la sécrétion de mucines[7], piégeant ainsi les vers en entravant leur mobilité (Hasnain *et al.*, 2013). Des molécules de type résistine-b (RELMb) empêchent également les vers vivant dans la lumière de se nourrir en entourant leur cuticule et en entravant leur croissance, leur motilité et leur attachement à l'épithélium (Artis *et al.*, 2004; Herbert *et al.*, 2009). De plus, des molécules toxiques pour les parasites sont sécrétées par les cellules caliciformes, les granulocytes et les mastocytes (Knight *et al.*, 2000; McDermott *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 2004; Artis *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2008; Herbert *et al.*, 2009) ou des dérivés réactifs de l'oxygène[8] par les éosinophiles (Sorobetea *et al.*, 2018). Piégé dans le mucus et recouvert de diverses protéines toxiques et d'ACs neutralisants, le péristaltisme intestinal permet l'expulsion des vers, aidé par une prolifération accrue des cellules épithéliales. Ces mouvements sont permis par la contraction des cellules musculaires lisses et induits à la fois par l'IL-9, l'IL-4, l'IL-13 et par les cellules T (Sorobetea *et al.*, 2018). Les mastocytes vont également libérer diverses protéases servant à relâcher les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, facilitant ainsi l'élimination des vers enkystés (McDermott *et al.*, 2003). La résolution de l'inflammation et la réparation des tissus endommagés est en partie orchestrée par les cytokines de type 2 impliquant plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages de type M2 (Notari *et al.*, 2014; Cosín-Roger *et al.*, 2016) et les éosinophiles (Yamada *et al.*, 2011; Goh *et al.*, 2013).

[7] Macromolécules recouvrant les cellules en contact avec le milieu extérieur, protégeant l'épithélium contre toutes sortes d'agressions

[8] Les espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais), sont des molécules (O_2^-, $O_2^\bullet$, H_2O_2) synthétisés par le SI lors d'une inflammation causé lors de l'infestation. Ces molécules ont une activité antiparasitaire (Roma *et al.*, 2016) mais sont aussi nocif pour l'organisme (Migdal and Serres, 2011).

B. La réponse immunitaire contre les nématodes gastro-intestinaux

a. Les défenses immunitaires des équidés face aux strongles

Trop peu d'études ont été réalisées pour connaître avec certitude les mécanismes du SI en jeu lors d'une infestation des chevaux par les cyathostomes. Les premières données qui ont conduit certains scientifiques à s'intéresser au rôle du SI portaient sur des comparaisons du nombre d'œufs excrétés entre des chevaux jeunes et âgés (Klei and Chapman, 1999). Ainsi, l'excrétion généralement plus élevée chez les jeunes chevaux et la vitesse de réapparition des œufs dans leurs crottins plus rapide après traitement a d'abord conduit à penser à une moindre efficacité des traitements chez les individus de cette classe d'âge (Herd and Gabel, 1990). Il a par la suite été montré que la plus forte infestation observée chez les jeunes chevaux résultait d'un SI encore naïf. Ainsi, la réapparition précoce d'œufs dans leurs crottins s'expliquait par une charge parasitaire dans les muqueuses importante et par l'inefficacité des traitements sur les larves enkystées (Love and Duncan, 1992; Klei and Chapman, 1999). D'autres résultats ont montré qu'une première infestation sur des chevaux naïfs permettait de réduire le nombre d'œufs excrétés et la charge parasitaire lors d'une seconde infestation (Love and Duncan, 1992; Klei and Chapman, 1999), confirmant ainsi l'importance de « l'éducation » du SI. Quelques années plus tard, Davidson et al., (2005) ont étudié le niveau de transcrit codant pour de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'INFγ entre deux groupes de chevaux présentant une charge parasitaire dans les muqueuses de faible à élevée ou nulle à négligeable. Le niveau de transcrit d'IL-4 et d'IL-10 était significativement plus important dans le groupe infesté. Une autre étude réalisée par Abo-Aziza *et al.*, (2017) s'est intéressé à l'équilibre entre Th1 et Th2 chez des ânes infestés par des cyathostomes. En considérant comme marqueur le taux de TNFα et d'IL-4 dans le sang, il a été observé que les animaux les plus excréteurs (les plus infestés) présentaient un taux d'IL-4 significativement plus élevé que celui de TNFα. Même si les études sont peu nombreuses, l'ensemble des résultats acquis permettent de confirmer la mise en place d'une réponse de type Th2 se renforçant avec le temps. À la naissance, le poulain dont le SI est naïf se nourrit du colostrum, le premier lait de sa mère riche en IgG (Perkins and Wagner, 2015). Ce colostrum contient également des cytokines de type Th1 (TNFα et IL-6) qui lui permettent d'initier une réponse inflammatoire dès la naissance. À l'inverse, il ne contient pas de cellules de la réponse Th2 (Wagner *et al.*, 2010; Perkins and Wagner, 2015). L'unique solution de protection des

poulains à la naissance est le recours aux traitements avec des anthelminthiques chimiques.

b. Stratégies d'évasion du système immunitaire de l'hôte

Au fil de leur évolution, les NGIs ont acquis différents mécanismes leur permettant de se protéger, de contourner ou d'inactiver la réponse immunitaire de l'hôte (Maizels *et al.*, 1993; Koski and Scott, 2003). Les nématodes sont entourés d'une cuticule faite d'une couche de fibres (Lee, 1966), leur permettant de se protéger des mécanismes non spécifiques de l'hôte (Bruschi *et al.*, 1992). Pour se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène, les nématodes peuvent présenter une série d'antioxydants de surface tels que la superoxyde dismutase et la glutathion-S-transférase (GST) et/ou les sécréter (Cookson *et al.*, 1992; Brophy and Pritchard, 1992; Brophy *et al.*, 1995; Selkirk *et al.*, 1998). Il a également été observé qu'*Ostertagia ostertagi*, NGI des bovins, sécrétait différentes protéinases pouvant dégrader la mucine en condition de pH acide (Geldhof *et al.*, 2001). Enfin, des études ont montré que les nématodes sécrétaient des molécules immunosuppressives les aidant à échapper aux défenses de l'hôte (Cayzer and Dobson, 1983; Faquim-Mauro and Macedo, 1998; Telford *et al.*, 1998; Paterson *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2004; Maizels *et al.*, 2012). Des études s'intéressent également à l'utilisation de molécules sécrétées par des ankylostomes comme anti-inflammatoires (Loukas *et al.*, 2016; Shepherd, 2017). Aucun mécanisme spécifique n'a été étudié sur les cyathostomes, mais ils pourraient être semblables à ceux observés chez d'autres nématodes.

C. Activité d'immunostimulation des plantes

La base de données USDA répertorie 135 MbS et 1110 plantes (≥ à 1 MbS) présentant une activité immunostimulante. Cependant, les effets rapportés reposent sur des connaissances ancestrales et nécessitent d'être validés scientifiquement.

a. Essais *in vitro*

Des études *in vitro* se sont intéressées aux effets des plantes sur le SI. Certaines ont été réalisées avec des extraits de plantes (aqueux, méthanol ou éthanol), ou bien avec les MbS. Diverses activités d'immunomodulation ont été décrites dans la littérature.

L'utilisation de l'ail (*Allium sativum)* a permis d'augmenter la prolifération de splénocytes et thymocytes murins, ainsi que l'activité mitogène de lymphocytes humains (Clement *et al.*, 2010). La lectine de l'oignon (*Allium cepa agglutinin),* a induit une stimulation des macrophages et des lymphocytes T, augmentant la production de cytokines pro-inflammatoire (TNFα, INFγ et IL-12) sur une lignée de macrophage murin (RAW 264.7) (Prasanna and Venkatesh, 2015). Bécabar bâtard (*Boerhavia diffusa*), a induit une diminution de l'activité cytotoxique de cellules *natural killer* (NK) humaines et la production de cytokines pro-inflammatoire sur des cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) humaines (Mehrotra *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'activité de phagocytose de neutrophiles humains a augmenté en présence de figuier des banians (*Ficus benghalensis*) (Gabhe *et al.*, 2006). Afin d'identifier le principe actif, certaines études s'intéressent directement à l'étude du MbS. Ainsi, un composé alcaloïde (matrine) a été décrit comme ayant une activité anti-inflammatoire et réduit les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6 et prostaglandine E2) dans les macrophages RAW 264.7 stimulés par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) (Wang *et al.*, 2021). Certains composés phénoliques ont montré des activités similaires. La quercétine (Tang *et al.*, 2019), la catéchine (Sunil *et al.*, 2021), le resvératrol (Ohtsu *et al.*, 2017) et la rutine (Tian *et al.*, 2022) ont induit une diminution de la réponse pro-inflammatoire provoquée par une stimulation *in vitro* au LPS. Il a été observé que le traitement à la curcumine (Zhang *et al.*, 2019b) ou à la quercétine (Lu *et al.*, 2018) transformait le phénotype pro-inflammatoire des macrophages 1 (M1) en un phénotype anti-inflammatoire M2, par modification de l'expression de chaque marqueur. Une activité immunomodulatrice a également été observée pour les composés terpéniques (Srivastava *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Jayachandran *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018). Ces résultats confirment les effets bénéfiques des plantes et de leurs MbS, soutenant ainsi leur utilisation en médecine vétérinaire.

b. Essais *in vivo*

De par la facilité d'utilisation du modèle, les tests d'immunostimulation sont majoritairement effectués sur la souris. Ainsi, différentes études ont observé des activités pro ou anti-inflammatoire à la suite d'un traitement à base de plantes chez cet animal. En particulier, une injection de silibinine (*Silybum marianum*) par voie intrapéritonéale (IP) durant cinq jours a induit chez des souris (BALB/c) une réponse pro-inflammatoire. Une

concentration testée de 10 mg/kg a provoqué une réduction d'IL-2 et 4. À l'inverse, une concentration de 250 mg/kg a induit une augmentation d'IL-1β, 6 et de TNFα (Johnson *et al.*, 2003). Des résultats proches ont été observés à la suite d'injection (voie IP) de 5mg/kg/jour (19 jours) d'un polysaccharide de polypore en touffe (*Grifola frondosa*). Le traitement a induit sur un modèle de souris cancéreuse (MM46 Carcinoma Bearing C3H/HeN) une augmentation de l'INFγ et du TNFα (Kodama *et al.*, 2002). Chez des rats, un traitement liquide par voie orale d'une décoction à 10% et 20% de thé noir (*Camellia sinensis*) a présenté un effet anti-inflammatoire. Une dose de 0,1 ml/10 g PV à 10 ou 20% a conduit à une diminution significative d'un œdème de la patte induit par carragénine ou dextranes. Ce même traitement donné durant 12 jours a également permis de diminuer significativement une arthrite induite par de l'adjuvant de Freund (Chattopadhyay *et al.*, 2012). Dans la stratégie d'utilisation des plantes comme alternative aux antiparasitaires, il est plus judicieux de s'intéresser aux traitements réalisés par voie orale. Un régime composé d'un extrait éthanolique d'andrographis (*Andrographis paniculata*) (25 mg/kg, durant sept jours), a conduit à une augmentation de la production d'ACs chez des souris BALB/c (Puri *et al.*, 1993). Des résultats similaires ont été observés à la suite de l'administration d'un régime composé à 5% de figuier des banians (*Ficus benghalensis*), sur une période de cinq semaines, chez des poissons (*Corydora punctatus*). Une augmentation de l'adhésion des neutrophiles a été observée chez le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), à la suite d'un régime composé de 3% d'ail (*A. sativatum*) ou de 1 ppb (partie par billion) d'échinacée (*Echinacea purpurea*), durant une période de un, deux ou trois mois (Aly and Mohamed, 2010). Ce régime a également permis d'augmenter le pourcentage de protection lors d'une infection à une bactérie (*Aeromonas hydrophila*). Par ailleurs, une étude a évalué chez des poulets de chair l'effet d'un régime supplémenté de 1 et 2% de purée de canneberges (*Vaccinium macrocarpon*), ou de 150 et 300 ppm (partie par million) d'extrait éthanolique de canneberges, sur une période de trente jours. Celui-ci a induit une surexpression des gènes codant pour de l'IL-4 et 5 (Das *et al.*, 2020).

À ce jour, aucune étude ne semble s'être intéressé aux effets immunomodulateurs potentiels de plantes incluses dans le régime alimentaire d'animaux d'élevage. Les résultats des différentes études précédemment présentés justifient d'une utilisation des plantes pour stimuler le SI. Néanmoins, une première approche *in vitro* est nécessaire afin d'évaluer l'effet des extraits sur le métabolisme des cellules de l'hôte.

Objectifs de la thèse

L'émergence grandissante d'isolats parasitaires résistants aux anthelminthiques conduit à repenser la gestion des strongyloses digestives. De plus, la règlementation européenne évolue vers une réduction de l'usage de traitements, ce qui pourrait affecter la filière équine à moyen terme. Ces restrictions sont motivées par la demande sociétale d'une gestion respectueuse de l'environnement et de l'utilisation d'alternatives « naturelles ».

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était d'identifier des plantes bioactives (utilisées comme complément alimentaire ou comme alicament) permettant d'altérer la biologie des cyathostomes (effet anthelminthique direct) et/ou de stimuler le SI du cheval (effet indirect). Pour ce faire, mes travaux ont été organisés en deux parties (appliquée ou exploratoire), comprenant chacune trois axes de recherches.

Partie appliquée

Cette partie a mobilisé trois études quantifiant l'activité anthelminthique *in vivo* de régimes à base de plantes. La première étude a évalué l'efficacité d'additifs alimentaires commerciaux composés d'une seule espèce de plante. Les deux autres études ont évalué l'activité antiparasitaire de deux fourrages alicaments : le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) distribué sous forme d'une cure de granulés déshydratés, et la chicorée (*Cichorium intybus*) dans des conditions d'élevage.

Partie exploratoire

L'objectif de cette seconde partie était (i) d'identifier dans la littérature des plantes ou MbS aux potentielles vertus antiparasitaires et immunomodulatrices, (ii) de réaliser différents criblages *in vitro* afin d'identifier les candidats les plus actifs et (iii) d'utiliser des approches de séquençage pour évaluer l'effet des meilleurs candidats sur la communauté d'espèces de cyathostomes et sur les réponses monocytaires en présence d'antigènes parasitaire.

Article 1 : Evaluation of commercial feed additives for equine cyathostomin control

I. Résumé

L'émergence croissante d'isolats parasitaires résistants aux anthelminthiques nous amène à reconsidérer la gestion de la strongylose digestive chez le cheval. En réponse à une demande croissante de la société en faveur d'une gestion respectueuse de l'environnement et de l'utilisation d'alternatives "naturelles", on observe de plus en plus de traitements à base de plantes sur le marché, proposant des bienfaits pour la santé des chevaux. Suite à une recherche avec différents mots clefs (*i.e.* complément alimentaire, parasite et cheval), 27 produits disponibles sur le marché totalisant 90 plantes ont été identifiés. Parmi ces 27 produits, 11 étaient composés d'une seule plante (dont 5 à base d'ail, 2 à base de levure, et 4 produits à base d'armoise, d'échinacée, de gingembre ou de spiruline).

Dans l'objectif d'identifier de nouveaux composés, cette étude a examiné l'efficacité de trois additifs alimentaires composés d'armoise (*Artemisia vulgaris*), d'échinacée (*Echinacea purpurea*) ou de curcuma (*Curcuma longa*) commercialisés pour leurs effets bénéfiques sur la santé des équidés. Les traitements ont été administrés conformément aux recommandations en termes de durée (*i.e.* 10, 15 et 30 jours, respectivement) à des poneys Welsh naturellement infestés par des cyathostomes (n = 6), pour des doses 1,8 fois supérieures aux recommandations donnés pour des chevaux de 500 kg. Ces différents traitements ont été donnés par voie orale sur deux prises quotidiennes (*i.e.* matin et soir), mélangés à leur ration journalière (*i.e.* 600g de granulés et 5 kg de paille de blé). En début et en fin de chaque traitement, nous avons mesuré le nombre d'œufs excrétés (OPG), le pourcentage de développement des œufs en larves infestantes (L3), ainsi que le dénombrement des cellules sanguines circulantes (*i.e.* les globules rouges, les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles). Aucun effet significatif des additifs alimentaires n'a été observé sur les différents paramètres étudiés. De plus, les efficacités mesurées à partir du FECR par rapport au groupe témoin s'élever à 38,3 % pour l'armoise, à 25,4 % pour l'échinacée et à 31,2 % pour le curcuma.

Mesurés dans des conditions visant à mettre en évidence des effets significatifs, les résultats obtenus sur ces trois additifs alimentaires ont révélé une efficacité faible, ne justifiant pas une utilisation en pratique de ces traitements. Néanmoins, ces produits

continuent de se vendre sans réclamations émissent par utilisateurs. Ainsi, cela soulève des questions quant à l'importance des anthelminthiques chimiques dans le contrôle des infestations aux cyathostomes chez les équins.

Evaluation of commercial feed additives for equine cyathostomin control

J. Malsa[1], F. Reigner[2], M. Riou[3], A. Gesbert[2], F. Guégnard[1], D. Serreau[1], G. Fleurance[4,5], G. Sallé[1]

[1]INRAE, Université de Tours, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France

[2]INRAE, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière, Nouzilly, France

[3]INRAE, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, Nouzilly, France

[4]Institut français du cheval et de l'équitation, Pôle développement, innovation et recherche, Saint-Genès-Champanelle, France

[5]INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, Saint-Genès-Champanelle, France

Corresponding author: Malsa Joshua. Email: joshua.malsa@inrae.fr

Abstract

The growing emergence of anthelmintic-resistant parasitic isolates is leading us to reconsider the management of digestive strongylosis in horses. In addition, European regulations are moving towards a reduction in the use of chemical treatments, in line with societal demand for environmentally-friendly management and the use of "natural" alternatives. In this context, this study investigated the effect of plant-based feed additives commercialized for their health benefits for equines. We administrated three treatments based either on mugwort (*Artemisia vulgaris*), echinacea (*Echinacea purpurea*) or curcumin (*Curcuma longa*) to 24 Welsh female ponies naturally infected with cyathostomins. Fecal egg count (FEC), eggs development into infective larvae FEC reduction (FECR) and immune system parameters (red blood cells, lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and basophils) were measured the first and the last day of each treatment, and compared with those characterizing the control group. No significant effect of feed additives administrated at levels 1.8 higher than the manufacturer's recommendations was observed on any of the parameters studied. The efficacy of treatments, measured from the FECR compared to the control group, was weak (*i.e.* 38.3% for mugwort, 25.4% for echinacea and 31.2% for curcumin). We conclude that these treatments do not enable to control strongyle infections in horses.

Keywords

Strongyles, Feed additive, Mugwort, Echinacea, Curcumin

Implications

In a context where the number of active treatments is limited, the emergence of cross-resistance increases and the lack of new molecules on the market leads to reconsider strategies to control small strongyles infections. Used as a food additive or as a nutraceutical, the pharmacological properties of plants offer particularly attractive possibilities for the development of new control methods. However, the low efficacy of commercial additives measured in this study raises the question of the gap between theoretical knowledge of plants and their use in practice.

Introduction

The most prevalent and problematic gastrointestinal nematodes in equines are cyathostomins (small strongyles) (Matthews, 2014). Their infection causes colic, diarrhea with significant weight loss and potentially horse death when large number of encysted larvae emerged from the colonic mucosa (*i.e.* larval cyathostominosis) (Matthews, 2014). Cyathostomin control relies on the use of chemical dewormers. However, this practice is currently challenged because the massive use of these molecules has selected drug-resistant isolates (Matthews, 2014). In this context, alternative strategies to the use of chemical anthelmintics are needed.

A growing number of commercial feed additives mentioning anthelmintic properties or immunity boosting effects are found on the market. This is despite the lack of evidence supporting their efficacy against cyathostomins. Trials on naturally infected donkeys fed with a commercialized phytotherapeutic product had slight FEC reduction (Arfuso et al., 2020) while another investigation of a plant-based dewormer (Papini et al., 2020) did not report any effect. Similarly, evaluation of a garlic-based feed additive showed no effect on naturally infected horses (Buono et al., 2019).

To further expand current knowledge on plant-based feed additives and identify potential candidates for the control of small strongyle infections in equines, we evaluated the direct and indirect activity of three feed additives commercialized for their health benefits. We focused on single-plant products composed of mugwort, echinacea or curcuma to facilitate the identification of the active compound thereafter. We analyzed the effects of these three products on FEC, larval egg development and circulating blood immune cell counts on naturally infected horses.

Materials and methods

The *in vivo* trial was conducted from October 6th to November 25th, 2020, at the experimental unit of animal physiology at l'Orfrasière (EUPAO) in Nouzilly, France (10.15454/1.5573896321728955E12).

2.1 Animal condition

Naturally infected female Welsh ponies (1 to 8 years old, n = 24) with individual fecal egg counts (FEC) higher than 200 egg per gram (EPG) were used. Animals were

allocated into four experimental groups balanced for their age and FEC measured 10 days before the experiment (Table 1). The number of individuals per treatment (n = 6) enabled to reveal potential strong effects of feed additives that are expected for their practical use.

Ponies were accustomed to experimental conditions during 10 days before the start of the experiment. For this, they were separated according to their age in groups of two or three individuals (*i.e.* 7 groups of 1 to 3 years old ponies and 4 groups of 4 to 8 years old ponies) and housed in 11 boxes. Animals were fed at trough with wheat straw and pellets containing wheat straw, oats, wheat bran, dehydrated alfalfa, barley, dried beet pulp and sugarcane molasses.

2.2 Experimental design

The three different plant-based feed additives tested were bought from ESC Laboratoire (58 B rue de Gérigny 58400 La Charité-sur-Loire). They are mainly commercialized to support natural defenses against intestinal parasites or support the immune system. They were included in each pony's ration (*i.e.* 600g of pellets and 5 kg of wheat straw), in two daily doses (morning and evening) mixed with the pellets. Ponies were individually tied to the feeder during 30 minutes to give them enough time to eat their pellets ration. None of the ponies made refusals. The manufacturer's recommendations for 500 kg horses were: (i) for the mugwort (*Artemisia vulgaris*) treatment : 10 g per day during 10 days, (ii), for the echinacea (*Echinacea purpurea*) treatment: 15 g per day during 15 days and (iii) for the curcumin (*Curcuma longa*) treatment: 10 g per day during 30 days. Ponies, whose mean body weight was 269.3 ± 56.0 kg, received feed additive levels 1.8 times higher compared to manufacter's recommendations established for 500 kg horses. The control group did not receive any feed additive and water was available *ad libitum* to all ponies. In order to analyse the effects of feed additives on parasitic parameters, fecal samples were collected individually from the rectum of each animal the first and the last day of each treatment. Blood samples were collected the same days using K2 EDTA tubes (Dutscher 367525A) to measure blood cell counts.

2.3 Fecal and blood sample analysis

Immediately after collection, individual FEC data were determined using a modified McMaster technique based on the dilution of 5 g of fecal matter in 70 mL of a saturated NaCl solution (density = 1.18). Eggs were counted using an optical microscope (×150 magnification), the minimum detection limit was set at 50 EPG. The fecal egg count reduction (FECR) percentage of each feed additive was measured using a Bayesian hierarchical model as recommended by WAAVP guideline (Kaplan et al., 2023) (see 2.4 Statistical analysis).

To evaluate the effects of feed additives on the larval development rate, the remaining fecal matter (70 g to 225 g) was incubated individually for each horse for 12 days at +25 °C and 60% relative humidity. Infective third-stage larvae (L3) of cyathostomins were then collected using a Baermann apparatus after 24 h and 48 h of sedimentation for each horse and timepoint. The larval count in each sample was determined from 30 drops of 5 µL of the larval solution under the microscope (×4 magnification). The larval development rate was then calculated as:

$$\left(\frac{Counted\ L3}{FEC\ \times\ quantity\ of\ fecal\ matter}\right) \times\ 100$$

Blood samples collected were analysis using an MSscan II automated system from Melet Schloesing Laboratoires. Subsequently, only red blood cells, lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and basophils data were taken into account for the analysis.

2.4 Statistical analysis

All data were analyzed using R software v. 4.3.0 (R Core Team, 2023). The mean age between groups was statistically analyzed using an ANOVA with groups as the fixed effect, using the *anova_test* function of the rstatix v.0.7.2 package. The mean FEC between groups at d-11 was statistically analyzed using a linear mixed-effects (LME) model with groups as fixed effect and horses as random effect, using the *lme* function of the nlme v.3.1-163 package (Pinheiro et al., 2013). The effect of feed additives on FEC, larval development and blood parameters were also analyzed using LME model with groups, day and group × day interaction as fixed effect and horses as random effect. The FECR was measured with a Bayesian hierarchical model, using the

fecr_stan function from eggCount v. 2.3-2 package (Wang et al., 2022), including the average FEC of the control group as pre-treatment, the average FEC of the treated group as post-treatment and the correction factor for the McMaster technique.

Results

3.1 Plant based feed additives effect on parasitic parameter and their FECR

No statistical difference was observed between control and experimental groups for FEC and larval development (Table 2). The average FEC in individuals of control and mugwort groups considered together was significantly higher at d10 compared to d0 ($P = 0.05$). The Bayesian approach provided low efficacy values, with the best results obtained for mugwort (38.3% [14.5 ; 67.8]; Table 2).

3.2 Plant based feed additives effect on blood cell count

As for parasitological parameters, feed additives did not induce any relevant changes in blood cell populations (Fig. 1). Only horses fed with mugwort presented lower basophil count at d10 compared to the control group (1.25 ± 0.18 (mean ± standard deviation) vs. 1.3 ± 0.35 respectively, $P = 0.05$). Otherwise, ponies of these two groups considered together presented higher eosinophils average value at d10 compared to d0 (Fig. 2, $P < 0.01$), but lower neutrophils (Fig. 2, $P = 0.01$) and monocytes (Fig. 2, $P = 0.05$) counts. Moreover, the number of circulating monocytes in horses of the control and curcumin groups considered together was higher at d30 compared to d0 (Fig. 2, $P = 0.05$).

Discussion

In this study, we evaluated the efficacy against cyathostomins of three different feed additives commercialized for their benefits on equine health. Curcumin was mainly observed to exhibit anti-inflammatory activity on murine macrophage or BV-2 microglia cells, decreasing the activity of proinflammatory cytokine (IL-6, TNFα) or the NF-ϰB pathway (Catanzaro et al., 2018). Similar results have been observed in *in vivo* models such as mice with cyclophosphamide or traumatic brain injury, or rats with traumatic spinal cord injury (Catanzaro et al., 2018). Echinacea has been observed to have both pro-inflammatory activity; increased natural killer activity in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma in

immortalized line of human T lymphocyte cells (Jurkat T cells). But it induced also a decrease in TNFα in human PBMCs (Catanzaro et al., 2018). Mugwort was found to have anti-inflammatory activity in Wistar albino rats of cotton pellet granuloma model or increased total and differential leukocyte counts in male rats (Siwan et al., 2022). None of these treatments, administrated 1.8 times higher than manufacturer's recommendations, showed any effect on cyathostomins FEC and larval development. When looking at the efficacy of each treatment, the mugwort-based additive presented the highest value (*i.e.* 38.3%). The efficacy of the echinacea and curcumin treatments was 25.4% and 32.1%, respectively. These values, measured according to the WAAVP recommendations, remained low compared to those expected in the case of chemical treatments (Kaplan et al., 2023): 95% for fenbendazoles, 88% for pyrantel and 96% for macrocyclic lactones.

In parallel, we investigated the potential effects of these treatments on the horse's immune system. Focusing on red blood cells, lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and basophils, no differences were observed in the cell count, except for basophil in the presence of mugwort at the end of treatment. *A. vulgaris* has been observed to modify the differential leukocyte counts in male rats (Siwan et al., 2022). This was observed in our study on basophils count. But as with the indirect antiparasitic effects, we conclude that the effects of these extracts are weak, and not highlighted by our experimental design. The literature also describes the effects of plants to modulate cytokine levels in the blood. Variation in cell count gives no indication of cytokine levels but it would be interesting to evaluate it in the future.

This study provided an overview of the efficacy of three plant-based feed additives commercialized for horses. The measured efficacy of these additives was low compared with chemical anthelmintics. Also, based on a conservative design, no strong effects were observed that were expected to control parasitic infections. Nevertheless, further studies should be carried out to investigate the effects of these plants on cytokine levels produced by equine immune cells.

Ethics approval

The experimental procedure received approval from the French Ministry of Research under protocol number APAFIS#26140-2020062216271790v2.

Data and model availability statement

Links to the R scripts and data of the analyses (https://github.com/Joshua-Malsa/Commercial-product-evaluation-paper).

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

The authors did not use any artificial intelligence assisted technologies in the writing process.

Author ORCIDs

J. Malsa: https://orcid.org/0000-0002-5625-3934

G. Fleurance: https://orcid.org/0000-0003-3221-9026

G. Sallé: https://orcid.org/0000-0002-4032-139X

Author contributions

Joshua Malsa: Data production, Statistical analysis, Investigation, Writing - Original draft preparation. **Fabrice Reigner:** Sample collection, Writing - Original draft preparation. **Mickaël Riou:** Investigation. **Amandine Gesbert:** Sample collection. **Fabrice Guégnard** and **Delphine Serreau:** Sample collection, Data production. **Géraldine Fleurance:** Conceptualization, Writing - Original draft preparation **Guillaume Sallé:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original draft preparation.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Joshua Malsa was grateful for the PhD grant of the Fonds Éperon and Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE). The authors thank the staff of the experimental unit of animal physiology at l'Orfrasière (EUPAO).

Financial support statement

This work benefited from the financial support of the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE), and Institut Carnot France Future Élevage (F2E).

References

Arfuso, F., Bazzano, M., Brianti, E., Gaglio, G., Passantino, A., Tesei, B., Laus, F., 2020. Nutritional Supplements Containing Cardus mariano, Eucalyptus globulus, Gentiana lutea, Urtica urens, and Mallotus philippinensis Extracts Are Effective in Reducing Egg Shedding in Dairy Jennies (Equus asinus) Naturally Infected by Cyathostomins. Frontiers in Veterinary Science 7, 556270.

Buono, F., Pacifico, L., Piantedosi, D., Sgroi, G., Neola, B., Roncoroni, C., Genovese, A., Rufrano, D., and Veneziano, V., 2019. Preliminary Observations of the Effect of Garlic on Egg Shedding in Horses Naturally Infected by Intestinal Strongyles. Journal of Equine Veterinary Science 72, 79–83.

Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., and Lanni, C., 2018. Immunomodulators Inspired by Nature: A Review on Curcumin and Echinacea. Molecules 23, 2778.

Kaplan, R.M., Denwood, M.J., Nielsen, M.K., Thamsborg, S.M., Torgerson, P.R., Gilleard, J.S., Dobson, R.J., Vercruysse, J., and Levecke, B., 2023. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. Veterinary Parasitology 318, 109936.

Matthews, J.B., 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 4, 310–315.

Papini, R.A., Orsetti, C., and Sgorbini, M., 2020. Evaluation of a Marketed Polyherbal Dewormer Against Intestinal Strongyles in Naturally Infected Donkeys. Helminthologia 57, 78–82.

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S.S. and Sarkar, D., 2013. Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 31-110 3, 1–113.

R Core Team 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Siwan D, Nandave D and Nandave M 2022. Artemisia vulgaris Linn: an updated review on its multiple biological activities. Future Journal of Pharmaceutical Sciences 8, 47.

Wang, C., Paul, M., Isler, T. and Furrer, R., 2022. eggCounts: Hierarchical Modelling of Faecal Egg Counts.

Table 1 Age and FEC arithmetic mean for each group before treatment

	Age (mean ± sd)[1]	FEC (mean EPG [95% CI])[2]
Control (n = 6)	3.1 ± 1.7	557 EPG [262.9 ; 851.4]
Mugwort (n = 6)	3.4 ± 1.4	540 EPG [360.2 ; 721.4]
Echinacea (n = 6)	3.5 ± 2.7	507 EPG [250.5 ; 763.5])
Curcumin (n = 6)	2.8 ± 1.5	553 EPG [483.8 ; 622.8]
P value[3]	0.942	0.994

[1] Arithmetic mean + standard deviation

[2] Arithmetic mean after back-transformation and 95% confidence interval

[3] *P value* of group as fixed effect, and horses as random effect

Table 2 FEC, larval development percentage and FECR percentage of feed additives

	FEC (mean EPG [95% CI])[1]			
	d0	d10	d15	d30
Control	516 [291 ; 743]	983 [542 ; 1424]	767 [502 ; 1031]	825 [454 ; 1196]
Mugwort	817 [569 ; 1064]	1008 [517 ; 1500]	/	/
Echinacea	983 [587 ; 1380]	/	942 [582 ; 1301]	/
Curcumin	850 [570 ; 1129]	/	/	775 [551 ; 999]
P value[2]		0.380	0.474	0.242
	Larval development rate (mean % ± s.d)[3]			
	d0	d10	d15	d30
Control	25.53 ± 21.99	42.45 ± 20.18	53.73 ± 27.23	47.01 ± 37.68
Mugwort	38.08 ± 13.16	48.97 ± 23.82	/	/
Echinacea	29.32 ± 16.63	/	34.24 ± 8.21	/
Curcumin	22.39 ± 5.17	/	/	28.95 ± 9.45
P value[2]		0.619	0.794	0.434
	FECR			
	Efficacy (%) [95% CI][4]			
Mugwort	38.3 [14.5 ; 67.8]			
Echinacea	25.4 [9.2 ; 46.7]			
Curcumin	32.1 [10.7 ; 56.8]			

[1] Arithmetic mean after back-transformation and 95% confidence interval

[2] *P value* of day and group interaction as fixed effect, and horses as random effect

[3] Arithmetic mean percentage + standard deviation

[4] Efficacy percentage and 95% confidence interval measured on FEC

Figure captions

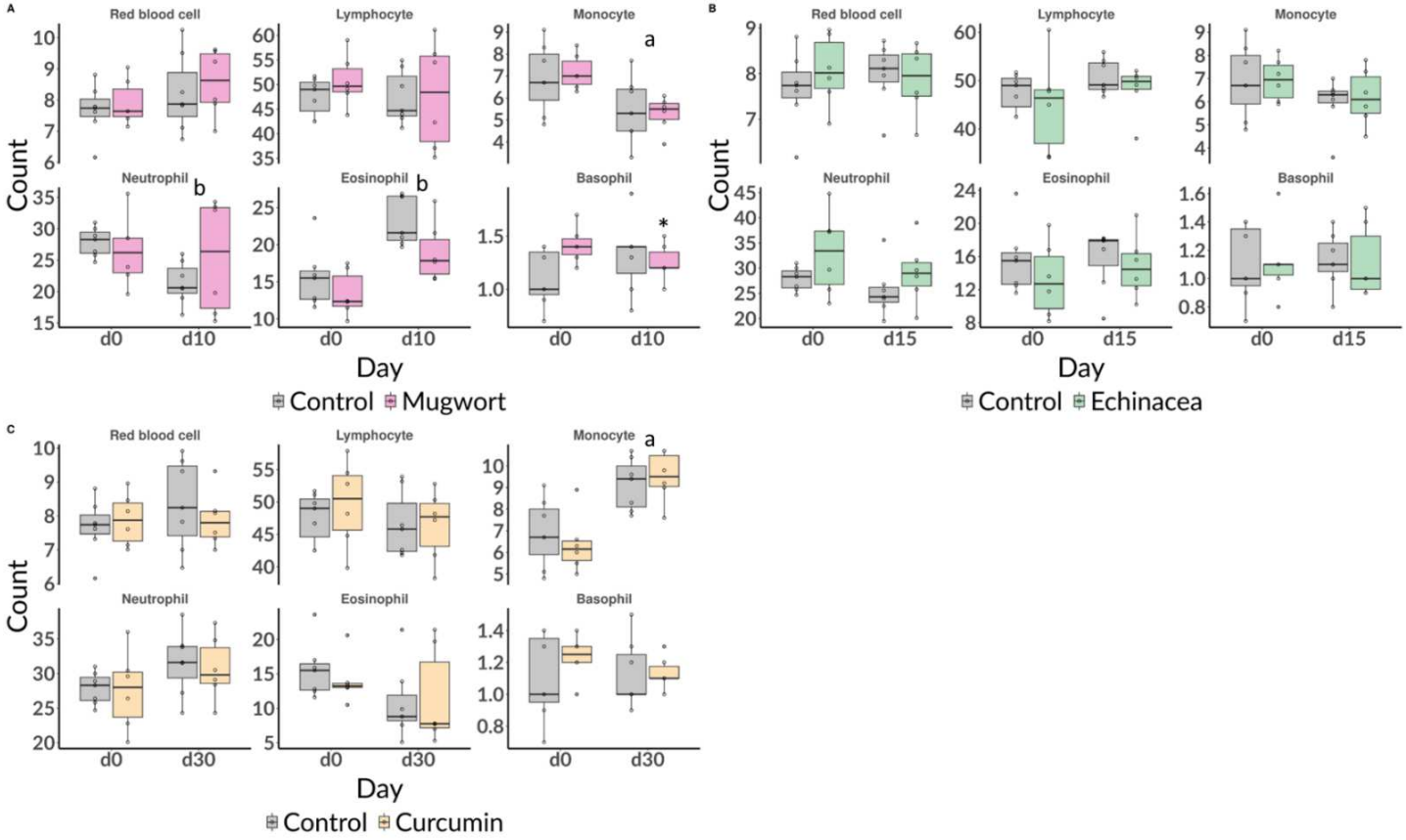


Fig. 2. Count of various blood parameters on samples collected at the beginning and the end of each treatment with mugwort (pink), echinacea (green) and curcumin (yellow)

Asterisks indicate significant differences ($P = 0.05$).

Lowercase letters indicate significant differences for a day effect (a: $P = 0.05$), b: $P \leq 0.01$).

Article 2 : Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on cyathostomin eggs excretion, larval development, larval community structure and efficacy of ivermectin treatment in horses

I. Résumé

La lutte contre les strongles équins repose sur l'utilisation d'anthelminthiques, dont l'efficacité est affectée par l'émergence d'isolats résistants. De plus, les effets toxiques sur l'environnement nécessitent le développement d'autres stratégies de contrôle comme l'utilisation d'alicaments comme le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), une plante riche en tanins.

Des études *in vivo* ont fait état d'une diminution du nombre d'œufs dans les matières fécales associée à une réduction de la fertilité ou du nombre de vers chez des chèvres ou les moutons nourris avec du sainfoin (Paolini *et al.*, 2003, 2005; Heckendorn *et al.*, 2006; Manolaraki *et al.*, 2010; Gaudin *et al.*, 2016). Une première approche *in vitro* a démontré un effet inhibiteur d'une solution de granulés de sainfoin déshydraté (var Perly) sur le développement des stades libres de cyathostomes (Collas et al. 2018). Ensemble ces résultats justifient l'utilisation du sainfoin dans l'objectif d'un contrôle des infestations chez le cheval.

Afin de valider et de développer les premiers résultats *in vitro*, 20 chevaux de 2 ans naturellement infestés ont été exposés à une cure de 28 jours de : i) sainfoin (n=10), composée de 70% MS de granulés de sainfoin Equifolia (Multifolia) et 30% MS de foin de prairie (2,4% MS de tannins condensés dans le régime) ou ii) un régime témoin (n=10) avec 60% MS de granulés de luzerne et 40% MS de foin de prairie. Les deux régimes étaient isoénergétiques et isoprotéiques. Le nombre d'œufs excrétés, le taux de développement des larves et les effets sur la structure de la communauté larvaire de cyathostomes basée sur l'ITS-2 ont été quantifiés chaque semaine. À la suite de l'étude, les 20 chevaux ont été traités à l'IVM. Nous avons mesuré la concentration plasmatique au cours des 96 heures suivant le traitement et observé le temps de réapparition des œufs dans les matières fécales afin d'identifier d'éventuelles interactions pharmacocinétiques entre le régime et l'IVM.

Aucune différence n'a été observée entre le nombre moyen d'œufs dans les matières fécales des deux groupes, cependant le taux de développement larvaire moyen a été observé significativement plus faible dans le groupe sainfoin suite à une augmentation moins importante en fin d'étude. L'évaluation de l'abondance des espèces de

cyathostomes a révélé que le régime alimentaire à base de sainfoin n'a pas affecté la structure du némabiome par rapport au régime alimentaire témoin. À la suite du traitement oral à l'IVM, la concentration dans le sang de la molécule a été observée significativement plus faible chez les chevaux nourris au sainfoin. De plus, des œufs ont réapparu plus rapidement dans ce même groupe démontrant un effet du régime sur le traitement anthelminthique.

Nos résultats démontrent que la consommation à court terme d'un régime riche en sainfoin ne permet pas de diminuer l'excrétion d'œufs de cyathostomes, mais semble réduire légèrement le développement larvaire. Comparée aux études réalisées sur les petits ruminants, la teneur en tanins condensés dans notre régime a été en deçà des recommandations permettant d'obtenir un effet anthelminthique (*i.e*. 3 à 5% MS). Par ailleurs, la consommation de granulé de sainfoin a réduit la pharmacocinétique de l'IVM, soulignant des vigilances quant à l'utilisation des plantes comme traitement.

Parasitology

cambridge.org/par

Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on cyathostomin eggs excretion, larval development, larval community structure and efficacy of ivermectin treatment in horses

Joshua Malsa[1], Élise Courtot[1], Michel Boisseau[1], Bertrand Dumont[2], Pascale Gombault[3], Tetiana A. Kuzmina[4], Marta Basiaga[5], Jérôme Lluch[6], Gwenolah Annonay[6], Sophie Dhorne-Pollet[7], Nuria Mach[8], Jean-François Sutra[9], Laurence Wimel[10], Cédric Dubois[10], Fabrice Guégnard[1], Delphine Serreau[1], Anne Lespine[9], Guillaume Sallé[1,*] and Géraldine Fleurance[2,11,*]

[1]INRAE, Université de Tours, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France; [2]INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, Saint-Genès Champanelle, France; [3]Multifolia, Viâpres-le-Petit, France; [4]Department of Parasitology, I. I. Schmalhausen Institute of Zoology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine; [5]Department of Zoology and Animal Welfare, Faculty of Animal Science, University of Agriculture in Kraków, 24/28 Mickiewicza Av., 30-059 Kraków, Poland; [6]GeT-PlaGe, INRAE, Genotoul, Castanet-Tolosan, France; [7]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France; [8]IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse Cedex 3, 31076, France; [9]INTHERES, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse Cedex 3, 31076, France; [10]IFCE, Plateau technique de la Station Expérimentale, Chamberet, France and [11]IFCE, Pôle Développement Innovation et Recherche, Exmes, France

Research Article

*These authors contributed equally to this work

Cite this article: Malsa J *et al* (2022). Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on cyathostomin eggs excretion, larval development, larval community structure and efficacy of ivermectin treatment in horses. *Parasitology* **149**, 1439–1449. https://doi.org/10.1017/S0031182022000853

Received: 5 April 2022
Revised: 25 May 2022
Accepted: 9 June 2022
First published online: 23 June 2022

Key words:
Fecal egg count; ITS-2; nemabiome; nematode; nutraceutical; strongylid; tannin

Author for correspondence:
Joshua Malsa,
E-mail: joshua.alexandre.malsa@gmail.com

Abstract

Alternative strategies to chemical anthelmintics are needed for the sustainable control of equine strongylids. Bioactive forages like sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) could contribute to reducing drug use, with the first hints of *in vitro* activity against cyathostomin free-living stages observed in the past. We analysed the effect of a sainfoin-rich diet on cyathostomin population and the efficacy of oral ivermectin treatment. Two groups of 10 naturally infected horses were enrolled in a 78-day experimental trial. Following a 1-week adaptation period, they were either fed with dehydrated sainfoin pellets (70% of their diet dry matter) or with alfalfa pellets (control group) for 21-days. No difference was found between the average fecal egg counts (FECs) of the two groups, but a significantly lower increase in larval development rate was observed for the sainfoin group, at the end of the trial. Quantification of cyathostomin species abundances with an ITS-2-based metabarcoding approach revealed that the sainfoin diet did not affect the nemabiome structure compared to the control diet. Following oral ivermectin treatment of all horses on day 21, the drug concentration was lower in horses fed with sainfoin, and cyathostomin eggs reappeared earlier in that group. Our results demonstrated that short-term consumption of a sainfoin-rich diet does not decrease cyathostomin FEC but seems to slightly reduce larval development. Consumption of dehydrated sainfoin pellets also negatively affected ivermectin pharmacokinetics, underscoring the need to monitor horse feeding regimes when assessing ivermectin efficacy in the field.

Introduction

Small strongyles or cyathostomins are a large group of gastrointestinal parasitic nematodes infecting grazing equids. Cyathostomins encompass more than 50 species able to infect domestic and wild equids (Lichtenfels *et al.*, 2008), among which a limited group of 10–12 species emerges as a prevalent and abundant parasitic core consistently found worldwide (Reinemeyer *et al.*, 1984; Bucknell *et al.*, 1995; Lyons *et al.*, 2000; Collobert-Laugier *et al.*, 2002; Osterman Lind et al., 2003, 2007; Kuzmina *et al.*, 2005, 2012). The main clinical effect of cyathostominosis is weight loss, and the massive simultaneous emergence of larval stages encysted in the colonic mucosa, can be fatal for horses especially for young animals (Love and Duncan, 1992; Love *et al.*, 1999; Peregrine *et al.*, 2014). This larval cyathostominosis syndrome, characterized by protein-losing enteropathy, diarrhoea and colic (Giles *et al.*, 1985), remains the leading cause of parasite-mediated death of young horses in some areas like France (Sallé *et al.*, 2020). Cyathostominosis control has long been achieved mainly through the use of chemical anthelmintics (Love, 2003; Peregrine *et al.*, 2014), but this has promoted the selection of isolates resistant to all anthelmintics used in equine medicine (Kaplan, 2002, 2004; Traversa *et al.*, 2012; Matthews, 2014). Macrocyclic lactones, including ivermectin (IVM) and moxidectin, remain the most effective drug class against small strongylids (Peregrine *et al.*, 2014; Sallé *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2020). They also remain the most widely used anthelmintic drugs in equine operations in the USA (Becher *et al.*, 2018; Nielsen *et al.*, 2020) or

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial licence (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited. The written permission of Cambridge University Press must be obtained prior to any commercial use.

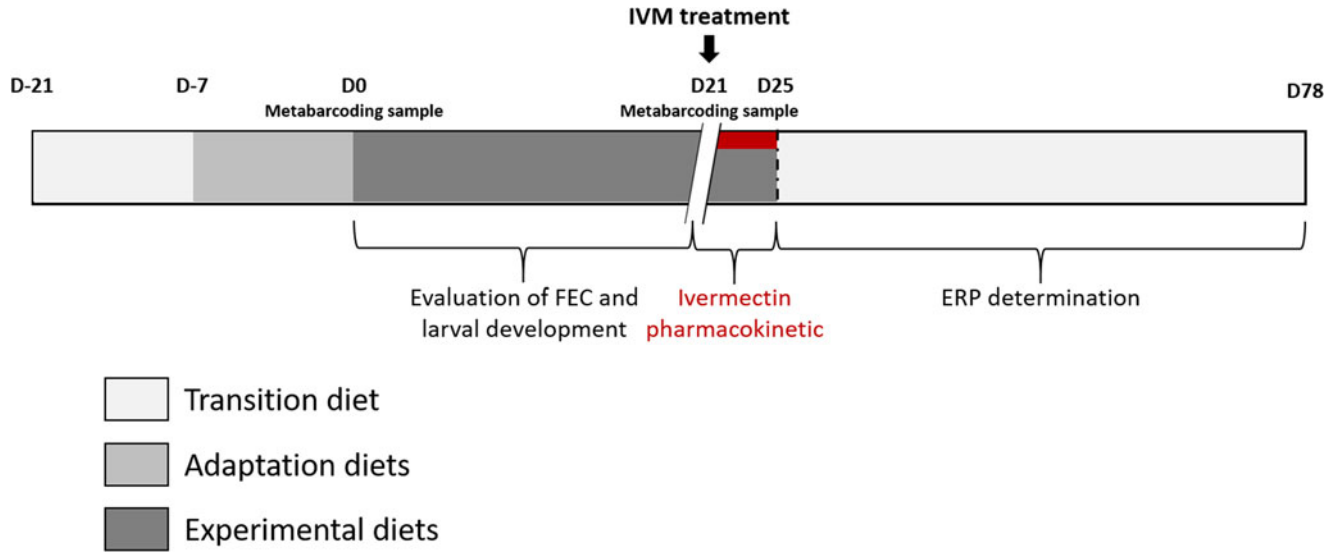


Fig. 1. Experimental design. The figure depicts the time points and sampling done in this experiment.

in the UK, where IVM and moxidectin are included in drenching programmes in more than a third of cases (Stratford *et al.*, 2014; Tzelos *et al.*, 2019). However, reduced IVM efficacy has been evidenced (Nielsen *et al.*, 2020), including a reduced egg reappearance period (ERP) (Lyons *et al.*, 2011*a*, 2011*b*; Nielsen *et al.*, 2020). In addition, high concentrations of these molecules are found in the feces of treated animals, with major detrimental effects on coprophagous organisms (Lumaret *et al.*, 2012; Verdú *et al.*, 2018).

This context warrants alternative strategies to the use of chemical anthelmintics, and the prospect of using bioactive plant compounds as nutraceuticals for the control of gastrointestinal parasites in livestock has been an active research field (Paolini *et al.*, 2003; Heckendorn *et al.*, 2007; Rochfort *et al.*, 2008; Manolaraki *et al.*, 2010; Sandoval-Castro *et al.*, 2012; Hoste *et al.*, 2015). Tannin-rich plants are studied for their anthelmintic activity and their use as bioactive forage (Hoste *et al.*, 2006, 2012; Gaudin *et al.*, 2016; Peña-Espinoza *et al.*, 2018).

Among tannin-rich plants, sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) is often used as a model fodder (Hoste *et al.*, 2012). Some *in vitro* tests on ruminant gastrointestinal nematodes have shown that sainfoin and the tannins reduce larval migration (Paolini *et al.*, 2004; Manolaraki *et al.*, 2010). *In vivo* studies have reported a decrease in fecal egg counts (FECs), associated with a reduction in worm fertility or counts in goats or sheep fed with sainfoin (Paolini *et al.*, 2003, 2005; Heckendorn *et al.*, 2006; Manolaraki *et al.*, 2010; Gaudin *et al.*, 2016). In horses, a previous study (Collas *et al.*, 2018) evaluated the anthelmintic activity of dehydrated sainfoin pellets on equine strongyles. While strongyle FEC did not differ between horses fed with sainfoin compared to the control group, an *in vitro* approach using sainfoin pellet water solutions revealed a decrease in egg hatching and larval development (Collas *et al.*, 2018). However, it remains unclear whether the latter effects can be reproduced *in vivo* and if the putative effects of sainfoin extracts vary across various cyathostomin species. The recent development of an ITS-2-based metabarcoding approach has allowed the simultaneous identification and quantification of strongyle abundances in domestic horses (Mitchell *et al.*, 2019; Poissant *et al.*, 2021) or wild equids (Tombak *et al.*, 2021). This approach has been used to characterize the response to anthelmintic treatment of trichostrongylids in ruminants (Queiroz *et al.*, 2020; Halvarsson and Höglund, 2021) or the monitoring of drug resistance in these species (Queiroz *et al.*, 2020). It has never been applied yet to study a plant extract effect on any gut parasite community.

In addition to their anthelmintic activity, tannin-rich plants contain flavonoids. These molecules modulate ATP binding cassette (ABC) transporters (Morris and Zhang, 2006), thereby affecting the *in vitro* and *in vivo* pharmacodynamics and activity of macrocyclic lactones (Lespine *et al.*, 2008). For instance, quercetin significantly increases exposure to moxidectin in lambs (Dupuy *et al.*, 2003). The tannin-rich plant redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) used in combination with oral IVM treatment has also increased the treatment efficacy against *Haemonchus contortus* in lambs (Whitney *et al.*, 2013). However, an *in vivo* trial in sheep reported a significant decrease in IVM efficacy in sainfoin-fed animals due to a concomitant reduction in plasma IVM concentrations (Gaudin *et al.*, 2016). Such interaction remains uncharacterized in horses to date.

To bridge this knowledge gap, the current study aimed (i) to evaluate the *in vivo* effect of dehydrated sainfoin pellets on cyathostomins (fecal egg excretion and larval development), (ii) to quantify any alterations of the cyathostomin larval community structure using a nemabiome approach, and (iii) to establish how the sainfoin diet may affect the efficacy of an oral IVM treatment in horses.

Materials and methods

The *in vivo* experiment was conducted from September 8th to December 15th 2020, at the French Horse and Riding Institute experimental farm (IFCE) in Chamberet, France. The experimental procedure received approval from the French Ministry of Research under protocol number APAFIS#26140-2020062216271790v2. The experimental design is summarized in Fig. 1.

Animal condition

Naturally infected saddle horses (Anglo-Arab breed, 2 years old) left undrenched for 137 days (last anthelmintic administered on 24 April 2020; 200 μg IVM kg^{-1} body weight (BW) and 1 mg praziquantel kg^{-1} BW; EQVALAN® DUO, France) were allocated into 2 groups of 10 horses. Horses were mainly infected by small strongylids (>95%), as revealed by larval culture (Collas *et al.*, 2018) and the herein reported nemabiome approach which did not disclose the presence of *Strongylus* spp. Both groups were balanced for

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

sex (8 females and 2 geldings in each group), FEC data before housing (September 8th 2020; sainfoin group FEC = 1875 ± 1253 eggs g^{-1} (EPG); control group FEC = 1940 ± 1064 EPG, mean ± S.D.), and for their BW measured on September 15th (average BW of 454.8 ± 28.1 kg and 457.6 ± 25.6 kg in the sainfoin and control diet groups, respectively). From September 8th to 21th (day-21 to day-8; see Fig. 1), all horses were housed in a single stall and collectively fed with a transition diet composed of 77% grassland hay and 23% of concentrate (made of 61.5% of barley, 35% of soya bean meal, 3.5% of minerals and vitamins), designed to meet their energy (6.0 UFC day^{-1}) (UFC; horse feed unit) and protein requirements (318 g MADC day^{-1}) (MADC; horse digestible crude protein), as previously defined for this breed (INRA, 2015).

Experimental diet

Horses were adapted (adaptation period) to their experimental diet for a week – from day-7 to day 0 (Fig. 1), i.e. the horses were fed individually with a decreasing proportion of the transition diet and an increasing proportion of the experimental diet. They subsequently received their experimental diet for the 3 following weeks (day 0–21, Fig. 1). The horses were housed in individual stalls during these 2 periods (from day-7 to day 21; see Fig. 1). This duration was in line with successful experiments in ruminants (Paolini *et al.*, 2005; Heckendorn *et al.*, 2006) and with practical implementation in the field. The sainfoin diet contained 2.3% dry matter (DM) of condensed tannins as determined by an acetone–butanol–HCl assay (Grabber *et al.*, 2013); it included 70% DM Equifolia dehydrated sainfoin pellets (*Onobrychis viciifolia*; provided by Multifolia, Viapres-le-Petit, France) and 30% grassland hay (on DM bases). We worked with a production chain for dehydrated sainfoin pellets, which ensured appropriate agronomic conditions for the plant cultivation, a good conservation of sainfoin characteristics over time and the standardization and characterization of the batches before use. The control diet consisted of 60% DM of alfalfa (*Medicago sativa*) pellets and 40% DM of grassland hay (Table 1; Supplementary Table S1). Proportions of diet components were chosen to maximize the amount of condensed tannins in the sainfoin diet (while taking care not to cause digestive problems) and to ensure each diet covered horse energy and protein requirements. The energy requirements (UFC) were covered at 108% ± 1.3 and 103% ± 1.5 on average for the sainfoin and control groups, respectively. This difference was statistically significant between the 2 groups ($P < 10^{-4}$), but our previous observations have shown that energy requirements were not affecting the outcome of the comparison (Collas *et al.*, 2014). The protein requirements (MADC) were covered at 250% ± 3.7 and 252% ± 5.5 on average for the sainfoin and control groups, respectively ($P = 0.13$). These values were safe for the duration of the treatment and showed no significant correlation with FEC or larval development rate ($P = 0.45$ and $P = 0.89$, respectively), in good agreement with past experimental findings (Collas *et al.*, 2018). Individual requirements were estimated based on INRA (2015) tables for UFC and MADC as

$$\text{UFC requirements (per kg BW}^{0.75}) = 0.0594 + 0.0252 \times BW\,gain^{1.4}$$

$$\text{MADC requirement (in g day}^{-1}) = 2.8 \times BW^{0.75} + 270 \times BW\,gain,\ \text{with } BW\,gain = 0.15\,\text{kg day}^{-1} \text{ for 2-year-old horses.}$$

Horses received half of their diet at 8:00 am and the other half at 4:00 pm. Quantities offered were adjusted every Tuesday based on BW changes and the DM content of diet components. If an individual horse lost weight, its BW measured the week before was used to determine its requirements. Individual refusals were weighed every morning, and they never exceeded 5% DM of the offered diet for more than 3 consecutive days, thereby warranting any particular adaptation.

Table 1. Chemical composition and nutritive value of foodstuffs offered to the 2 groups (sainfoin diet, control diet) of horses during the experimental period[a]

	Sainfoin pellets[b]	Alfalfa pellets[c]	Grassland hay[d]
DM (g kg^{-1})	921	941	976
CP (g kg^{-1} DM)[e]	169	184	52
CF (g kg^{-1} DM)[f]	231	287	354
UFC (kg^{-1} DM)[g]	0.67	0.62	0.47
MADC (g kg^{-1} DM)[g]	99	110	14

DM, dry matter; CP, crude protein; CF, crude fibre; UFC, horse feed unit; MADC, digestible protein.
[a]Analyses were performed by UpScience, Saint-Nolff, France, on 4 samples of each foodstuff collected all along the experimental period.
[b,d]In sainfoin diet.
[c,d]In control diet.
[e]Dumas method.
[f]Weende method.
[g]From INRA (INRA, 2015) equations.

Fecal sample analysis

Fecal samples were collected individually from the rectum of each horse every Monday of the experimental period (day 0, day 7, day 14 and day 21). Samples were stored at +4 °C and shipped to the INRAE Centre Val de Loire facilities (Nouzilly, France) for further processing. Individual FEC data were determined using a modified McMaster technique (Raynaud *et al.*, 1970) based on 5 g of fecal matter diluted with a dilution factor of 5. Eggs were then counted using optical microscopy (×150 magnification), with a minimum detection limit of 50 EPG. To evaluate the effect of the diet on larval development, the remaining fecal matter (40–90 g) was incubated individually for each horse for 12 days at +25 °C and 60% relative humidity during 2 weeks as suggested by Roberts and O'Sullivan (1950). The correlation between the quantity of fecal matter cultured and the larval development was not significant (Spearman's $\rho = 0.08$, $P = 0.4$). Infective third-stage larvae (L3) of cyathostomins were then collected using a Baermann apparatus after 24 and 48 h of sedimentation, and pooled together for each horse and time point. To count larval concentration, 30 drops of 5 μL were taken from a homogenized larval suspension (using a bar magnet in a glass beaker) and inspected using optical microscopy. The average number of larvae across the 30 drops was related to the total volume of larval suspension collected after Baermann. Following Collas *et al.* (2018), the larval development rate was then derived as:

$$\left(\frac{Counted\ L3}{FEC \times quantity\ of\ fecal\ matter}\right) \times 100$$

Gastrointestinal nemabiome

To identify the putative effects of sainfoin on the gastrointestinal nemabiome, a metabarcoding approach was applied to cyathostomin larval populations (using pools of 20 000 L3) harvested from fecal samples collected on day 0 and day 21 of the experiment. Larvae were incubated with 10 μL of a 20 mg mL^{-1} proteinase K

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

(Qiagen) solution at 56 °C for 3 h; DNA was subsequently extracted using a phenol–chloroform protocol (Sambrook and Russell, 2006) and eluted in a 30 μL TE (Tris-EDTA) buffer solution. For metabarcoding, the ITS-2 gene region was PCR amplified using the NC1 (5′-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3′) and NC2 (5′-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3′) primers (Gasser *et al.*, 1993). Between 1 and 3 random bases were added to the 5′ primer end to increase sequence complexity. Moreover, a 2-bp linker and an Illumina 28-bp overhang were added for the forward and reverse sequences, respectively, for subsequent ligation with Illumina adapters. PCR was run for 3 min at 95 °C for the first denaturation, then 30 cycles starting with 15 s at 98 °C, then 60 °C for 15 s and 72 °C for 15 s, followed by a final extension of 72 °C for 2 min. PCR products were then loaded on a 1% agarose gel to validate the presence of an amplicon product. After this step, 31 out of the 40 samples from 16 horses remained for library preparation. Because MiSeq enables paired 250-bp reads, the ends of each read are overlapped and can be stitched together to generate extremely high-quality, full-length reads of the entire region in a single run. Single multiplexing was performed using a homemade 6 bp index, which was added to reverse primer during a second PCR with 12 cycles using forward primer (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC) and reverse primer (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). The resulting PCR products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer's instructions. Libraries were further processed for a single run of MiSeq sequencing using 500 cycle reagent kit v3 (2 × 250 output; Illumina, USA), the raw data of which are registered under SRA bioproject number PRJNA840924. The quality of the run was checked internally using PhiX, and then each paired-end sequence was assigned to its sample with the help of the previously integrated index.

To assess the predictive ability of the nemabiome approach and determine the best set of parameters for data processing, five mock communities of known species composition were built from worms collected and morphologically identified in Ukraine (T. A. Kuzmina, personal communication) or Poland (M. Basiaga, personal communication). Two mock communities of 5 species (a single male worm each), including *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus insigne*, *Cyathostomum catinatum*, *Cyathostomum pateratum* and *Coronocyclus labiatus* were considered using either raw or equimolar DNA concentrations. In addition, two mock communities comprising *C. pateratum* and *C. catinatum* (equivalent proportion or in a 1:4 ratio) were also considered to establish the ability of the ITS-2 sequence to delineate between these 2 phylogenetically close species (Hung *et al.*, 2000). Raw reads were processed with Cutadapt v.1.14 (Martin, 2011) to remove bad quality bases at the 3′ end of reads (-q 15), trim primer sequences, remove sequences with evidence of indels (--no-indels) or that showing no trace of primer sequence (--discard-untrimmed). Quality filtered ITS-2 amplicon sequences were subsequently handled with the dada2 algorithm (Callahan *et al.*, 2016). A set of different parameters was tested to measure the total number of amplicon sequence variants (ASVs), the rate of taxonomic assignment, and the proportion of false-positive and false-negative detection in mock community samples. First, the maximum error rate (--max-ee) was set to 1 for both reads or 2 and 5 for forward and reverse reads, respectively. The read truncation parameter was either 200 bp or 217 bp, corresponding to the minimal average read length measured across all samples as determined with FastQC v.0.11.7 (Andrews, 2010). The BAND_SIZE parameter effect (that penalizes the number of insertions permitted when aligning 2 sequences) was tested using either the default or the ITS-2 recommended values (16 and 32, respectively), or disabling banding (BAND_SIZE = −1) to perform a full Needleman–Wunsch alignment as described elsewhere (Poissant *et al.*, 2021). Denoising was performed using the *pseudo-pool* option, and chimaera removal was performed under the default *consensus* mode. Taxonomic classification was subsequently done using the curated ITS-2 database (https://www.nemabiome.ca/its2-database.html), last accessed on 2 February 2022 (Workentine *et al.*, 2020). Two taxonomic assignments were considered and compared, considering mock communities as a ground truth. First, the *IdTaxa* (Murali *et al.*, 2018) function implemented in the DECIPHER package v2.18.1 (Wright, 2016) was applied with 100 bootstraps and a threshold of 50%. Second, the dada2 *assignTaxonomy* (Callahan *et al.*, 2016) function was implemented as already described (Poissant *et al.*, 2021), i.e. setting *tryRC* = TRUE, *minBoot* = 0, *outputBootstraps* = TRUE and retaining ASVs with 50% bootstrap support. In both cases, the number of false-positive and false-negative counts were determined.

Count tables data were further analysed in R v. 4.1 (R Team, 2020) using the phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) and vegan packages (Oksanen *et al.*, 2015). Rare ASVs (<50 counts in total) were considered contaminants and removed. Samples with less than 50 read counts (negative water control; $n = 1$ at day 21) were also discarded.

Egg reappearance period

At the end of the sainfoin-fed diet (day 21), all horses were treated with oral IVM (Eqvalan, 200 μg kg^{-1} BW, Boehringer Ingelheim, Lyon, France) and were still fed with their respective experimental diets for 4 days. In addition, the ERP was determined from measurements of individual FECR data on 5 occasions over a 42-day window (on day 36, day 50, day 63, day 71 and day 78). The ERP was defined by WAAVP (Nielsen *et al.*, 2022) as the time when the upper confidence interval for the mean fecal egg count reduction (FECR) fell below the mean of FECR determined 2 weeks post-treatment minus 10%. FECR data were calculated according to the WAAVP guidelines (Coles *et al.*, 1992, 2006) as

$$\left(\frac{FECd21 - FECi}{FECd21}\right) \times 100,$$

where *FECd21* – FEC data on day 21, FEC_i stands for the FEC measured at each timepoint *i* between day 36 and day 78.

Ivermectin dosage in plasma and pharmacokinetics parameters

To quantify horse exposure to IVM, blood samples (9 mL) were taken from the jugular vein of each horse in heparinized tubes at 0, 1, 2, 24, 48, 72 and 96 h after IVM treatment. Blood samples were kept at +4 °C before centrifugation (1500 *g* for 30 min), and the plasma was frozen at −20 °C until further shipment and processing. Plasmatic IVM concentration was determined by high-performance liquid chromatography (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) was calculated from 1 to 96 h by the linear trapezoidal rule. C_{max}, maximal concentration was then determined. Data were expressed as geometric mean ± standard error of the mean.

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

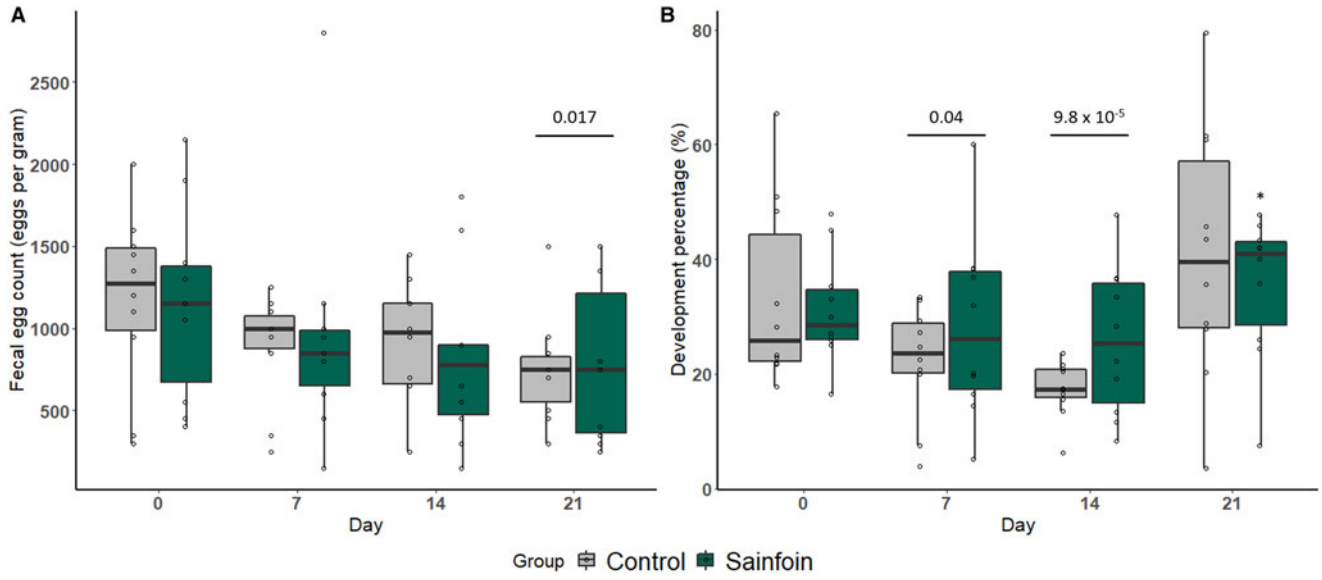


Fig. 2. Arithmetic average of FEC (A) and larval development rate (B) measured over the experimental period. Weekly arithmetic average FEC (A) or larval development rate (B) measured throughout the experimental period in horses receiving the control (light grey) or sainfoin (dark green) diet. The average cyathostomin FEC on day 21 (represented by the bar) was significantly different from the average FEC on day 0 ($P = 0.017$) (A). *Statistically significant difference in larval development rate from day 14 to day 21 between the sainfoin and control groups ($P = 0.02$). The bars indicate a significant difference in the mean larval development at day 7 ($P = 0.04$) and day 14 ($P = 9.8 \times 10^{-5}$), both compared to day 0 (B).

Statistical analysis

To test for the effect of the diet on FEC and larval development rate, a generalized estimating equation model was implemented with the *geeglm* function of the geepack v.1.3-1 package (Højsgaard *et al.*, 2006).

To test for differences in alpha diversity, a *t*-test was performed between the Shannon index values estimated for the sainfoin and control group on day 0 and day 21. To test for a differential temporal trend in species abundance between both groups during the experimental diet, species counts were regressed upon the experimental group and the day effects and setting horse as a random effect with the nlme package v.3.1-155. This analysis was restricted to 12 horses with data on both days ($n = 8$ in the sainfoin group, $n = 4$ in the control group) and to the most abundant cyathostomin species (overall abundance of 10 000 counts, including *C. nassatus*, *Cylicocyclus ashworthi*, *Cylicostephanus minutus* and *C. longibursatus*). Species counts were 4th-root transformed to better fit normality (Shapiro–Wilk test = 0.56 and 0.96 before and after transformation, respectively).

FEC measured after IVM treatment was modelled with a linear mixed-effects model using the *lme* function of the nlme package (Pinheiro *et al.*, 2013), fitting diet, time and diet × time interaction terms as fixed effects and horse as a random effect. The FECR was measured according to the WAAVP guidelines (Coles *et al.*, 1992, 2006) with Bayesian hierarchical models using the *fecrtCI* function on the eggCounts package v.3.2-3 (Wang *et al.*, 2022).

The average IVM concentration and C_{max} for the sainfoin group were compared to the control group at every time point (+1, +2, +24, +48, +72 and +96 h). Data were analysed with a Mann–Whitney *U* test, and the *P* values were corrected for multiple tests using a Bonferroni procedure as implemented in the *wilcox_test* function of rstatix package v.0.6.0 (Kassambara, 2021). The pharmacokinetics (PK) parameters (AUC) for each group were compared with an unpaired *t*-test, and the *P* values were corrected by Bonferroni, as explained above.

Results

Sainfoin effect on FEC excretion

When horses received their experimental diet (day 0 to day 21), individual cyathostomin FECs significantly decreased by 35% from 1165 ± 545 EPG to 765 ± 396 EPG on average ($P = 0.017$, Fig. 2A). However, no significant difference between the sainfoin and the control group was found at any considered time point ($P = 0.90$).

Sainfoin effect on larval development rate

The average larval development rate (Fig. 2B) decreased between day 0 and day 14 of the experiment from an average development of 32.3 ± 12.8% at day 0 to 25.2 ± 13.3% at day 7 ($P = 0.04$) and 21.5 ± 10.4% at day 14 ($P = 9.8 \times 10^{-5}$). This decrease was similar between the 2 diets ($P = 0.27$ and 0.06 on day 7 and day 14, respectively). However, the subsequent increase in larval development rate from day 14 to day 21 was significantly lower in the sainfoin-fed group ($P = 0.02$, Fig. 2B).

Sainfoin effect on cyathostomin larval community structure

Among the combinations of parameters tested, a BAND_SIZE of −1 combined with a truncation length of 217 bp and maximal error rates of 2 and 5 for the forward and reverse reads were optimal. This combination yielded the highest fraction of assigned amplicon sequence variants without false-positive calls in the mock parasite community (83.6% assigned ASVs out of the 110 ASVs detected in total; Supplementary Table S2). Using this set of parameters and after filtering, 31 samples were left for analysis with an average of 6768 reads per sample (ranging between 2269 and 25 434 reads) that defined 110 ASVs. Out of these, 15 were considered contaminants (<50 occurrences), 75 ASVs were assigned to 13 identified cyathostomin species and 6 remained undetermined (amounting to 0.6% of total counts). Members of the *Cyathostomum* and *Cylicocyclus* genera accounted for the highest misassignment rate at the species level

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

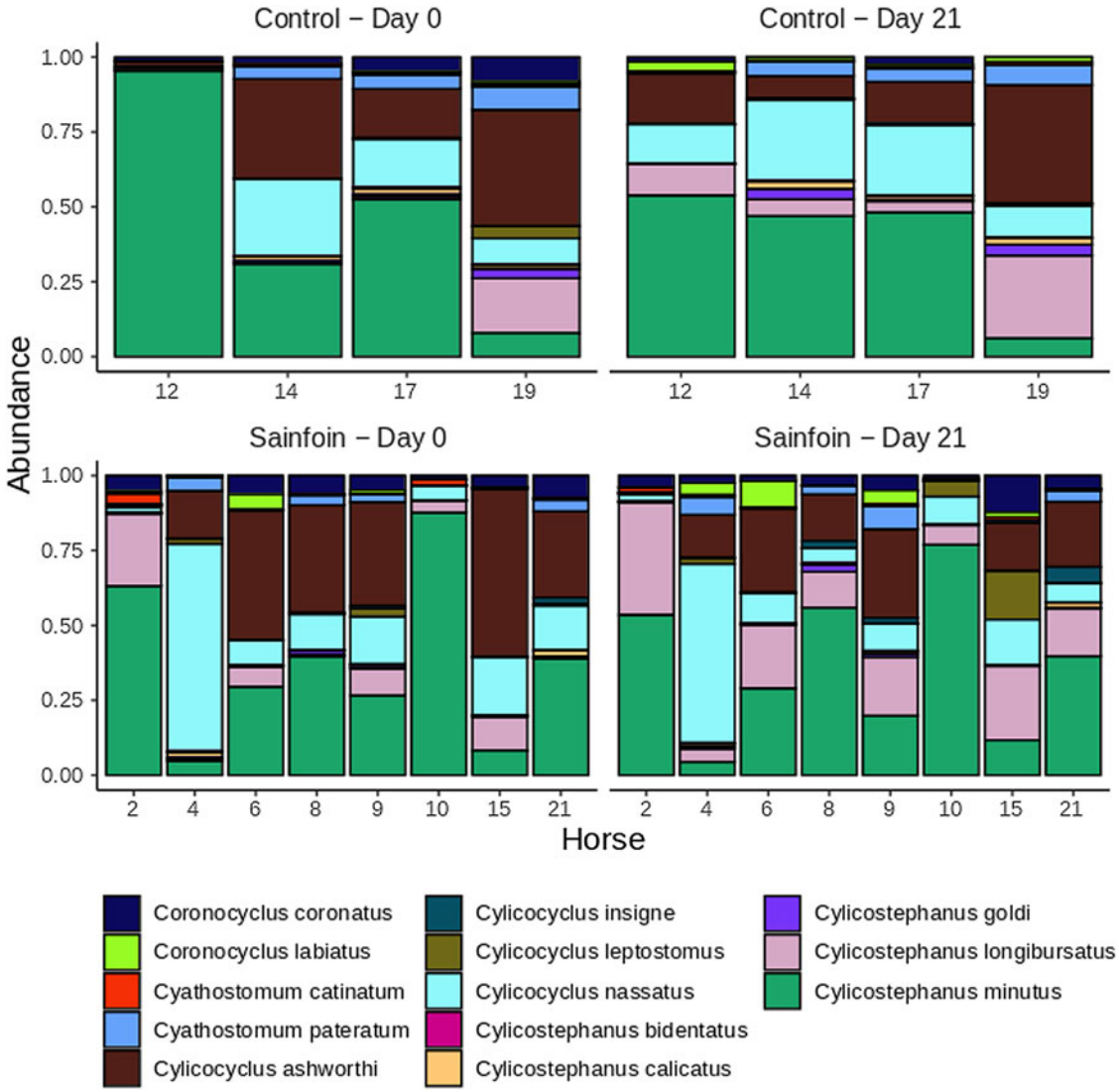


Fig. 3. Cyathostomin larval community structure estimated using the metabarcoding approach across days and groups. Relative abundance of cyathostomin species in control (upper panels) and sainfoin-fed horses (lower panels) on days 0 and 21 of the experiment. Data are from 12 horses with samples successfully amplified.

(5.78 and 2.75% of total counts, respectively), while unassigned *Cylicostephanus* spp. represented 0.09% of total counts. To this respect, taxonomic assignment with the *Idtaxa* function performed better than the *assignTaxonomy* function that consistently introduced false-positive identification of *C. longibursatus* instead of *Cyathostomum* species. In line with this higher misassignation rate, the inferred proportions of *Cyathostomum* species in respective mock communities departed from the expected ratio, with a bias towards *C. catinatum* relative to *C. pateratum* (62.3 and 92.7% in lieu of 50 and 75% expected, Supplementary Figure S1).

On day 0, *Cylicostephanus minutus* was the most abundant species in the gastrointestinal nemabiome (13.83% of overall counts, Fig. 3), followed by *C. ashworthi* and *C. nassatus* (5.47 and 5.06% of total counts on that day, respectively, Fig. 3). At the community level, we could not evidence any differences in alpha diversity between larval communities of the sainfoin and control groups, neither at the beginning [average Shannon index difference of 0.18, 95% c. i. = (−0.71; 0.35), $P = 0.47$] nor at the end of the experimental period [average Shannon index difference of 0.16, 95% c. i. = (−0.72; 0.41), $P = 0.53$]. Similarly, PERMANOVA analyses did not evidence any difference between the larval community structures of the 2 groups on day 0 ($P = 0.47$ and $P = 0.2$ with the Bray-Curtis and Jaccard dissimilarity index, respectively) or day 21 ($P = 0.24$ and $P = 0.55$ with the Bray-Curtis and Jaccard dissimilarity index, respectively) of the experiment.

Analysis of species abundance trajectory from day 0 to day 21 was restricted to the top 4 most abundant species (Fig. 4). *Cylicostephanus longibursatus* contributed significantly fewer individuals than the other 3 species (differential 4th-root transformed count of 2.74 ± 1.27 relative to *C. ashworthi*, $P = 0.03$). No significant variation relative to the experimental diet was found for the top 4 most abundant species ($P = 0.59$–0.96, Fig. 4).

Sainfoin effect on the ERP and ivermectin concentration in plasma following oral ivermectin treatment

Eggs reappeared 42 days after IVM treatment in the feces of both experimental groups (1 horse in each group). On day 78 (57 days after IVM treatment), sainfoin-fed horses excreted significantly more eggs than their counterparts fed with the control diet ($P = 0.04$, Fig. 5A). These excretion levels corresponded to FECR of 89.6% (75.4; 95.6) for the sainfoin group. This value was significantly lower than the FECR of the control group on the same day [95.8% (84.1; 98.9), Table 2]. However, the ERP was

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

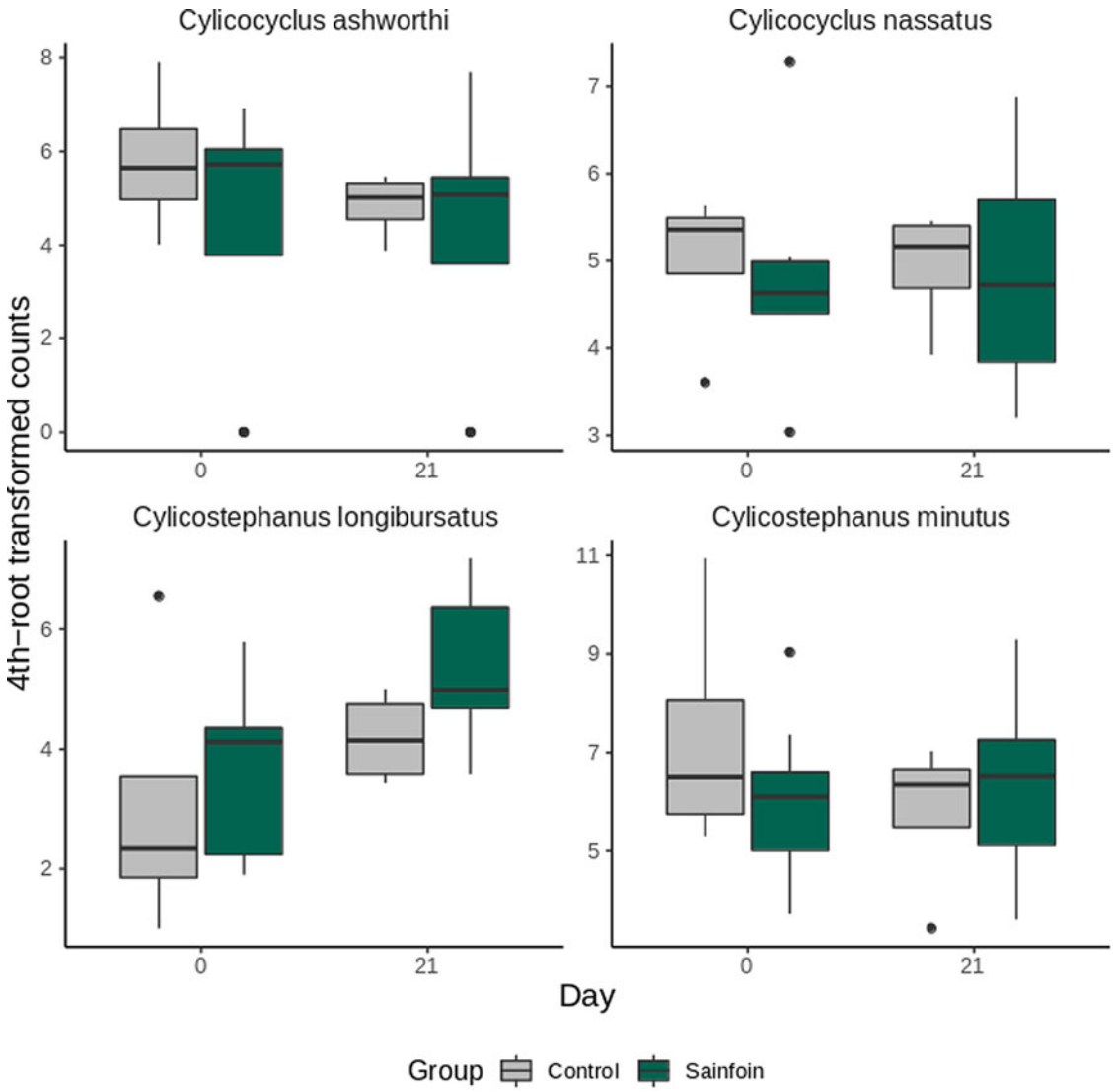


Fig. 4. Most abundant species estimated using the metabarcoding approach in horses from the control and sainfoin groups. Evolution of the 4 most abundant species in horses from the control and sainfoin groups between day 0 and day 21. Data are from 12 horses with samples successfully amplified.

above 57 days in both groups. The plasmatic IVM concentration was also measured. The drug profiles followed a typical kinetic curve expected after an oral drench with a maximum IVM concentration (C_{max}) recorded at 24 h in both groups. Importantly, the sainfoin diet negatively impacted the IVM concentration in plasma. These IVM concentrations were twice lower in horses of the sainfoin group when compared with those fed the control diet (Fig. 5B). This was observed at 24 and 48 h after IVM treatment ($P = 0.001$ and 0.006, respectively, Fig. 5B, Table 3). Consequently, the average AUC, reflecting the animal exposure to the IVM drug, was significantly lower in horses fed with the sainfoin diet ($P < 0.001$, Table 3) than in the control group.

Discussion

The present study evaluated the anthelmintic activity of a sainfoin diet as a possible alternative mode of control of cyathostomin populations in domestic horses and its interaction with IVM treatment. It provides evidence of a mild effect of dehydrated sainfoin pellets on larval development rate *in vivo* and their negative impact on the IVM pharmacokinetics. It also reports the first application of a nemabiome approach to study the effects of bioactive plants, which supports the lack of a systematic alteration of the cyathostomin larval community structure by sainfoin.

Our results agree with previous observations by Collas *et al.* (2018), who did not report any effect of dehydrated sainfoin pellets (3.6% DM condensed tannins in the diet) on strongyle FEC in horses. However, we observed a slight reduction of larval development rate in horses fed with sainfoin between day 14 and day 21 (9.7% vs 23.4% in the control group), i.e. the end of the distribution of experimental diets). On the contrary, Collas *et al.* (2018) demonstrated that sainfoin inhibited strongyle larvae development *in vitro*. This discrepancy between *in vitro* and *in vivo* studies may indicate that bioactive compounds, presumably condensed tannins (Hoste *et al.*, 2006, 2012), may not have reached sufficient levels in the gastrointestinal lumen of horses to affect the cyathostomin population. In small ruminants, it is suggested that a minimum threshold of 3–5% DM condensed tannins in the diet should be applied to observe an anthelmintic effect (Hoste *et al.*, 2012). Here, the concentration of condensed tannins in the diet was lower (i.e. 2.3% DM). Still, the proportion of dehydrated sainfoin pellets in the diet (i.e. 70% DM, as in Collas *et al.* (2018)) could not have been increased without compromising the proper functioning of the horse's digestive system. We also relied on the same treatment duration as implemented in successful experiments in ruminants (Paolini *et al.*, 2005; Heckendorn *et al.*, 2006). A more extended period of the sainfoin diet may substantially affect larval development.

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

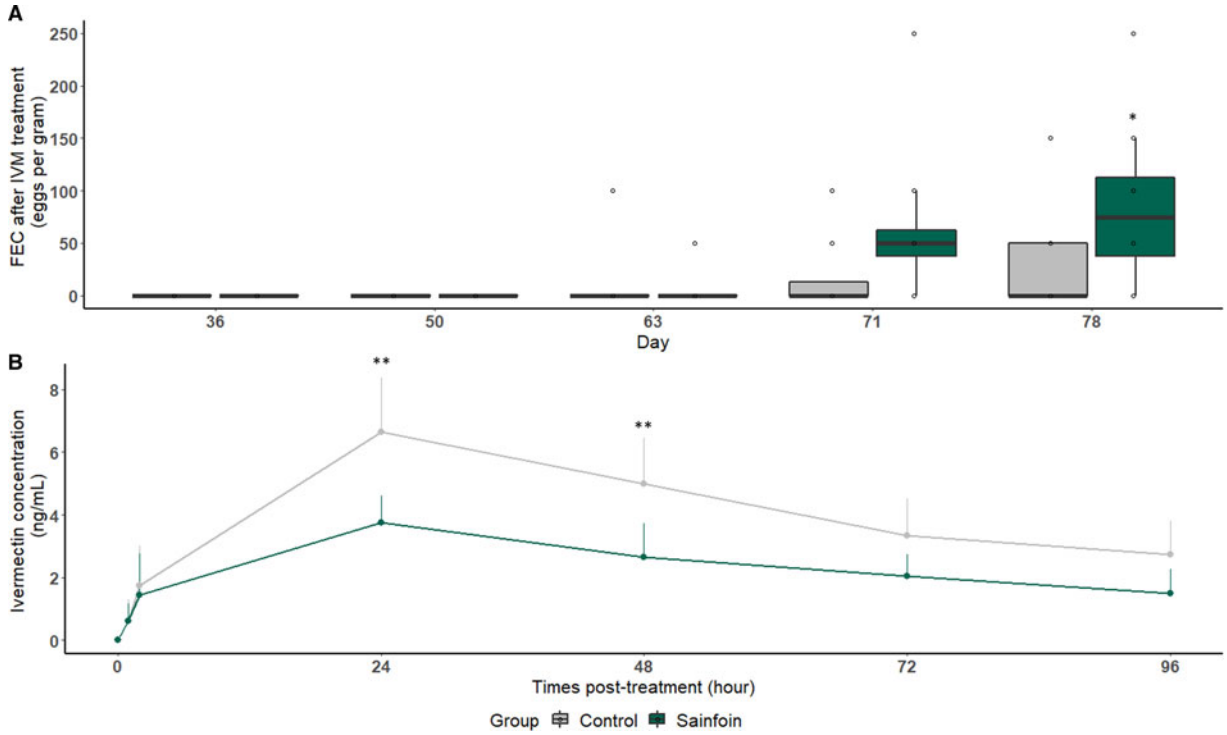


Fig. 5. Average fecal egg count (A) and plasma ivermectin concentration (B) measured after treatment. Average cyathostomin FEC (A) or IVM concentration in plasma (B) measured after IVM treatment is represented for horses receiving the control (light grey) or sainfoin (dark green) diet. *Statistically significant difference of FEC between the 2 groups at day 78 ($P = 0.04$) (A). **Statistically significant difference of average plasma IVM concentration between groups at 24 and 48 h post-treatment ($P < 0.01$) (B).

Table 2. Average FECR data (%; arithmetic mean with the 95% confidence interval) in horses receiving the control or sainfoin-enriched diet after IVM treatment

	Day 36 (57 days a. t.[a])	Day 50 (57 days a. t.)	Day 63 (57 days a. t.)	Day 71 (57 days a. t.)	Day 78 (57 days a. t.)
Control	100 (nd[a].; nd[b].)	100 (nd[a].; nd.)	98.33 (85.3; 99.8)	97.50 (88.2; 99.5)	95.83 (84.1; 98.9)
Sainfoin	100 (nd[a].; nd.)	100 (nd[a].; nd.)	99.2 (93.3; 99.9)	91.8 (77.8; 96.9)	89.55 (75.4; 95.6)

[a]After treatment.
[b]Not determined.

However, the excess protein intake (i.e. 250% MADC requirements) for more than 3 weeks could have caused health problems in horses.

Our study also evaluated the potential interaction between the tannin-rich diet and an oral IVM treatment, and showed a substantial decrease of IVM concentration in plasma when the drug was given with tannin-rich diet. In a previous experiment conducted on lambs, lower IVM plasma concentration after an oral treatment was reported in animal fed with sainfoin compared to their counterparts fed with a control diet (Gaudin *et al.*, 2016). This lower IVM plasma concentration was associated with the chelation of the molecule by the tannins *in vitro* in a dose-dependent manner (Gaudin *et al.*, 2016). Similarly, the plasma IVM concentration was reduced in horses fed with sainfoin from 24 h onwards in our study. It is generally reported that the T_{max} (time to peak plasma concentration) is 8 h for oral IVM treatment in horses (Gokbulut *et al.*, 2001; Saumell *et al.*, 2017; Vyniarska *et al.*, 2021). The measure at 8 h post-treatment was not practically feasible under our setting. In line with this lower IVM plasma concentration, measured fecal egg reduction was lower in the sainfoin group and egg excretion reappeared earlier in this group. Although the ERP was above 57 days in both groups, this observation is in favour of a decreased treatment efficacy associated with sainfoin.

This effect on IVM plasma concentration may be related to the presence of tannins in the intestinal fluid that could chelate the drug, and reduce the amount of drug available for intestinal absorption (Gaudin *et al.*, 2016). In addition, tannin-rich diets contain flavonoids, like the procyanidins (Quijada *et al.*, 2015), which are known to modulate the expression of ABC transporters (Morris and Zhang, 2006), like the P-glycoproteins (P-gps), pump the drug out of tissues and the organisms, lowering plasma IVM concentration (Bartley *et al.*, 2009; Dupuy *et al.*, 2010). Their inhibition increases IVM efficacy against susceptible *H. contortus*, a trichostrongylid of small ruminants (Kerboeuf *et al.*, 2003; Bartley *et al.*, 2009; Lespine *et al.*, 2012; Peachey *et al.*, 2017). There is evidence that polyphenols can decrease the parasite ATP-binding cassette (ABC) transporter activity or directly affect the parasite (Dupuy *et al.*, 2003; Whitney *et al.*, 2013). In addition, differential expression of these genes was found between IVM-resistant and IVM-susceptible isolates of *H. contortus* (Mate *et al.*, 2022) and cyathostomins (Peachey *et al.*, 2017) or *Parascaris* sp. (Janssen *et al.*, 2015). But our results failed to show a positive interaction between the tannin-rich diet and oral IVM treatment and in our experimental conditions, it is impossible to determine the origin of the low plasma IVM concentration in horse fed tannin-rich diet. The set-up of an equine fermenter able to mimic the hindgut conditions similar to that

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

Table 3. Pharmacokinetic parameters of ivermectin in plasma of horses receiving the sainfoin-rich or control diet

	Sainfoin	Control
C_{max}[a] (ng mL^{-1})	3.8 ± 0.8***	6.8 ± 1.7
T_{max}[b] (h)	24 ± 0.0[ns]	24 ± 0.0
$AUC^{c}_{0\rightarrow t}$ (ng.h mL^{-1})	240.4 ± 77.5***	419.8 ± 111.9

The parameters were calculated from 7 time-point concentrations measured in each animal. Values are geometric mean ± S.E.M of 10 animals.
[ns]Not significant.
***Statistically significant difference of kinetic parameters compared to control ($P \leqslant 0.001$).
[a]Maximum plasma concentration.
[b]Time of maximum concentration.
[c]AUC from 0 to the last time point.

available for the foregut (Strauch *et al.*, 2017) could help validate this hypothesis in horses. In any case, these observations suggest that horse feed should be monitored in the field while measuring ERP, as variation in plant secondary metabolites like flavonoids may obscure the results or comparison across operations.

Because a slight difference in larval development rate was observed between the two groups, the metabarcoding approach was implemented to quantify the relative abundance of each species, with a specific interest for the *Cyclicocyclus* genus. Previous records using a reverse line blot assay found that members of that genus reappeared first following IVM or pyrantel treatment (van Doorn et al., 2014; Kooyman *et al.*, 2016). Here, the sainfoin diet administered had no detectable effects on the cyathostomin larval community structure. This would be in line with the limited effects observed on other traits or with non-specific effects that apply to every species equally. To our knowledge, this is the first attempt to apply the metabarcoding approach to analyse the activity of a plant product in a parasite system. In addition, the use of mock communities of known composition highlighted two strands of improvement for this approach. Suboptimal taxonomic assignment was detected for the members of the *Cyathostomum* genus, with a high rate of uncertainty when attempting to distinguish between *C. catinatum* and *C. pateratum* in mock communities. This limitation adds up to the similarity between *Cylicostephanus calicatus* ITS-2 sequences and that of *Coronocyclus coronatus* worms, and to the presence of cryptic cyathostomin species in the community (Bredtmann *et al.*, 2019; Louro *et al.*, 2021). Additional markers like the mitochondrial cytochrome oxidase I (CO1) barcode may help increase the specificity of this approach. However, its higher rate of evolution provides a within-species resolution that may be more difficult to handle (Ramünke *et al.*, 2018).

This study confirmed the absence of effects of dehydrated sainfoin pellets *in vivo* on cyathostomin FEC and reported a weak impact on cyathostomin larval development. This is despite sainfoin pellets amounting to 70% of the horse diet. Applying a metabarcoding approach with mock communities revealed substantial margins for improvement in the taxonomic assignment. Still, it did not evidence any effect of sainfoin on the cyathostomin larval population structure. In addition, sainfoin significantly reduced IVM plasma concentration in horses leading to an accelerated reappearance of eggs in the feces. Altogether, sainfoin, administered as in this study, does not appear to be able to control cyathostomin in the field.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at https://doi.org/10.1017/S0031182022000853.

Data availability. The raw data files and associated R scripts are available under the following repository: https://github.com/Joshua-Malsa/Sainfoin-paper.git.

Acknowledgements. We are grateful to the GenoToul bioinformatics platform (https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12) for providing computing and storage resources.

Author contributions. G. Fleurance, G. Sallé, B. Dumont and J. Malsa conceived and designed the study; G. Fleurance, L. Wimel, C. Dubois, E. Courtot, M. Boisseau, F. Guégnard, D. Serreau and J. Malsa gathered the data; A. Lespine and J-F. Sutra produced and analysed ivermectin plasma concentration data; J. Lluch, G. Annonay conducted the sequencing of cyathostomin ITS-2 amplicon; T. A. Kuzmina, M. Basiaga collected the samples used for the mock community preparation; G. Sallé performed the analyses of the cyathostomin ITS-2 amplicon sequencing data; J. Malsa performed statistical analyses; J. Malsa, G. Fleurance, G. Sallé, E. Courtot, T. A. Kuzmina, M. Basiaga, S. Dhorne-Pollet, N. Mach, A. Lespine drafted the paper; P. Gombault prepared the sainfoin pellets.

Financial support. This work benefited from the financial support of the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) and Institut Carnot France Future Élevage (F2E). Joshua Malsa is a grateful recipient of a joint Fond Eperon and IFCE fellowship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethical standards. The experimental procedure received approval from the French Ministry of Research under protocol number APAFIS#26140-2020062216271790v2.

References

Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J and Lanusse C (1999) Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. *Research in Veterinary Science* **66**, 57–61.

Andrews S (2010) *FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*.

Bartley DJ, McAllister H, Bartley Y, Dupuy J, Ménez C, Alvinerie M, Jackson F and Lespine A (2009) P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology* **136**, 1081–1088.

Becher AM, van Doorn DC, Pfister K, Kaplan RM, Reist M and Nielsen MK (2018) Equine parasite control and the role of national legislation – a multinational questionnaire survey. *Veterinary Parasitology* **259**, 6–12.

Bredtmann CM, Krücken J, Kuzmina T, Louro M, Madeira de Carvalho LM and von Samson-Himmelstjerna G (2019) Nuclear and mitochondrial marker sequences reveal close relationship between *Coronocyclus coronatus* and a potential *Cylicostephanus calicatus* cryptic species complex. *Infection Genetics and Evolution* **75**, 103956.

Bucknell DG, Gasser RB and Beveridge I (1995) The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. *International Journal for Parasitology* **25**, 711–724.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA and Holmes SP (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**, 581–583.

Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA and Waller PJ (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* **44**, 35–44.

Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA and Vercruysse J (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* **136**, 167–185.

Collas C, Fleurance G, Cabaret J, Martin-Rosset W, Wimel L, Cortet J and Dumont B (2014) How does the suppression of energy supplementation affect herbage intake, performance and parasitism in lactating saddle mares? *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* **8**, 1290–1297.

Collas C, Sallé G, Dumont B, Cabaret J, Cortet J, Martin-Rosset W, Wimel L and Fleurance G (2018) Are sainfoin or protein supplements alternatives to control small strongyle infection in horses? *Animal* **12**, 359–365.

Collobert-Laugier C, Hoste H, Sevin C and Dorchies P (2002) Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy. *Veterinary Parasitology* **110**, 77–83.

Dupuy J, Larrieu G, Sutra JF, Lespine A and Alvinerie M (2003) Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology* **112**, 337–347.

Dupuy J, Alvinerie M, Ménez C and Lespine A (2010) Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells. *Chemico-Biological Interactions* **186**, 280–286.

Gasser RB, Chilton NB, Hoste H and Beveridge I (1993) Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research* **21**, 2525–2526.

Gaudin E, Simon M, Quijada J, Schelcher F, Sutra J-F, Lespine A and Hoste H (2016) Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: implications for on-farm control. *Veterinary Parasitology* **227**, 122–129.

Giles CJ, Urquhart KA and Longstaffe JA (1985) Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. *Equine Veterinary Journal* **17**, 196–201.

Gokbulut C, Nolan AM and Mckellar QA (2001) Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin, doramectin and moxidectin following oral administration in horses. *Equine Veterinary Journal* **33**, 494–498.

Grabber JH, Zeller WE and 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 2669–2678.

Halvarsson P and Höglund J (2021) Sheep nemabiome diversity and its response to anthelmintic treatment in Swedish sheep herds. *Parasites & Vectors* **14**, 114.

Heckendorn F, Häring DA, Maurer V, Zinsstag J, Langhans W and Hertzberg H (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.

Heckendorn F, Häring DA, Maurer V, Senn M and Hertzberg H (2007) Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* **146**, 123–134.

Højsgaard S, Halekoh U and Yan J (2006) The R Package geepack for generalized estimating equations. *Journal of Statistical Software* **15**, 1–11.

Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM and Hoskin SO (2006) The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* **22**, 253–261.

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

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

Hung G-C, Chilton NB, Beveridge I and Gasser RB (2000) A molecular systematic framework for equine strongyles based on ribosomal DNA sequence. *International Journal for Parasitology* **30**, 95–103.

INRA (2015) *Equine Nutrition: INRA Nutrient Requirements, Recommended Allowances and Feed Tables*. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publisher. Available at doi:10.3920/978-90-8686-855-1.

Janssen IJI, Krücken J, Demeler J and von Samson-Himmelstjerna G (2015) Transgenically expressed Parascaris P-glycoprotein-11 can modulate ivermectin susceptibility in *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **5**, 44–47.

Kaplan RM (2002) Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research* **33**, 491–507.

Kaplan RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* **20**, 477–481.

Kassambara A (2021) *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests*.

Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R and von Samson-Himmelstjerna G (2003) P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 332–346.

Kooyman FNJ, van Doorn DCK, Geurden T, Mughini-Gras L, Ploeger HW and Wagenaar JA (2016) Species composition of larvae cultured after anthelmintic treatment indicates reduced moxidectin susceptibility of immature *Cylicocyclus* species in horses. *Veterinary Parasitology* **227**, 77–84.

Kuzmina TA, Kharchenko VA, Starovir AI and Dvojnos GM (2005) Analysis of the strongylid nematodes (Nematoda: Strongylidae) community after deworming of brood horses in Ukraine. *Veterinary Parasitology* **131**, 283–290.

Kuzmina TA, Lyons ET, Tolliver SC, Dzeverin II and Kharchenko VA (2012) Fecundity of various species of strongylids (Nematoda: Strongylidae) – parasites of domestic horses. *Parasitology Research* **111**, 2265–2271.

Lespine A, Alvinerie M, Vercruysse J, Prichard RK and Geldhof P (2008) ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in Parasitology* **24**, 293–298.

Lespine A, Ménez C, Bourguinat C and Prichard RK (2012) P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2**, 58–75.

Lichtenfels JR, Kharchenko VA and Dvojnos GM (2008) Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary Parasitology* **156**, 4–161.

Louro M, Kuzmina TA, Bredtmann CM, Diekmann I, de Carvalho LMM, von Samson-Himmelstjerna G and Krücken J (2021) Genetic variability, cryptic species and phylogenetic relationship of six Cyathostomin species based on mitochondrial and nuclear sequences. *Scientific Reports* **11**, 8245.

Love S (2003) Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **19**, 791–806.

Love S and Duncan JL (1992) The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. *Veterinary Parasitology* **44**, 127–142.

Love S, Murphy D and Mellor D (1999) Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology* **85**, 113–121; discussion 121–122, 215–225.

Lumaret J-P, Errouissi F, Floate K, Römbke J and Wardhaugh K (2012) A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**, 1004–1060.

Lyons ET, Drudge JH and Tolliver SC (2000) Larval cyathostomiasis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **16**, 501–513.

Lyons E, Tolliver S, Collins S, Ionita M, Kuzmina T and Rossano M (2011*a*) Field tests demonstrating reduced activity of ivermectin and moxidectin against small strongyles in horses on 14 farms in Central Kentucky in 2007–2009. *Parasitology Research* **108**, 355–360.

Lyons ET, Tolliver SC and Collins SS (2011*b*) Reduced activity of moxidectin and ivermectin on small strongyles in young horses on a farm (BC) in Central Kentucky in two field tests with notes on variable counts of eggs per gram of feces (EPGs). *Parasitology Research* **108**, 1315–1319.

Manolaraki F, Sotiraki S, Stefanakis A, Skampardonis V, Volanis M and Hoste H (2010) Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* **137**, 685–696.

Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *European Molecular Biology Network* **17**, 10–12.

Mate L, Ballent M, Cantón C, Lanusse C, Ceballos L, Alvarez L LI and Liron JP (2022) ABC-transporter gene expression in ivermectin-susceptible and resistant *Haemonchus contortus* isolates. *Veterinary Parasitology* **302**, 109647.

Matthews JB (2014) Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **4**, 310–315.

McMurdie PJ and Holmes S (2013) Phyloseq: an R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* **8**, e61217.

Mitchell CJ, O'Sullivan CM, Pinloche E, Wilkinson T, Morphew RM and McEwan NR (2019) Using next-generation sequencing to determine diversity of horse intestinal worms: identifying the equine 'nemabiome'. *Journal of Equine Science* **30**, 1–5.

Morris ME and Zhang S (2006) Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences* **78**, 2116–2130.

Murali A, Bhargava A and Wright ES (2018) IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome* **6**, 140.

Nielsen MK, Banahan M and Kaplan RM (2020) Importation of macrocyclic lactone resistant cyathostomins on a US thoroughbred farm. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **14**, 99–104.

Nielsen MK, von Samson-Himmelstjerna G, Kuzmina TA, van Doorn DCK, Meana A, Rehbein S, Elliott T and Reinemeyer CR (2022) World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): third edition of guideline for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. *Veterinary Parasitology* **303**, 109676.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara B, Simpson G, Solymos P, Stevens H and Wagner H (2015) Vegan: community ecology package. *R Package Version 2.2-1* **2**, 1–2.

Osterman Lind E, Eysker M, Nilsson O, Uggla A and Höglund J (2003) Expulsion of small strongyle nematodes (*Cyathostomin* spp) following

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

deworming of horses on a stud farm in Sweden. *Veterinary Parasitology* **115**, 289–299.

Osterman Lind E, Kuzmina T, Uggla A, Waller PJ and Höglund J (2007) A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Veterinary Research Communications* **31**, 53–65.

Paolini V, Dorchies P and Hoste H (2003) Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *The Veterinary Record* **152**, 600–601.

Paolini V, Fouraste I and 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 and Hoste H (2005) Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* **127**, 277–283.

Peachey LE, Pinchbeck GL, Matthews JB, Burden FA, Lespine A, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J and Hodgkinson JE (2017) P-glycoproteins play a role in ivermectin resistance in cyathostomins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **7**, 388–398.

Peña-Espinoza M, Valente AH, Thamsborg SM, Simonsen HT, Boas U, Enemark HL, López-Muñoz R and Williams AR (2018) Antiparasitic activity of chicory (*Cichorium intybus*) and its natural bioactive compounds in livestock: a review. *Parasites & Vectors* **11**, 475.

Peregrine AS, Molento MB, Kaplan RM and Nielsen MK (2014) Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Veterinary Parasitology* **201**, 1–8.

Pinheiro J, Bates D, DebRoy SS and Sarkar D (2013) Nlme: linear and nonlinear mixed effects models. *R Package Version 31-110* **3**, 1–113.

Poissant J, Gavriliuc S, Bellaw J, Redman EM, Avramenko RW, Robinson D, Workentine ML, Shury TK, Jenkins EJ, McLoughlin PD, Nielsen MK and Gilleard JS (2021) A repeatable and quantitative DNA metabarcoding assay to characterize mixed strongyle infections in horses. *International Journal for Parasitology* **51**, 183–192.

Queiroz C, Levy M, Avramenko R, Redman E, Kearns K, Swain L, Silas H, Uehlinger F and Gilleard JS (2020) The use of ITS-2 rDNA nemabiome metabarcoding to enhance anthelmintic resistance diagnosis and surveillance of ovine gastrointestinal nematodes. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance* **14**, 105–117.

Quijada J, Fryganas C, Ropiak HM, Ramsay A, Mueller-Harvey I and Hoste H (2015) Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 6346–6354.

Ramünke S, de Almeida Borges F, von Son-de Fernex E, von Samson-Himmelstjerna G and Krücken J (2018) Molecular marker sequences of cattle *Cooperia* species identify *Cooperia spatulata* as a morphotype of *Cooperia punctata*. *PLoS One* **13**, e0200390.

Raynaud J-P, William G and Brunault G (1970) Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **45**, 321–342.

Reinemeyer CR, Smith SA, Gabel AA and Herd RP (1984) The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. *Veterinary Parasitology* **15**, 75–83.

Roberts FHS and O'Sullivan PJ (1950) Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* **1**, 99–102.

Rochfort S, Parker AJ and Dunshea FR (2008) Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* **69**, 299–322.

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Sallé G, Cortet J, Bois I, Dubès C, Guyot-Sionest Q, Larrieu C, Landrin V, Majorel G, Wittreck S, Woringer E, Couroucé A, Guillot J, Jacquiet P, Guégnard F, Blanchard A and Leblond A (2017) Risk factor analysis of equine strongyle resistance to anthelmintics. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance* **7**, 407–415.

Sallé G, Guillot J, Tapprest J, Foucher N, Sevin C and Laugier C (2020) Compilation of 29 years of postmortem examinations identifies major shifts in equine parasite prevalence from 2000 onwards. *International Journal for Parasitology* **50**, 125–132.

Sambrook J and Russell DW (2006) Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protocols* **2006**, pdb.prot4455.

Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ, Hoste H, Salem AZM and Chan-Pérez JI (2012) Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Animal Feed Science and Technology* **176**, 192–201.

Saumell C, Lifschitz A, Baroni R, Fusé L, Bistoletti M, Sagües F, Bruno S, Alvarez G, Lanusse C and Alvarez L (2017) The route of administration drastically affects ivermectin activity against small strongyles in horses. *Veterinary Parasitology* **236**, 62–67.

Stratford CH, Lester HE, Morgan ER, Pickles KJ, Relf V, McGorum BC and Matthews JB (2014) A questionnaire study of equine gastrointestinal parasite control in Scotland. *Equine Veterinary Journal* **46**, 25–31.

Strauch S, Wichert B, Greef JM, Hillegeist D, Zeyner A and Liesegang A (2017) Evaluation of an in vitro system to simulate equine foregut digestion and the influence of acidity on protein and fructan degradation in the horse's stomach. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **101**, 51–58.

Tombak KJ, Hansen CB, Kinsella JM, Pansu J, Pringle RM and Rubenstein DI (2021) The gastrointestinal nematodes of plains and Grevy's zebras: phylogenetic relationships and host specificity. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife* **16**, 228–235.

Traversa D, Castagna G, von Samson-Himmelstjerna G, Meloni S, Bartolini R, Geurden T, Pearce MC, Woringer E, Besognet B, Milillo P and D'Espois M (2012) Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. *Veterinary Parasitology* **188**, 294–300.

Tzelos T, Morgan ER, Easton S, Hodgkinson JE and Matthews JB (2019) A survey of the level of horse owner uptake of evidence-based anthelmintic treatment protocols for equine helminth control in the UK. *Veterinary Parasitology* **274**, 108926.

van Doorn DCK, Ploeger HW, Eysker M, Geurden T, Wagenaar JA and Kooyman FNJ (2014) *Cylicocyclus* species predominate during shortened egg reappearance period in horses after treatment with ivermectin and moxidectin. *Veterinary Parasitology* **206**, 246–252.

Verdú JR, Lobo JM, Sánchez-Piñero F, Gallego B, Numa C, Lumaret J-P, Cortez V, Ortiz AJ, Tonelli M, García-Teba JP, Rey A, Rodríguez A and Durán J (2018) Ivermectin residues disrupt dung beetle diversity, soil properties and ecosystem functioning: an interdisciplinary field study. *Science of The Total Environment* **618**, 219–228.

Vyniarska A, Ziółkowski H, Madej-Śmiechowska H and Jaroszewski JJ (2021) The pharmacokinetics and antiparasitic activity of ivermectin in Hutsul and Toric horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **44**, 11–17.

Wang C, Paul M, Isler T and Furrer R (2022) *eggCounts: Hierarchical Modelling of Faecal Egg Counts*.

Whitney TR, Wildeus S and Zajac AM (2013) The use of redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* fecal egg counts and increase ivermectin efficacy. *Veterinary Parasitology* **197**, 182–188.

Workentine ML, Chen R, Zhu S, Gavriliuc S, Shaw N, de Rijke J, Redman EM, Avramenko RW, Wit J, Poissant J and Gilleard JS (2020) A database for ITS2 sequences from nematodes. *BMC Genetics* **21**, 74.

Wright ES (2016) Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *The R Journal* **8**, 352–359.

https://doi.org/10.1017/S0031182022000853 Published online by Cambridge University Press

Article 3 : Chicory (*Cichorium intybus*) reduces cyathostomin egg excretion and development in grazing horses

I. Résumé

Toujours dans l'objectif d'identifier une plante pouvant être utilisée comme alicament pour contrôler les infestations par les strongles chez les équins, cette étude fait suite de l'évaluation du sainfoin. N'ayant observé aucune efficacité de cette approche chez le cheval (Collas *et al*., 2018, Malsa *et al*., 2022) et pour offrir de nouvelles perspectives de contrôle, nous nous sommes intéressés aux propriétés antiparasitaires de la chicorée fourragère (*Cichorium intybus*) chez des chevaux aux pâturages.

L'évaluation de l'activité antiparasitaire de la chicorée au pâturage s'est faite sur une période de 45 jours à l'été 2022. Deux groupes de 10 poulains de selle de 2 ans ont été conduits en rotation pendant 3 cycles (i) soit sur une prairie semée avec de la chicorée (variété Puna II), soit sur une prairie permanente. La composition botanique des bouchées prélevées par les poulains a été évaluée par observation directe au cours de cinq journées et pendant 7h par jour. La structure et la qualité des deux types de couverts végétaux ont de même été caractérisées à cinq reprises pendant l'expérimentation. Également, les paramètres parasitaires (excrétion d'œufs de parasite ou « OPG », leur développement en larves infestantes et la diversité alpha en espèce) ont été mesurés toutes les deux semaines. De plus, afin d'étudier le mécanisme d'action de la chicorée, une extraction des lactones sesquiterpéniques (LSs) a été réalisée et évaluée *in vitro* sur deux isolats cyathostomes présentant une sensibilité au PYR différente.

La hauteur moyenne des deux couverts était de 7cm au cours de l'essai et le coefficient de variation de 61%. Le régime « chicorée » avait un pourcentage de matières sèches (MS) inférieur à celui du régime « témoin » (*i.e*. 19,3 ± 4,3 % contre 39,6 ± 9,4 %, respectivement). Il en était de même pour la teneur en parois totales (celluloses, hémicellulose et lignine) moyennes au cours de l'étude (*i.e*. 66,8 ± 2,5 % de MS contre 52,8 ± 5,9 % de MS pour la chicorée). À l'inverse la teneur moyenne en matières azotées totales était supérieure dans le régime « chicorée » (*i.e.* 15,9 ± 4,3 % de MS) que le régime « contrôle » (*i.e.* 12,1 ± 1,2 % de MS). Les chevaux du groupe « chicorée » ont majoritairement pâturé de la chicorée (89 % des bouchées), tandis que ceux du groupe « témoin » ont surtout pâturé des graminées (73 %). A j0, les lots « chicorée » et « témoin » excrétaient 2169 ± 794 et 2169 ± 853 OPG respectivement. L'excrétion du lot témoin a

diminué au cours de l'essai tout en restant significativement supérieure à celle du lot « chicorée » (excrétion à la fin de l'expérimentation : 864 ± 316 OPG pour le lot « témoin » vs. 153 ± 215 OPG pour le lot « chicorée » ; $P < 0,001$). À l'issue du suivi, une efficacité de 85.5 % a été obtenue. Cela a eu un impact sur la diversité alpha en espèce qui était significativement différent à j31 ($P < 0,03$) et j45 ($P < 0,02$) pour l'indice de Shannon et uniquement à j45 pour l'indice de Simpson ($P < 0,02$). De plus, une réduction du développement larvaire significative a été observée chez les poulains pâturant le couvert de chicorée, -39,5 % entre j16 et j45 ($P = 0,02$). Enfin, l'extrait de chicorée enrichie en LSs a montré une activité *in vitro* faible sur les deux isolats. Cependant, l'isolat avec une sensibilité réduite au PYR avait une CI_{50} significativement plus élevée de 3,4 mg/mL contre 1,0 mg/mL ($P < 0,001$).

En conclusion, le pâturage de la chicorée fourragère par les poulains semble être une solution prometteuse pour réduire le recours aux anthelminthiques de synthèse. Néanmoins, les faibles résultats *in vitro* soulèvent des questionnements sur le mécanisme d'action *in vivo* ainsi que sur les risques d'apparition de résistances envers les métabolites secondaires des plantes.

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 24 (2024) 100523

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpddr

Chicory (*Cichorium intybus*) reduces cyathostomin egg excretion and larval development in grazing horses

Joshua Malsa [a,*], Leslie Boudesocque-Delaye [b], Laurence Wimel [c], Juliette Auclair-Ronzaud [c], Bertrand Dumont [d], Núria Mach [e], Fabrice Reigner [f], Fabrice Guégnard [a], Angélique Chereau [a], Delphine Serreau [a], Isabelle Théry-Koné [b], Guillaume Sallé [a,1], Géraldine Fleurance [d,g,1]

[a] INRAE, Université de Tours, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France
[b] Université de Tours, EA 7502 Synthèse et Isolement de Molécules Bioactives, Tours, France
[c] Institut Français Du Cheval et de L'équitation, Plateau Technique de Chamberet, Chamberet, France
[d] INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, Saint-Genès-Champanelle, France
[e] IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, Cedex 3, 31076, France
[f] INRAE, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de L'Orfrasière, Nouzilly, France
[g] Institut Français Du Cheval et de L'équitation, Pôle Développement, Innovation et Recherche, Saint-Genès-Champanelle, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Strongyles
ITS-2
Nutraceutical
Terpene
Health management

ABSTRACT

Cyathostomins are the most prevalent parasitic nematodes of grazing horses. They are responsible for colic and diarrhea in their hosts. After several decades of exposure to synthetic anthelmintics, they have evolved to become resistant to most compounds. In addition, the drug-associated environmental side-effects question their use in the field. Alternative control strategies, like bioactive forages, are needed to face these challenges. Among these, chicory (*Cichorium intybus,* Puna II cultivar (cv.)) is known to convey anthelmintic compounds and may control cyathostomins in grazing horses. To challenge this hypothesis, we measured fecal egg counts and the rate of larval development in 20 naturally infected young saddle horses (2-year-old) grazing either (i) a pasture sown with chicory (n = 10) or (ii) a mesophile grassland (n = 10) at the same stocking rate (2.4 livestock unit (LU)/ha). The grazing period lasted 45 days to prevent horse reinfection. Horses in the chicory group mostly grazed chicory (89% of the bites), while those of the control group grazed mainly grasses (73%). Cyathostomins egg excretion decreased in both groups throughout the experiment. Accounting for this trajectory, the fecal egg count reduction (FECR) measured in individuals grazing chicory relative to control individuals increased from 72.9% at day 16 to 85.5% at the end of the study. In addition, larval development in feces from horses grazed on chicory was reduced by more than 60% from d31 compared to control individuals. Using a metabarcoding approach, we also evidenced a significant decrease in cyathostomin species abundance in horses grazing chicory. Chicory extract enriched in sesquiterpenes lactones was tested on two cyathostomins isolates. The estimated IC_{50} was high (1 and 3.4 mg/ml) and varied according to the pyrantel sensitivity status of the worm isolate. We conclude that the grazing of chicory (cv. Puna II) by horses is a promising strategy for reducing cyathostomin egg excretion and larval development that may contribute to lower the reliance on synthetic anthelmintics. The underpinning modes of action remain to be explored further.

1. Introduction

Small strongyles of the family Strongylidae are the most prevalent gastrointestinal nematodes in horses (Reinemeyer et al., 1984). Infection-induced clinical signs include colic, diarrhea and weight loss. The massive simultaneous emergence of larval stages encysted in the colonic mucosa (larval cyathostominosis) can lead to the death of the most susceptible hosts, especially young animals (Giles et al., 1985; Love et al., 1999; Love and Duncan, 1992; Peregrine et al., 2014). Therefore, small strongyle control is essential, but the frequent use of synthetic anthelmintics has selected resistant isolates worldwide (Kaplan, 2002, 2004; Traversa et al., 2012; Matthews, 2014). Moreover, the molecules

* Corresponding author.
E-mail address: joshua.malsa@inrae.fr (J. Malsa).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100523
Received 16 June 2023; Received in revised form 19 January 2024; Accepted 21 January 2024
Available online 9 February 2024
2211-3207/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

remaining the most effective against small strongyles (macrocyclic lactones like ivermectin and moxidectin (Nielsen, 2022)) have the potential to induce toxic effects on coprophagous organisms (Lumaret et al., 2012; Verdú et al., 2018). These accelerate the need to explore alternative solutions for a sustainable control of cyathostomins. In small ruminants facing a comparable challenge, a significant body of research has been published to evaluate the anthelmintic activity of bioactive plants harboring secondary metabolites like alkaloids, tannins, or terpenoids (Santos et al., 2019). To date, *in vitro* tests have evidenced the anthelmintic activity of alkaloids against trichostrongylids (da Silva et al., 2021) but *in vivo* effects were poorly studied or not significant (Dubois et al., 2019). On the other hand, *in vitro* tests have evidenced that condensed tannins could affect larval motility assay or exsheathment (Paolini et al., 2004; Manolaraki et al., 2010). In contrast to alkaloid-containing plant, the anthelmintic efficacy of condensed tannin-rich plants such as sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) has been demonstrated *in vivo* in sheep and goat studies (Paolini et al., 2003, 2005; Heckendorn et al., 2006; Manolaraki et al., 2010; Gaudin et al., 2016). However, in horses, two independent trials concluded on the lack of efficacy of the short-term consumption of a sainfoin-rich diet on cyathostomins egg excretion and larval development (Collas et al., 2018; Malsa et al., 2022). In addition, sainfoin pellets did not affect the structure and diversity of the parasite community and interacted negatively with an oral ivermectin treatment, reducing its plasma concentration (Malsa et al., 2022). Finally, terpenes such as sesquiterpene lactones (SLs) (*i.e.* 8-deoxylactucin hereafter referred to as 8-DOL) have demonstrated significant *in vitro* effects against *Ascaris suum* (Valente et al., 2021). Chicory (*Cichorium intybus*), a plant used as animal forage (Rumball, 1986; Niezen et al., 1994; Scales et al., 1995; Street et al., 2013), contains SLs in the leaves (2% DM according to Peña-Espinoza et al. (2015) and Valente et al. (2021)). Significant reductions of L4 and adult counts helminths of the abomasum were observed in infected sheep grazing chicory, but their fecal egg count (FEC) and intestinal worm abundance were not affected (Marley et al., 2003). Moreover, a reduction of abomasal worm numbers of *Ostertagia ostertagi* has been reported in cattle (Peña-Espinoza et al., 2016). To date, all studies evaluating chicory's anthelmintic activity in ruminants have found it to be effective only on abomasum species and for diet including at least 70%DM of chicory (Peña-Espinoza et al., 2018). While a number of studies have explored the potential of chicory against parasitic nematodes in ruminants, none of them assessed its efficacy for the control of equine cyathostomins.

With the aim of reducing the use of chemical antiparasitic, our study investigated the anthelmintic effects of chicory Puna II cultivar (cv.) in grazing horses. A first *in vivo* approach was designed to test if cyathostomin egg excretion and larval development were lower in young horses grazing a chicory pasture during 45 days compared to control individuals grazing a mesophile grassland. To study a potential difference in sensitivity to chicory between cyathostomins species, an ITS-2-based metabarcoding approach was implemented as in (Malsa et al., 2022). Using a molecular "barcode", this approach allows us to quantify cyathostomin species abundances (Mitchell et al., 2019; Poissant et al., 2021; Tombak et al., 2021) and to infer putative species-specific effects of chicory. Finally, an *in vitro* experiment was performed to evaluate the direct activity of chicory leaves extracts enriched in sesquiterpene lactones on the larval development of cyathostomin isolates with varying sensitivity to pyrantel.

2. Materials and methods

The *in vivo* trial was conducted from August 22nd to October 5th, 2022, at the French Horse and Riding Institute experimental farm (IFCE) in Chamberet (45.5820° N, 1.7212° E), France. Each individual fecal sample was taken from the ground directly after its release, taking particular care to collect only the part that has not touched the ground, to avoid contamination from the soil.

2.1. Animal condition

For the *in vivo* experiment, twenty naturally infected saddle horses (Anglo-Arab breed, 2 years old) were used. All horses were born at the IFCE experimental farm and were exposed to the same parasite populations. Infected horses were left undrenched for 264 days before the onset of the trial (last anthelmintic administered on November 30th, 2021 ; moxidectin 400 µg/kg body weight, Equest, Zoetis, France). Two fecal egg counts (FECs, per gram of fresh fecal matter) performed in April and June 2022 on individual feces showed that horses were moderately infested (<380 eggs per gram (EPG)). On August 19th, 2022, three days before the start of the study, animals were assigned to two experimental groups (chicory and control) of ten horses balanced for their last FEC values (chicory group FEC average = 2169 EPG [95% CI = 1676.42; 2661.57] ; control group FEC average = 2169 EPG [95% CI = 1639.97 ; 2698.03]). Horses were weighted (PUEC31, Radwag electronics, Poland) on two consecutive days one week before the start of the study, to ensure that the two groups were also balanced for average body weight (BW) (460.6 ± 20.2 kg and 457.6 ± 18.2 kg in the chicory and control groups, respectively, $P = 0.731$), and sex (eight females and two geldings in each group).

2.2. Parasite material

Two different cyathostomins isolates were used in this study. The first one came from horses of the IFCE experimental farm in Chamberet, France. The *in vivo* effects of grazing chicory were measured on this isolate. The second isolate came from the INRAE experimental station in Nouzilly (47.5434° N, 0.7442° E), France (DOI:10.15454/1.5573896321728955E12). Mock communities were derived from this isolate. Both isolates were used for the *in vitro* larval development assay. Chamberet and INRAE isolates were both benzimidazole-resistant and ivermectin susceptible. While the INRAE isolate was slightly resistant to pyrantel (Boisseau et al., 2023), the sensitivity to pyrantel of the Chamberet isolate was unknown. We therefore performed a fecal egg count reduction test (FECRT) on twenty horses of Chamberet (n = 10 treated and n = 10 not treated) on March 28, 2023, with pyrantel (6.6 mg/kg of BW, Strongid®, Zoetis, France). Fecal samples were collected on the ground at d0 and d14 after treatment and a McMaster assay was performed with a sensitivity of 10 eggs/g (Qualyse lab, Tulle, France). The two isolates showed different pyrantel sensitivity: FECRT of the INRAE isolate (Boisseau et al., 2023) was 91.5%, [95% CI = 78.1; 100] and that of the Chamberet isolate was 99.3% [95% CI = 98.2; 100].

2.3. Experimental design

The trial was conducted over 45 days to evaluate the anthelmintic effect of chicory while preventing horse reinfection. The two groups grazed rotationally at the same stocking rate (2.4 LU/ha, 1 LU (livestock units) = 600 kg BW) either: (i) a pasture sown in April 2022 with pure chicory (cv. Puna II, 9 kg/ha) (45°34′03″N, 1°43′28″E), or (ii) an old mesophile temporary grassland (sown in 2006 and overseeded with 25 kg/ha of perennial ryegrass in October 2020) (control group) (45°34′00″N, 1°43′25″E). Between October 2021 and January 2022, both pastures were fertilized with organic nitrogen and received manure as well as a mixture of calcium and magnesium oxides. Urea was also applied on the mesophile pasture in April 2022. For each treatment, the pasture (3.2 ha) was divided into five subplots (0.64 ha) grazed during three rotation cycles: 1st cycle from day 1 (22/08) to day 15 (05/09), 2nd cycle from day 16 (06/09) to day 30 (20/09) and third cycle from day 31 (21/09) to day 45 (05/10). Horses in both groups grazed each subplot for three days before being moved to the next one. No additives or supplements were given to the horses during the entire experimental period and water was available *ad libitum*.

2.4. Vegetation and dietary choices measurements

In each treatment, vegetation biomass was determined on four occasions along the experiment (d5, d17, d26 and d38), on the second day of the presence of horses in a subplot. For this, six 0.5 m^2 (10 cm × 5 m-long) strips were randomly cut to ground level with manual lawn-mowers and weighted (Sartorius Economy Series EB, Sartorius AG, Germany). Representative samples were dried at 60 °C for 72 h to estimate the dry matter (DM) content. Samples were then ground to 1 mm and analyzed for crude protein (CP ; Dumas method (Jung et al., 2003), N × 6.25) and neutral detergent fiber content (NDF, according to the method of (Van Soest et al., 1991)). The distribution of vegetation heights (100 sample points per diagonal, measured at the first place where a stick contacted the sward surface) was assessed five times during the experiment, on the second day of the presence of horses in a subplot (d5, d11, d23, d32, and d44). At each sample point, we also recorded available bites characterized by the dominant item (chicory, grasses, legumes, or forbs) and the potential presence of plants with anthelmintic properties reported in small ruminants (*i.e.*, *Plantago lanceolata., Rumex obtusifolius* L., and *Chenopodium album* L*)*. On the same day, dietary choices were measured by two observers (one in each group) using a scan-sampling method with activity recorded in both groups every 15 min for each animal (from 7:30 a.m.–11 a.m. and from 4:30 p.m.–8 p.m.). When an individual was grazing, the observer moved as close to the animal as possible (~2 m) without disturbing it to record the composition of one selected bite. Observers decided beforehand which bite to register (*i.e.*, the fifth one) to avoid bias in picking the most visible bites. This required animals to be trained for a week before measurements.

2.5. Fecal sample analysis

Fecal samples were collected individually from the ground, directly after their excretion, at four times during the experiment (d0, d16, d31, and d45). Samples were stored at +4 °C until they were sent to INRAE Centre Val de Loire facilities (Nouzilly, France) where they were processed within 24 h upon collection. Dry matter content of the feces was determined from fecal samples collected at d16 that were dried at 60 °C. As no significant difference in feces DM was observed ($P = 0.06$) between the two groups, we considered FEC values measured on fresh fecal matter. Individual FEC data were determined using a modified McMaster technique (Raynaud et al., 1970) based on the dilution of 5 g of fecal matter in 70 mL of a saturated NaCl solution (density = 1.18). Eggs were counted using an optical microscope (× 150 magnification), the minimum detection limit was set at 50 EPG.

To evaluate the effect of the diet on larval development, the remaining fecal matter (40 g–90 g) was incubated individually for each horse for 12 days at +25 °C and 60% relative humidity. Infective third-stage larvae (L3) of cyathostomins were then collected using a Baermann apparatus after 48 h allowing larval migration for each horse and timepoint. The larval count in each sample was determined from 30 drops of 5 µL of the larval solution under the microscope (× 4 magnification). Based on the method used by Collas et al. (2018), the larval development rate was calculated with individual larval cultures from each horse as follows:

$$\left(\frac{Counted\ L3}{FEC \times g\ of\ cultured\ feces}\right) \times 100$$

2.6. Gastrointestinal nemabiome

To further investigate the antiparasitic activity of chicory, we estimated changes in the cyathostomin community structure during the trial. We used a metabarcoding approach on cyathostomin larval populations harvested from fecal samples collected on d0, d16, d31, and d45 of the experiment. From 80 fecal samples, 13 did not produce any larvae. Ultimately, we extracted the DNA from 67 samples following the DNeasy PowerSoil Pro Kits (Qiagen, Holland). Mock community included 32 worms (14 *Cylicocyclus nassatus*, 12 *Cyathostomum pateratum*, 3 *Cylicostephanus goldi*, 1 *Cyathostomum catinatum*, 1 *Cylicostephanus minutus* and 1 *Cylicocyclus ashworhi*) collected after pyrantel treatment (6.6 mg/kg BW, Strongid®, Zoetis, France) of Welsh ponies from INRAE. The DNA from each adult parasite was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) and used for genotyping the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and cytochrome *c* oxidase I (COI). DNA concentrations were quantified using the Qubit® double-stranded high-sensitivity assay kit (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) with a minimum sensitivity of 0.1 ng/µL. Two mock communities were then built with a mix of raw DNA concentrations containing one or all adults of each species (Table S1). For the nemabiome study, the ITS-2 gene region was PCR amplified using the NC1 (5′-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3′) and NC2 (5′-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3′) primers (Gasser et al., 1993). Primers also contained between one to three random bases to increase diversity and an Illumina adapter overhang as described previously (Courtot et al., 2023). PCR reactions were realized on 80 µL using 16 µL HF buffer 5X, 1.6 µL dNTPs (10 mM), 4 µL primer mix containing forward and reverse primers, 0.8 µL Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL ; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and 2 µL of a 5 ng/µL genomic DNA solution (Courtot et al., 2023). The libraries were created with 25 µL of each DNA sample concentrated 0.4–74.2 ng/µL in TRis-HCL. Each sample was sequenced on two lanes of NovaSeq 6000 with 250 cycles (IGA sequencing platform, Italy). The adapter trimmed reads were edited to remove the ITS-2 primer sequences using cutadapt v.1.4 (Martin, 2011). Nemabiome data were subsequently analyzed in R v.4.2.1 (R Core Team, 2023) with the dada2 software (Callahan et al., 2016) using the mock community as a standard to choose appropriate bioinformatic parameters as described previously (Courtot et al., 2023). Using this approach, we retained a maximum number of expected errors of 2 and 5 for the forward and reverse reads respectively, a truncation length of 200 bp, and applied the default BAND_SIZE parameter. Downstream analyses and count tables data were analyzed using the phyloseq v.1.42.0 R package (McMurdie and Holmes, 2013) and vegan v.2.6–4 R package (Oksanen et al., 2015). The amplicon sequencing workflow yielded 465,366 sequences on average [820–703,166] for 56 samples. A first filter was applied to remove any amplicon sequence variants (ASVs) with less than 10,000 occurrences. A second filtration was realized to remove the samples that failed, *i.e.* two samples showing less than 10,000 (2 samples removed). Following taxonomy assignment, one false positive ASV (detected in the mock communities while absent) with a summed relative abundance below 5% across the 54 samples was removed. Between filtering and the final analysis, a few samples ($n = 24$) with abnormal behaviors were removed from further analyses. At the end of the pre-treatment, we worked on 30 samples and 14 ASVs, corresponding to 12 species correctly identified. One ASV was attributed only at genus level and another at family level. Due to the low quality of the samples at d0, these were removed from the analysis. The final dataset comprised 30 samples and 14 ASVs, corresponding to 12 species. Species diversity within the two groups was measured at each sampling date, using alpha diversity, an indicator of the number of different species present in a specific condition. We used both Shannon and Simpson indexes, whereby the Shannon index has greater sensitivity to variation in rarer species abundances. We also used β-diversity (Bray Curtis distance) to measure species dissimilarity between the two groups.

2.7. Preparation of sesquiterpenes lactones (SLs) enriched chicory extract

Fresh chicory leaves samples were collected by hand from the entirety of the five subplots at the end of the experiment, when the cumulative effects of chicory consumption on FEC and development of eggs into L3 larvae were maximal (d45; September 05, 2022). After collection, the samples were frozen at −20 °C until extraction. The

isolation and purification of SLs were performed according to a previously published protocol (Peña-Espinoza et al., 2015). First, 11 g of fresh leaves were freeze-dried overnight, then ground to powder and separated in 50 mL tubes (2 g per tube) before 30 mL of methanol/Milli-Q-H_2O (4/1 ; v/v) containing 2% formic acid (v/v) was added. Each tube was vortexed (1 min), sonicated in a water bath (at room temperature) for 10 min, and centrifuged (10 min, 1200 rpm Rotanta 460 R from Hettich®). After centrifugation, the supernatants from each 50 mL tube were pooled in a round-bottomed glass flask. The ground leaves remaining in the tube were extracted three more times, following the protocol described above, and supernatants were pooled in the round-bottomed flask. The supernatant was concentrated under reduced pressure at 35 °C to evaporate methanol and formic acid. To remove Milli-Q-H_2O, the round-bottomed flask was freeze-dried overnight. The crude extract obtained was resuspended in methanol (5 mL) and dissolved with 70 mL of a cellulase enzyme solution (10 mg cellulase from *Aspergillus niger* [Sigma 22,178]/mL Milli-Q-H_2O). The mix was incubated in a water bath for 2 h at 40 °C. After the enzymatic reaction, the extract was distributed into 5 mL tubes and 25 mL of ethyl acetate was added to each tube. The tubes were centrifuged (10 min, 1200 rpm Rotanta 460 R from Hettich®) and the supernatant was pooled in round-bottomed glass flasks. The sedimented material remaining in the tubes were extracted twice, following the protocol described above. The ethyl acetate extracts were evaporated to dryness under reduced pressure (35 °C), redissolved in methanol (8 mL) and transferred to 50 mL tubes. The final purification of SLs was performed by solid-phase extraction (SPE). Dichloromethane (28 mL) was added to each tube and centrifuged (10 min, 1200 rpm Rotanta 460 R from Hettich®). A SPE vacuum manifold (Thermofisher) was equipped with 6 mL SPE tubes (Supelclean® LC-Si SPE tubes, Supelco 505,374). SPE tubes were conditioned with dichloromethane/i-propanol (6 mL, 1/1 ; v/v) and equilibrated with dichloromethane (6 mL). Extract mixed with dichloromethane (6 mL) was loaded in each SPE tube and the collected fraction was dried under reduced pressure (35 °C). Lastly, 590 mg of chicory extract enriched in SLs were obtained and collected in a pillbox. The composition and the concentration of terpenes from the enriched SLs extract were carried out on an ultra-high-performance liquid chromatography-diode array (UHPLC-DAD) adapted from Ferioli and D'Antuono (2012). The extract was dissolved at 10 mg/mL with methanol/water (1/1) solution and filtered at 0.2 µm. SLs titration was performed using UHPLC-DAD protocol adapted from Ferioli and D'Antuono (2012). HPLC analysis were performed on a Dionex UHPLC U3000RS system equipped with a LPG-3400RS quaternary pump, a RSLC WPS-300 T RS automated injector, a TCC-300SD column oven and a UHPLC + DAD-3000 diode array detector (ThermoFisher SA, Voisins le Bretonneux, France). The system was fitted with an Accucore aQ C18 (15 cm × 3 mm i.d., 2.6 µm particle size) column, itself protected by an Accucore aQ C18 10 × 3.0 mm 2.6 µm Defender Guards (ThermoFisher SA, Voisins le Bretonneux, France). The mobile phases were solvent A methanol:water (14:86,v/v), solvent B methanol:water (64:36,v/v). The gradient was set as follow: initial solvent B content was 0%, it was raised to 42% in 7.4 min and maintained for 3.75 min. Then solvent B was raised to 100% in 5.63 min and maintained for 2 min. Post run equilibrium was performed during 5 min. Signal acquisition was performed at 210 and 260 nm and a UV 3D scan was performed between 200 and 400 nm. Lactucopicrin (LACP) titration was performed using a calibration curve of LACP (99%, Sigma PHL84796) in the range of 100–300 ng. In order to build the calibration curve a solution of LACP was prepared at 50 µg/mL and injected volume were set at 2, 3, 4, 5 and 6 µL. Crude extract and enriched SL fraction were injected at 10 mg/mL, with a volume of 5 and 4 µL respectively. Peaks assignment to flavonoid or SL was performed by comparison of the full UV–Visible spectra on each peak, to the reference library.

2.8. In vitro experiment (larval development assay)

To investigate the relative contribution of SLs from chicory leaves on the observed *in vivo* effects, a larval development assay was conducted on the cyathostomin isolate where the trial was conducted (Chamberet) and that from an independent experimental pony herd (INRAE). The eggs were extracted from fecal samples collected from the ground directly after excretion, on 07.03.23 for INRAE samples and on 11.04.23 for Chamberet samples. *Cyathostomum pateratum* and *Cylicocyclus ashworthi* were dominant in both isolates, with *Cylicocyclus nassatus* as an additional species in the INRAE isolate. First, the samples were washed through a colander to remove the largest particles and then through two sieves, a first of 125 µm and a second of 20 µM to retain the eggs. Kaolin (Sigma K7375) was then added to the egg solution before centrifugation. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in a saturated NaCl solution (density = 1.18) before centrifugation (5 min, 2500 RPM). The supernatant was collected on a 20 µm sieve. After eggs purification, 2.75 eggs/µL (110 eggs) were filled in a 96-well plate with feces mixture made with the residual fecal matter samples (horse feces mixed with water, v/v ; the mixture was crushed through a filter (125 µm) to collect only the liquid and used at an OD_{650nm} of 0.8), bacteria (*Escherichia coli* OP50 strain) to an OD_{650nm} of 1.3 and 500 µg/mL of amphotericin b (Sigma A4888). The plate was incubated at +25 °C for 24 h, letting the eggs develop into L1/L2 larvae. After the incubation, the SLs extract was added to the larvae at the concentrations of interest (between 5000 and 1 µg/mL) and incubated for six days, before the number of undeveloped (L1/L2), dead, or developed (L3) larvae were counted. The six replicates performed were sampled from a single larval batch cultured from 1 INRAE pony and 20 Chamberet horses. The development percentage was calculated as follows:

$$\left(\frac{\text{number of L3}}{\text{number of L1 and L2} + \text{number of L3}}\right) \times 100$$

2.9. Statistical analysis

All data were analyzed using the R software v.4.2.1 (R Core Team, 2023). The difference of BW between the two groups at d45 was tested using an ANOVA (anova_test function from rstatix v.0.7.2 package) considering the BW at d0 (control: 456.6 ± 17.9 kg, chicory: 461.5 ± 20.2 kg) as a covariate. FEC data have been backtransformed (*i.e.* transformed into exp (log data+1) – 1). The effect of chicory on the FEC rate was analyzed with a generalized linear mixed-effects model assuming a negative binomial distribution using the *glmer.nb* function of the lme4 v.1.1–34 package (Bates et al., 2015). We fitted diet, time and diet × time interaction terms as fixed effects, and horse as a random effect. This model estimates the deviation in FEC occurring in the chicory group relative to the control group over time, while accounting for inter-horse variation. The diet effect on the FEC and the larval development rate at each sampling date was analyzed using a Wilcoxon rank sum test (*wilcox.test* function from stats v.4.2.1 package) (R Core Team, 2023). The differences in alpha diversity (Shannon and Simpson index) between the two groups were analyzed using a *t*-test. The efficacy of chicory on reducing FEC was first measured at d16, d31 and d45 based on the Bayesian hierarchical approach as recommended by the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) (Kaplan et al., 2023), with the individual FEC of the control group used as pre-treatment and the individual FEC of the chicory group as post-treatment, including the correction factor for the McMaster technique (50), which resulted in an average fecal egg count reduction (FECR%) and 95% confidence interval (CI). For this, we used the fecr_stan function from eggCount v.2.3–2 package (Wang et al., 2022). In addition, the cumulative FEC of each animal at the end of the trial was calculated according to Vercruysse et al. (1993) and compared between the two groups using the Wilcoxon rank sum test as used in (Peña-Espinoza et al., 2016). Pyrantel efficacy was also measured as

recommended by the WAAVP. The LDA data were used to fit a two-parameter log-logistic regression model on the development ratio to the control as the response variable and the concentration range as the variable, using the *LL.2* function where the lower and upper limits are fixed at 0 and 1 respectively of the drc v.3.0–1 package (Ritz et al., 2015). The inhibitory concentration 50 (IC_{50}) was determined with the *ED* function and statistically compared using the compParm function from the same package. This function compares actual parameter estimates taking into account the model and the parameters used to measure IC_{50}.

The R scripts used and associated datasets are freely available under https://github.com/Joshua-Malsa/Chicory-paper.

3. Results

3.1. Vegetation characteristics and dietary choices

Vegetation structure and quality of chicory and control pastures are presented in Table 1. In the control group, the bites available for horses were dominated by grasses (65.9 ± 7.1% of available bites) and, to a lesser extent, by forbs (plants other than grasses, legumes or chicory) (21.7 ± 8.8% of available bites ; Table S2) including some species with known anthelmintic activity in ruminants (*i.e.*, *Plantago lanceolata, Rumex obtusifolius* L. and *Chenopodium album* L.) (11.8 ± 9.7% of available bites). In the pasture sown with chicory, bites dominated by chicory represented 88.4 ± 5.4% of the total available bites (Table S2) while other plants with known anthelmintic activity in ruminants represented 0.5 ± 0.6% of available bites. Horses in the control group mostly grazed on grasses (72.8 ± 10.3% of the bites consumed by horses) while their counterparts in the other group mostly grazed chicory (88.8 ± 7.6% of their bites were dominated by chicory, and a total of 89.2 ± 7.4% of the bites contained chicory; Table S3). Among forbs with known anthelmintic activity in ruminants, plantain (*Plantago lanceolata*) was the sole consumed by horses in both groups; its presence was observed in 3.7 ± 3.0% and 0.1 ± 0.2% of horses' bites in the control and chicory treatments, respectively. The average BW of horses at the end of the experiment was significantly higher in the control group (471.2 ± 20.4 kg BW and 458.9 ± 17.5 kg BW for the control and chicory groups, respectively; $P < 0.01$).

3.2. Chicory effect on FEC

Mean FEC of the two groups and the corresponding FECR are listed in Table 2. A significant decrease in cyathostomin eggs counts occurred in both groups at the first sampling (on day 16) relative to day 0: from 2169 EPG [95% CI = 1639.97; 2698.03] to 1085 EPG [95% CI = 847.11; 1321.89] in the control group (−50.0%), and from 2169 EPG [95% CI = 1676.42; 2661.57] to 285 EPG [176.04; 393.95] in the chicory group (−86.9% (d16 effect; $P = 0.01$), (Fig. 1). The decrease in FEC between d0 and d16 was higher in the case of the chicory group, which resulted in a lower FEC in this group compared to the control group at d16 (interaction d16 × group, $P < 0.001$). The difference in FEC between groups remained significant on the following occasions ($P < 0.001$ for d31 and d45). The FECR in the chicory group was greater than 70% compared with the control group on days 16, 31 and 45, with a final FECR of 85.5 % [95% CI = 69.5; 99.5]. The cumulative FEC sampled in horses grazing chicory (26929.50 [95% CI = 18047.14; 35811.86]) over the course of the study was also twice lower than the control group (58088.25 [95% CI = 44308.35; 71868.15]) ($P = 0.001$).

Table 1
Vegetation structure and quality (Mean ± sd).

	Control	Chicory
Sward surface height (cm)	6.6 ± 1.3	6.8 ± 2.5
Biomass (g DM/m^2)	53 ± 20	75 ± 42
Dry matter (%)	39.6 ± 9.4	19.3 ± 4.3
Crude protein (DM %)	12.1 ± 1.2	15.9 ± 4.3
Neutral detergent fiber (DM %)	66.8 ± 2.5	52.8 ± 5.9

Table 2
FEC and FECR results.

		FEC (mean EPG [95% CI])	FECR (Efficacy (%) [95% CI])
d0	Control	2169.0 [1639.97–2698.0]	
	Chicory	2169.0 [1676.42–2661.57]	
d16	Control	1085 [847.10–1321.89]	
	Chicory	285 [176.05–393.95]	72.9 [55.9–86.6]
d31	Control	1233 [827.17–1638.85]	
	Chicory	282 [91.13–472.87]	78.5 [55.7–94.7]
d45	Control	864 [667.55–1060.45]	
	Chicory	153 [19.50–289.49]	85.5 [69.5–99.5]

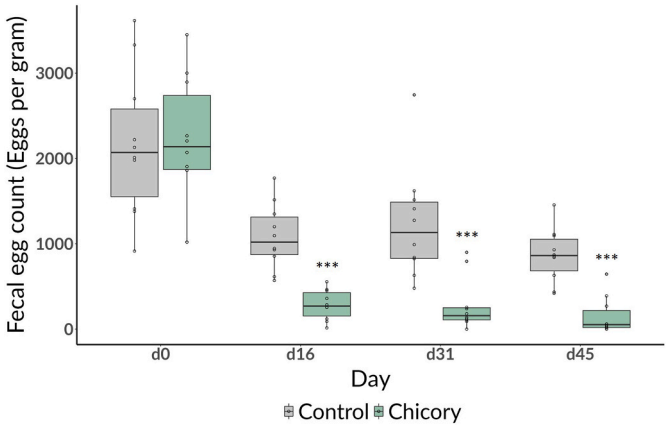


Fig. 1. FEC distribution measured at four time points over the experimental period for control (gray) and chicory (green) groups
Asterisks indicate the statistically significant difference between groups at each time point ***$P < 0.001$.

3.3. Chicory effect on larval development

Despite similar procedures, the average larval development rate at d0 was close to 0% (1.01 ± 2.45%) in both groups. It increased in both groups at d16 (13.2 ± 7.5% and 12.4 ± 6.4% for the control and chicory groups, respectively (mean ± sd)), without any significant difference

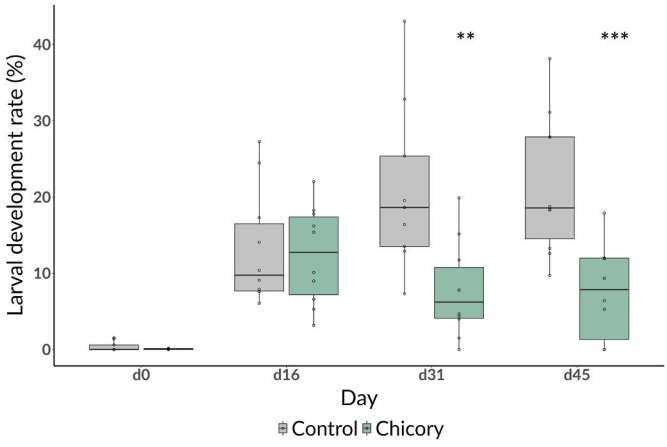


Fig. 2. Larval development rate measured over the experimental period for control (gray) and chicory (green) groups
Asterisks indicate statistically significant differences between the two groups at day 31 (**$P = 0.006$) and day 45 (***$P = 0.001$)

between groups ($P = 0.9$) (Fig. 2). At d31 and d45, the percentage of larval development was significantly lower in the chicory group (2.7 and 2.9 times lower at d31 ($P = 0.006$) and d45 ($P = 0.001$), respectively).

3.4. Chicory effect on equine cyathostomins larval community structure

Following data editing, a significant reduction in alpha-diversity (Shannon's index) was found in the chicory group relative to the control group from day 31 onwards ($P = 0.03$ at day 31 and $P = 0.02$ at day 45 ; Fig. 3A) (Fig. 3A). A slight difference was observed for the Simpson index between the two groups at day 45 ($P = 0.05$). This reduced species richness in the chicory group was concomitant of a significant variation in β-diversity attributable to the experimental group effect (Fig. 3B). The β-diversity shift was underpinned by differential abundances of *Cylicostephanus longibursatus* and *Cylicostephanus minutus* that were less affected by the chicory diet compared to the other species (Fig. 4).

3.5. Sesquiterpenes lactones-enriched extract composition

To test for the putative role played by SLs in the observed *in vivo* activity, the SLs-enriched extract composition was determined using UHPLC-DAD. The obtained chromatogram found a limited subset of SLs. Seven main peaks were observed with retention times of 5.6, 6.8, 10.7, 16.1, 16.4, 17.6, and 18.6 min (Fig. 5). The 16.4 min peak corresponded to the LACP, which was the primary terpene identified with a content of 7.6 μg/mg of extract. By a comparison of the full UV–Visible spectra on each peak, to the reference library we can confirm that peaks with retention times of 5.6, 6.8 and 16.1 min are SLs and those at 17.6, and 18.6 min are flavonoids. However, the peak at 10.7 min remains unknown.

3.6. In vitro anthelmintic activity evaluation of the purified chicory extract enriched of SLs

We next tested the effect of the purified chicory extract on cyathostomin larval development to investigate their role in the inhibitory effect observed *in vivo*, using a pyrantel-sensitive and -resistant isolates (Fig. 6). We noticed, however, that the Chamberet isolate (pyrantel sensitive) displayed a significantly higher sensitivity to the chicory extract enriched of SLs ($IC_{50} = 1.0$ mg/mL [95% CI = 0.6; 1.4]) relative to the INRAE (pyrantel resistant) experimental isolate (IC_{50} of 3.4 mg/mL [95% CI = 3.2 ; 3.5]) ($P < 0.001$).

4. Discussion

This study investigated for the first time the use of chicory as a bioactive forage to control equine cyathostomins. After 16 days of chicory grazing, a significant FEC reduction was observed, reaching an efficacy slightly lower than that of pyrantel treatment at the end of the study (85.5% vs 99.3% FECR for chicory and pyrantel respectively). This diet also reduced the development of eggs into third-stage larvae in feces and affected the cyathostomin community diversity, whereby *Cylicostephanus longibursatus* and *Cylicostephanus minutus,* two of the most prevalent species in the world (Ogbourne, 1978; Bucknell et al., 1995; Lyons et al., 2000; Laugier et al., 2003; Kuzmina, 2012), were the dominant species in the chicory group at the end of the trial. This observation is compatible with a reduced sensitivity of the most abundant species to the chicory regime. On the contrary, minor species would be more prone to disappear following chicory-induced modifications of the fecal microenvironements. The metabarcoding approach would be especially useful to test for species-specific effect of chicory extracts using *in vitro* larval development assay.

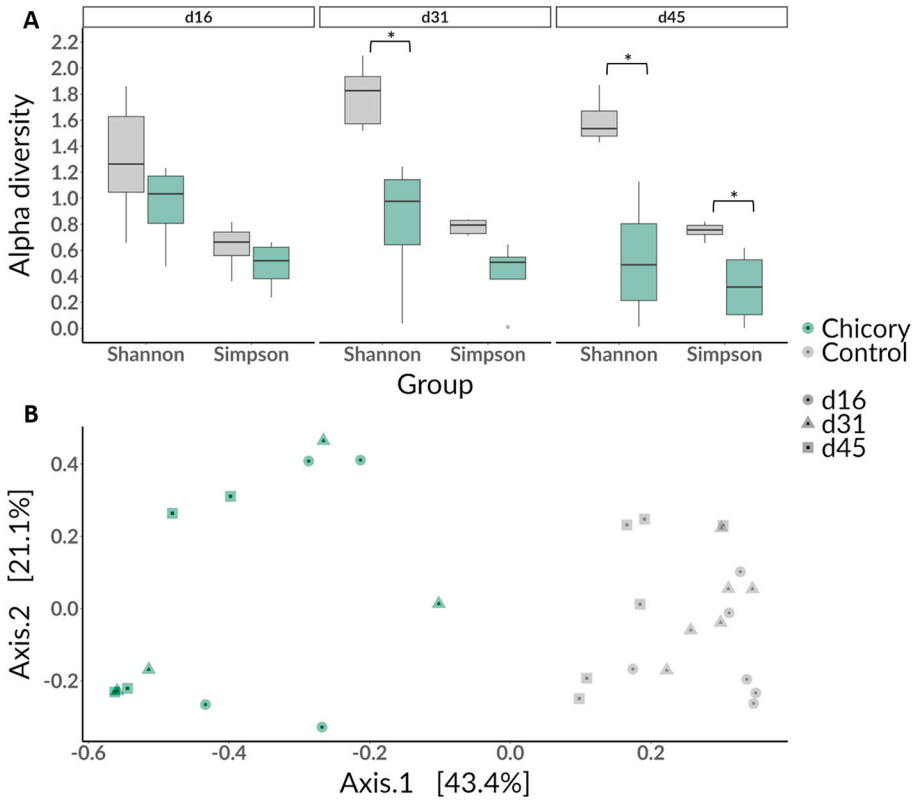


Fig. 3. Effect of chicory on cyathostomin community diversity Upper panel (A) depicts the alpha diversity (Shannon and Simpson index) of cyathostomin species in the control (gray) and chicory-fed horses (green) groups. The bottom panel (B) shows a PCoA plot using Bray Curtis distance (beta diversity) between the group and the day.
Asterisk indicates the statistically significant difference between the two groups at day 31 and day 45 (*$P < 0.05$).

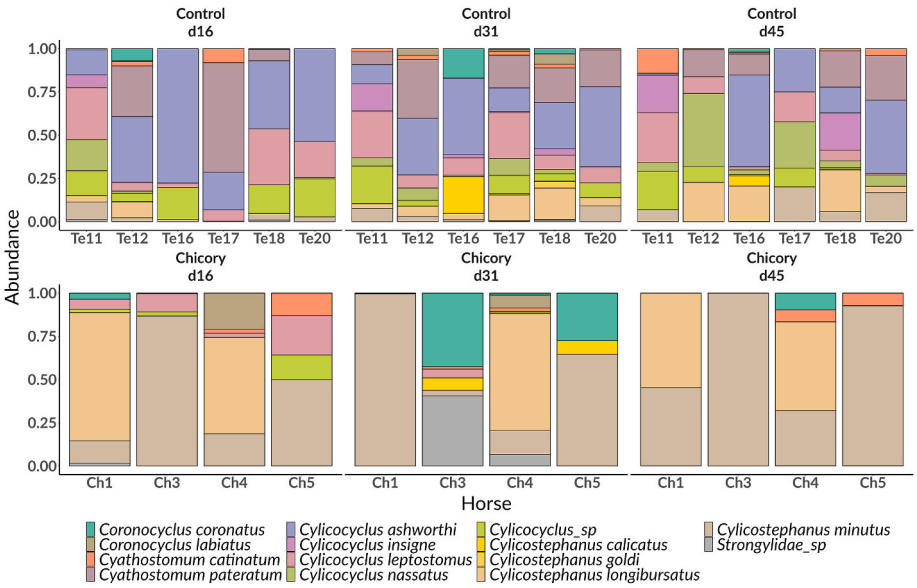


Fig. 4. Cyathostomin larval community abundance estimated using the metabarcoding approach across days and groups.

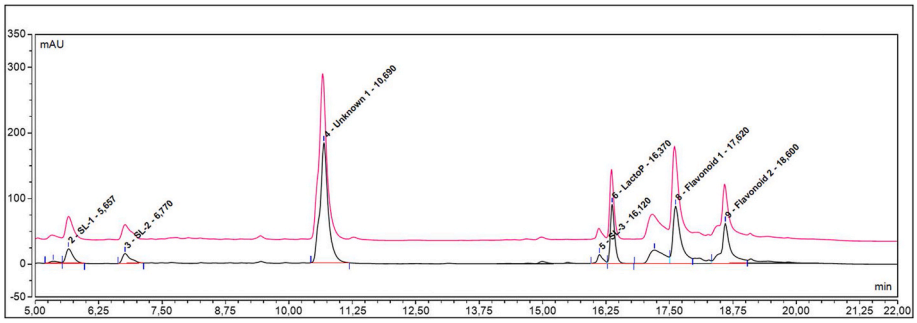


Fig. 5. Chromatogram obtained from chicory (cv. Puna II) extract enriched of SLs used for the *in vitro* LDA
The chromatogram is presented at 215 nm (black) and 280 nm (pink) wavelengths for the chicory extract enriched of SLs. 2 = unknown SL, 3 = unknown SL, 4 = unknown compound, 5 = unknown SL, 6 = lactucopicrin, 8 = flavonoid compound and 9 = flavonoid compound.

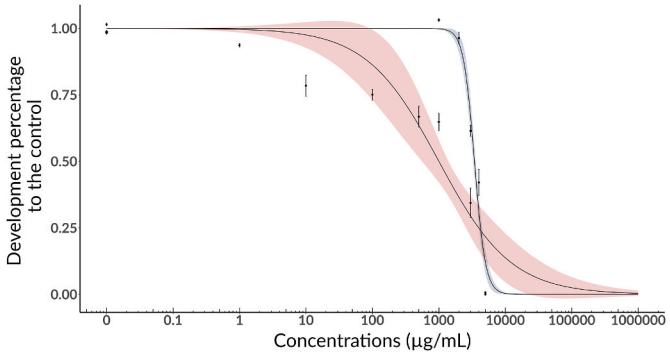


Fig. 6. Dose-response curve of chicory extract enriched of SLs against two cyathostomin populations Development percentage third-stage larvae of cyathostomins isolates from Chamberet (red) and INRAE (blue) in the presence of different concentrations of chicory extract enriched of SLs. A control condition was performed presented by squares found at concentration 0.

While the chicory group showed a significant reduction in FEC overall, this reduction occurred in both groups over the first 16 days of the trial. In the lack of any changes brought neither to horse management or to sample collection and treatment, this might be linked to a seasonal-induced reduction in parasite development. As the chicory efficacy was already high at d16 (*i.e.* 72.9%), we may assume that a 16-day consumption of similar amounts of chicory in the diet (*i.e.* 89% of bites) would control cyathostomins infestations. Nevertheless, further studies over a range of conditions are required to confirm these results.

Knowing that studies conducted in ruminants have reported anthelmintic effects for chicory proportions higher than 70% DM in the diet (Peña-Espinoza et al., 2018), we opted for an almost pure chicory cover. The chicory pasture also contained a low proportion of plantain (*Plantago lanceolata*) (0.05% of the potential bites if horses eat at random) with known antiparasitic activity in small ruminants (Reza et al., 2021). However, as this plant was present in only 0.1% of the bites taken by horses, we consider its potential effect on cyathostomins egg excretion and larval development as negligible. Although vegetation quality was slightly higher in the chicory pasture and both treatments offered close biomasses, the BW of horses grazing chicory remained stable while control horses gained on average 13 kg over the course of the study. It may be that horses grazing chicory achieved lower DM intake compared to control individuals because chicory contained more water and/or was less palatable than graminoids. Characterizing nutrient intake in horses grazing chicory was unfortunately not feasible, as this would first require adaptation of the reference method developed for grasslands (*i.e.* based on total fecal collection and estimation of vegetation digestibility from fecal nitrogen (Mésochina et al., 1998; Penning, 2004),). Whatever the case, it therefore seems unlikely that the lower eggs excretion measured in horses grazing chicory resulted from a

higher nutritional status compared to control individuals. Differences of FEC between groups cannot be explained either by differential ingestion of infective larvae as the duration of our study was lower than the prepatent period of cyathostomins. While the present test was carried out with a substantial number of individuals to support the results, additional trials using chicory across other environments, such as in the face of different parasitic isolates or in the presence of a more diversified plant cover would provide decisive evidence that chicory grazing allows robust cyathostomins control. Moreover, the production of secondary metabolites is influenced by pedoclimatic conditions, the chicory cultivar, the age of the crop and the season of the year (Foster et al., 2006, 2011), which justifies studying the effect of chicory under other conditions.

Studies on small ruminants (Marley et al., 2003; Athanasiadou et al., 2005; Tzamaloukas et al., 2005; Heckendorn et al., 2007; Peña-Espinoza et al., 2016) suggest that chicory has anthelmintic activity against abomasal nematodes, but no effect was observed on small intestinal worms. In horses, our results provide evidence that chicory have an anthelmintic activity against large intestinal cyathostomins. However, the underpinning mechanisms related to the substantial FEC reduction following chicory intake still remains to be elucidated. Chicory harbors sesquiterpenes lactones (SLs) that are known to exert anthelmintic activity against *A. suum, Cooperia oncophora, Oesophagostomum dentatum, O. ostertagi* and *Teladorsagia circumcincta in vitro* (Peña-Espinoza et al., 2015, 2017; Williams et al., 2016; Valente et al., 2021). This is in line with our results of reduced larval development in feces. However, the *in vitro* effects of the chicory extract enriched of SLs against cyathostomin larvae were not able to recapitulate the *in vivo* efficacy in our trial. *In vivo* effects on larval development were observed after 31 days, while *in vitro* larvae were exposed for 6 days. This difference suggests that a longer exposure time may be required for chicory to have an effect on larval development.

Further, chicory SLs may exert indirect *in vivo* effects on adult worms. Indeed, SLs have antimicrobial activity (Mohamed et al., 2017) that may affect the horse gut microbiota. Thus, it can be supposed that chicory grazing would have induced a change in the structure of the gut microbiota, which forms a complex biological system (Rynkiewicz et al., 2015) involving direct interactions with the parasite (Hayes et al., 2010; Reynolds et al., 2014). A longitudinal metagenomic study encompassing the whole range of the horse gut macro- and microbiota, *i.e.* archae, bacteria, fungi, protozoa, helminths and viruses (Mach et al., 2022) would contribute to resolve how the ecosystem is affected by the chicory regime *in vivo* as recently reported for pyrantel treatment (Boisseau et al., 2023). In addition, the observed IC_{50} was also higher than that previously observed (*i.e.* 146 μg/mL measured on *A. suum* L3 (Williams et al., 2016)) suggesting differential sensitivities across nematode clades or different compounds being involved. Moreover, previous studies (Peña-Espinoza et al., 2015, 2017; Williams et al., 2016) have evidenced a reduced sensitivity of larval stage relative to adult worms that may mirror the hereing reported effects on cyathostomins. In addition, some studies (Foster et al., 2011; Peña-Espinoza et al., 2015; Valente et al., 2021) investigated the SLs composition of *Puna cultivar* leaves extract and observed the presence of lactucin (LAC), 11,13-dihydrolactucin (DI-LAC), 8-deoxylactucin (8-DOL), 11,13-dihydro-8-deoxylactucin (DI-8-DOL), lactucopicrin (LACP), and 11,13-dihydro-lactucopicrin (DI-LACP). The activity of these different molecules was evaluated on third-stage larvae *A. suum* and showed a higher activity for the 8-DOL (Valente et al., 2021). Using UHPLC-DAD, we observed the presence of LACP (major compound) and three undetermined SLs. LACP was not the most active SL against *A. suum* (Valente et al., 2021) and its concentration was low in our extract (*i.e.* 7.6 μg/mg compared 19.5 μg/mL (Peña-Espinoza et al., 2015) or 21.5 (Williams et al., 2016)). The low concentration of LACP in our extract is another factor that may explain the difference between *in vitro* and *in vivo* results. Based on these results, we can hypothesize that chicory has an effect on adult fecundity, as mentioned in (Peña-Espinoza et al., 2018). This hypothesis supported the reduction in the number of eggs excreted and a reduction in their development in feces caused by low egg fitness.

5. Conclusion

Our study demonstrated the efficacy of grazing chicory (cv. Puna II) to reduce cyathostomins egg excretion and larval development in horses. The magnitude of this effect was almost as high as expected from synthetic drugs, although we identified differential sensitivity between species. We evidenced a direct but limited, activity of chicory extract enriched of SLs on free living stages. The putative indirect anthelmintic effect of chicory consumption needs to be investigated as it is known that the gut microbiota, gastrointestinal nematodes, and the host immune system are tightly intertwined (Cortés et al., 2020; Williams et al., 2020; Boisseau et al., 2023). The direct activity of chicory also remains to be elucidated and additional studies on the nutritive values of this plant in horses are also needed to adjust recommendations in the field.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work benefited from the financial support of the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE), and Institut Carnot France Futur Élevage (F2E). Joshua Malsa was grateful for the stipend of the Fonds Éperon and IFCE. We are grateful to the GenoToul bioinformatics platform (https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12) for providing computing and storage resources. The authors thank the staff of the IFCE Chamberet experimental farm and Sandrine Faure from INRAE UMR 1213 for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100523.

References

Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against Trichostrongylus colubriformis in grazing sheep. Vet. Parasitol. 127, 233–243.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J. Stat. Softw. 67, 1–48.

Boisseau, M., Dhorne-Pollet, S., Bars-Cortina, D., Courtot, É., Serreau, D., Annonay, G., Lluch, J., Gesbert, A., Reigner, F., Sallé, G., Mach, N., 2023. Species interactions, stability, and resilience of the gut microbiota - helminth assemblage in horses. iScience 26, 106044.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13, 581–583.

Collas, C., Sallé, G., Dumont, B., Cabaret, J., Cortet, J., Martin-Rosset, W., Wimel, L., Fleurance, G., 2018. Are sainfoin or protein supplements alternatives to control small strongyle infection in horses? Anim. Int. J. Anim. Biosci. 12, 359–365.

Cortés, A., Rooney, J., Bartley, D.J., Nisbet, A.J., Cantacessi, C., 2020. Helminths, hosts, and their microbiota: new avenues for managing gastrointestinal helminthiases in ruminants. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 18, 977–985.

Courtot, É., Boisseau, M., Dhorne-Pollet, S., Serreau, D., Gesbert, A., Reigner, F., Basiaga, M., Kuzmina, T., Lluch, J., Annonay, G., Kuchly, C., Diekmann, I., Krücken, J., Samson-Himmelstjerna, G. von, Mach, N., Sallé, G., 2023. Comparison of two molecular barcodes for the study of equine strongylid communities with amplicon sequencing. PeerJ 11, e15124.

da Silva, G.D., de Lima, H.G., de Sousa, N.B., de Jesus Genipapeiro, I.L., Uzêda, R.S., Branco, A., Costa, S.L., Batatinha, M.J.M., Botura, M.B., 2021. In vitro anthelmintic evaluation of three alkaloids against gastrointestinal nematodes of goats. Vet. Parasitol. 296, 109505.

Dubois, O., Allanic, C., Charvet, C.L., Guégnard, F., Février, H., Théry-Koné, I., Cortet, J., Koch, C., Bouvier, F., Fassier, T., Marcon, D., Magnin-Robert, J.B., Peineau, N., Courtot, E., Huau, C., Meynadier, A., Enguehard-Gueiffier, C., Neveu, C., Boudesocque-Delaye, L., Sallé, G., 2019. Lupin (Lupinus spp.) seeds exert anthelmintic activity associated with their alkaloid content. Sci. Rep. 9, 9070.

Ferioli, F., D'Antuono, L.F., 2012. An update procedure for an effective and simultaneous extraction of sesquiterpene lactones and phenolics from chicory. Food Chem. 135, 243–250.
Foster, J.G., Cassida, K.A., Sanderson, M.A., 2011. Seasonal variation in sesquiterpene lactone concentration and composition of forage chicory (Cichorium intybus L.) cultivars. Grass Forage Sci. 66, 424–433.
Foster, J.G., Clapham, W.M., Belesky, D.P., Labreveux, M., Hall, M.H., Sanderson, M.A., 2006. Influence of Cultivation site on sesquiterpene lactone composition of forage chicory (cichorium intybus L.). J. Agric. Food Chem. 54, 1772–1778.
Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. Nucleic Acids Res. 21, 2525–2526.
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.
Giles, C.J., Urquhart, K.A., Longstaffe, J.A., 1985. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. Equine Vet. J. 17, 196–201.
Hayes, K.S., Bancroft, A.J., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I.S., Grencis, R.K., 2010. Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode trichuris muris. Science 328, 1391–1394.
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.
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 lambs. Vet. Parasitol. 142, 293–300.
Jung, S., Rickert, D.A., Deak, N.A., Aldin, E.D., Recknor, J., Johnson, L.A., Murphy, P.A., 2003. Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. J. Am. Oil Chem. Soc. 80, 1169–1173.
Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol. 20, 477–481.
Kaplan, R.M., 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. Vet. Res. 33, 491–507.
Kaplan, R.M., Denwood, M.J., Nielsen, M.K., Thamsborg, S.M., Torgerson, P.R., Gilleard, J.S., Dobson, R.J., Vercruysse, J., Levecke, B., 2023. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. Vet. Parasitol. 318, 109936.
Love, S., Duncan, J.L., 1992. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. Vet. Parasitol. 44, 127–142.
Love, S., Murphy, D., Mellor, D., 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. Vet. Parasitol. 85, 113–121 discussion 121-122, 215–225.
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.
Mach, N., Midoux, C., Leclercq, S., Pennarun, S., Le Moyec, L., Rué, O., Robert, C., Sallé, G., Barrey, E., 2022. Mining the equine gut metagenome: poorly-characterized taxa associated with cardiovascular fitness in endurance athletes. Commun. Biol. 5, 1032.
Malsa, J., Courtot, É., Boisseau, M., Dumont, B., Gombault, P., Kuzmina, T.A., Basiaga, M., Lluch, J., Annonay, G., Dhorne-Pollet, S., Mach, N., Sutra, J.-F., Wimel, L., Dubois, C., Guégnard, F., Serreau, D., Lespine, A., Sallé, G., Fleurance, G., 2022. Effect of sainfoin (Onobrychis viciifolia) on cyathostomin eggs excretion, larval development, larval community structure and efficacy of ivermectin treatment in horses. Parasitology 149, 1439–1449.
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.
Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003. The effect of birdsfoot trefoil (Lotus corniculatus) and chicory (Cichorium intybus) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. Vet. Parasitol. 112, 147–155.
Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. Eur. Mol. Biol. Netw. 17, 10–12.
Matthews, J.B., 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. In: Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist., Includes Articles from Two Meetings: "Anthelmintics: from Discovery to Resistance", Pp. 218–315, and "Global Challenges for New Drug Discovery against Tropical Parasitic Diseases", pp. 310–315, 316–357 4.
McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One 8, e61217.
Mésochina, P., Martin-Rosset, W., Peyraud, J.-L., Duncan, P., Micol, D., Boulot, S., 1998. Prediction of the digestibility of the diet of horses: evaluation of faecal indices. Grass Forage Sci. 53, 189–196.
Mitchell, C.J., O'Sullivan, C.M., Pinloche, E., Wilkinson, T., Morphew, R.M., McEwan, N. R., 2019. Using next-generation sequencing to determine diversity of horse intestinal worms: identifying the equine "nemabiome.". J. Equine Sci. 30, 1–5.
Mohamed, T.A., Hegazy, M.-E.F., Abd El Aty, A.A., Ghabbour, H.A., Alsaid, M.S., Shahat, A.A., Paré, P.W., 2017. Antimicrobial sesquiterpene lactones from *Artemisia sieberi*. J. Asian Nat. Prod. Res. 19, 1093–1101.
Nielsen, M.K., 2022. Anthelmintic resistance in equine nematodes: current status and emerging trends. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 20, 76–88.
Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Raufaut, K., Robertson, H.A., McFarlane, R.G., 1994. Lamb weight gain and faecal egg count when grazing one of seven herbages and dosed with larvae for six weeks. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 54, 15–18.
Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., Wagner, H., 2015. Vegan: community ecology package. R Package Version 22–1 (2), 1–2.
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.
Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. Vet. Rec. 152, 600–601.
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.
Peña-Espinoza, M., Boas, U., Williams, A.R., Thamsborg, S.M., Simonsen, H.T., Enemark, H.L., 2015. Sesquiterpene lactone containing extracts from two cultivars of forage chicory (Cichorium intybus) show distinctive chemical profiles and in vitro activity against Ostertagia ostertagi. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 5, 191–200.
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.
Peña-Espinoza, M., Valente, A.H., Thamsborg, S.M., Simonsen, H.T., Boas, U., Enemark, H.L., López-Muñoz, R., Williams, A.R., 2018. Antiparasitic activity of chicory (Cichorium intybus) and its natural bioactive compounds in livestock: a review. Parasites Vectors 11, 475.
Peña-Espinoza, M., Williams, A.R., Thamsborg, S.M., Simonsen, H.T., Enemark, H.L., 2017. Anthelmintic effects of forage chicory (Cichorium intybus) against free-living and parasitic stages of Cooperia oncophora. Vet. Parasitol. 243, 204–207.
Penning, P., 2004. Animal-based techniques for estimating herbage intake. Herb. Intake Handb. 53–93.
Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? Vet. Parasitol. 201, 1–8.
Poissant, J., Gavriliuc, S., Bellaw, J., Redman, E.M., Avramenko, R.W., Robinson, D., Workentine, M.L., Shury, T.K., Jenkins, E.J., McLoughlin, P.D., Nielsen, M.K., Gilleard, J.S., 2021. A repeatable and quantitative DNA metabarcoding assay to characterize mixed strongyle infections in horses. Int. J. Parasitol. 51, 183–192.
R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
Raynaud, J.-P., William, G., Brunault, G., 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. Hum. Comp. 45, 321–342.
Reinemeyer, C.R., Smith, S.A., Gabel, A.A., Herd, R.P., 1984. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the. U.S.A. Vet. Parasitol. 15, 75–83.
Reynolds, L.A., Smith, K.A., Filbey, K.J., Harcus, Y., Hewitson, J.P., Redpath, S.A., Valdez, Y., Yebra, M.J., Finlay, B.B., Maizels, R.M., 2014. Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract. Gut Microb. 5, 522–532.
Reza, M.M., Redoy, M.R.A., Rahman, M.A., Ety, S., Alim, M.A., Cheng, L., Al-Mamun, M., 2021. Response of plantain (Plantago lanceolata L.) supplementation on nutritional, endo-parasitic, and endocrine status in lambs. Trop. Anim. Health Prod. 53, 82.
Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. PLoS One 10, e0146021.
Rumball, W., 1986. Grasslands Puna' chicory (cichorium intybus L.). N. Z. J. Exp. Agric. 14, 105–107.
Rynkiewicz, E.C., Pedersen, A.B., Fenton, A., 2015. An ecosystem approach to understanding and managing within-host parasite community dynamics. Trends Parasitol. 31, 212–221.
Santos, F.O., Cerqueira, A.P.M., Branco, A., Batatinha, M.J.M., Botura, M.B., 2019. Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. Parasitology 146, 1233–1246.
Scales, G.H., Knight, T.L., Saville, D.J., 1995. Effect of herbage species and feeding level on internal parasites and production performance of grazing lambs. N. Z. J. Agric. Res. 38, 237–247.
Street, R.A., Sidana, J., Prinsloo, G., 2013. Cichorium intybus: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. Evid. Based complement. Alternat. Med. 2013, e579319.
Tombak, K.J., Hansen, C.B., Kinsella, J.M., Pansu, J., Pringle, R.M., Rubenstein, D.I., 2021. The gastrointestinal nematodes of plains and Grevy's zebras: phylogenetic relationships and host specificity. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 16, 228–235.
Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'Espois, M., 2012. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. Vet. Parasitol. 188, 294–300.
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.
Valente, A.H., de Roode, M., Ernst, M., Peña-Espinoza, M., Bornancin, L., Bonde, C.S., Martínez-Valladares, M., Ramünke, S., Krücken, J., Simonsen, H.T., Thamsborg, S. M., Williams, A.R., 2021. Identification of compounds responsible for the anthelmintic effects of chicory (Cichorium intybus) by molecular networking and bio-guided fractionation. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 15, 105–114.
Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Vercruysse, J., Dorny, P., Hong, C., Harris, T.J., Hammet, N.C., Smith, D.G., Weatherley, A.J., 1993. Efficacy of doramectin in the prevention of gastrointestinal nematode infections in grazing cattle. Vet. Parasitol., Special Issue: Doramectin - a novel avermectin 49, 51–59.

Verdú, J.R., Lobo, J.M., Sánchez-Piñero, F., Gallego, B., Numa, C., Lumaret, J.-P., Cortez, V., Ortiz, A.J., Tonelli, M., García-Teba, J.P., Rey, A., Rodríguez, A., Durán, J., 2018. Ivermectin residues disrupt dung beetle diversity, soil properties and ecosystem functioning: an interdisciplinary field study. Sci. Total Environ. 618, 219–228.

Wang, C., Paul, M., Isler, T., Furrer, R., 2022. eggCounts: Hierarchical Modelling of Faecal Egg Counts.

Williams, A.R., Andersen-Civil, A.I.S., Zhu, L., Blanchard, A., 2020. Dietary phytonutrients and animal health: regulation of immune function during gastrointestinal infections. J. Anim. Sci. 98 skaa030.

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.

Supplementary information

Supplementary Table S1. Detailed of mock community composition

The composition of the two mock communities used in this study is provided with the final DNA concentration and relative abundance of each species. Heterogeneous corresponds to an equal volume of DNA added per species from a single worm.

Mock	Species	DNA concentration (ng/mL)	Percentage (%)
Heterogeneous, 6 species, n=37	*Cylicocyclus nassatus*	1,35	2,0
	Cylicocyclus nassatus	1,08	1,6
	Cylicocyclus nassatus	0,962	1,4
	Cylicocyclus nassatus	1,12	1,7
	Cylicocyclus nassatus	1,85	2,8
	Cylicocyclus nassatus	1,03	1,5
	Cylicocyclus nassatus	1,38	2,1
	Cylicocyclus nassatus	3,28	4,9
	Cylicocyclus nassatus	2,5	3,7
	Cylicocyclus nassatus	4,34	6,5
	Cylicocyclus nassatus	3,24	4,8
	Cylicocyclus nassatus	3,32	5,0
	Cylicocyclus nassatus	2,48	3,7
	Cylicostephanus goldi	5	7,5
	Cylicostephanus goldi	1,04	1,6
	Cylicostephanus goldi	1,03	1,5
	Cyathostomum catinatum	0,304	0,5
	Cylicocyclus ashworhi	0,584	0,9
	Cylicostephanus minutus	0,946	1,4
	Cyathostomum pateratum	0,252	0,4
	Cyathostomum pateratum	2,64	3,9
	Cyathostomum pateratum	3,26	4,9
	Cyathostomum pateratum	2,06	3,1
	Cyathostomum pateratum	1,77	2,6
	Cyathostomum pateratum	3,94	5,9
	Cyathostomum pateratum	1,78	2,7
	Cyathostomum pateratum	1,03	1,5
	Cyathostomum pateratum	2,78	4,2
	Cyathostomum pateratum	2,4	3,6
	Cyathostomum pateratum	4,12	6,2
		2,5	3,7
		1,48	2,2
Heterogeneous, 6 species, n=6	*Cylicocyclus nassatus*	5	41,9
	Cylicostephanus goldi	1,04	8,7
	Cyathostomum catinatum	0,584	4,9
	Cylicocyclus ashworhi	0,946	7,9
	Cylicostephanus minutus	0,252	2,1
	Cyathostomum pateratum	4,12	34,5

Supplementary Table S2. Available bites proportion in each mesophile (contrai) and chicory subplot for the entire period of the study

[1]Eac h pastures was split on five subplot of 0.64 ha.

[2]Dominant bites only included the main caver pointed by the stick for mixed bites.

[3]Tot al bites included ail the caver out by the stick, the minority bites which was chicary or an anthelmintic plant.

				Dominant available bit e[2]					Total available bit es[3]	
	Sub plot[1]	Average caver height (cm)	Empty ground {%)	Chicory {%)	Grass{%)	No anthelminthic leguminous {%)	No anthelminthic divers{%)	Anthelmintic {%)	Chicory {%)	Anthelmintic {%)
Contrai	1611 Tb	7 ± 7.2	23.0		64.9	9.7	10.4	14.9		24.7
	6/7 T b2	8.8 ± 6.4	8.5		62.1	8.2	26.9	2.7		6.0
	1611 Tf	5.8 ± 3.4	15.5		60.4	3.0	30.2	6.5		13.6
	1611 Tc	6.2 ±3.1	9.0		56.6	15.4	21.4	6.6		6.6
	6/7 T bl	5.4 ± 3.2	14.0		76.2	2.3	19.2	2.3		2.9
	Mean± S.D.	6.6 ± 1.3	14 ± 5.9		64 ± 7.4	7.7 ± 5.4	21.6 ± 7.6	6.6 ± 5.1		10.8 ± 8.7
	Biomass average (gDM/ m^2)	53 ± 20								
Chicary	161 C b	7.6 ± 4.4	22.5	95.5	2.6	0.0	1.9	0.0	95.5	0.0
	6/7 Cal	10.6 ± 6.0	12.5	82.3	1.7	0.6	14.9	0.6	86.9	1.1
	161 Cc	4.4 ± 2.8	53.0	87.2	9.6	0.0	3.2	0.0	88.3	0.0
	161 Ca	6.7 ± 4.3	30.0	88.6	7.9	0.0	2.9	0.7	91.4	0.7
	6/7 C a2	4.6 ± 2.4	23.0	66.9	20.8	0.6	11.0	0.6	66.9	0.6
	Mean± S.D.	6.6 ± 2.5	28.2 ± 15.2	84.1 ± 10.7	8.5 ± 7.6	0.2 ± 0.3	6.8 ± 5.8	0.4 ± 0.4	85.8 ± 11.1	0.5 ± 0.5
	Biomass average (gDM/ m^2)	75 ±42								

Supplementary Table S3. Percentage of each plant grazed by horses during the study

[1]Dominant bites only included the main cover pointed by the stick for mixed bites.

[2]Total bites included all the cover out by the stick, the minority bites which was chicory or an anthelmintic plant.

[3]Anthelmintic concern plants described as having a anthelmintic activity against ruminant on the literature (*Plantago lanceolata*, *Rumex obtusifolius* L. and *Chenopodium album* L.).

[4]Standard Deviation

				Dominante bite[1]					Total bite[2]	
Date	Group	Horses	Time to grazed (%)	Chicory grazed (%)	Grass grazed (%)	Legouminous grazed (%)	Forbs grazed (%)	Anthelmintic[3] grazed (%)	Chicory grazed (%)	Anthelmintic[3] grazed (%)
25-26.08.2022	Chicory	1	83.33	92.00	8.00	0.00	0.00	0.00	92.00	0.00
		2	80.00	87.50	12.50	0.00	0.00	0.00	87.50	0.00
		3	73.33	72.73	22.73	0.00	0.00	4.55	72.73	4.55
		4	66.67	80.00	20.00	0.00	0.00	0.00	80.00	0.00
		5	80.00	91.67	8.33	0.00	0.00	0.00	91.67	0.00
		6	76.67	91.30	8.70	0.00	0.00	0.00	95.65	0.00
		7	70.00	95.24	4.76	0.00	0.00	0.00	95.24	0.00
		8	80.00	62.50	33.33	0.00	4.17	0.00	62.50	0.00
		9	63.33	63.16	36.84	0.00	0.00	0.00	63.16	0.00
		10	73.33	86.36	13.64	0.00	0.00	0.00	86.36	0.00
		Mean ± S.D[4]	74.7 ± 6.5	82 ± 12.2	16.9 ± 11.1	0.00 ± 0.00	0.4 ± 1.3	0.5 ± 1.4	82.7 ± 12.6	0.5 ± 1.4
	Control	11	86.67		69.23	19.23	3.85	7.69		7.69
		12	93.33		57.14	32.14	0.00	10.71		10.71
		13	86.67		46.15	42.31	3.85	7.69		11.54
		14	83.33		80.00	12.00	4.00	4.00		8.00
		15	80.00	-	50.00	37.50	4.17	8.33	-	8.33
		16	83.33		44.00	44.00	4.00	8.00		8.00
		17	93.33		57.14	32.14	0.00	10.71		10.71
		18	96.67		62.07	27.59	3.45	6.90		6.90
		19	96.67		62.07	20.69	6.90	10.34		13.79
		20	93.33		57.14	39.29	0.00	3.57		3.57
		Mean ± S.D[4]	89.3 ± 60		58.5 ± 10.8	30.7 ± 10.7	3.0 ± 2.3	7.8 ± 2.5		8.9 ± 2.9
01.09.2022	Chicory	1	73.33	86.36	9.09	0.00	4.55	0.00	86.36	0.00
		2	70.00	95.24	4.76	0.00	0.00	0.00	95.24	0.00
		3	70.00	80.95	14.29	0.00	4.76	0.00	80.95	0.00
		4	73.33	95.45	0.00	0.00	4.55	0.00	95.45	0.00
		5	70.00	76.19	19.05	4.76	0.00	0.00	76.19	0.00
		6	76.67	91.30	8.70	0.00	0.00	0.00	91.30	0.00
		7	70.00	80.95	14.29	0.00	4.76	0.00	85.71	0.00
		8	73.33	86.36	13.64	0.00	0.00	0.00	86.36	0.00
		9	73.33	86.36	9.09	0.00	4.55	0.00	86.36	0.00
		10	63.33	89.47	5.26	0.00	5.26	0.00	89.47	0.00
		Mean ± S.D[4]	71.3 ± 3.6	86.9 ± 6.3	9.8 ± 5.6	0.5 ± 1.5	2.8 ± 2.5	0.00 ± 0.00	87.3 ± 6.0	0.00 ± 0.00
	Control	11	73.33		72.73	9.09	18.18	0.00		0.00
		12	83.33		60.00	8.00	32.00	0.00		0.00
		13	86.67		69.23	15.38	15.38	0.00		0.00
		14	73.33		77.27	4.55	18.18	0.00		4.55
		15	83.33		84.00	0.00	16.00	0.00		4.00
		16	73.33	-	86.36	4.55	9.09	0.00	-	0.00
		17	80.00		87.50	4.17	8.33	0.00		4.17
		18	80.00		75.00	4.17	20.83	0.00		0.00
		19	76.67		73.91	4.35	21.74	0.00		0.00
		20	80.00		87.50	4.17	8.33	0.00		0.00
		Mean ± S.D[4]	79.0 ± 4.7		77.4 ± 9.1	5.8 ± 4.1	16.8 ± 7.3	0.00 ± 0.00		1.3 ± 2.1
13.09.2022	Chicory	1	93.33	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		2	100.00	96.67	3.33	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		3	90.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		4	93.33	96.43	0.00	0.00	3.57	0.00	96.43	0.00
		5	90.00	92.59	7.41	0.00	0.00	0.00	92.59	0.00
		6	100.00	86.67	10.00	0.00	3.33	0.00	86.67	0.00

		7	86.67	92.31	7.69	0.00	0.00	0.00	92.31	0.00
		8	96.67	96.55	3.45	0.00	0.00	0.00	96.55	0.00
		9	93.33	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		10	96.67	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		Mean ± S.D[4]	9.4 ± 4.4	96.1 ± 4.4	3.2 ± 3.9	0.00 ± 0.00	0.7 ± 1.5	0.00 ± 0.00	96.5 ± 4.6	0.00 ± 0.00
	Control	11	93.33		71.43	3.57	25.00	0.00		0.00
		12	96.67		72.41	6.90	20.69	0.00		0.00
		13	90.00		62.96	7.41	25.93	3.70		3.70
		14	96.67		79.31	0.00	17.24	3.45		3.45
		15	93.33		64.29	3.57	28.57	3.57		3.57
		16	90.00	-	74.07	3.70	22.22	0.00	-	3.70
		17	90.00		66.67	14.81	18.52	0.00		0.00
		18	93.33		64.29	7.14	21.43	7.14		10.71
		19	93.33		75.00	7.14	17.86	0.00		0.00
		20	93.33		57.14	7.14	32.14	3.57		3.57
		Mean ± S.D[4]	93 ± 2.5		68.8 ± 6.8	6.1 ± 3.9	23.0 ± 4.9	2.1 ± 2.5		2.9 ± 3.3
22.09.2022	Chicory	1	96.67	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		2	96.67	96.55	3.45	0.00	0.00	0.00	96.55	0.00
		3	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		4	90.00	96.30	3.70	0.00	0.00	0.00	96.30	0.00
		5	93.33	96.43	3.57	0.00	0.00	0.00	96.43	0.00
		6	96.67	93.10	6.90	0.00	0.00	0.00	93.10	0.00
		7	86.67	92.31	3.85	3.85	0.00	0.00	92.31	0.00
		8	93.33	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		9	90.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		10	93.33	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
		Mean ± S.D[4]	93.7 ± 4.0	97.5 ± 3.0	2.1 ± 2.5	4.0 ± 1.2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	97.5 ± 3.0	0.00 ± 0.00
	Control	11	100.00		80.00	16.67	3.33	0.00		3.33
		12	100.00		80.00	16.67	3.33	0.00		3.33
		13	86.67	-	69.23	23.08	7.69	0.00	-	3.85
		14	96.67		75.86	17.24	6.90	0.00		3.45
		15	93.33		64.29	14.29	21.43	0.00		0.00
		16	86.67		61.54	30.77	7.69	0.00		0.00
		17	90.00		88.89	7.41	3.70	0.00		3.70
		18	96.67		72.41	17.24	6.90	3.45		6.90
		19	90.00		74.07	25.93	0.00	0.00		0.00
		20	93.33		67.86	17.86	14.29	0.00		7.14
		Mean ± S.D[4]	93.3 ± 5.0		73.4 ± 8.2	18.7 ± 6.5	7.5 ± 6.2	0.3 ± 1.1		3.2 ± 2.6
04.10.2022	Chicory	1	83.33	84.00	16.00	0.00	0.00	0.00	84.00	0.00
		2	93.33	71.43	21.43	0.00	7.14	0.00	75.00	0.00
		3	90.00	84.62	15.38	0.00	0.00	0.00	84.62	0.00
		4	90.00	88.89	7.41	0.00	3.70	0.00	88.89	0.00
		5	96.67	72.41	24.14	0.00	3.45	0.00	75.86	0.00
		6	100.00	90.00	6.67	0.00	3.33	0.00	90.00	0.00
		7	96.67	78.57	21.43	0.00	0.00	0.00	78.57	0.00
		8	83.33	91.67	0.00	0.00	8.33	0.00	91.67	0.00
		9	93.33	78.57	21.43	0.00	0.00	0.00	78.57	0.00
		10	96.67	72.41	20.69	0.00	6.90	0.00	72.41	0.00
		Mean ± S.D[4]	92.3 ± 5.7	81.3 ± 7.7	15.5 ± 8.1	0.00 ± 0.00	3.3 ± 3.3	0.00 ± 0.00	82.0 ± 6.8	0.00 ± 0.00
	Control	11	100.00		76.67	3.33	16.67	3.33		3.33
		12	93.33		78.57	7.14	14.29	0.00		3.57
		13	96.67		86.21	6.90	6.90	0.00		0.00
		14	93.33		92.86	3.57	3.57	0.00		0.00
		15	100.00		86.67	0.00	13.33	0.00		0.00
		16	90.00	-	96.30	0.00	3.70	0.00	-	0.00
		17	93.33		89.29	0.00	10.71	0.00		3.57
		18	100.00		80.00	0.00	16.67	3.33		3.33
		19	93.33		92.86	0.00	7.14	0.00		3.57
		20	96.67		82.76	0.00	17.24	0.00		3.45
		Mean ± S.D[4]	95.7 ± 3.5		86.2 ± 6.7	2.1 ± 3.0	11.0 ± 5.4	0.7 ± 1.4		2.1 ± 1.8
Mean ± S.D[4] over the entire study (chicory)			85.2 ± 11.2	88.8 ± 7.6	9.5 ± 6.8	0.2 ± 2.0	1.4 ± 1.5	0.1 ± 0.2	89.2 ± 7.4	0.1 ± 0.2
Mean ± S.D[4] over the entire study (control)			90.1 ± 6.6	-	72.8 ± 10.3	12.7 ± 11.9	12.3 ± 7.8	2.2 ± 3.2	-	3.7 ± 3.0

Article 4 : Carvacrol and cinnamaldehyde potential for cyathostomin control: anthelmintic and immunomodulatory effects

I. Résumé

L'émergence d'isolats de parasites résistants aux anthelminthiques et le manque de nouveaux produits commercialisés pour traiter les strongyloses gastro-intestinales des équidés ont conduit à l'exploration de nouvelles stratégies de contrôle. Conformément aux tendances sociétales en faveur de la gestion respectueuse de l'environnement, le contrôle des infections futures nécessite l'utilisation d'alternatives "naturelles".

Dans ce contexte, cette étude a évalué l'activité directe et indirecte de divers terpènes en vue de leur utilisation en tant qu'additifs alimentaires. L'activité directe de l'anéthol, du L-menthol, du thymol, de l'eugénol, du carvacrol et du cinnamaldéhyde a été évaluée à l'aide de tests *in vitro* d'inhibition du développement et de la migration larvaire. L'activité indirecte de ces molécules a, quant à elle, été étudiée en mesurant la concentration de TNFα sécrété par des macrophages murins (RAW 264.7) par ELISA après incubation des cellules avec les extraits en présence ou non de LPS. De plus, afin d'améliorer notre compréhension de la réponse à l'infestation parasitaire chez les chevaux, nous avons étudié pour la première fois les gènes exprimés par les monocytes équins stimulés par de l'antigène parasitaire. Cela a induit la répression de 282 gènes et la surexpression de 468 gènes. Par la suite, une analyse bio-informatique d'enrichissement KEGG, effectuée sur l'ensemble des gènes surexprimés, a révélé que 28 voies de biosynthèse étaient significativement enrichies, avec une attention particulière sur les voies de signalisation TNF et TLR, qui présentaient les enrichissements les plus marqués. Nous avons cherché à moduler la réponse induite par l'antigène larvaire en utilisant du carvacrol et du cinnamaldéhyde, cependant, ces extraits n'ont montré aucun effet. L'effet de ces deux extraits sur la diversité des espèces de cyathostomes a également été évalué le long d'un gradient de concentration croissante. Nous avons observé une réduction significative de la diversité alpha à la dernière et troisième concentration de carvacrol et cinnameldéhyde, respectivement. Parallèlement, le comptage des espèces les plus abondantes à la concentration de contrôle (*i.e. Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus ashworthi* et *Cyathostomum pateratum*) a été observé significativement plus élevé aux concentrations les plus fortes de carvacrol et de cinnamaldéhyde. Enfin, nous avons tenté d'évaluer l'activité anthelminthique *in vivo* de l'eugénol et du cinnamaldéhyde utilisés comme additifs alimentaires sur une période de 28 jours. Aucun effet n'a été observé sur

les paramètres parasitaires et sanguins, démontrant l'écart entre l'activité des plantes mesurée *in vitro* et leurs utilisations *in vivo*.

(En cours de rédaction. Des analyses complémentaires seront réalisées à la suite de ma thèse)

Carvacrol and cinnamaldehyde potential for cyathostomin control: anthelmintic and immunomodulatory effects

Joshua Malsa[1], Angélique Chereau[1], Fabrice Guégnard[1], Delphine Serreau[1], Amandine Gesbert[2], Fabrice Reigner[2], Léonie Chamoin[3], Jacques Guillot[3], Jean-Paul Pais de Barros[4], Alexandre Vernudachi[5], Nuria Mach[6], Géraldine Fleurance[7,8], Sonia Lamandé[1], Andrew R Williams[9#], Guillaume Sallé[1#]

[1]INRAE, Université de Tours, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France
[6]INRAE, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière, Nouzilly, France
[3]École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Nantes (Oniris), France
[4]Plateforme de Lipidomique, 21000 Dijon, France
[5]INVENesis, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France
[6]IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse Cedex 3, 31076, France
[7]INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, Saint-Genès-Champanelle, France
[8]Institut français du cheval et de l'équitation, Pôle développement, innovation et recherche, Saint-Genès-Champanelle, France
[9]Department of Veterinary and Animal Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Dyrlægevej 100, 1870, Frederiksberg C, Denmark.
Corresponding author: Joshua Malsa

Abstract

The emergence of anthelmintic resistant parasite isolates and the lack of new products commercialized to treat equine digestive strongylosis led to investigated new control strategies. In line with societal trends towards environmentally-friendly management, future infection control requires the use of "natural" alternatives. In this context, this study evaluated the direct and indirect activity of various terpenes with a view to their use as food additives. The in vitro activity of anethol, L_menthol, thymol, eugenol, carvacrol and cinnamaldehyde was tested on larval development, larval migration and immunomodulatory tests. Also, to improve our knowledge of the response to parasite infection in horses, for the first time we studied the genes expressed by equine monocytes stimulated by parasite antigen.This induced repression of 282 genes and overexpression of 468 genes. Subsequent KEGG enrichment bioinformatics analysis, performed on all overexpressed genes, revealed that 28 biosynthetic pathways were significantly enriched, with a particular focus on the TNF and TLR signaling pathways, which showed the most marked enrichments. We tried to modulate the larval antigen-induced response with carvacrol and cinnamaldehyde, with no effect from these extracts. The effect of these same two compounds on cyathostomins species diversity was studied over an increasing concentration gradient. We observed an increase in the count of the most abundant species in the control concentration (*i.e. Cylicocyclus nassatus, Cylicocyclus. ashworthi et Cyathostomum pateratum*) to be significantly higher at the highest concentrations of carvacrol and cinnamaldehyde. Finally, we tried to evaluate the in vivo anthelmintic activity of eugenol and cinnamaldehyde used as feed additives over a 28-day period. No effects were observed on parasitic and blood parameters, demonstrating the gap between plant activity measured in vitro and their practical use.

Keywords

strongyles; terpene; feed additive; ITS-2;

Introduction

Alternative control strategies are needed for cyathostomins control in horses. These parasites cause colic, diarrhea, weight loss and the death of the most susceptible hosts, especially young animals (Giles et al., 1985; Love and Duncan, 1992; Love et al., 1999; Peregrine et al., 2014). Nearly 100% of horses are infected by these parasites (Reinemeyer et al., 1984; Lyons et al., 1999; Morariu et al., 2016; Bellaw and Nielsen, 2020) whereby *Cylicocyclus nassatus*, *Cyathostomum catinatum* and *Cylicostephanus longibursatus* are the most prevalent species in the USA (Bellaw and Nielsen, 2020; Morariu et al., 2016) or in France (Boisseau et al., 2023). Today, a 50 % mortality in young horse rate is reported in clinical larval cyathostominosis (Giles et al., 1985; Peregrine et al., 2006; Walshe et al., 2021). Current infection control strategies are based on frequent anthelmintic treatments at regular intervals, but that induced the emergence of resistant populations (Kaplan, 2002; Nielsen, 2014; Schneider et al., 2014). Due to the reduced efficacy of current treatments, the presence of cross-resistance and the lack of new molecules on the market, new strategies are turning towards the use of plants with positive health benefits. (Rochfort et al., 2008; Rana et al., 2022).
In order to defend itself against various abiotic and biotic stresses, plants produce secondary metabolites (SMs) (Bennett and Wallsgrove, 1994; Harborne, 1999; Zaynab et al., 2018; Erb and Kliebenstein, 2020). These molecules are classified into three main groups: alkaloids (or nitrogen compounds), phenolic compounds and terpenes (Harborne, 1999; Bourgaud et al., 2001), for which the literature has described *in vitro* antiparasitic activity on different parasites as *Caenorhabditis elegans*, *Haemonchus contortus* or *Strongyloides ratti* (Abdel-Rahman et al., 2013; André et al., 2017, 2016; Asha et al., 2001; Ferreira et al., 2016; Hernando et al., 2019; Katiki et al., 2014, 2017; Olounladé et al., 2012; Pessoa et al., 2002; Qi et al., 2015; Silva et al., 2018; Štrbac et al., 2022; Zhu et al., 2013). *In vivo* activity has also been observed in naturally infected sheep with gastrointestinal nematodes (André et al., 2017, 2016; Ferreira et al., 2016; Štrbac et al., 2022). Plant SMs have also been described with immune system stimulation activity. Alkaloid compound (matrine) has been described with anti-inflammatory activity decreasing pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-6 and prostaglandin E2) in RAW264.7 macrophages bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulated cells (Wang et al., 2021). Some phenolics compounds have shown similar *in vitro* (Ohtsu et al., 2017; Tang et al.,

2019; Sunil et al., 2021) or *in vivo* (Tian et al., 2022) activities. Studies have also observed *in vitro* (Srivastava et al., 2009) or *in vivo* (Wang et al., 2013; Jayachandran et al., 2015; Du et al., 2018) immune system modulation results for terpenes compounds. These data confirmed the beneficial effect of the plant's SMs and supported the use of their anti-parasite and immune system stimulation activity, which together can act on the parasite both directly and indirectly to manage equine infection.

Terpenic compounds such as anethole, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and thymol have shown *in vitro* activity in inhibiting egg hatching in the small ruminant strongyle *H. contortus* (Zhu et al., 2013; Katiki et al., 2014; Ferreira et al., 2016; André et al., 2017; Katiki et al., 2017; Silva et al., 2018). Carvacrol and thymol have also been observed to have a larval development inhibitory activity (Zhu et al., 2013; André et al., 2016; Ferreira et al., 2016; André et al., 2017). To address the problem of cyathostomins resistance, this study focused on screening the direct antiparasitic activity and the immunomodulatory propreties of six terpenic compounds (*i.e.* anethole, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, L-menthol and thymol) to control equine strongyle infections. We measured their direct activity on larval development assay (LDA) and a larval motility assay (LMA), and quantified the immunostimulant activity using an ELISA test on RAW 264.7 murine macrophages cell line. For the first time, we also investigated gene expression following larval antigen-induced stimulation of equine monocytes, and the modulation of this response by carvacrol and cinnamaldehyde. Using a metagenomic approach, we also investigated the effect of these two extracts on the cyathostomins species community compared with the pyrantel effect. In parallel with these *in vitro* studies, a trial was performed to test the *in vivo* effects of cinnamaldehyde and eugenol used as feed additives in horses. The fecal egg count (FEC), larval development and circulating blood immune cell counts were investigated.

Materials and methods

Fecal, blood and cyathostomins isolate samples were collected from experimental Welsh ponies from the INRAE experimental farm (doi: 10.15454/1.5573896321728955E12). The experimental procedure received approval from the French Ministry of Research under protocol number APAFIS #35631-202202281021526.

2.1 Screening of indirect and direct activity of plants secondary metabolites

2.1.1 Initial screen of immunomodulatory activity on murine raw macrophages

Given the large number of compounds to be evaluated, an initial immunomodulation assay was carried out on RAW 264.7 murine macrophage cells (ATCC TIB-71). Cells were counted and suspended (250,000 cells/mL, 50,000 per well) in 96-well plates (flat bottom) with culture medium composed of RPMI 1640 media with 2mM L-glutamine (Sigma R5758), 10% inactivated fetal bovine serum (Sigma F2442), 1% PS (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma 4333). The cells were put back into the incubator (+37 °C, 5% CO_2) for two hours, so that they adhered to the bottom of the well. After incubation, the cells are pre-stimulated with anethol, L_menthol, thymol, eugenol, carvacrol or cinnamaldehyde from Pancosma (Z. A. La Pièce 3, 1180 Rolle, Switzerland) (final concentration 5 µg/mL). The bacterial antigen (lipopolysaccharides - LPS) was added 30 minutes later (final concentration 500 ng/mL) to assess anti-inflammatory activity, and an identical volume of culture medium for the condition evaluating the pro-inflammatory activity of the molecules. The cells were then incubated (+37 °C, 5% CO_2) for 24 h. After incubation, the concentration of TNFα in the medium for each condition (in LPS presence or not) was quantified by ELISA using a mouse TNFα ELISA Kit (Sigma RAB0477).

2.1.2 Larval development assay (LDA)

A larval development assay (LDA) was conducted on a cyathostomins isolate. The eggs were extracted from fecal samples collected from the ground directly after excretion of several ponies and pooled. To avoid any contamination, only the top part of the fecal matter (not having touched the ground) was carefully collected. First, the samples were washed through a colander to remove the largest particles and then through two sieves, a first of 125 µm and a second of 20 µM to retain the eggs. Kaolin (Sigma K7375) was then added to the egg solution before centrifugation. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in a saturated NaCl solution (density = 1.18) before centrifugation (5 min, 2,500 RPM). The supernatant was collected on a 20 µm sieve. After egg purification, 2.75 eggs/µL (110 eggs) were filled in a 96-well plate with feces mixture (horse feces mixed with water and pressed through a 125 µm filter, v/v; OD_{650nm} of 0.8), bacteria (*Escherichia coli* OP50 strain) to an OD_{650nm} of 1.3 and 500 µg/mL of

amphotericin b (Sigma A4888). The plate was incubated at +25 °C for 24 h, letting the eggs develop into L1/L2 larvae. After the incubation, the extract was added to the larvae in a concentration gradient of interest and incubated for six days. Afterwards, undeveloped (L1/L2), dead, or developed (L3) larvae were counted with a microscope (×4 magnification), and the larval development rate was calculated as:

$$\frac{number\ of\ L3}{number\ of\ L1\ and\ L2\ +\ number\ of\ L3} \times 100$$

The LDA data were used to fit a two-parameter log-logistic regression model to determine inhibitory concentration 50 (IC_{50}) (see 2.4 Statistical analysis).

2.2.3 Larval motility assay

The INVENesis Migration Trap Assay (MTA) (previously described in (Harrington et al., 2023) measures the effect of compounds on the third larval (L3) stage of *Cyathostomum spp*.. Approximately 300 L3s were exposed to the drug or control treatments in each well of a 96 well plate. In all experiments, non escheated L3s were exposed for 24 h to the compound in a solution of 1.5% of DMSO and 0.00425% of Tween 20. Larvae were then transferred to a migration plate, which is a 96-well plate allowing *Cyathostomum spp*. L3s to migrate from a deposit area to a trap area through a corridor. The mobility of the worms in the trap area was monitored over a 21 minute time window by an automated data acquisition system equipped with a Basler acA2000-50gm camera with which pixel displacement was measured. The effect of compounds was expressed as a percent reduction of motility compared to negative controls (1.5% DMSO). All compounds were tested in triplicates and the IC_{50} was determined as per LDA data (see 2.4 Statistical analysis).

Following the results of the immunomodulatory activity screen, LDA and LMA, a score was measured (the sum of each result) to determine the two best extracts.

2.2 Specifique evaluation of carvacrol and cinnamaldehyde indirect and direct activity

2.2.1 In vitro test of carvacrol and cinnamaldehyde on equine PBMCs

To confirm the anti-inflammatory effects of carvacrol and cinnamaldehyde in horses, we carried out an *in vitro* screening on equine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on four different Welsh ponies. To obtain the cells, 20 ml of blood was collected in K2 EDTA tubes (Dutscher 367525A). The blood was then diluted 1:1 in sterile DPBS (Sigma

D8537) and 20 ml was delicately deposited on 15 ml of histopaque Ficoll-Paque™ PLUS (Sigma 10771). The histopaque blood mix was centrifuged without brake (30 min, 400 g) to isolate the buffy coat located between the serum at the top and the histopaque at the bottom. PBMCs were collected and resuspended in DPBS before red blood cell lysis with lysis buffer (Sigma R7767). Subsequently, PBMCs were treated as RAW 264.7 cells in the section *2.1* "Initial immunomodulatory activity screen on murine raw macrophages".

2.2.2 Cyathostomin antigen preparation and bacterial contaminant dosing

Based on the study of Hellman et al., (2021), 100 mL of cyathostomins third-stage larvae suspension was added to 0.32% sodium hypochlorite solution (Nectra javel 9.6%) during 15 minutes and 0.48% during 5 minutes under agitation to exsheathment larvae. The larvae solution was then centrifuged without brake (5 min, 3,000 g) and the supernatant was replaced with sterile H_2O. This last step was carried out six times to clean the suspension before resuspending it in culture medium (1640 media with 2mM L-glutamine, 10% FCS and 1% PS) during 30 minutes (+25 °C). The larvae suspension was washed three times as above but in culture medium before being crushed in liquid nitrogen and a small amount of DPBS. The larval crushed material was centrifuged without brake (5 min, 3,000 g) then filtered (2 µm). The proteins in the antigen extract were dosed with nanodrop. The amount of LPS present in the extract was dosed by the Plateforme de lipidomique (Dijon, France) and contained 125 ng/mL of LPS.

2.2.3 Transcriptomic response of equine monocytes to carvacrol and cinnamaldehyde in presence of cyathostomin antigen

The first step was to purify equine monocytes. For this we collected PBMCs as presented in section *2.4* and then incubated with anti-$CD14^+$ antibodies coupled to a fluorochrome (Alexa Fluor 647) (Kabithe et al., 2010) for thirty minutes in the dark (-4 °C). After incubation, monocytes were purified with a flow cytometer (MoFol® Astrios (Beckman-Coulter), IMI-ISP, Nouzilly, France). A minimum of 6×10^5 monocytes per condition was suspended in 96-well plates (flat bottom) in culture media and left to rest (+37 °C, 5% CO_2) for 17 h. After rest, the cells were stimulated for six hours by LPS (125 ng/mL), cyathostomins antigen extract (50 µg/mL), dimethyl sulfoxide (DMSO) (0.05%) + LPS (125 ng/mL) and carvacrol or cinnamaldehyde (5 µg/mL) + cyathostomins antigen extract (50 µg/mL). Following stimulation, cells were collected and subjected to RNA

extraction using the Qiagen RNeasy® Plus Mini kit (74134) following manufacturer's recommendations. The quality and purity of RNA was evaluated with bioAnalyzer. RNAseq data were quality filtered using Trim-galore and the retained reads were pseudo-aligned onto the horse transcriptome (Ensembl110) using the Salmon v. 1.4 software. Count tables were imported using *tximport* function from tximport v.1.28 R package (Love et al., 2023b) for subsequent modeling and analysis using the DESeq2 v. 1.40.2 R package (Love et al., 2023a). Gene ontology (GO) enrichment was conducted using *gost* function from gprofiler2 v. 0.2.2 R package (Raudvere et al., 2019; Kolberg et al., 2020).

2.2.4 Measures of differential sensitivity of cyathostomins to carvacrol and cinnamaldehyde

To measure the differential sensitivity of cyathostomins, we first performed an LDA with a higher larvae content to provide sufficient genetic material. In this case, 5,000 larvae (L1/L2) were placed in contact with the extracts in 24-well plates and developed under the same conditions as in section *2.2*. After incubation in five different concentrations of carvacrol or cinnamaldehyde, living larvae were collected using a filter (30 µm) and the DNA from 84 samples was individually extracted using NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Germany). To determine the better parameter for the analysis, we used a mock community from Malsa et al., (under review). This mock community included 32 worms (14 *Cylicocyclus nassatus*, 12 *Cyathostomum pateratum*, 3 *Cylicostephanus goldi*, 1 *Cyathostomum catinatum*, 1 *Cylicostephanus minutus* and 1 *Cylicocyclus ashworhi*). The nemabiome study was performed as the protocol described in Malsa et al., (under review). Subsequently, data were analyzed in R v.4.2.1 with the dada2 software (Callahan et al., 2016) using the mock community as a standard to choose appropriate bioinformatic parameters as described previously (Courtot et al., 2023). Using this approach, we retained a maximum number of expected errors of 2 and 5 for the forward and reverse reads respectively, a truncation length of 200 bp, and applied the default BAND_SIZE parameter. Downstream analyses and count tables data were analyzed using the phyloseq v.1.42.0 R package (McMurdie and Holmes, 2013) and vegan v.2.6-4 R package (Oksanen et al., 2015). All amplicon sequence variants (ASVs) had more than 10,000 hits (min = 216821) and their occurrence sum higher than 10,000. We realized a filtration to remove the samples with an occurrence sum lower than 4,000 (no samples removed). Following taxonomy assignment, five false positive ASV (detected in the mock communities while

absent) with a summed relative abundance below 5% across the 142 samples was removed. The final dataset comprised 142 samples and 7 ASVs, corresponding to 17 species.

2.3 In vivo evaluation of cinnamaldehyde and eugenol as food additives

2.3.1 Animal condition

For the *in vivo* experiment, 19 naturally infected Welsh ponies (between 2 and 5 years old) were used. After a grazing period, the ponies were returned to the stalls two weeks before the experiment to acclimatize to the study conditions. During the acclimatization period, a dietary transition was made from a grass-based diet to one consisting of 600 grams of pellets and hay. The ponies were divided into three groups (control (n=7), cinnamaldehyde (n=6) and eugenol (n=6)) on the basis of age, weight and fecal egg count (FEC) measured one week before the experiment, without significant difference between groups (Table S1).

2.3.2 Experimental design

The trial was conducted over 28 days (from November 8 to December 6 2021). During this period, the ponies of the cinnamaldehyde and eugenol batch receive every day 50 mg of the additive (23.6 µL of cinnamaldehyde and 23.8 µL of eugenol) deposited on 20 grams of pellets. This was prepared one hour before consumption. In view of the lack of an emerging tendency, it was decided to double the dose of additives distributed during the last week (November 29 to Sunday December 5 2021). To monitor the antiparasitic and immunostimulatory effects, five fecal samples, blood samples and weight data were collected per pony over the period of the study (d0, d7, d14, d21 and d28). Individual FEC data were determined using a modified McMaster technique (Raynaud et al., 1970) based on the dilution of 5 g of fecal matter in 70 mL of a saturated NaCl solution (density = 1.18). Eggs were counted using an optical microscope (×150 magnification), the minimum detection limit was set at 50 EPG. The efficacy of additives was measured with Bayesian hierarchical models (see 2.4 Statistical analysis).

To evaluate the effect of the additives on larval development, 50 g of fecal matter mixed with 15 g of vermiculite (30%) was incubated individually for each horse for 13 days at +23 °C and 70% relative humidity. Infective third-stage larvae (L3) of cyathostomins were

then collected using a Baermann apparatus after 24 h and 48 h of sedimentation for each horse and timepoint. The larval count in each sample was determined from 30 drops of 5 µL of the larval solution under the microscope (×4 magnification). Based on the method used by Collas et al., (2018), the larval development rate was then computed as follows:

$$\left(\frac{Counted\ L3}{FEC\ \times\ quantity\ of\ fecal\ matter}\right) \times\ 100$$

Blood samples were analyzed by the PFIE INRAE Val de Loire, Nouzilly, France using a Melet Schloesing Laboratoires M-Scan II.

2.4 Statistical analysis

All data were analyzed using R software v. 4.3.0 (R Core Team, 2023). The plant's SM effects on TNFa levels measured on RAW 264.7 and equine PBMC were statistically analyzed using a Wilcoxon rank sum test with the *wilcox.test* function from the stats v. 4.3.0 package (Bolar, 2019). The larval development and larval migration rate data from LDA and LMA were used to fit a two-parameter log-logistic regression model on the development and motility ratio to the control as the response variable and the concentration range as the variable. We used the *LL.2* function where the lower and upper limits are fixed at 0 and 1 respectively (Ritz et al., 2015) of the drc v. 3.0-1 package (Ritz and Strebig, 2016). The IC_{50} was determined with *ED* function and statistically compared using the *compParm* function from the same package.

As previously mentioned, all RNAseq data were analyzed using the DESeq2 v. 1.40.2 package (Love et al., 2023a) and gprofiler2 v. 0.2.2 R package (Raudvere et al., 2019; Kolberg et al., 2020). The abundance and the Shannon diversity dataset were obtained using phyloseq v. 1.44.0 package (McMurdie and Holmes, 2013). The correlation test between Shannon diversity and the extracts concentration was realized using the *cor.test* function from the stat v. 4.3.0 package (Bolar, 2019)). The Shannon index measured on each group was analyzed using a linear mixed-effects (LME) model with the *lme* function from the nlme v. 3.1-162 package (Pinheiro et al., 2013). Group (carvacrol and cinnamaldehyde) as fitted as fixed effect and technical replicate as a random effect. A LME model was also used to statistically analyze the effect of each SM on cyathostomins count species. The species, the SM and the species x SM interaction were used as fixed effects, and the technical replicate as a random effect.

The data used to determine the groups for the *in vivo* assay (age, weight and FEC at d-7) were analyzed using a ANOVA with the *anova* function of stat package. The groups were used as a fixed effect and horses as a random effect. FEC data was analyzed by a generalized linear mixed-effects models assuming a negative binomial distribution using the *glmer.nb* function of lme4 v.1.1-34 package (Bates et al., 2015), fitting group (control, cinnamaldehyde and eugenol), days (d0, d7, d14, d21 and d28) and group x day interaction as a fixed effect, and with horses as random effect. The larval development rate and hematological parameters (performed individually on each cell population) data were analyzed using LME models. Each dataset was fitted as the *glmer.nb* model used for FEC analysis. The feed additive efficacy was measured using the *fecr_stan* function from eggCount v. 2.3-2 package (Wang et al., 2022) based on the Bayesian hierarchical models recommended by WAAVP guideline (Kaplan et al., 2023). The average FEC of the treated group at d0 was used as post-treatment and at d7, d14, d21 and d28 as post-treatment, including the correction factor for the McMaster technique. The correlation between hematological data and FEC was determined using the *rcorr* function from Hmisc v. 5.1-0 package (Harrell Jr and Dupont, 2023).

Results

3.1 Carvacrol shows the best direct and indirect in vitro activity

The anti-inflammatory and pro-inflammatory activity of anethol, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, L-menthol and thymol was screened on RAW 264.7 cells using an ELISA. The results showed no pro-inflammatory activity of these extracts (data not shown). The extracts with the highest anti-inflammatory activity were cinnamaldehyde, carvacrol and eugenol (Fig. 1) with a reduction in TNFα in the medium of 100% ($P_{Bonferroni\ adjusted} < 0.001$), 47% ($P_{Bonferroni\ adjusted} = 0.002$) and 38% ($P_{Bonferroni\ adjusted} = 0.04$) respectively, compared to control. LDA and LMA were then performed to identify the most active extracts using their IC_{50}. The two extracts with the best activity in inhibiting larval development were carvacrol (IC_{50} = 0.19 mM [95% c.i. = 0.17 ; 0.20]) and eugenol (IC_{50} = 0.41 mM [95% c.i. = 0.38 ; 0.45]) (Fig.1). For motility inhibition activity, eugenol (IC_{50} = 0.29 mM [95% c.i. = 0.04 ; 0.54]) and anethol (IC_{50} = 1.59 mM [95% c.i. = 0.87 ; 2.31]) was

the two most active. Cinnamaldehyde and carvacrol obtained the best scores of 3.74 and 58.35 respectively. All results are summarized in Supplementary Table S2.

3.2 Carvacrol and cinnamaldehyde effects are conserved in equine PBMCs

Following the results of the immunomodulatory activity screening on RAW 264.7 cells, the anti-inflammatory activity of cinnamaldehyde and carvacrol was evaluated on equine PBMC. On average over four trials and seven technical replicat, cinnamaldehyde and carvacrol induced a decrease in TNFα of 41% ($P < 0.001$) and 14% ($P = 0.01$), respectively in medium (Fig. 2).

3.3 Carvacrol activates genes regulating oxidative stress in equine monocytes exposed to larval antigen

The variance in transcript counts mainly reflects (47% of the observed variance) the immunogenicity gradient of the performed treatment (Fig. 3). While the DMSO solvent only had a minor effect on monocyte gene expression (n = 5 genes with no known function; P adjusted < 0. 05), bacterial LPS induced a significant change in the expression of 666 genes, including the activation of 526 genes defining a significant enrichment of ontologies related to the cytokine-cytokine receptor interaction (KEGG:04060, *P adjusted* = 1.4e-9), TNF response (KEGG:04668, *P adjusted* = 1.0e-08), Nf-Kappa B (KEGG:04064, *P adjusted* = 2.2e-7), JAK-STAT signaling (KEGG:04630, *P adjusted* = 4.4-07) or Toll-like receptor (TLR) signaling pathway (KEGG:04620, *P adjusted* = 0.1e-03). The differential response of monocytes to parasite antigen (compared to the LPS-contaminated control) showed a significant deviation in the expression of 750 genes. Compared to the bacterial antigen alone, the cells repressed the expression of 282 genes. In contrast, the 249 over-expressed genes in the presence of parasite antigen defined a significant enrichment of 28 biosynthetic pathways, as the TNF (KEGG:04668, *P adjusted* = 3.0e-05), TLR (KEGG:04620, *P adjusted* = 5.4e-05), the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) (KEGG:04066, *P adjusted* = 4.7e-05) or the Nf-Kappa B (*P adjusted* = 9e-05) pathway. The addition of carvacrol or cinnamaldehyde had only a limited effect on gene expression in monocytes stimulated by parasitic antigen, with 22 genes over-expressed respectively (Fig. 4). However, comparison of the two extracts isolated 38 genes differentially expressed by monocytes when in the presence of parasitic antigen.

3.4 Larval community structure variation following exposure to carvacrol, cinnamaldehyde and pyrantel

In this study we investigated the effect of equine cyathostomins larval community structure to cinnamaldehyde, carvacrol or pyrantel under a concentration gradient. To estimate concentrations, we relied on those used for the *in vitro* LDA test. The results showed a decrease in alpha diversity (Shannon index) in correlation with the increase of cinnamaldehyde ($r_{Pearson's}$ = -0.64 ; P < 0.001), carvacrol ($r_{Pearson's}$ = -0.68 ; P < 0.001) or pyrantel ($r_{Pearson's}$ = -0.84 ; P < 0.001) concentration. Compared with the control group, the Shannon index was significantly lower for the last tested concentration of carvacrol and pyrantel (P < 0.001) (Fig.5), and for the three last cinnamaldehyde concentrations evaluated (P < 0.001). At the control concentration, the most abundant species were *Cylicocyclus nassatus*, *C. ashworthi* and *Cyathostomum pateratum* (Fig S1). During the cinnamaldehyde concentration gradient, only the count of *C. ashworthi* was modified, becoming significantly higher (P < 0.001) at the highest concentration (3 mM) compared to control. In the face of the carvacrol concentration gradient, the counts of *C. pateratum* and *C. nassatus* became significantly higher at the last concentration tested (0.5 mM) compared with the control. In the presence of pyrantel, only the counts of the three most abundant species decreased significantly compared with the control condition. This to 2,000 mM and 125,000 mM (P < 0.001) for *C. nassatus*, at 2,000, 20,000 and 125,000 mM for *C. pateratum* and 2,000 mM and 5,000 mM for *C ashworthi*. A dose-response effect by species tried to be determined, but the count trajectories (Fig S2) were too random to allow the model to converge.

3.5 In vivo trial of both extract as feed additives

The use of cinnamaldehyde or eugenol additives had no effect on parasite parameters (Fig. 6). Only at d7, the FECs of the test groups were significantly different from those of the control group ($P_{cinnamaldehyde}$ = 0.05 ; $P_{eugenol}$ = 0.02), but this is explained by the increased excretion in the control group. Efficiencies were measured during the trial and did not exceed 4.9% for cinnamaldehyde at d28 (Table S3). The additives also had no effect on the selected hematological parameters (Fig. 7). Some isolated cases showed significant differences in the test batches compared with the control. This was the case for the number of red blood cells at d7 in the cinnamaldehyde group (P = 0.04), the number of monocytes at d21 in the eugenol group (P = 0.03), the number of eosinophils at d14 (P

= 0.07) and 21 (P = 0.05) in the eugenol group and the number of basophils at d21 in the cinnamaldehyde group (P = 0.05). Also, on average during the trial, red blood cell (+20% ; P = 0.02) and lymphocyte (+13% ; P = 0.03) counts were higher in the cinnamaldehyde group. The correlation between FEC and cell count was observed and revealed no effect (Table S4).

Discussion

In this study, we focused on screening the direct anthelmintic and the immunomodulatory activity of plant terpenic compounds on small strongyle. The aim was to identify molecules that could be used as food additives to manage cyathostomins infection in equines and stimulate their immune response, thereby promoting their natural defense. Following the results of *in vitro* screening, we identified three interesting molecules. Cinnamaldehyde with the highest anti-inflammatory activity, and eugenol and carvacrol with the highest activity in inhibiting larval mobility and development respectively. Our study is the first to evaluate the sensitivity of cyathostomins to these molecules. Past tests on *C. elegans* found IC_{50} of 1.45 and 0.80 mM for eugenol and carvacrol respectively (Hernando et al., 2019). Compared to our results, cyathostomins are more sensitive to eugenol (IC_{50} = 0.29 mM) and carvacrol (IC_{50} = 0.19 mM). Conversely, they appear less sensitive to cinnamaldehyde effect on motility with an IC_{50} of 1.3 mM (0.16 mg/mL) compared to *H. contortus* (IC_{50} = 0.018 mg/mL (Katiki et al., 2014) or IC_{50} = 7.2 µM (Frota et al., 2023)) or *Ascaris suum* (Williams et al., 2015) where 125 µg/mL cinnamon bark extract inhibited 100% of migration. To further investigate the direct antiparasitic activity of the two best compounds selected (*i.e.* carvacrol and cinnamaldehyde), we studied the effect of increasing concentration, as well as that of pyrantel on cyathostomins species community. At the control concentration, the three most abundant species were *C. nassatus*, *C. ashworthi* and *C. pateratum*. In the presence of pyrantel, these three species out of 17 were the only ones to decrease significantly during the concentration gradient. Moreover, *C. ashwortii* counts were significantly higher at the highest concentration of cinnamaldehyde compared with the control. Similar results were observed for *C. nassatus* and *C. pateratum* in the presence of carvacrol. These results may suggest a better adaptation of these species to the molecules tested. However, they were the only ones to

have been significantly impacted. Being more abundant, the effects on these species will be more detectable than on rare species explaining these results.

The second aspect of this study was to investigate the indirect activity of the selected candidates. A first evaluation of the anti-inflammatory activity of cinnamaldehyde and carvacrol on equine peripheral blood mononuclear cells was performed. The anti-inflammatory activity of these extracts was confirmed on equine cells, despite a weaker response, which can be explained by the weaker reactivity of the primary cells. To further investigate the effects of these two MSs on the horse's immune system, the response of stimulated equine monocytes to parasite antigen was studied for the first time. A study published in 2020 by Hellman et al., evaluated cytokine expression by equine PBMC, after *Strongulus vulgaris* or cyathostomin antigen stimulation. L3 cyathostomins antigen induced over-expression of IL-4 and IL-13. In our study, L3 cyathostomins antigen induced a change in the expression of 750 genes, of which 468 up and 282 down-expressed. Based on the KEGG database, focused on the enrichment of biological processes (GO:BP), the two pathways over-expressed were TNF and TLR signaling patway.

HIF-1 signaling pathways. TNF is involved in several therapeutic roles, but is an especially important mediator in resistance against such infections (Idriss and Naismith, 2000). HIF-1 is a gene code for a transcription factor involved in regulating the response to hypoxia, consisting of two subunits: an inducibly-expressed HIF-1α and a constitutively-expressed HIF-1β subunit (McGettrick and O'Neill, 2020). HIF-α also plays a role in the immune response. Studies have shown that HIF-1α deficient mice lose macrophage activity (Cramer et al., 2003; Peyssonnaux et al., 2007; Tannahill et al., 2013; Wang et al., 2017). In contrast to the antigen stimulation, LPS induces differential expression of 666 genes compared with the control, including 140 genes under-expressed and 526 over-expressed. Functional enrichment analysis (Kolberg et al., 2020) brings out various immune-related genes. Four of the most differentially expressed pathways were identified concerned response to cytokine, cellular response to cytokine stimulus, immune system process and response to external stimulus. With KEGG, the four most significantly over-repressed pathways are : Cytokine-cytokine receptor interaction, NF-ϰB, TNF and JAK-STAT signaling pathway. In both conditions, the TLR signaling pathway was also found to be overexpressed. Stimulation of equine monocytes with larval antigen

or LPS induced overexpression of similar genes found in human monocytes after LPS stimulation (Guha and Mackman, 2001; Wan et al., 2016). The monocyte response to LPS stimulation is well described in humans. Recognized by TLR4, LPS induces the differentiation of monocytes into macrophages via the NF-ϰB pathway (Guha and Mackman, 2001; Wan et al., 2016). The role of TLR4 in the LPS-induced immune response has also been demonstrated in mice (Hoshino et al., 1999). Based on the literature and our results, we can conclude that the TLR is involved in the initiation of the immune response of equine monocytes in the presence of LPS or larval antigen. More, the NF-ϰB pathway has been described as able to polarize M2-type macrophages, specific for repair following infection (Notari et al., 2014; Cosín-Roger et al., 2016), into M1 macrophages (Hagemann et al., 2009). Our results suggest that the presence of larval antigen induces the differentiation of monocytes into M1 macrophages, promoting an inflammatory response. With high expression of HIF-1 and NF-kB, it would be interesting to explore the differentiation of monocytes into macrophages in the presence of parasite antigen. This would provide an overview of the specific immune response to strongyles infection in horses. We also examined the response of monocytes to larval antigen in the presence of cinnamaldehyde or carvacrol. Resulting from *in vitro* anti-inflammatory activity, we expected a modulating effect, however no effect of these compounds to modulate the larval antigen-induced monocyte response was observed.

Finally, following the results of *in vitro* activity screening, a first *in vivo* study was conducted over a period of 28 days, to evaluate the effects of cinnamaldehyde and eugenol used as a food additive on parasitological and hematological parameters. To date, no studies have evaluated the *in vivo* activity of eugenol and both in horses. At the dose tested and doubled over the last week of the study, no effects directly associated with additives were observed. We observed a number of eggs excreted at d7 was significantly lower in the test batches compared with the control, but these results are explained by the increased FEC in the control group. This was also confirmed by the efficacy of the additives measured negative at this date and did not exceed 4.9% at d28 for cinnamaldehyde. Our results show the gap between *in vitro* and *in vivo* results. In our case, once ingested by the animal, the food additive has to pass through the digestive tract before coming into contact with the parasite in the intestine. Between entry and arrival at the site, several factors can influence the structure of the molecules, such as digestive pH, gastric emptying speed and secretion, as well as diet (Vertzoni et al., 2019). The transition

from *in vitro* to *in vivo* therefore requires galenic studies to improve molecule delivery. The development of an equine fermenter capable of reproducing hindgut conditions (Strauch et al., 2017) could help identify the fate of ingested molecules. Some authors have also proposed the use of yeast particles offering stability and prolonged release properties for essential oil use (Soto et al., 2023).

Conclusion

Our study enabled us to validate the in vitro anti-inflammatory activity of cinnamaldehyde and carvacrol on a murine macrophages cell line. However, this activity was weaker on equine PBMC purified from a blood sample. *In vitro* anti-parasitic activity was also observed, without *in vivo* effect of extracts used as a food supplement. This difference between the two trials raises several questions about the dose and formulation of the extracts, in order to maximize their effects in the host. Finally, using an RNAseq approach, we described the response of equine monocytes in the presence of LPS or larval antigen. These two responses appears to induce the NF-kappaB pathway via TLRs, promoting the monocytes differentiation into M1 macrophages. A complementary study investigating monocyte differentiation and macrophage polarization in the presence of larval antigen would give us a clearer picture of the mechanism.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work benefited from the financial support of the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE), and Institut Carnot France Future Élevage (F2E). Joshua Malsa was grateful for the stipend of the Fonds Éperon and IFCE. We are grateful to the GenoToul bioinformatics platform (https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12) for providing computing and storage resources.

References

Abdel-Rahman, F.H., Alaniz, N.M., Saleh, M.A., 2013. Nematicidal activity of terpenoids. J. Environ. Sci. Health B 48, 16–22.

André, W.P.P., Cavalcante, G.S., Ribeiro, W.L.C., Santos, J.M.L. dos, Macedo, I.T.F., Paula, H.C.B. de, Morais, S.M. de, Melo, J.V. de, Bevilaqua, C.M.L., 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 26, 323–330.

André, W.P.P., Ribeiro, W.L.C., Cavalcante, G.S., Santos, J.M.L. dos, Macedo, I.T.F., Paula, H.C.B. de, de Freitas, R.M., de Morais, S.M., Melo, J.V. de, Bevilaqua, C.M.L., 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. Vet. Parasitol. 218, 52–58.

Asha, M.K., Prashanth, D., Murali, B., Padmaja, R., Amit, A., 2001. Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum sanctum and eugenol. Fitoterapia 72, 669–670.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J. Stat. Softw. 67, 1–48.

Bellaw, J.L., Nielsen, M.K., 2020. Meta-analysis of cyathostomin species-specific prevalence and relative abundance in domestic horses from 1975–2020: emphasis on geographical region and specimen collection method. Parasit. Vectors 13, 509.

Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytol. 127, 617–633.

Boisseau, M., Dhorne-Pollet, S., Bars-Cortina, D., Courtot, É., Serreau, D., Annonay, G., Lluch, J., Gesbert, A., Reigner, F., Sallé, G., Mach, N., 2023. Species interactions, stability, and resilience of the gut microbiota - Helminth assemblage in horses. iScience 26, 106044.

Bolar, K., 2019. STAT: Interactive Document for Working with Basic Statistical Analysis.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161, 839–851.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13, 581–583.

Collas, C., Sallé, G., Dumont, B., Cabaret, J., Cortet, J., Martin-Rosset, W., Wimel, L., Fleurance, G., 2018. Are sainfoin or protein supplements alternatives to control small strongyle infection in horses? Anim. Int. J. Anim. Biosci. 12, 359–365.

Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Calatayud, S., Hernández, C., Esplugues, J.V., Barrachina, M.D., 2016. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. Mucosal Immunol. 9, 986–998.

Courtot, É., Boisseau, M., Dhorne-Pollet, S., Serreau, D., Gesbert, A., Reigner, F., Basiaga, M., Kuzmina, T., Lluch, J., Annonay, G., Kuchly, C., Diekmann, I., Krücken, J., Samson-Himmelstjerna, G. von, Mach, N., Sallé, G., 2023. Comparison of two molecular barcodes for the study of equine strongylid communities with amplicon sequencing. PeerJ 11, e15124.

Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Johnson, R.S., 2003. HIF-1α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. Cell 112, 645–657.

Du, Z.-A., Sun, M.-N., Hu, Z.-S., 2018. Saikosaponin a Ameliorates LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. Inflammation 41, 193–198.

Erb, M., Kliebenstein, D.J., 2020. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and

Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. Plant Physiol. 184, 39–52.

Ferreira, L.E., Benincasa, B.I., Fachin, A.L., França, S.C., Contini, S.S.H.T., Chagas, A.C.S., Beleboni, R.O., 2016. Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep. Vet. Parasitol. 228, 70–76.

Frota, G.A., Santos, V.O.D., Rodrigues, J.F.V., Oliveira, B.R., Albuquerque, L.B., Vasconcelos, F.R.C. de, Silva, A.C., Teixeira, M., Brito, E.S. de, Santos, J.M.L.D., Vieira, L. da S., Monteiro, J.P., 2023. Biological activity of cinnamaldehyde, citronellal, geraniol and anacardic acid on Haemonchus contortus isolates susceptible and resistant to synthetic anthelmintics. Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao Of. Col. Bras. Parasitol. Vet. 32, e006023.

Giles, C.J., Urquhart, K.A., Longstaffe, J.A., 1985. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): A report of 15 clinical cases. Equine Vet. J. 17, 196–201.

Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell. Signal. 13, 85–94.

Hagemann, T., Biswas, S.K., Lawrence, T., Sica, A., Lewis, C.E., 2009. Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NF-κB. Blood 113, 3139–3146.

Harborne, J.B., 1999. Classes and functions of secondary products from plants, in: Chemicals from Plants. WORLD SCIENTIFIC / IMPERIAL COLLEGE PRESS, pp. 1–25.

Harrell Jr, F.E., Dupont, C., 2023. Hmisc: Harrell Miscellaneous.

Harrington, S., Pyche, J., Burns, A.R., Spalholz, T., Ryan, K.T., Baker, R.J., Ching, J., Rufener, L., Lautens, M., Kulke, D., Vernudachi, A., Zamanian, M., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Roy, P.J., 2023. Nemacol is a small molecule inhibitor of C. elegans vesicular acetylcholine transporter with anthelmintic potential. Nat. Commun. 14, 1816.

Hellman, S., Tydén, E., Hjertner, B., Nilsfors, F., Hu, K., Morein, B., Fossum, C., 2021. Cytokine responses to various larval stages of equine strongyles and modulatory effects of the adjuvant G3 in vitro. Parasite Immunol. 43, e12794.

Hernando, G., Turani, O., Bouzat, C., 2019. Caenorhabditis elegans muscle Cys-loop receptors as novel targets of terpenoids with potential anthelmintic activity. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, e0007895.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S., 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J. Immunol. Baltim. Md 1950 162, 3749–3752.

Idriss, H.T., Naismith, J.H., 2000. TNFα and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). Microsc. Res. Tech. 50, 184–195.

Jayachandran, M., Chandrasekaran, B., Namasivayam, N., 2015. Geraniol attenuates fibrosis and exerts anti-inflammatory effects on diet induced atherogenesis by NF-κB signaling pathway. Eur. J. Pharmacol. 762, 102–111.

Kabithe, E., Hillegas, J., Stokol, T., Moore, J., Wagner, B., 2010. Monoclonal antibodies to equine CD14. Vet. Immunol. Immunopathol. 138, 149–153.

Kaplan, R.M., 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. Vet. Res. 33, 491–507.

Kaplan, R.M., Denwood, M.J., Nielsen, M.K., Thamsborg, S.M., Torgerson, P.R., Gilleard, J.S., Dobson, R.J., Vercruysse, J., Levecke, B., 2023. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing

anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. Vet. Parasitol. 318, 109936.

Katiki, L., Evangelista, A., Canova, E., Piza, A., Fornazari, B., Araujo, R., Louvandini, H., Amarante, A., Costa, R., Bueno, M., Lima, J., Verissimo, C., 2014. Anthelmintic activity of anethole, carvone, carvacrol, thymol, linalool, limonene, eucalyptol, vanillin, cinnamaldehyde and eugenol in in vitro tests. Planta Med. 80, P1L14.

Katiki, L.M., Barbieri, A.M.E., Araujo, R.C., Veríssimo, C.J., Louvandini, H., Ferreira, J.F.S., 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against Haemonchus contortus in vitro. Vet. Parasitol. 243, 47–51.

Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Vilo, J., Peterson, H., 2020. gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. F1000Research 9, ELIXIR-709.

Love, M., Ahlmann-Eltze, C., Forbes, K., Anders, S., Huber, W., FP7, R.E., NHGRI, N., CZI, 2023a. DESeq2: Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution.

Love, M., Soneson, C., Robinson, M., Patro, R., Morgan, A.P., Thompson, R.C., Shirley, M., Srivastava, A., 2023b. tximport: Import and summarize transcript-level estimates for transcript- and gene-level analysis.

Love, S., Duncan, J.L., 1992. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. Vet. Parasitol. 44, 127–142.

Love, S., Murphy, D., Mellor, D., 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. Vet. Parasitol. 85, 113–122.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., 1999. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. Vet. Parasitol. 85, 97–111; discussion 111-112, 215–225.

McGettrick, A.F., O'Neill, L.A.J., 2020. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. Cell Metab. 32, 524–536.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE 8, e61217.

Morariu, S., Mederle, N., Badea, C., Dărăbuş, G., Ferrari, N., Genchi, C., 2016. The prevalence, abundance and distribution of cyathostomins (small stongyles) in horses from Western Romania. Vet. Parasitol. 223, 205–209.

Nielsen, M.K., 2014. Integrated parasite control - how to strike that balance. Proc. 60th Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract. Salt Lake City Utah USA Dec. 6-10 2014 401–406.

Notari, L., Riera, D.C., Sun, R., Bohl, J.A., McLean, L.P., Madden, K.B., Rooijen, N. van, Vanuytsel, T., Jr, J.F.U., Zhao, A., Shea-Donohue, T., 2014. Role of Macrophages in the Altered Epithelial Function during a Type 2 Immune Response Induced by Enteric Nematode Infection. PLOS ONE 9, e84763.

Ohtsu, A., Shibutani, Y., Seno, K., Iwata, H., Kuwayama, T., Shirasuna, K., 2017. Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6 secretion via the RAGE/TLR4-NF-κB-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages. Exp. Ther. Med. 14, 4363–4370.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., Wagner, H., 2015. Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 22-1 2, 1–2.

Olounladé, P.A., Azando, E.V.B., Hounzangbé-Adoté, M.S., Ha, T.B.T., Leroy, E., Moulis, C., Fabre, N., Magnaval, J.F., Hoste, H., Valentin, A., 2012. In vitro anthelmintic activity of the essential oils of Zanthoxylum zanthoxyloides and Newbouldia laevis against

Strongyloides ratti. Parasitol. Res. 110, 1427–1433.
Peregrine, A.S., McEwen, B., Bienzle, D., Koch, T.G., Weese, J.S., 2006. Larval cyathostominosis in horses in Ontario: An emerging disease? Can. Vet. J. 47, 80–82.
Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? Vet. Parasitol. 201, 1–8.
Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Luciano, J.H.S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn. and eugenol against Haemonchus contortus. Vet. Parasitol. 109, 59–63.
Peyssonnaux, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S., Nizet, V., 2007. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 178, 7516–7519.
Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S.S., Sarkar, D., 2013. Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 31-110 3, 1–113.
Qi, H., Wang, W.X., Dai, J.L., Zhu, L., 2015. In vitro anthelmintic activity of Zanthoxylum simulans essential oil against Haemonchus contortus. Vet. Parasitol. 211, 223–227.
R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., Aluko, R.E., 2022. Health benefits of polyphenols: A concise review. J. Food Biochem. 46, e14264.
Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., Vilo, J., 2019. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). Nucleic Acids Res. 47, W191–W198.
Raynaud, J.-P., William, G., Brunault, G., 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. Hum. Comparée 45, 321–342.
Reinemeyer, C.R., Smith, S.A., Gabel, A.A., Herd, R.P., 1984. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. Vet. Parasitol. 15, 75–83.
Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. PLOS ONE 10, e0146021.
Ritz, C., Strebig, J.C., 2016. drc: Analysis of Dose-Response Curves.
Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. Phytochemistry 69, 299–322.
Schneider, S., Pfister, K., Becher, A.M., Scheuerle, M.C., 2014. Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses — a risk assessment. BMC Vet. Res. 10, 262.
Silva, C.R., Lifschitz, A.L., Virkel, G.L., Viviani, P., Silva, N.C.S., Costa Junior, L.M., 2018. Ruminal stability of terpenoids with anthelmintic activity on Haemonchus contortus. Resúmenes XX Congr. Bras. Parasitol. Vet.
Soto, E.R., Rus, F., Mirza, Z., Ostroff, G.R., 2023. Yeast Particles for Encapsulation of Terpenes and Essential Oils. Mol. Basel Switz. 28, 2273.
Srivastava, J.K., Pandey, M., Gupta, S., 2009. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. Life Sci. 85, 663–669.
Strauch, S., Wichert, B., Greef, J.M., Hillegeist, D., Zeyner, A., Liesegang, A., 2017. Evaluation of an in vitro system to simulate equine foregut digestion and the influence of acidity on protein and fructan degradation in the horse′s stomach. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 101, 51–58.
Štrbac, F., Bosco, A., Maurelli, M.P., Ratajac, R., Stojanović, D., Simin, N., Orčić, D., Pušić, I., Krnjajić, S., Sotiraki, S., Saralli, G., Cringoli, G., Rinaldi, L., 2022. Anthelmintic

Properties of Essential Oils to Control Gastrointestinal Nematodes in Sheep—In Vitro and In Vivo Studies. Vet. Sci. 9, 93.

Sunil, M.A., Sunitha, V.S., Santhakumaran, P., Mohan, M.C., Jose, M.S., Radhakrishnan, E.K., Mathew, J., 2021. Protective effect of (+)-catechin against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells through downregulation of NF-κB and p38 MAPK. Inflammopharmacology 29, 1139–1155.

Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., Xiong, L., 2019. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. BioMed Res. Int. 2019, 7039802.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S.S., Corr, S.C., Haneklaus, M., Caffrey, B.E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F.C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C.T., Lin, H., Masters, S.L., Gottlieb, E., Kelly, V.P., Clish, C., Auron, P.E., Xavier, R.J., O'Neill, L. a. J., 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. Nature 496, 238–242.

Tian, C., Shao, Y., Jin, Z., Liang, Y., Li, C., Qu, C., Sun, S., Cui, C., Liu, M., 2022. The protective effect of rutin against lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice based on the pharmacokinetic and pharmacodynamic combination model. J. Pharm. Biomed. Anal. 209, 114480.

Vertzoni, M., Augustijns, P., Grimm, M., Koziolek, M., Lemmens, G., Parrott, N., Pentafragka, C., Reppas, C., Rubbens, J., Van Den Abeele, J., Vanuytsel, T., Weitschies, W., Wilson, C.G., 2019. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An UNGAP review. Eur. J. Pharm. Sci. 134, 153–175.

Walshe, N., Mulcahy, G., Crispie, F., Cabrera-Rubio, R., Cotter, P., Jahns, H., Duggan, V., 2021. Outbreak of acute larval cyathostominosis - A "perfect storm" of inflammation and dysbiosis. Equine Vet. J. 53, 727–739.

Wan, J., Shan, Y., Fan, Y., Fan, C., Chen, S., Sun, J., Zhu, L., Qin, L., Yu, M., Lin, Z., 2016. NF-κB inhibition attenuates LPS-induced TLR4 activation in monocyte cells. Mol. Med. Rep. 14, 4505–4510.

Wang, C., Paul, M., Isler, T., Furrer, R., 2022. eggCounts: Hierarchical Modelling of Faecal Egg Counts.

Wang, L., Jiang, Y., Yaseen, A., Li, F., Chen, B., Shen, X.-F., Zheng, C., Zhang, G.-L., Wang, M.-K., 2021. Steroidal alkaloids from the bulbs of Fritillaria pallidiflora Schrenk and their anti-inflammatory activity. Bioorganic Chem. 112, 104845.

Wang, T., Liu, H., Lian, G., Zhang, S.-Y., Wang, X., Jiang, C., 2017. HIF1α-Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. Mediators Inflamm. 2017, 9029327.

Wang, X., Liu, R., Zhang, W., Zhang, X., Liao, N., Wang, Z., Li, W., Qin, X., Hai, C., 2013. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. Mol. Cell. Endocrinol. 376, 70–80.

Williams, A.R., Ramsay, A., Hansen, T.V.A., Ropiak, H.M., Mejer, H., Nejsum, P., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2015. Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (Cinnamomum verum). Sci. Rep. 5, 14791.

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H., Bahadar, K., 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microb. Pathog. 124, 198–202.

Zhu, L., Dai, J., Yang, L., Qiu, J., 2013. Anthelmintic activity of Arisaema franchetianum and Arisaema lobatum essential oils against Haemonchus contortus. J.

Ethnopharmacol. 148, 311–316. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.034

Legends to figures

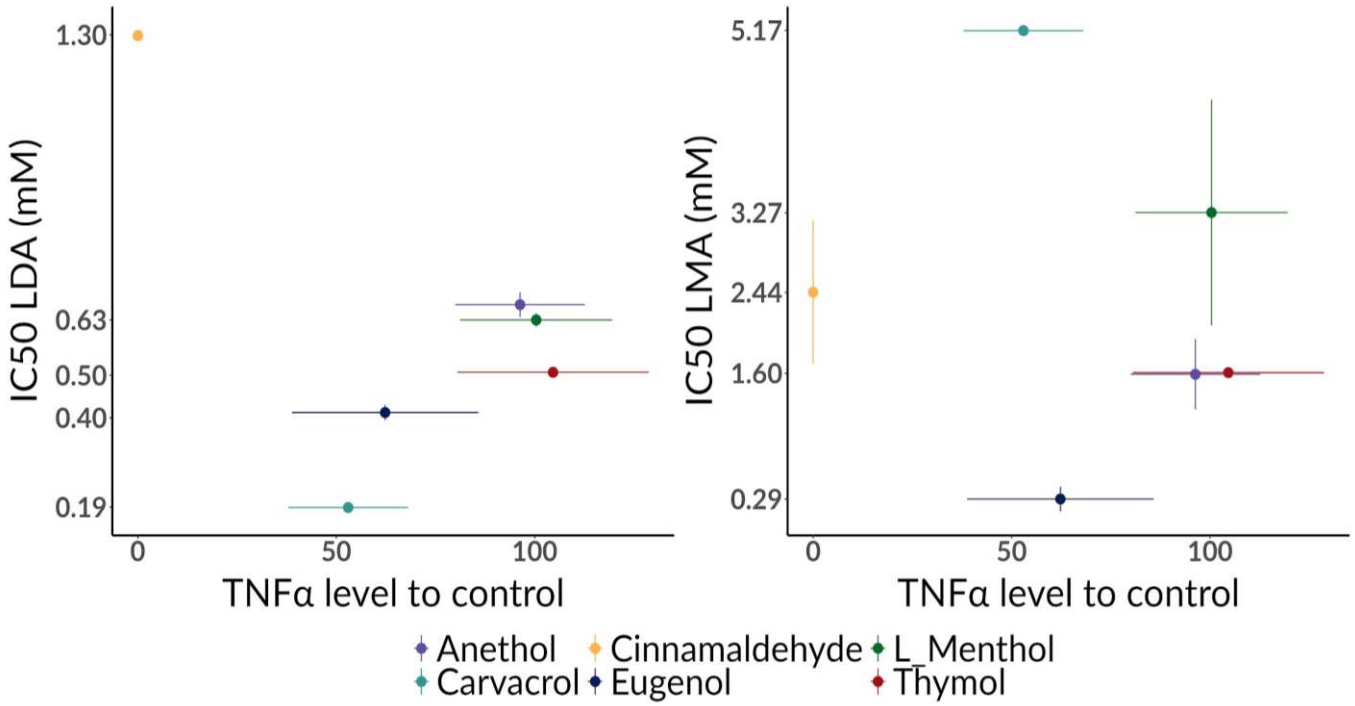


Fig 1. Direct and anti-inflammatory activity of a set of six extracts

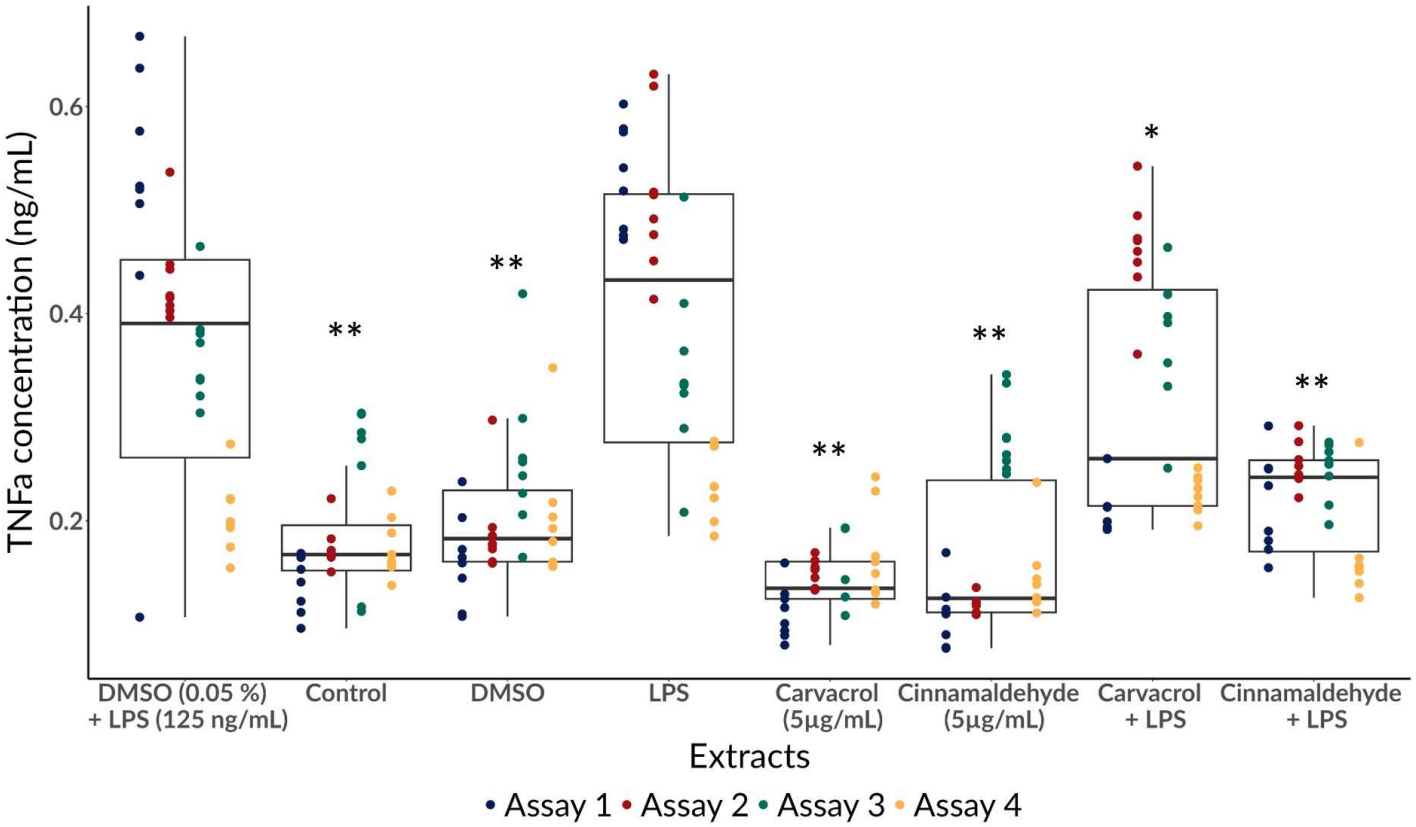


Fig 2. Anti-inflammatory activity of carvacrol and cinnamaldehyde on equine PBMC

Asterix indicates the significant difference of TNFα level compared to the DMSO + LPS group (* $P = 0.01$, ** $P < 0.001$).

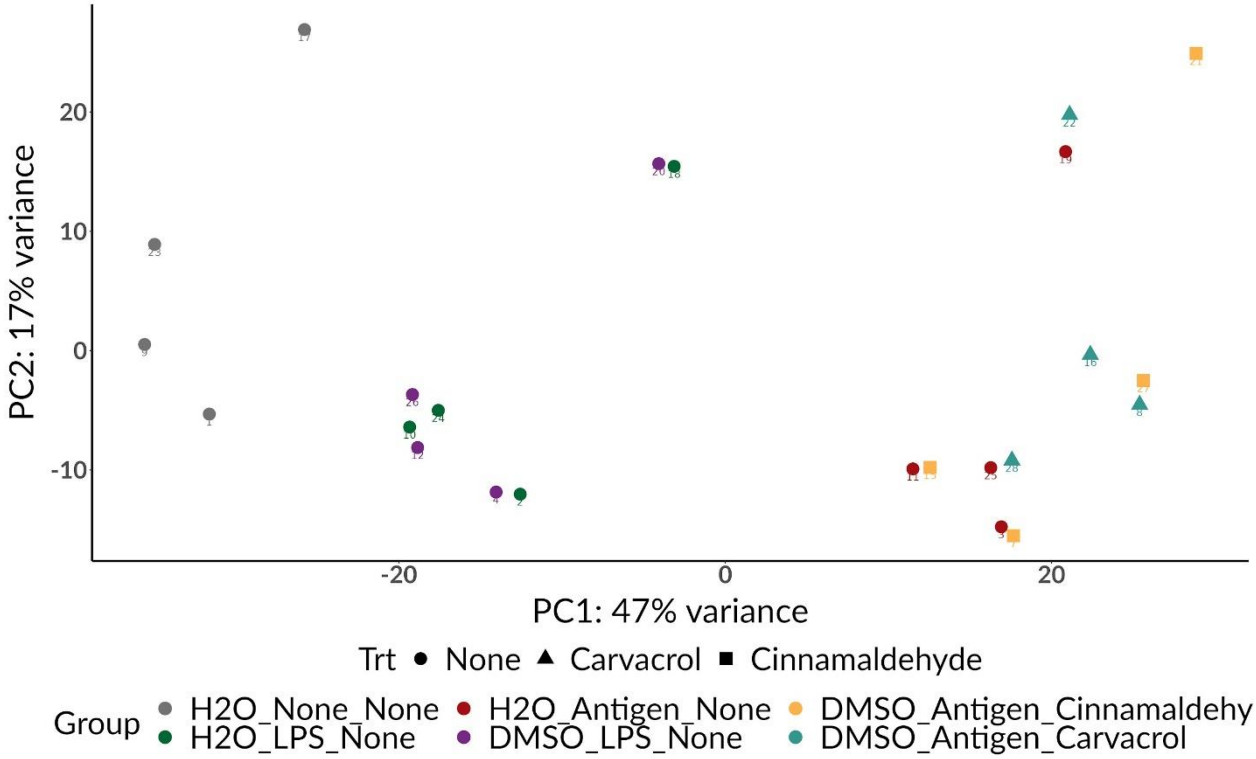


Fig 3. Principal component analysis (PCA) of monocyte RNA-seq data under different conditions (Group)

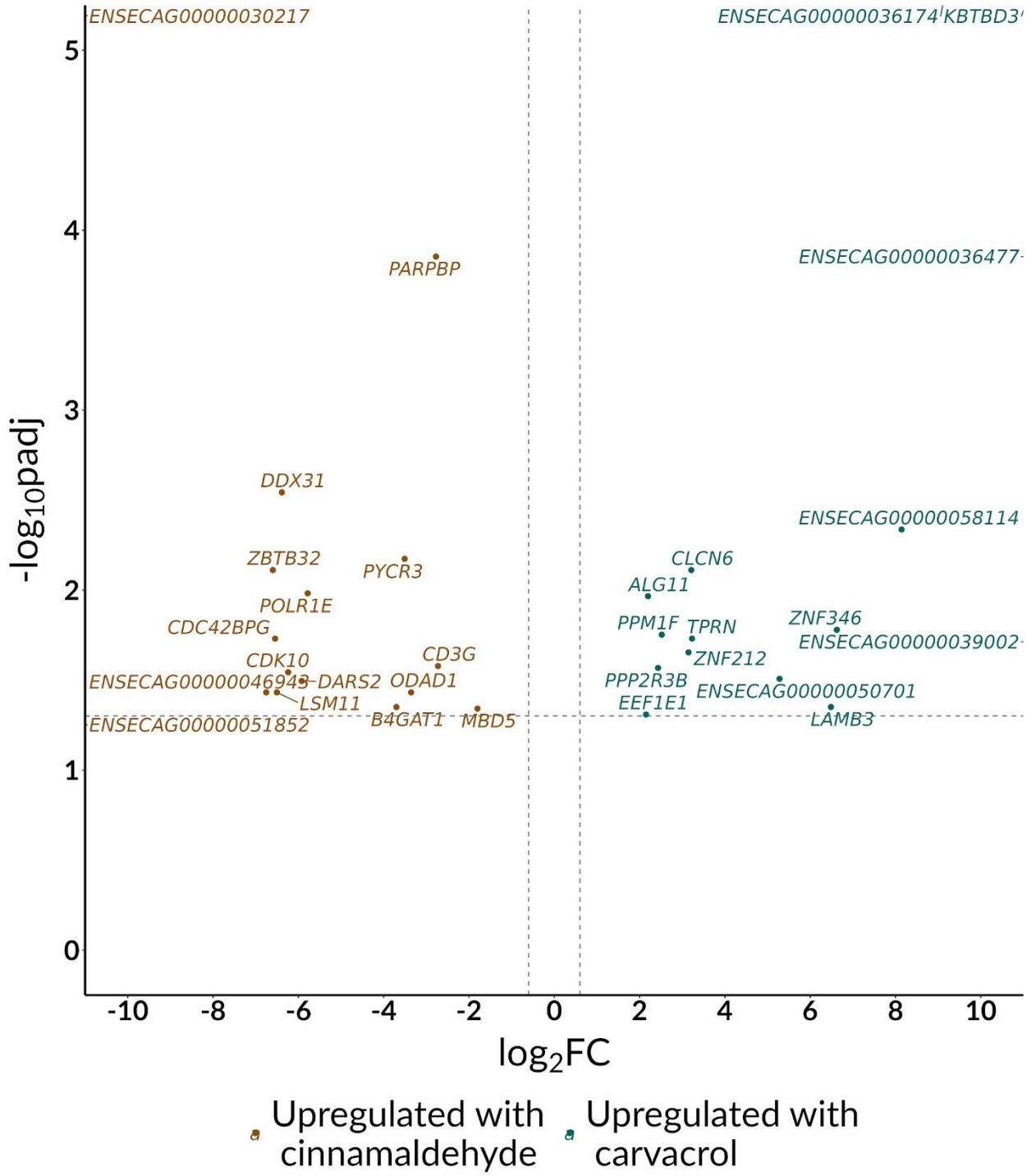


Fig 4. Volcano plot of equine monocyte differentially expressed genes between cinnamaldehyde and carvacrol condition

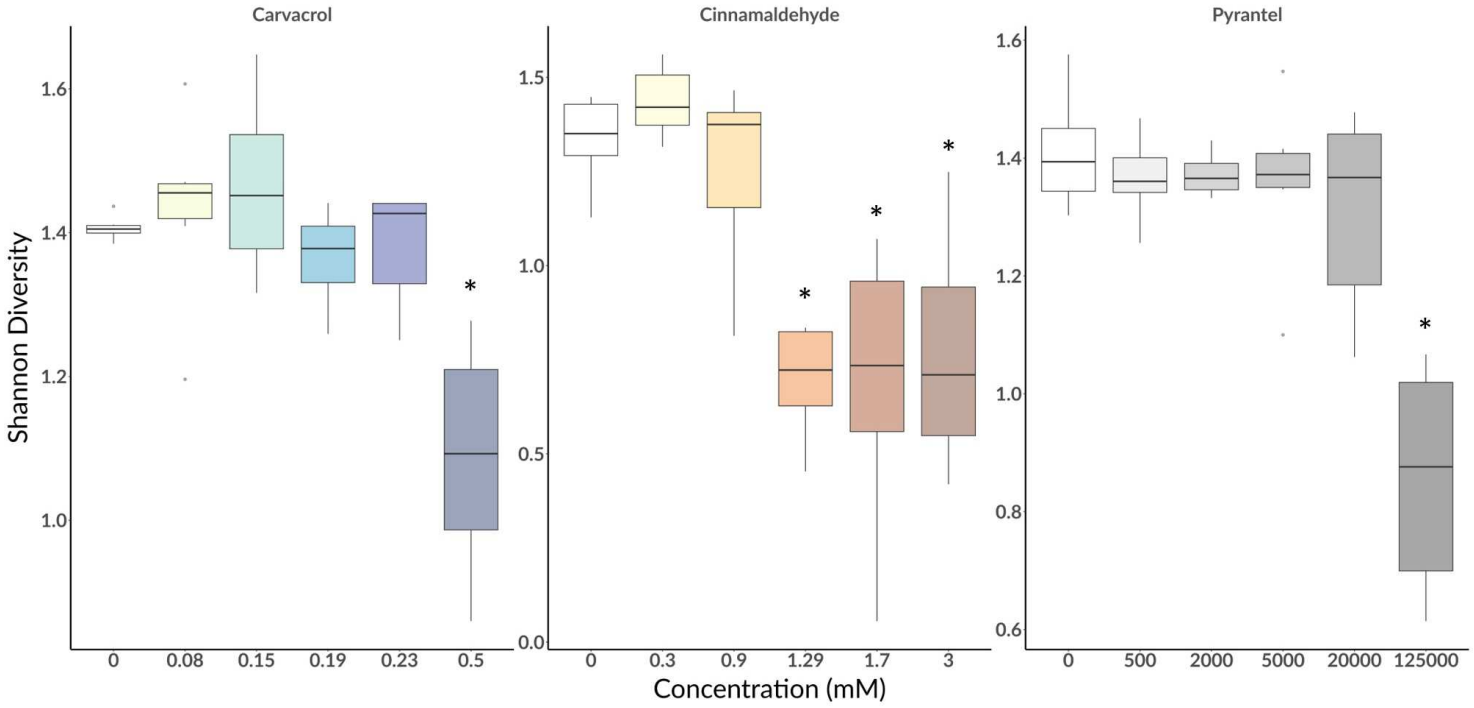


Fig 5. Shannon diversity during carvacrol and cinnamaldehyde trial

The asterisk indicates the significant difference ($P < 0.01$) of Shannon diversity at the specific concentration for each condition (carvacrol or cinnamaldehyde)

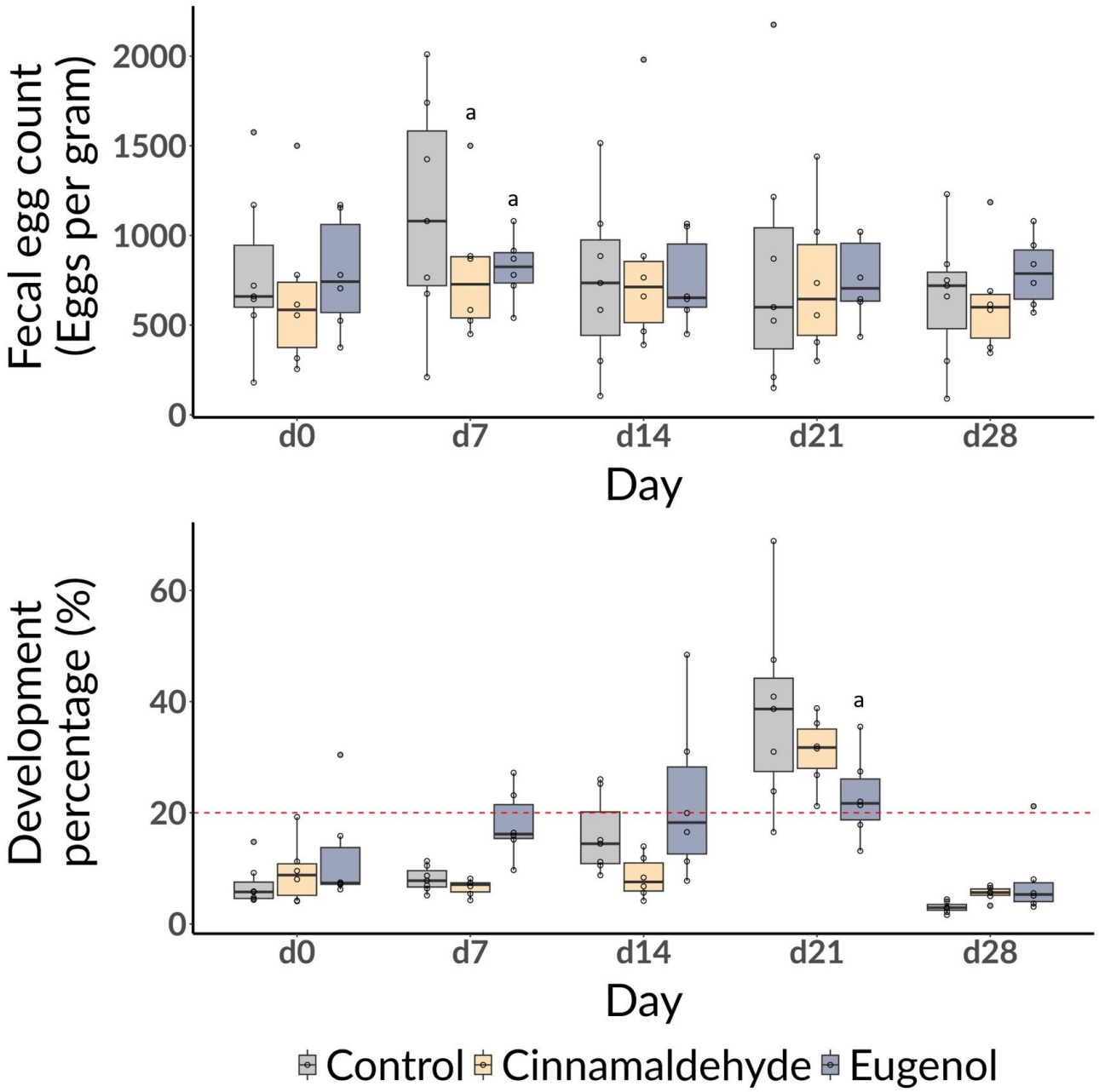


fig 6. FEC (top) and larval development rate (down) for ponies eating cinnamaldehyde (yellow) or eugenol (dark blue)-based additives compared control group (gray)

The lowercase letter in the up panel indicates the significant difference at the day of $P \leq 0.05$ compared to the control group. The red line in the down panel indicates the 20% development rate. The lowercase letter in the up panel indicates the significant difference at the day of $P < 0.01$ compared to the control group.

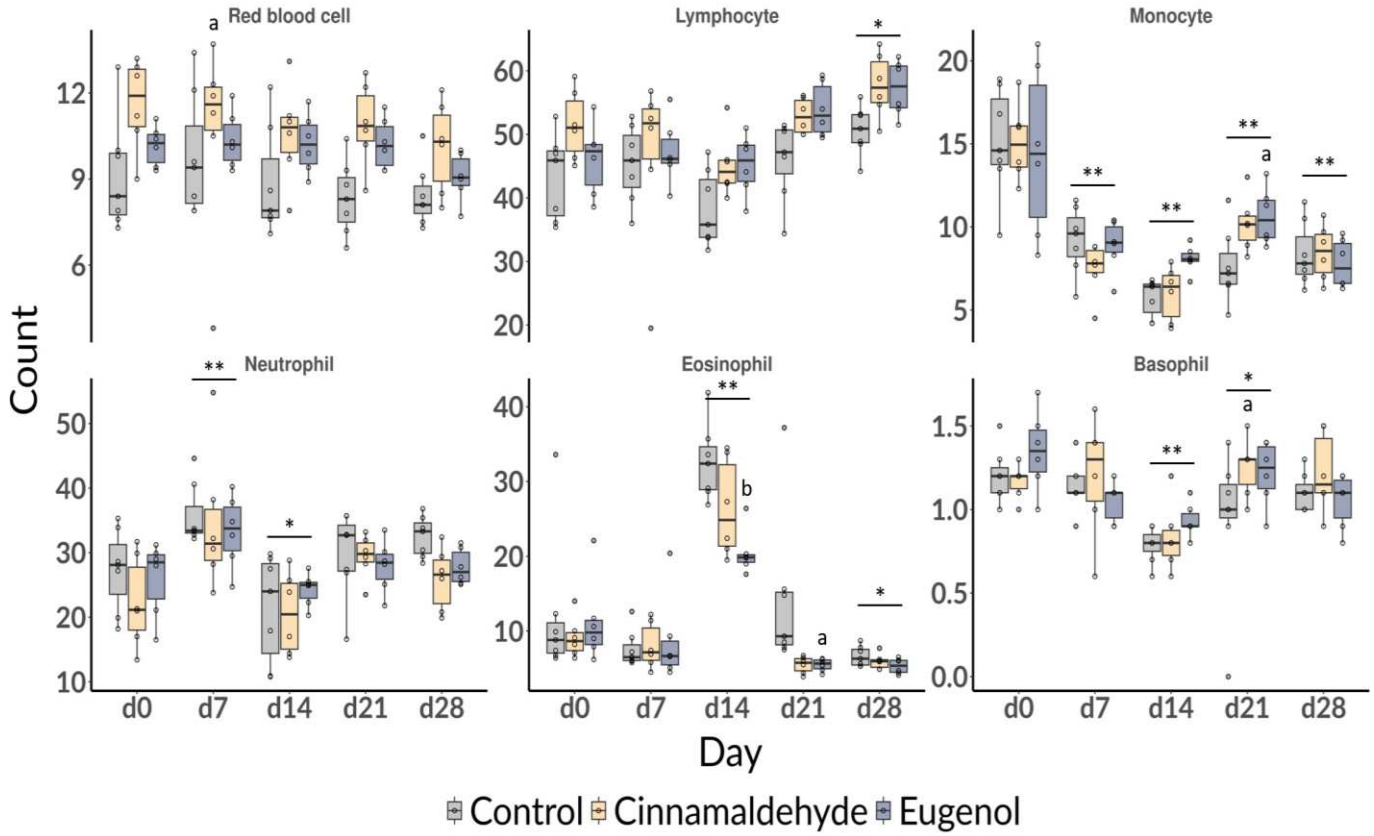


Fig 7. Trends in six hematological parameters selected during the study

The lowercase letter indicates the significant difference at the day of a. $P \leq 0.05$ and b. $P < 0.01$ compared to the control counts. The horizontal bars with the stars indicate a significant difference of * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$ in the days compared to the other, specific to the cell population.

Supplementary information

Supplementary Table S1. Batches characteristics

	Control	Cinnamaldehyde	Eugenol
Age (mean ± s.d)[1]	3.7 ± 1.60	3.0 ± 1.09	3.3 ± 0.82
Weight (mean ± s.d)	285 ± 46	286 ± 55	327 ± 52
FEC (mean ± s.d)	626 ± 268	615 ± 387	687 ± 340

[1] Mean and standard deviation of age, weight and FEC per group

Supplementary Table S2. Summary of the *in vitro* screening data

Extract	TNFα level to the control (%)	LDA IC50 (mM) [Lower ; Upper]	LMA IC50 (mM) [Lower ; Upper]	Score[1]
Anethol	96.3	0.66 [0.61 ; 0.72]	1.59 [0.87 ; 2.31]	98.55
Carvacrol	52.99	0.19 [0.17 ; 0.21]	5.17 [n.d[2] ; n.d]	58.35
Cinnamaldehyde	0	1.3 [1.27 ; 1.32]	2.44 [0.98 ; 3.91]	3.74
Eugenol	62.3	0.41 [0.38 ; 0.45]	0.29 [0.04 ; 0.54]	63
L Menthol	100.37	0.63 [0.60 ; 0.66]	3.27 [0.96 ; 5.59]	104.27
Thymol	104.61	0.51 [0.49 ; 0.52]	1.61 [n.d ; n.d]	106.73

[1]The score is the sum of each column (TNFα level to the control + LDA IC_{50} + LMA IC_{50})

[2]Not determined

Supplementary Table S3. Additive efficacy during the trial

Day	Cinnamaldehyde	Eugenol
d7	-20.9[1] [-40.2 ; -2.3][2]	-5.3 [-5.2 ; 10.7]
d14	-29.4 [-50.4 ; -8.6]	4.7 [-12.1 ; 19.9]
d21	-12.1 [-31.5 ; 5.2]	3.7 [-10.6 ; 18.9]
d28	4.9 [-12.4 ; 22.3]	-2.6 [-18.4 ; 13.4]

[1]Efficacy, [2]95% confidence interval

Supplementary Table S4. Correlation data

Correlation matrix

		FEC	Red blood cell	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil	Eosinophil	Basophil
	FEC		-0.06	-0.03	0.03	0	0	-0.01
	R.B.C.	0.5331		0.21	0.1	-0.09	-0.11	0.32
	Lympho	0.8098	0.0439		0.11	-0.32	-0.58	0.32
P values	Mono.	0.7849	0.3448	0.289		-0.07	-0.41	0.49
	Neutro.	0.9962	0.3794	0.0015	0.5097		-0.5	0.19
	Eosino	0.965	0.2993	0	0	0		-0.59
	Baso	0.9251	0.0014	0.0013	0	0.0587	0	

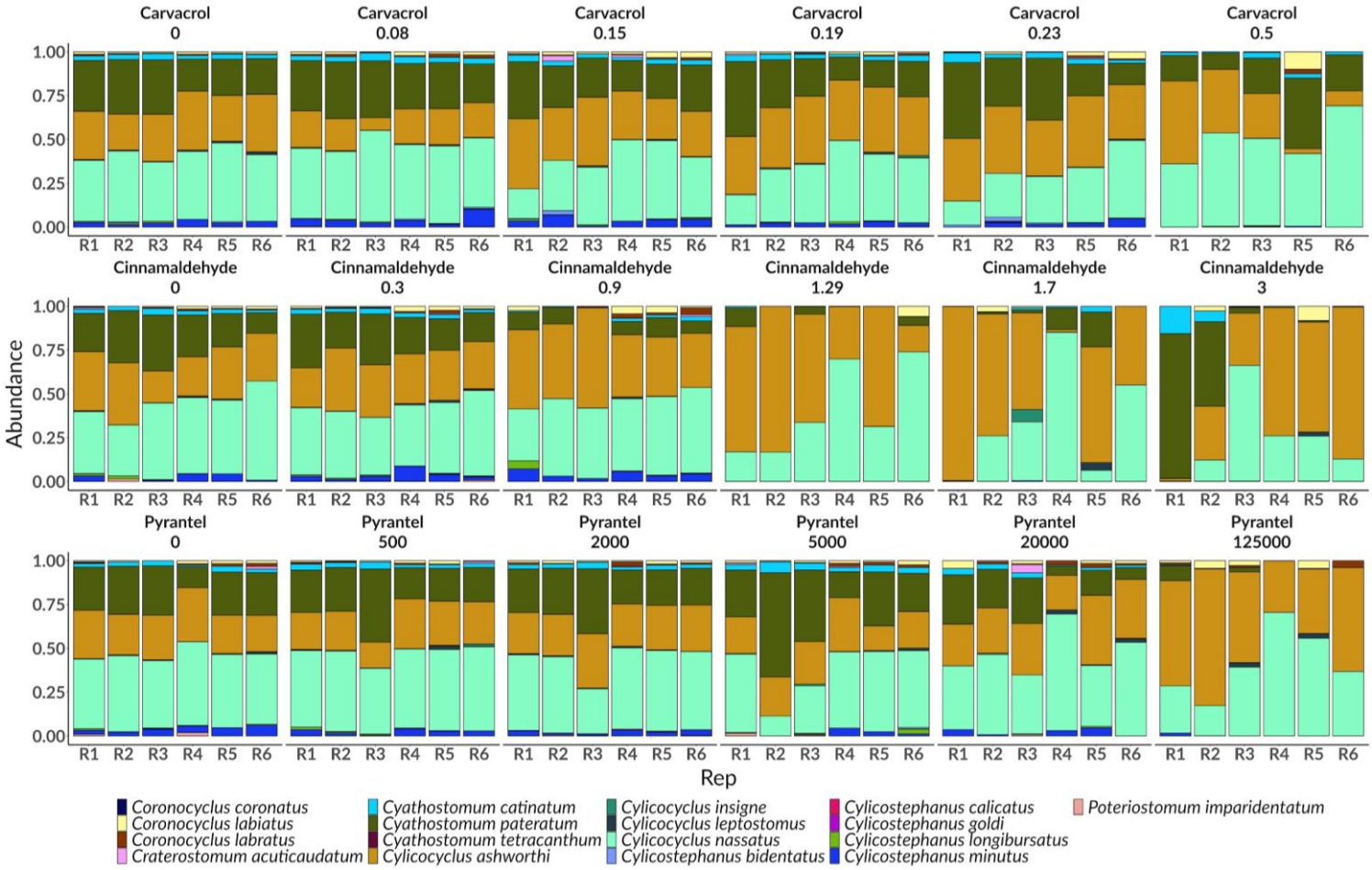


Figure S1. Cyathostomin larval community abundance estimated using the metabarcoding approach across carvacrol, cinnamaldehyde or pyrantel concentration

C1 is the highest concentration and C5 the lowest.

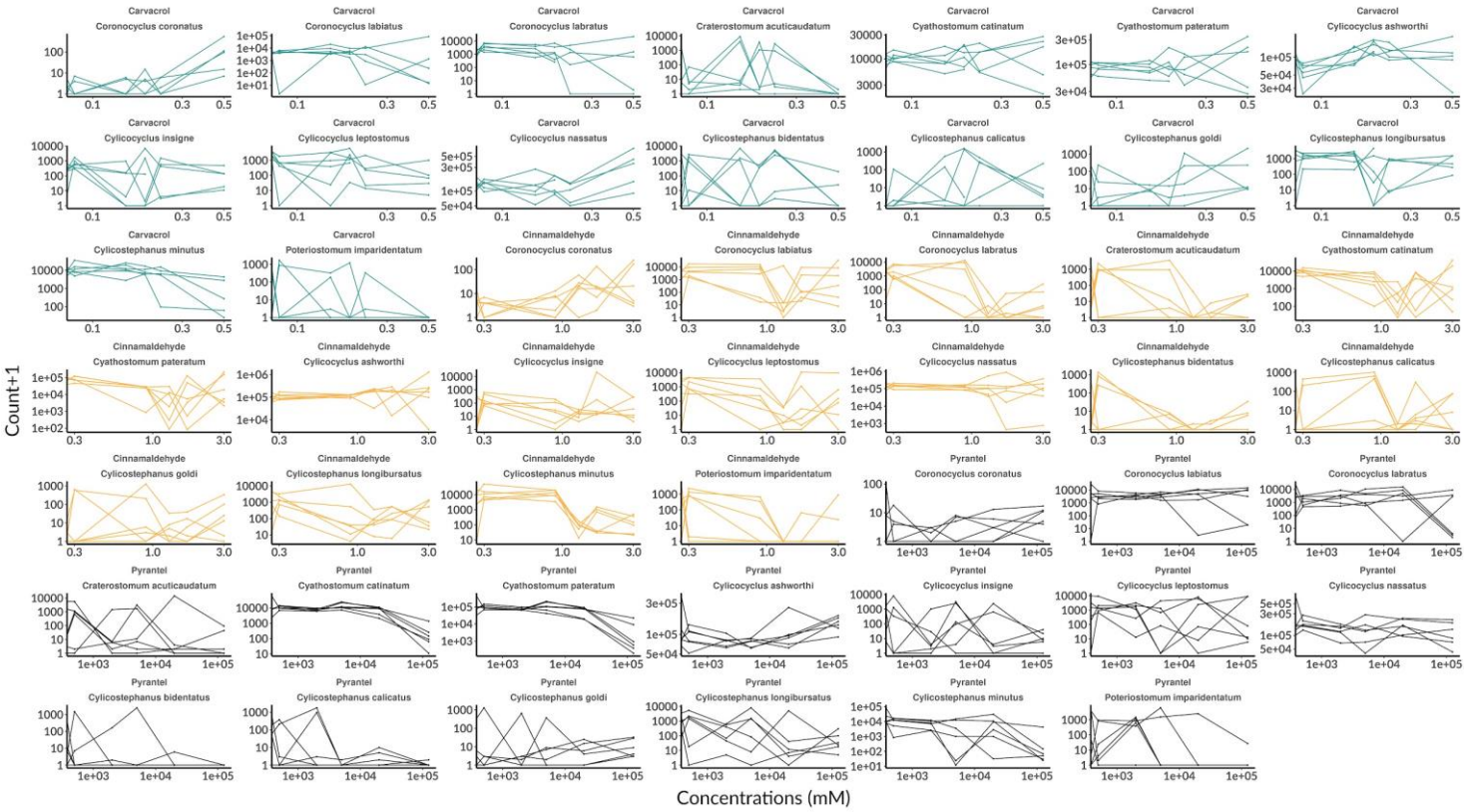


Figure S2. Count of each cyathostomins species according to increasing concentrations of carvacrol (green), cinnamaldehyde (yellow) or pyrantel (black).

Etude complémentaire : combinaison du chamazulène avec du pyrantel ou de l'ivermectine

I. Introduction

Face à l'apparition de résistance, des stratégies employées pouvaient s'appuyer sur la réalisation de combinaisons de plusieurs anthelminthiques (*i.e.* les pipérazines en combinaison avec le disulfure de carbone et les phénothiazines) (Lyons *et al.*, 1999). Une étude réalisée sur des moutons naturellement infestés au sein de quatre différentes fermes, a observé un FECR supérieur à 98% pour une combinaison de derquantel et d'abamectine, par rapport à un traitement fenbendazole, lévamisole ou IVM (< 95%) (Geurden *et al.*, 2012). La résistance à l'abamectine étant fréquente, son association au derquantel, pour lequel aucune résistance n'a été rapportée (Sales and Love, 2016), justifie la stratégie de combinaisons. Le but est d'utiliser deux molécules qui agissent en synergie (McKellar and Jackson, 2004; Shalaby, 2013). En effet, le derquantel et l'abamectine agissent tous deux sur les nAChR (Puttachary *et al.*, 2013).

Dans l'objectif d'optimiser l'activité anthelminthique du PYR contre des isolats résistants et de préserver l'efficacité de l'IVM dont la diminution a été rapportée (Nielsen, 2022), nous avons évalué les concentrations inhibitrices médianes[9] (CI_{50}) de ces deux molécules en combinaison avec du carvacrol, du chamazulène ou de l'eugénol au cours d'une étude *in vitro* sur un isolat de cyathostomes présentant une sensibilité réduite au PYR (Article 3).

II. Matériels et méthodes

Les. cyathostomes utilisaient provient de poneys Welsh naturellement infestés de l'unité expérimentale de physiologie animale de l'Orfrasière (EUPAO) à Nouzilly, France (10.15454/1.5573896321728955E12).

Les œufs utilisés pour les tests de développement larvaire (TDL) ont été purifiés selon le protocole expliqué en partie 2.8 « *In vitro experiment (Larval development assay)* » (Article 3) à partir de matières fécales collectées au sol. Les prélèvements ont été réalisés directement après excrétion et de façon à collecter uniquement les parties n'ayant pas touchées le sol. Après purification des œufs, 2,75 œufs/µL (110 œufs) ont été placés dans

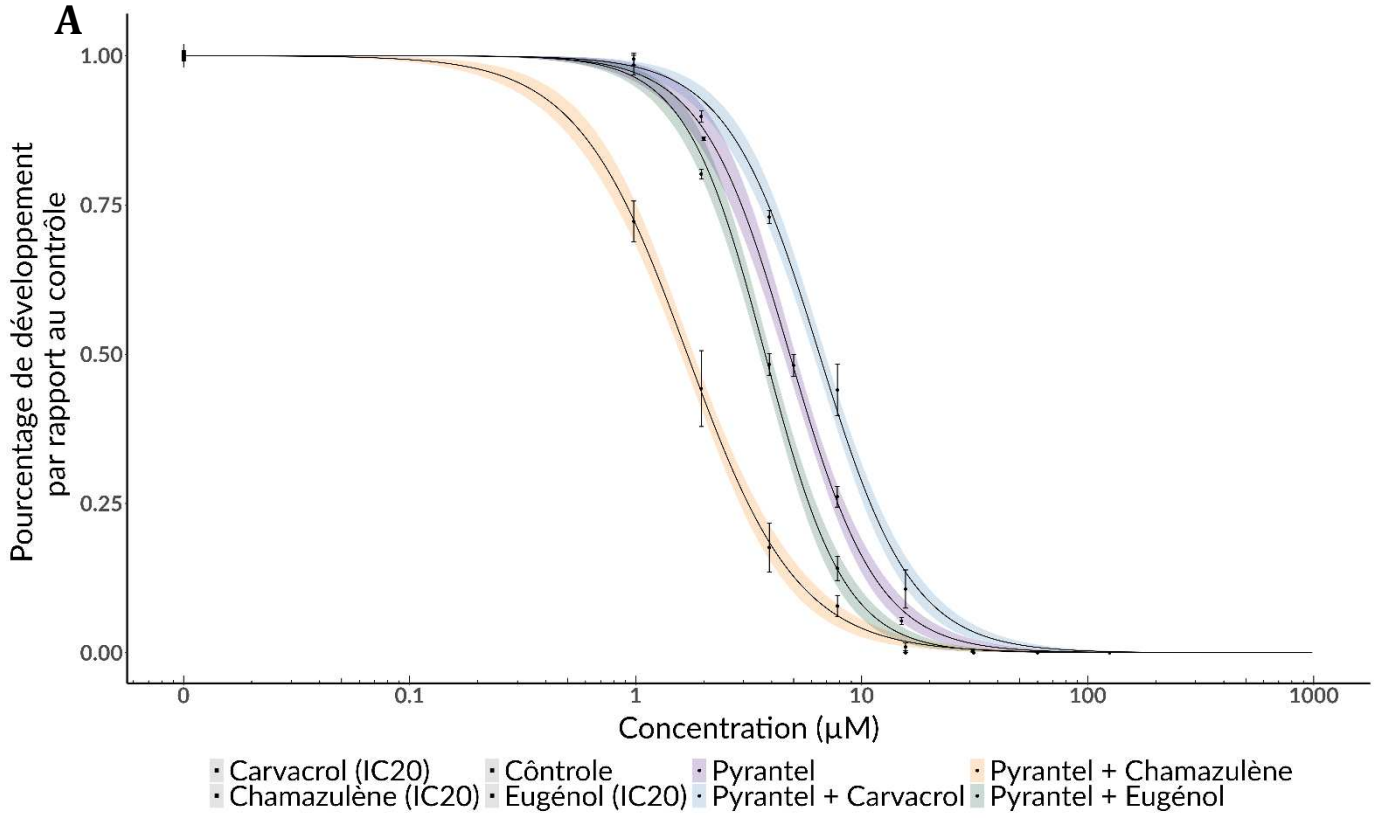
[9] Concentration nécessaire pour obtenir 50% d'un effet maximal

une plaque 96 puits avec une solution de matière fécale (crottins de cheval mélangés à de l'eau, v/v ; DO_{650nm} de 0,8), des bactéries (souche *Escherichia coli* OP50) à une DO_{650nm} de 1,3 et avec 500 µg/mL d'amphotéricine b (Sigma A4888). La plaque a été incubée à +25 °C pendant 24 h, laissant les œufs se développer en L1/L2. Par la suite, des concentrations en PYR ou en IVM ont été ajoutées aux larves seules, ou en combinaison avec la CI_{20} du carvacrol (132 µM), du chamazulène (76 µM) ou de l'eugénol (214 µM). Après six jours d'incubation supplémentaires (+25 °C), les larves non développées (L1/L2) ou développées (L3) ont été comptées au microscope (grossissement ×4). Le pourcentage de développement larvaire a été calculé comme suit :

$$\frac{nombre\ de\ L3}{nombre\ de\ L1/L2\ +\ nombre\ de\ L3} \times 100$$

L'ensemble des données TDL ont été analysées en utilisant le logiciel Rstudio (R Core Team, 2023).comme décrit en partie 2.9 « *Statistical analysis* » (Article 3).

III. Résultats et discussion



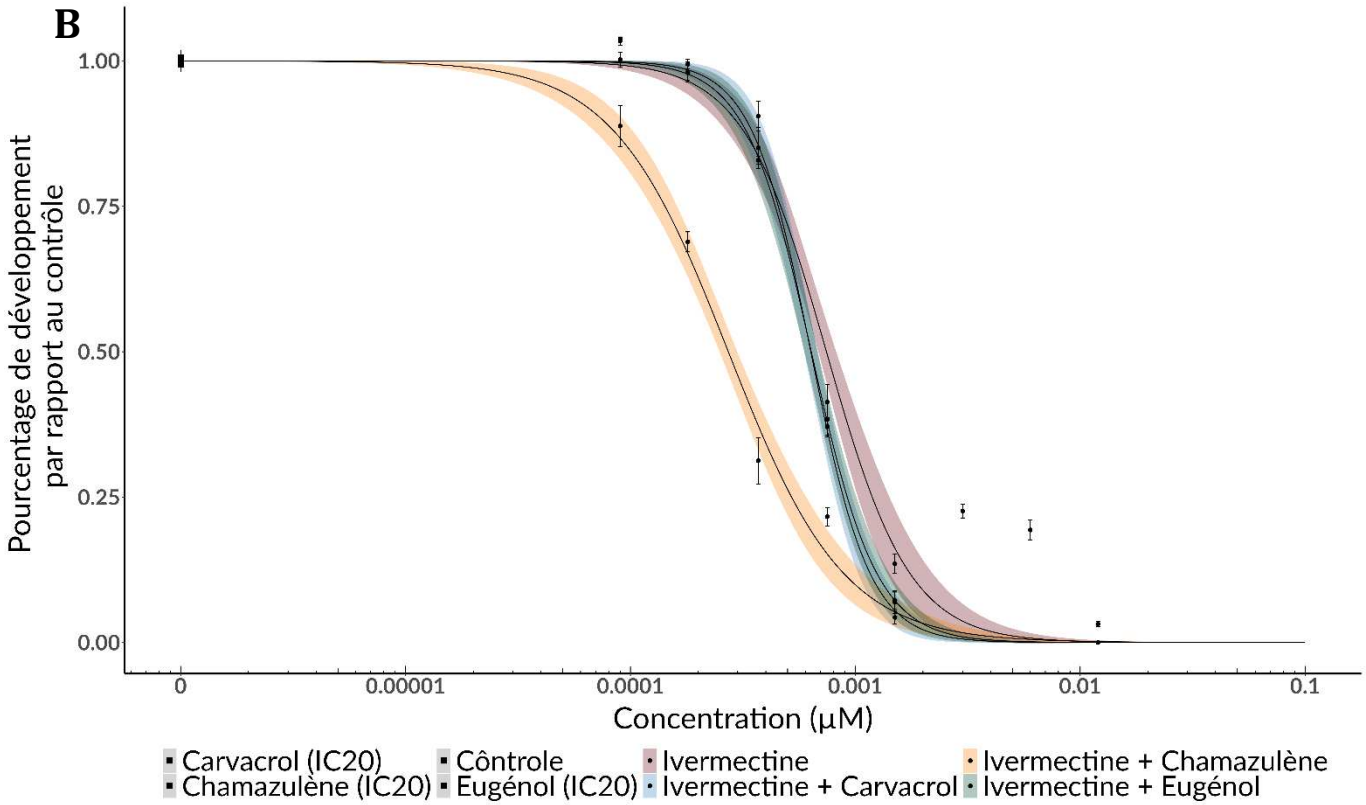


Figure 8 : Courbes dose-réponse d'un test de développement larvaire sur cyathostomes en présence de (A) pyrantel ou (B) ivermectine, en combinaison ou non avec du carvacrol (bleu), du chamazulène (jaune) ou de l'eugénol (vert).

Entre les deux molécules évaluées, l'IVM était significativement plus active que le PYR (CI_{50} = 4,8 µM [95% IC. = 4,5 ; 5,1] vs. 7,4e-4 µM [95% IC. = 6,8e-4 ; 8,1e-4], $P < 0,01$). Ces résultats correspondent à ceux rapportés dans la littérature concernant une efficacitée plus élevé de l'IVM que du PYR sur les cyathostomes (Nielsen *et al.*, 2018b; Apolinário *et al.*, 2022).

Utilisé en combinaison, l'ajout de chamazulène a significativement réduit la CI_{50} de 64% pour l'IVM et le PYR, augmentant ainsi leur activité anthelminthique. Cependant, nous ne pouvons conclure à un effet de synergie du fait de concentrations similaires de PYR ou IVM utilisées seul ou en combinaison avec les extraits. Réaliser des tests avec des concentrations décroissantes plus faibles en anthelminthique permettrait de réellement conclure de l'effet observé. De plus, ces tests ont été réalisés avec des isolats sensibles. Des résultats similaires obtenus sur des isolats résistants renforceraient l'intérêt pour le chamazulène. Enfin, connaître la cible d'action permettrait d'utiliser la molécule dans des stratégies de réduction du fitness. En effet, des combinaisons de différents mécanismes d'action réduiraient la capacité du parasite à avoir des descendances rapidement,

réduisant par la même occasion la diminution d'isolats résistants (McKellar and Jackson, 2004; Shalaby, 2013).

Parallèlement aux effets du chamazulène, l'ajout de carvacrol a entraîné une diminution significative de la CI_{50} du PYR ($P < 0.001$). Ce terpène a été observé avec une activité antagoniste des nAChRs (Marjanović *et al.*, 2020, 2021; Trailovic *et al.*, 2021). L'activité du carvacrol étant à l'opposé de l'activité agoniste du PYR pour ce même récepteur (Robertson *et al.*, 1994), cela explique les résultats observés lors de la combinaison des deux molécules.

Ces résultats ont suscité un intérêt pour l'utilisation du chamazulène en combinaison avec des anthelminthiques chimiques. Des études complémentaires doivent encore être réalisées afin de confirmer à un effet de synergie et de valider l'activité du chamazulène sur des isolats résistants. De plus, ils ont permis de mettre en évidence l'importance de connaître les cibles et les mécanismes d'action des molécules utilisées en combinaison, afin d'éviter les diminutions d'efficacités comme observées avec le PYR et le carvacrol.

Discussion / perspectives

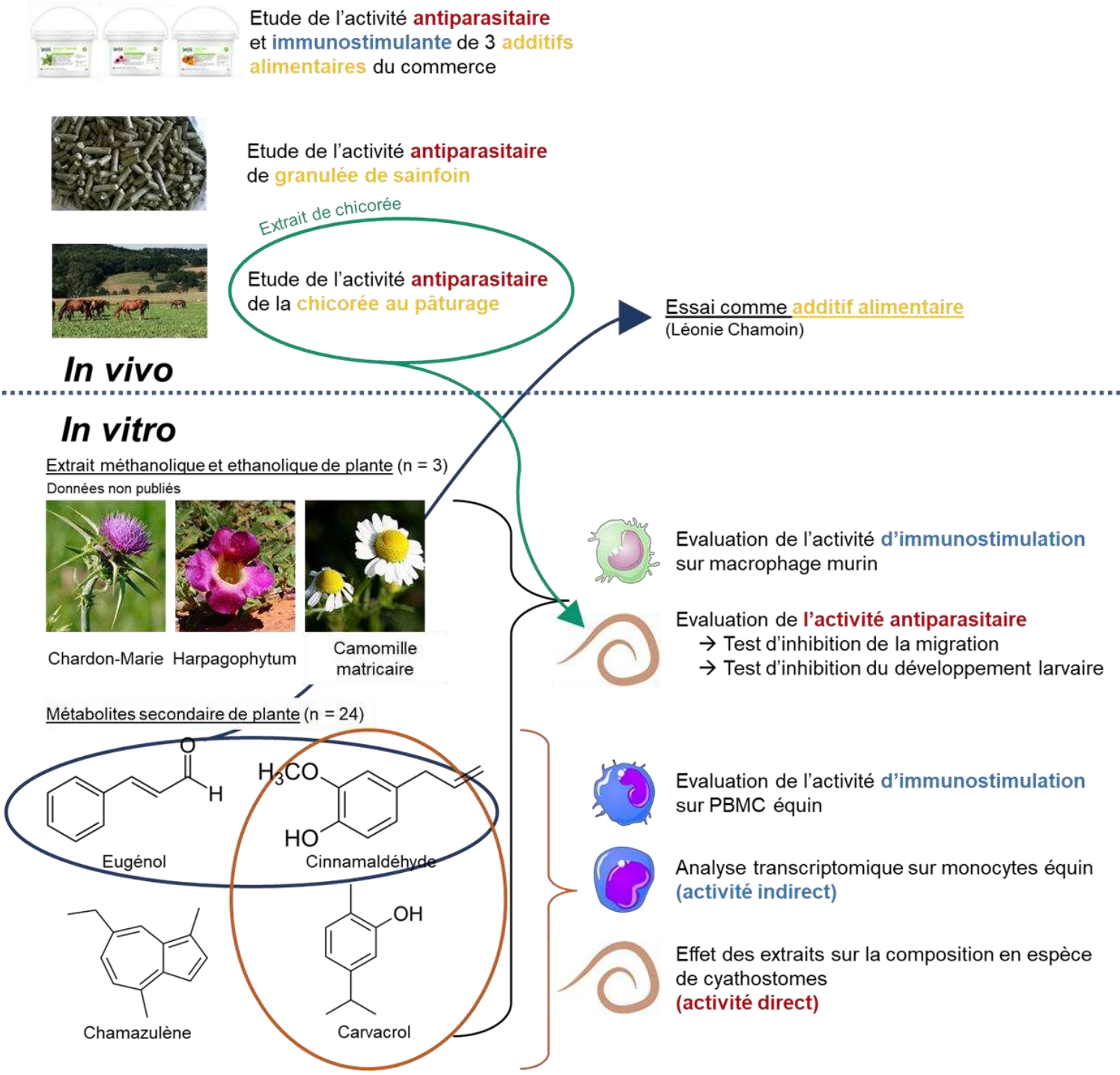


Figure 9 : Récapitulatif des différentes études réalisées au cours de la thèse

I. Les plantes entières ou transformées permettent-elles un contrôle des infestations par les strongles chez les équins ?

Pour faire face aux différents stress abiotiques et biotiques auxquels elles sont confrontées, les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires (MbS) (Bennett and Wallsgrove, 1994; Harborne, 1999; Zaynab *et al.*, 2018; Erb and Kliebenstein, 2020), dont certains ont des activités anthelminthiques directes ou immunomodulatrices pouvant être utilisées pour le contrôle des strongles gastro-intestinaux.

Dans un contexte où la gestion des strongyloses chez les équins est compromise par le développement d'isolats résistants à l'ensemble des molécules constitutives des anthelminthiques de synthèse, mon projet de thèse s'est focalisé sur l'identification de plantes bioactives comme stratégie alternative. Pour ce faire, différentes modalités d'utilisation des plantes entières *in vivo* ont été explorées (*i.e.* additif alimentaire ou alicament). De plus, des criblages *in vitro* de l'activité anthelminthique directe et indirecte de différents candidats ont été effectués dans le but d'identifier de nouveaux candidats actifs sur les cyathostomes. Enfin, dans le but d'amplifier l'efficacité des anthelminthiques de synthèse, des combinaisons ont été étudiées à la suite d'un régime composé de sainfoin ou avec certaines molécules étudiées.

A. Les additifs alimentaires commerciaux testés ne se sont pas révélés efficaces, mais restent-ils tout de même utiles ?

Dans la littérature, deux études réalisées sur des chevaux (Buono *et al.*, 2019) ou des ânes (Papini *et al.*, 2020) naturellement infestés par des strongles indiquent n'avoir observé aucun effet sur l'infestation à la suite de l'évaluation de produits commercialisés à base de plante (*i.e.* additif alimentaire composé d'ail chez les chevaux ou un vermifuge à base de mallotus, de Chardon-Marie, d'ortie brûlante, de gentiane jaune et d' eucalyptus chez les ânes). À l'inverse, une autre étude réalisée sur des ânes avec un traitement de composition botanique similaire au produit évalué dans l'étude de Papini *et al.*, (2020)

rapporte une excrétion d'œufs de strongles significativement plus faible (66% de moins) dans le groupe traité par rapport au groupe témoin le dernier jour d'expérimentation (Arfuso *et al.*, 2020). Dans l'étude de Papini *et al.*, (2020), les auteurs ont traité leurs animaux à deux reprises à 21 jours d'écart, d'abord avec une dose adaptée au poids des ânes (*i.e*. 28 g en moyenne) puis avec une dose de 50 g comme recommandé par le fournisseur (*i.e.* 50 g pour des animaux de 600 kg). Dans l'étude d'Arfuso *et al.*, (2020), les ânes ont été traités deux fois à 15 jours d'intervalle, avec une dose de 50 g lors de chaque traitement. Ainsi, les doses administrées dans l'étude d'Arfuso *et al.*, (2020), qui a révélé une efficacité du produit testé étaient plus importantes et données sur un intervalle plus court. Ces résultats de la littérature permettent d'émettre une première hypothèse sur l'importance de la dose et de la fréquence de traitement pour obtenir un effet anthelminthique associé à l'utilisation de produits composés de plantes.

Dans l'objectif d'identifier de nouveaux candidats, des additifs alimentaires composés d'une seule plante (*i.e*. armoise, échinacée, curcuma) et commercialisés en santé équine ont été évalués (Article 1). Leurs vertus avancées sur le renforcement des défenses de l'hôte sont restées insuffisantes pour mettre en évidence un effet antiparasitaire dans les conditions de notre étude (*i.e.* aucun effet sur les paramètres sanguins, les OPG et sur le développement des œufs en larves L3). Les trois études de la littérature citées ci-dessus ainsi que la nôtre ont été réalisées avec une approche conservative, dans l'objectif de révéler des effets forts des traitements justifiant leur utilisation en pratique. Les différents résultats obtenus et les efficacités faibles que nous avons mesurées (*i.e.* inférieures à 38,3%) sur des produits du commerce, soulignent l'écart entre les connaissances actuelles sur l'activité des plantes et leur utilisation en pratique pour limiter l'infestation des équidés par les strongles. Dans la littérature, des études réalisées avec les mêmes plantes que celles que nous avons testées ont mis en évidence des effets anthelminthiques chez d'autres espèces. Ainsi, un régime composé de 300 mg/ml d'*Artemisia vulgaris* dilué dans 2 mL d'eau et administré à des rats durant 20 jours a permis de réduire la charge parasitaire de *Trichinella spiralis* dans différents organes (*i.e.* langue, diaphragme et quadriceps) (Caner *et al.*, 2008). D'autre part, une efficacité de 66% de réduction d'excrétion d'œufs a été mesurée chez des chèvres naturellement infestées de NGIs, 10 jours après l'administration d'extrait éthanolique de *Curcuma longa* à une concentration de 500 mg/kg PV (Nath *et al.*, 2019). Dans l'étude de Nath *et al.*,

(2019), la dose de curcuma utilisée était 25 fois plus élevée que celle utilisée dans notre étude (*i.e.* 10 g pour 500 kg soit 20 mg/kg). Notre traitement a toutefois duré 30 jours, tandis qu'une seule dose a été administrée chez les chèvres (Nath *et al.*, 2019). Augmenter les doses des plantes que nous avons testées et les administrer sur une durée équivalente ou plus importante que celle que nous avons mise en œuvre pourrait peut-être permettre de révéler leur activité antiparasitaire sur les cyathostomes. Par ailleurs, une évaluation préalable *in vitro* de l'activité antiparasitaire de ces extraits permettrait de confirmer la sensibilité des cyathostomes. Enfin, alors que l'échinacée est majoritairement décrite pour ses vertus immunostimulantes, antioxydantes et antibactériennes (Sharifi-Rad *et al.*, 2018; Burlou-Nagy *et al.*, 2022), elle ne semble pas agir sur les cellules équines aux concentrations utilisées dans notre étude. L'absence d'efficacité de ces produits du commerce suggérée par nos résultats soulève la question des motivations qui conduisent certains propriétaires de chevaux à les utiliser. De plus, si ces personnes ne mettent pas en œuvre de modes de gestion du parasitisme complémentaires et qu'ils ne rapportent pas de problèmes liés à l'infestation par les strongles, on peut se dire que l'utilisation de tels produits est peut-être préférable à la mise en œuvre d'une vermifugation systématique à partir d'anthelminthiques de synthèse. Toujours est-il que nos résultats encouragent à réfléchir à d'autres stratégies afin d'optimiser l'activité des plantes, telle qu'une utilisation comme alicament. Cette stratégie vise à associer les effets anthelminthiques de la plante dans un régime alimentaire respectant les besoins nutritionnels de l'hôte.

B. L'utilisation d'alicament semble pertinente, mais nécessite une exploration holistique de leurs effets biologiques

Des études ont observé des résultats anthelminthiques positifs associés à l'utilisation de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) ou de chicorée (*Cichorium intybus*) comme fourrage chez les petits ruminants (Marley *et al.*, 2003; Paolini *et al.*, 2003, 2005; Heckendorn *et al.*, 2006; Manolaraki *et al.*, 2010; Gaudin *et al.*, 2016; Peña-Espinoza *et al.*, 2016). Nous avons testé l'efficacité de ces deux plantes bioactives modèles sur les cyathostomes, dans le cadre d'une alimentation à base de granulés déshydratés de sainfoin (Article 2), d'une part et du pâturage de la chicorée fourragère (Article 3), d'autre part.

a. Le sainfoin n'a qu'un effet mineur sur l'infestation parasitaire par les cyathostomes et interagit négativement avec l'ivermectine

Au cours de l'étude, les chevaux étaient nourris avec un régime composé à hauteur de 70% de sa matière sèche (MS) par des granulés déshydratés de sainfoin (Multifolia). Utilisée comme alicament, la quantité de cette légumineuse ingérée par les chevaux a pu être supérieure à une quantité donnée comme additif. Cependant, pour éviter des problèmes de santé liés à un excès d'apports protéiques prolongé, le régime a été donné sous forme de cure pendant 21 jours. Cette durée était toutefois cohérente avec celle utilisée dans des études rapportant des effets anthelminthiques du sainfoin chez des petits ruminants (*i.e.* 11 jours dans Gaudin *et al.*, (2016) ou 16 jours dans Heckendorn *et al.*, (2006)). En dépit des effets *in vitro* d'inhibition du développement larvaire que notre équipe avait précédemment rapportés (Collas *et al.*, 2018), l'ingestion de sainfoin a présenté une efficacité *in vivo* faible sur les cyathostomes. Ainsi, seul le pourcentage de développement des œufs en L3 a été légèrement affecté en fin d'étude. Dans la littérature relative aux petits ruminants, des recommandations faisant suite à plusieurs essais préconisent une teneur minimum de 3-5% MS de tanins condensés dans le régime pour obtenir une activité anthelminthique (Hoste *et al.*, 2012). En raison de contraintes de fabrication des granulés de sainfoin, la teneur en tanins condensés du régime ingéré par les chevaux de notre étude était de 2,3%. Cette teneur atteignait 5,2% lors de l'étude *in vitro* validant un effet antiparasitaire des granulés de sainfoin sur les cyathostomes (Collas *et al.*, 2018). De plus, dans cette dernière étude, les granulés étaient broyés, solubilisés, puis mélangés aux matières fécales, directement en contact des œufs et des larves. D'après les résultats *in vitro* de la littérature (Molan *et al.*, 2000; Paolini *et al.*, 2004; Barrau *et al.*, 2005; Alonso-Díaz *et al.*, 2008a; b), et les observations de Collas *et al.*, (2018), il est raisonnable de supposer que ces tannins condensés soient responsables des effets anthelminthiques *in vitro* du sainfoin sur les cyathostomes. Suite à l'ingestion des granulés de sainfoin, les concentrations en MbS n'ont certainement pas atteint des niveaux suffisants dans la lumière gastro-intestinale des chevaux pour affecter la population de cyathostomes.

En parallèle de l'évaluation de l'activité anthelminthique, nous nous sommes également intéressés aux effets du régime sur un traitement IVM, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité des traitements chimiques. Les chevaux nourris au sainfoin présentaient une

concentration plasmatique d'IVM significativement plus faible, entrainant une réapparition significative d'œufs plus rapide. Des études *in vitro* ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs des transporteurs ABC (*i.e.* P-gps) augmentait l'efficacité des anthelminthiques chimiques (Bartley *et al.*, 2009; Raza *et al.*, 2015). Ces effets de synergie entre un régime composé de polyphénols (*i.e.* quercétine) ou d'une plante contenant des tanins condensés (*i.e. Redberry juniper*) avec un traitement aux LMs ont également été confirmés *in vivo* (Dupuy *et al.*, 2003; Whitney *et al.*, 2013). En effet, il a été observé que les flavonoïdes ont une activité de modulation de l'expression des transporteurs ABC (Morris and Zhang, 2006). Le sainfoin étant riche en prodelphinidines (Quijada *et al.*, 2015), nous pouvons supposer à la suite de nos résultats et de ceux de Gaudin *et al.*, (2016) que ce tanin condensé augmenterait l'activité des P-gps, contrairement aux autres polyphénols évalués *in vivo*. En plus de soulever l'importance des doses, cette étude sur le sainfoin a également soulevé l'importance des MbS qui composent les plantes, et le risque d'interaction médicamenteuse négative qui est à prendre en considération dans l'objectif d'une utilisation généralisée des plantes.

b. Le pâturage de la chicorée, une alternative efficace aux anthelminthiques chimiques

Ce second régime (Article 3) a été évalué sur une plus longue durée (*i.e.* 45 jours). Correctement implantée (*i.e.* 88% de la parcelle) et pâturée proportionnellement à sa disponibilité (*i.e.* 89,2% des bouchés totaux), la chicorée a induit une réduction significative de l'excrétion d'œufs dans les crottins et de leur développement en larves L3. En considérant la trajectoire du groupe témoin, une efficacité de 85,5% a été mesurée en fin d'étude. Cet effet est le plus important noté parmi les tests d'efficacité *in vivo* réalisés sur le modèle équin (Jatzlau *et al.*, 2014; Arfuso *et al.*, 2020; Imani-Baran *et al.*, 2020; Grimm *et al.*, 2022). La chicorée Puna II est un cultivar riche en lactones sesquiterpéniques (LSs) (*i.e.* 324,6 µg/mg de chicorée en MS (Peña-Espinoza *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2016)). La teneur en terpènes ingérée par les chevaux n'a pas pu être évaluée durant l'étude, néanmoins celle-ci a permis d'obtenir une efficacité anthelminthique importante. Peña-Espinoza *et al.*, (2018) recommandent un minimum de 70% MS de chicorée dans le régime pour obtenir des effets antiparasitaires. Nos résultats appuient encore une fois l'hypothèse de l'importance de la teneur en MbS dans le régime

pour obtenir des effets antiparasitaires. Par ailleurs, le poids des chevaux nourris à la chicorée n'a pas montré de variation significative entre le début et la fin de l'étude. Néanmoins, il est essentiel de déterminer les valeurs nutritionnelles de la chicorée afin de valoriser une utilisation prolongée au pâturage.

Pour comprendre les résultats *in vivo*, un extrait de chicorée enrichi en LSs a été préparé et testé sur deux isolats distincts de cyathostomes, chacun montrant une sensibilité différente au PYR. Par l'utilisation d'une chromatographie en phase liquide à haute performance comprenant un détecteur à barrette diodes (UHPLC-DAD), nous avons pu identifier la présence de lactucopicrine (LACP) dans notre extrait. Les CI_{50} mesurées avec notre extrait étaient plus élevées (*i.e.* 1,0 et 3,4 mg/mL) que celles retrouvées dans la littérature sur *A. suum* (*i.e.* 146 µg/mL) (Williams *et al.*, 2016). La différence d'ampleur entre les effets observés *in vitro* et *in vivo s*uggère une activité de la chicorée spécifique sur les adultes, comme rapportée dans différentes études (Athanasiadou *et al.*, 2005; Tzamaloukas *et al.*, 2005; Heckendorn *et al.*, 2007; Peña-Espinoza *et al.*, 2016, 2017). Nous pouvons également émettre l'hypothèse d'effets du régime sur l'environnement de vie du parasite. En effet, les parasites gastro-intestinaux et les bactéries du tractus digestif de l'hôte (le microbiote intestinal) forment un système biologique complexe (Rynkiewicz *et al.*, 2015) impliquant des interactions directes (Hayes *et al.*, 2010; Reynolds *et al.*, 2014). Une étude a rapporté qu'un traitement antiparasitaire visant à diminuer la charge de vers adultes a induit une diminution dans la diversité en espèces bactériennes (Walshe *et al.*, 2019). De par ces résultats, nous pouvons supposer qu'une modification de la structure du microbiote intestinal induit par le régime aurait affecté la population parasitaire. Par ailleurs, la CI_{50} la plus élevée observée était associée à l'isolat moins sensible au PYR. Pour rappel, les résistances au PYR sont dues à la présence de mutations sur les nAChRs (Sleigh, 2010). De plus, des observations indépendantes réalisées *in vitro* montrent que le carvacrol (un monoterpène) présente une activité antagoniste de ces récepteurs chez *A. suum* (Marjanović *et al.*, 2020, 2021) ou *Parascaris sp* (Trailovic *et al.*, 2021). Ces résultats suggèrent que les changements physiologiques intervenus chez des isolats parasitaires résistants au PYR, confèrent une sensibilité réduite aux terpènes pouvant être associés aux nAChRs. Il serait par ailleurs intéressant d'étudier l'efficacité de la chicorée utilisée comme fourrage au pâturage sur des chevaux infestés par des isolats résistants au PYR. Comme pour les anthelminthiques chimiques, l'apparition de résistance contre les MbS des plantes pourrait apparaître rapidement. Cependant, ces affirmations reposent sur les

résultats obtenus *in vitro* avec un extrait enrichi en LSs. Il faut considérer que les plantes contiennent de nombreux MbS avec des mécanismes d'actions distincts. Des études de simulations suggèrent que les thérapies en combinaison considérées comme la meilleure option permettant de retarder le développement de résistances (Dobson *et al.*, 2012). Cependant, il est essentiel de rester vigilant quant au risque d'apparition de résistance lors du développement des stratégies visant à maximiser l'efficacité des plantes.

C. Limites à l'utilisation des plantes bioactives pour le contrôle des strongles gastro-intestinaux

La synthèse des MbS au sein de la plante est liée aux conditions environnementales (Schuh *et al.*, 1997; Loreto and Delfine, 2000; Kusano *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016b; Zhang *et al.*, 2019a). Ainsi, une plante identique poussant dans deux conditions pédoclimatiques différentes ne présente pas les mêmes teneurs en MbS (Foster *et al.*, 2006). De plus, le réchauffement climatique augmenterait l'intensité des stress abiotiques, modifiant ainsi les compositions en MbS des plantes (Zandalinas *et al.*, 2022) et par conséquent leur activité anthelminthique. Des études ont observé une variation dans la teneur en MbS entre cultivars de chicorée (Foster *et al.*, 2011; Peña-Espinoza *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2016). L'évaluation de l'activité de différents cultivars dans diverses conditions pédoclimatiques permettrait de sélectionner des plantes mieux adaptées et moins susceptibles de varier en termes de teneur en MbS, mais également de valeurs nutritionnelles pour l'hôte. Servant principalement d'alimentation, les plantes doivent permettre de couvrir les besoins énergétiques et azotés des chevaux. L'évaluation de l'activité anthelminthique du sainfoin a été réalisée sous forme de cure afin de limiter la durée au cours de laquelle les poulains recevaient un régime suralimenté en azote. Ainsi, un des enjeux dans l'emploi des plantes comme alicament est de parvenir à gérer d'éventuels compromis entre bénéfices nutritionnels et antiparasitaires attendus de la plante. De plus, ne possédant pas de rumen, les chevaux sont moins aptes que les ruminants à détoxifier les MbS ingérés (Martin-Rosset, 2012). Il est important de rappeler que la synthèse de certaines de ces molécules est induite en réponse aux attaques des herbivores servant de mécanisme de défense (Mithöfer and Boland, 2012; Zaynab *et al.*, 2018) et donc toxique pour l'hôte comme la majorité des alcaloïdes (Bhambhani *et al.*, 2021). Nous avons précédemment souligné l'importance de la diversité des MbS présents

dans une plante, qui permet de limiter le développement de la résistance. Cependant, cela peut également augmenter le risque de toxicité pour l'hôte. Pour ces raisons, il est essentiel de connaître la composition en MbS afin de promouvoir l'utilisation des plantes bioactives. Des stratégies *in silico*, basées sur la structure chimique de la molécule et sur des bases de données obtenues à la suite d'études *in vivo* ou *in vitro* permettent d'identifier le potentiel toxique d'une molécule (Claude *et al.*, 2009; Alqahtani, 2017). Ces approches *in silico* permettent également d'identifier les composés actifs putatifs d'un extrait (Valente *et al.*, 2021), à partir des données de spectrométrie de masse à fragmentation comparées à une base de données en ligne (GNPS ; (Wang *et al.*, 2016a; Nothias *et al.*, 2020)). L'ensemble de ces outils permettent d'acquérir de l'information sur les MbS d'une plante. Par la suite, nous pourrions envisager de purifier les molécules et de ne conserver que les plus actives et moins toxiques pour l'hôte, afin de les utiliser en mélange, dans le but d'améliorer leur efficacité et de réduire le développement de la résistance.

Par conséquent, l'utilisation de MbS purifiés pourrait offrir une solution aux problèmes de variation mentionnés précédemment, notamment en réponse aux changements environnementaux de plus en plus fréquents prévus pour les années à venir.

II. Les tests *in vitro* permettent un criblage haut débit, mais illustrent-ils correctement les conditions *in vivo* ?

Dans un souci de délivrer de nouvelles solutions de contrôle à la filière, un travail de criblage de molécules issues de plantes pouvant être utilisées comme additifs alimentaires a été entrepris. Ce criblage sur 29 extraits de plantes et MbS a couvert les effets directs et indirects.

A. Criblage de l'activité immunomodulatrice

Parmi tous les extraits évalués sur des macrophages murins (RAW 264.7), l'acide bétulinique, le Chardon-Marie (MeOH), l'Harpagophytum (extrait MeOH et EtOH) et la Camomille matricaire (extrait MeOH et EtOH) ont été observés avec une activité pro-

inflammatoire (Fig. S1). À l'inverse, une activité anti-inflammatoire a été observée sur un plus grand nombre de molécules (*i.e*. l'adénosine, l'isothiocyanate de benzyle, l'acide bétulinique, le cinnamaldéhyde, le carvacrol, le chamazulène, l'eugénol, le Chardon-Marie (MeOH), l'Harpagophytum (EtOH) et la Camomille matricaire (EtOH)) (Fig. S2). Ces différents résultats correspondent à ceux retrouvés dans la littérature (Tableau S3). De façon inattendue, l'extrait méthanolique de Chardon-Marie et éthanolique d'Harpagophytum et de Camomille matricaire ont induit la synthèse de TNFα dans le milieu, mais également sa diminution. Le LPS induit la synthèse de TNFα via des récepteurs membranaires (le *toll like receptor* 4 (TLR4) et le récepteur CD14), déclenchant ainsi les voies MAP kinases (p38) ou NF-κB (Rossol *et al.*, 2011). Un extrait de plante avec une activité pro-inflammatoire activera ces voies. À l'inverse, l'inhibition de ces voies est associée à une activité anti-inflammatoire comme observée pour l'eugénol ou le cinnamaldéhyde (Tableau S3). Présentant de légers effets pro- et anti-inflammatoires, nous pouvons supposer que ces trois extraits agissent à la fois sur le LPS et sur les voies de signalisation induisant la synthèse de TNFα. Dans le but de réduire les effets induits par le parasite lors d'une infestation, nous avons sélectionné les extraits présentant la plus forte activité anti-inflammatoire, à savoir le cinnamaldéhyde, le carvacrol, le chamazulène et l'eugénol. L'isothiocyanate de benzyle n'a pas été retenu du fait de son activité génotoxique démontrée (Kassie *et al.*, 1999). Même si les cellules RAW 264.7 sont un excellent modèle d'évaluation de l'activité d'immunostimulation d'extraits, une validation *in vitro* sur le modèle cible reste nécessaire (Merly and Smith, 2017). L'activité anti-inflammatoire du cinnamaldéhyde et du carvacrol a ainsi été confirmée sur des PBMC équins.

Dans l'objectif d'avoir un regard descriptif des effets du carvacrol et du cinnamaldéhyde lors d'une infestation parasitaire, des monocytes équins ont été stimulés par de l'antigène parasitaire de larves L3 de cyathostomes. Une étude publiée en 2020 par Hellman *et al.*, a évalué l'expression des cytokines par les PBMC équins, après stimulation par l'antigène de *Strongulus vulgaris* ou de cyathostomes. Les auteurs ont observé une surexpression des gènes codants de l'IL-4 et de l'IL-13. Dans notre étude, une incubation de 6h des monocytes en présence d'antigène parasitaire a induit la répression de 282 gènes et la surexpression de 468 gènes. Une analyse bio-informatique d'enrichissement KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; (Kanehisa and Goto, 2000)) permettant d'identifier les voies métaboliques et les fonctions biologiques significativement enrichies a été

réalisée sur l'ensemble des gènes surexprimés. Un ensemble de 28 voies de biosynthèse a été retrouvé significativement enrichi, dont les plus fortes concernaient les voies de signalisation TNF et TLR. L'ajout de carvacrol et de cinnamaldéhyde à l'antigène a induit une expression de 13 et 22 gènes et une répression de 16 et 15 gènes respectivement. Parmi les gènes les plus fortement réprimés, 3 ont été retrouvés dans les deux conditions (i.e. *LOC111772092*, *LOC111772291* et un inconnu). Aucune modification de l'expression de gène en lien avec la réponse du TNFα a été observée. L'approche transcriptomique a permis d'identifier les voies de biosynthèses modulées par la présence d'antigène larvaire. Cependant, cette approche décrit une réaction à un instant donné. Comme expliqué dans l'introduction, la réponse immunitaire est un enchaînement de différentes étapes. Une analyse des transcrits couplée à une cinétique aurait permis de dresser une image plus précise de la réponse mise en place par les monocytes en présence d'antigènes. De plus, l'étude a été réalisée sur des monocytes. N'étant pas en contact direct avec les parasites, ces cellules sont néanmoins les précurseurs des macrophages (Germic *et al.*, 2019). Ainsi des études complémentaires étudiant la différentiation des monocytes en présence d'antigènes larvaire permettraient d'obtenir des informations sur le phénotype des macrophages et de comprendre le rôle des monocytes dans la défense antiparasitaire. Enfin, une étude globale, utilisant la technologie de séquençage d'ARN à cellule unique (*single-cell RNA sequencing*) (Papalexi and Satija, 2018), pourrait être menée pour obtenir les réponses de chaque cellule, permettant ainsi d'identifier leurs rôles spécifiques dans la mise en place de la réponse immunitaire chez le cheval en présence d'antigènes larvaires.

B. Les limites des tests parasitologiques *in vitro* pour la prédiction d'une activité anthelminthique *in vivo*

Le criblage de l'activité directe des molécules a été réalisé à l'aide d'un test de développement larvaire (TDL) et d'un test de motilité larvaire (TML). Le TDL est couramment utilisé afin d'identifier le développement de résistances (Coles *et al.*, 1988) et donc peut être utilisé pour cribler l'activité anthelminthique de molécules. Le TML a été réalisé en collaboration avec l'entreprise INVENesis qui a développé un outil permettant de cribler rapidement l'activité anthelminthique de candidats sur la motilité des vers (Harrington *et al.*, 2023). Le carvacrol et l'eugénol ont présenté la meilleure activité

mesurée sur le LDA, tandis que l'eugénol et l'anéthol ont eu les meilleurs résultats sur la motilité. Ces différents tests, en plus des tests d'inhibition de l'éclosion, ciblent les stades libres et ne traduisent pas la réelle activité *in vivo*. Ainsi, utilisant un test de motilité, il a été observé sur différents nématodes (*i.e. A. ceylanicum, Necator americanus* et *T. muris*) que leur sensibilité à différents anthelminthiques (*i.e.* monépantel, albendazole, lévamisole et pamoate de pyrantel) variait entre les stades L3 et adultes (Tritten *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'absence de résultats ou de résultats faibles ne signifie pas nécessairement l'absence d'activité *in vivo*. Les molécules testées sur les larves peuvent agir de façon différente sur les adultes, impacter des mécanismes physiologiques non présents comme le système de reproduction, ou également agir sur l'environnement du parasite. Ces différents points soulignent certaines difficultés entre l'évaluation de composés *in vitro* et leurs activités *in vivo*. Néanmoins, dans un contexte de gestion épidémiologique, ces différents tests permettent de prédire des effets visant à atténuer les contaminations environnementales, notamment celle des larves présentes dans les matières fécales, dans le but de réduire les infestations.

Plusieurs espèces infestant les chevaux, des approches de métabarcoding pourraient permettre d'identifier *in vitro* la sensibilité à un composé à l'échelle de l'espèce. Dans cet objectif, des concentrations croissantes de PYR, carvacrol et de cinnamaldéhyde ont été utilisées en TDL, et la diversité (Fig 7 ; Article 4) et l'abondance (Fig S1 ; Article 4) en espèces ont été observées. L'alpha diversité[10] (indice de Shannon) dans les trois essais a diminué au cours de l'augmentation des concentrations. Les espèces les plus abondantes dans les conditions contrôles (*i.e. Cylicocyclus nassatus, C. ashworthi* et *Cyathostomum pateratum*) diminuaient significativement lorsque les concentrations de PYR augmentaient. Ces résultats ont été observés uniquement sur les espèces les plus abondantes, cependant la tendance de la majorité des espèces était à la diminution. À l'inverse, le comptage de *C. ashwortii* était significativement plus élevé à la concentration la plus forte de cinnamaldéhyde par rapport au témoin. Des résultats similaires ont été observés pour *C. nassatus* et *C. pateratum* en présence de carvacrol. Cette approche de métabarcoding semble être une alternative intéressante au criblage de l'activité anthelminthique d'extraits. Cependant, elle ne présente pas une sensibilité suffisamment

[10] Indicateur du nombre d'espèces différentes présentes dans une condition spécifique. L'indice de Shannon est un indice sensible aux espèces rares.

forte pour étudier les effets sur les espèces rares. Pour cela il faudrait augmenter considérablement le nombre de larves utilisées *in vitro* (*i.e.* 5000 L1/L2 utilisées par concentration dans l'étude). Cette approche pourrait néanmoins être utilisée afin d'étudier la différence de sensibilité d'un extrait entre les larves *in vitro* et les adultes *in vivo*. Pour cela, il faudrait comparer la structure de la communauté larvaire à la suite d'un TDL avec celle des larves récoltées dans les matières fécales après traitement. La collecte des vers adultes se fait par l'utilisation d'un traitement anthelminthique qui pourrait interférer avec les effets du traitement étudié. C'est pourquoi cette approche nécessite de considérer que chaque espèce pond un nombre équivalent d'œufs. Enfin, le métabarcoding permettrait d'étudier les effets d'un changement du microbiote intestinal et donc des bactéries qui composent les matières fécales sur le développement des larves à l'échelle de l'espèce.

C. Les barrières d'une ingestion par voie orale

a. Étude préliminaire de l'activité *in vivo* du cinnamaldéhyde et de l'eugénol (Résultats de Léonie Chamoin ; Article 4)

Avant d'obtenir l'intégralité des résultats, le cinnamadéhyde et l'eugénol ont été sélectionnés comme candidats intéressants pour une utilisation *in vivo*. Cette étude fut menée par Léonie Chamoin dans le cadre de sa thèse pour l'obtention du diplôme d'État de docteur vétérinaire. L'étude fut réalisée sur des ponettes Welsh, réparties en trois lots : contrôle (n = 7), cinnamaldéhyde et eugénol (n = 6, respectivement). Les animaux ont reçu 50 mg d'additifs, soit 23,6µL de cinnamaldéhyde et 23,8µL d'eugénol dans 20 grammes de granulés durant 21 jours, puis 100 mg durant 7 jours. Aucun effet sur les OPG et sur les paramètres sanguins n'a été observé. Cette étude préliminaire a ainsi soulevé plusieurs questionnements, notamment sur les doses utilisées et les différences de résultats entre les tests *in vitro* et les tests *in vivo*.

b. Difficultés du passage *in vitro* à l'*in vivo*

À la suite des tests *in vitro*, il faut être en mesure de confirmer les résultats au sein de l'hôte. Nous avons déjà abordé l'importance de la quantité de MbS dans un régime à base de plantes bioactives pour obtenir des effets anthelminthiques *in vivo*. L'essai réalisé

avec du cinnamaldéhyde et de l'eugénol comme additif alimentaire n'a révélé aucun effet anthelminthique de ces extraits. On peut supposer l'absence d'effets de ces extraits sur les stades adultes ou que les concentrations utilisées ont été trop faibles. Cependant, augmenter les concentrations peut devenir problématique. En effet, les terpènes sont des composés fortement odorants (Tetali, 2019). Sensibles aux odeurs, les chevaux peuvent rapidement refuser les composés. De plus, ces extraits peuvent être toxiques puisqu'ils sont sécrétés par la plante comme stratégie de défense des stress biotiques tels que l'agression d'organismes herbivores (Divekar *et al.*, 2022). Ainsi, il faut parvenir à identifier une dose à ingérer qui puisse être active sur le parasite sans être toxique pour l'hôte. Utilisé par voie orale, l'additif va être absorbé et se retrouver dans la circulation sanguine (Currie, 2018). Le parasite logeant dans les muqueuses du gros intestin, il est alors nécessaire d'adapter la forme galénique afin que le composé puisse traverser les muqueuses gastriques ou les pompes d'efflux, barrières importantes de l'absorption intestinale (Vertzoni *et al.*, 2019). Dans l'étude préliminaire *in vivo* réalisée dans l'équipe, les MbS étaient déposés sur des granulés. Une étude a observé que la majorité des terpènes du Mastic de Chios (une résine naturelle riche en terpènes) étaient biodisponibles dès 30 minutes et atteignaient leur concentration maximale entre 2h et 4h après ingestion par 17 candidats (Papada *et al.*, 2018). Fortement biodisponibles, les terpènes pourraient agir de façon systémique sur le parasite, cependant les résultats *in vivo* du cinnamaldéhyde et de l'eugénol tendent à indiquer le contraire. Utilisées par voie orale, ces molécules pourraient également interagir avec le bol alimentaire. Il a été admis que le régime alimentaire module l'absorption des médicaments (Deng *et al.*, 2017). Par exemple des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que des aliments riches en fibres peuvent adsorber l'acide biliaire sécrété postprandial, entraînant une diminution de l'absorption des médicaments lipophiles (Kern *et al.*, 1978). Enfin, les MbS ont également été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999; Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Tariq *et al.*, 2009) et peuvent donc également modifier le microbiote intestinal (Wan *et al.*, 2021). L'utilisation d'un système de fermenteur *in vitro* reproduisant les conditions du gros intestin similaire à l'étude de Strauch *et al.*, (2017) permettrait d'étudier les effets des MbS sur le microbiote intestinal et les potentiels effets sur des larves de cyathostomes.

L'utilisation de MbS de plantes en tant qu'additif alimentaire est une stratégie exploitable similaire à celle des alicaments. Cependant, elle nécessite une optimisation

pour une administration par voie orale, permettant ainsi à la molécule d'atteindre le parasite et d'exercer un effet direct.

III. Comment améliorer l'efficacité anthelminthique des plantes pour une utilisation optimale chez le cheval ?

Les MbS des plantes étant susceptibles de partager des cibles d'action similaires à celles des anthelminthiques de synthèse (*i.e.* carvacrol), il est envisageable que des résistances se développent contre les plantes et leurs MbS. Du fait de ce risque, il est essentiel d'adapter l'utilisation des plantes afin de prévenir le développement de résistances.

A. Amélioration des propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique des extraits

Un des points qui a été le plus abordé dans la discussion concerne la dose et l'équilibre à trouver entre la pharmacodynamie (*i.e.* l'activité de la molécule contre le parasite) et la pharmacocinétique (*i.e.* l'évolution de la molécule dans l'hôte). Ces deux principes permettent de calculer un index thérapeutique (*i.e.* rapport de la concentration toxique minimale sur la concentration efficace médiane) permettant de déterminer l'efficacité et la sécurité d'un médicament (van den Anker *et al.*, 2018). L'utilisation de doses plus fortes réduirait cet index et augmenterait la toxicité de la molécule pour l'hôte. Le système d'encapsulation permettrait d'acheminer la molécule jusqu'au parasite à des concentrations plus faibles, mais nématicides par action directe. En effet, l'encapsulation de molécules actives offre plusieurs intérêts : une protection vis-à-vis de l'environnement extérieur, une libération contrôlée des molécules et un camouflage du goût ou des odeurs des composés (White *et al.*, 2001). Différents types de système d'encapsulation existent (*i.e.* des capsules, des sphères ou des vésicules) avec des avantages ou inconvénients en fonction des molécules à enfermer (Sharma *et al.*, 2021; Guimarães *et al.*, 2021). Une récente étude a démontré que des particules de levure avaient la capacité de se charger en terpènes par diffusion passive dans leurs cavités hydrophobes et de les protéger durant

plusieurs heures (Mirza *et al.*, 2020). Comme utilisées dans l'étude, ces particules fonctionnent sur des extraits aqueux et permettent une forte biodisponibilité des terpènes ainsi qu'une libération prolongée. Cette approche a pu être améliorée par la modification des terpènes en « pro-terpènes », permettant un relargage à la suite d'un stimulus comme la variation du pH (Soto *et al.*, 2023). Cette stratégie permet aux pro-terpènes encapsulés de traverser la barrière de l'estomac et de favoriser leur libération dans le milieu intestinal. Cette même étude a observé que la transformation du carvacrol en pro-carvacrol n'induisait aucune modification de l'activité anthelminthique sur les cyathostomes. Afin d'adapter au mieux les stratégies d'encapsulation, il serait intéressant d'étudier *in vitro* les effets du passage des MbS dans l'appareil digestif. Strauch *et al.*, (2017) ont développé un système *in vitro* permettant de simuler la digestion au niveau de l'intestin antérieur du cheval. L'utilisation d'un système similaire permettrait d'étudier la dégradation des MbS et de tester le résultat sur le parasite. À l'aide de cette approche, les résultats *in vitro* seront plus proches des conditions *in vivo*.

B. Utilisation de combinaisons de plantes ou de MbS pour limiter le développement de résistances

Composée de différents MbS, une plante présenterait plusieurs mécanismes d'actions agissant simultanément. Utilisée en combinaison avec des traitements anthelminthiques chimiques, elle pourrait agir en synergie favorisant une meilleure activité des molécules comme observée dans l'étude de (Dupuy *et al.*, 2003; Whitney *et al.*, 2013). Cependant, les résultats de l'étude du sainfoin (Article 2) et de l'essai combinant le carvacrol et le PYR (« Étude complémentaire ») soulignent le risque d'effets antagonistes des combinaisons. Ainsi, l'utilisation de plusieurs plantes ou MbS en présence d'anthelminthiques nécessite de connaître au préalable le mécanisme d'action de chaque molécule. De cette manière, celles-ci peuvent être utilisées spécifiquement de façon à agir sur la même cible (avec un mécanisme d'action similaire) afin d'amplifier l'efficacité. Différentes études se sont intéressées à évaluer le coût biologique de l'acquisition de résistance, cependant les résultats étaient variables (Donald *et al.*, 1980; Maclean *et al.*, 1987; Waller *et al.*, 1989). Néanmoins, dans l'hypothèse où l'acquisition de résistance entraîne un coût pour le nématode, les stratégies de combinaisons seraient davantage efficaces (Leathwick, 2013). En effet, pour que le parasite survive, il devrait acquérir plusieurs mécanismes de résistance, ce qui impacterait son *fitness* et sa capacité à se reproduire rapidement (Vassilieva *et al.*, 2000), limitant ainsi le développement

d'individus résistants (Leathwick, 2012, 2013). L'utilisation appropriée de combinaisons permettrait de cibler des candidats contrôlant des effets biologiques antagonistes, empêchant ainsi les vers de s'adapter dans les deux conditions opposées, les plaçant ainsi dans une impasse évolutive.

Les stratégies d'encapsulation et de combinaison permettent de maximiser et de renforcer l'utilisation des plantes, offrant de nouvelles possibilités et axes de recherche pour le contrôle des infestations aux strongles chez le cheval. En effet, on pourrait envisager des systèmes d'encapsulation qui libéreraient des MbS vers le côlon distal, permettant ainsi à ces molécules d'être excrétées dans les matières fécales et d'agir sur le développement des stades de vie libre. Il sera également essentiel d'étudier les effets des plantes ou extraits sur la faune prairiale. Mais, au préalable, il faut réussir à identifier des combinaisons, ce qui peut être facilité par les approches *in silico.*

C. Les algues, d'autres ressources de molécules actives

Dans l'objectif de réaliser des combinaisons, les algues offrent un choix de nouveaux composés aux propriétés antiparasitaires (Taki *et al.*, 2020; González-Andrés *et al.*, 2022; Miclon *et al.*, 2023; Pérez-Lloréns *et al.*, 2023). Les algues sont présentes dans tous les systèmes aquatiques (*i.e.* en milieux marins ou en eaux douces) (Lewis and McCourt, 2004) et sont donc adaptées à des paramètres différents des plantes terrestres comme les facteurs hydrodynamiques, la pression ou encore la salinité de l'eau (Barsanti *et al.*, 2008). De ce fait, elles contiennent de nombreuses molécules actives (Cardozo *et al.*, 2007) pouvant être potentiellement utilisées en combinaisons avec les plantes. Les algues sont également utilisées pour l'alimentation humaine et animale et dans l'agriculture (Leandro *et al.*, 2019). Les macroalgues sont riches en nutriments et en polysaccharides solubles. Il a été observé qu'une supplémentation dans l'alimentation des porcs en laminarine et en fucoïdane obtenues à partir d'une algue brune (*Laminaria digitata*) améliorait leurs performances de croissance et leur santé intestinale (O'Doherty *et al.*, 2010). De par leurs vertus nutritionnelles et leurs activités anthelminthiques, les algues sont d'excellentes candidates à utiliser en combinaison avec les plantes afin d'augmenter la qualité et l'activité des régimes utilisés.

Conclusion

Dans l'objectif d'identifier des plantes ou métabolites secondaires comme alternatives aux anthelminthiques chimiques, ce travail de thèse a permis de mettre en lumière plusieurs verrous, tant dans l'identification de nouveaux composés que dans leur utilisation *in vivo*. Suite à l'évaluation de l'activité anthelminthique de produits du commerce à base de plante, du sainfoin et de la chicorée, seule la chicorée utilisée comme fourrage a démontré une efficacité suffisamment élevée pour envisager une utilisation généralisée. Les divers criblages *in vitro* ont permis d'identifier des composés présentant une activité antiparasitaire directe et anti-inflammatoire, cependant, ces effets n'ont pas été observés *in vivo*. Les différents résultats obtenus soulèvent principalement des difficultés à rendre compte des effets *in vivo* à partir des observations réalisées *in vitro*, mais également à optimiser l'utilisation des plantes en conditions *in vivo.* Ainsi, dans le but d'améliorer et de valoriser l'utilisation des plantes, des approches *in silico* peuvent être employées pour cribler des composés en fonction de leur structure chimique, permettant ainsi d'identifier directement leurs mécanismes d'action. De plus, les stratégies d'encapsulation pourraient améliorer l'efficacité des molécules actives administrées par voie orale en les protégeant et en ciblant le parasite. Enfin, afin de prévenir l'émergence de résistances, il est envisagé d'utiliser des combinaisons entre métabolites secondaires issues de différentes plantes ou des combinaisons entre métabolites secondaires et anthelminthiques.

Références bibliographiques

Abbas, G., Ghafar, A., Hurley, J., Bauquier, J., Beasley, A., Wilkes, E.J.A., Jacobson, C., El-Hage, C., Cudmore, L., Carrigan, P., Tennent-Brown, B., Gauci, C.G., Nielsen, M.K., Hughes, K.J., Beveridge, I., Jabbar, A., 2021. Cyathostomin resistance to moxidectin and combinations of anthelmintics in Australian horses. Parasit. Vectors 14, 597.

Abdel-Rahman, F.H., Alaniz, N.M., Saleh, M.A., 2013. Nematicidal activity of terpenoids. J. Environ. Sci. Health B 48, 16–22.

Abo-Aziza, F.A.M., Hendawy, S.H.M., Namaky, A.H.E., Ashry, H.M., 2017. Th1/Th2 balance and humoral immune response to potential antigens as early diagnostic method of equine Strongylus nematode infection. Vet. World 10, 679–687.

Aceves, J., Erlij, D., Martínez-Marañón, R., 1970. The mechanism of the paralysing action of tetramisole on Ascaris somatic muscle. Br. J. Pharmacol. 38, 602–607.

Alemayehu, M.T., Abebe, B.K., Haile, S.M., 2022. Investigation of Strongyle Prevalence and Associated Risk Factors in Horses in and around Alage District, Ethiopia. J. Parasitol. Res. 2022, 3935008.

Alonso-Díaz, M., Torres-Acosta, F., Sandoval-Castro, C., Capetillo, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008. 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, 187–92.

Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of Haemonchus contortus larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. Vet. Parasitol. 153, 313–319.

Alqahtani, S., 2017. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 13, 1147–1158.

Aly, S.M., Mohamed, M.F., 2010. ORIGINAL ARTICLE: Echinacea purpurea and Allium sativum as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (Oreochromis niloticus). J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 94, e31–e39.

Amirkia, V., Heinrich, M., 2014. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. Phytochem. Lett. 10, xlviii–liii.

Andersen, F.L., Levine, N.D., Boatman, P.A., 1970. Survival of Third-Stage Trichostrongylus colubriformis Larvae on Pasture. J. Parasitol. 56, 209.

André, W.P.P., Cavalcante, G.S., Ribeiro, W.L.C., Santos, J.M.L. dos, Macedo, I.T.F., Paula, H.C.B. de, Morais, S.M. de, Melo, J.V. de, Bevilaqua, C.M.L., 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 26, 323–330.

André, W.P.P., Ribeiro, W.L.C., Cavalcante, G.S., Santos, J.M.L. dos, Macedo, I.T.F., Paula, H.C.B. de, de Freitas, R.M., de Morais, S.M., Melo, J.V. de, Bevilaqua, C.M.L., 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. Vet. Parasitol. 218, 52–58.

Aniszewski, T., 2007. Alkaloids - Secrets of Life:: Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier.

Apolinário, E.C.F., Oliveira, L.L. dos S., Rocha, R.H.F., Silva, F.V. e, Santos, I.S., Alves, C.A., Dias Júnior, J.A., Mendes, L. de J., Lima, W. dos S., 2022. Anthelmintic efficacy in strongyles of horses in Northern Minas Gerais, Brazil. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep. 36, 100810.

Arfuso, F., Bazzano, M., Brianti, E., Gaglio, G., Passantino, A., Tesei, B., Laus, F., 2020. Nutritional Supplements Containing Cardus mariano, Eucalyptus globulus, Gentiana lutea, Urtica urens, and Mallotus philippinensis Extracts Are Effective in Reducing Egg Shedding in Dairy Jennies (Equus asinus) Naturally Infected by Cyathostomins. Front. Vet. Sci. 7, 556270.

Artis, D., Wang, M.L., Keilbaugh, S.A., He, W., Brenes, M., Swain, G.P., Knight, P.A., Donaldson, D.D., Lazar, M.A., Miller, H.R.P., Schad, G.A., Scott, P., Wu, G.D., 2004. RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 13596–13600.

Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against Trichostrongylus colubriformis in grazing sheep. Vet. Parasitol. 127, 233–243.

Aubry, M.L., Cowell, P., Davey, M.J., Shevde, S., 1970. Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic. Br. J. Pharmacol. 38, 332–344.

Bach, T.J., 1987. Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. Synth. Metab. Mevalonic Acid Plants 25, 163–178.

Barger, I.A., 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. Int. J. Parasitol., Second International Conference Novel Approaches to the Control of the Helminth Parasites of Livestock 29, 41–47.

Barger, I.A., 1989. Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. Vet. Parasitol. 32, 21–35.

Barger, I.A., Siale, K., Banks, D.J.D., Le Jambre, L.F., 1994. Rotational grazing for control of gastrointestinal nematodes of goats in a wet tropical environment. Vet. Parasitol. 53, 109–116.

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.

Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Vesentini, N., Gualtieri, P., 2008. The World of Algae, in: Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Gualtieri, P. (Eds.), Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–15.

Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Ménez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Lespine, A., 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of Teladorsagia circumcincta and Haemonchus contortus. Parasitology 136, 1081–1088.

Beech, R.N., Skuce, P., Bartley, D.J., Martin, R.J., Prichard, R.K., Gilleard, J.S., 2011. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? Parasitology 138, 160–174.

Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytol. 127, 617–633.

Beraldi, D., McRae, A.F., Gratten, J., Pilkington, J.G., Slate, J., Visscher, P.M., Pemberton, J.M., 2007. Quantitative trait loci (QTL) mapping of resistance to strongyles and coccidia in the free-living Soay sheep (Ovis aries). Int. J. Parasitol. 37, 121–129.

Bernal, J., Nozal, M., Salas, M., Galante, E., Jean-Pierre, L., 1994. HPLC Determination of Residual Ivermectin in Cattle Dung Following Subcutaneous Injection. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 17, 2429–2444.

Bhambhani, S., Kondhare, K.R., Giri, A.P., 2021. Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. Molecules 26, 3374.

Blackhall, William J, Liu, H.Y., Xu, M., Prichard, R.K., Beech, R.N., 1998. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of Haemonchus contortus. Mol. Biochem. Parasitol. 95, 193–201.

Blackhall, William J., Pouliot, J.-F., Prichard, R.K., Beech, R.N., 1998. Haemonchus contortus: Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin- and Moxidectin-Selected Strains. Exp. Parasitol. 90, 42–48.

Boelow, H., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2023. Epidemiological study on factors influencing the occurrence of helminth eggs in horses in Germany based on sent-in diagnostic samples. Parasitol. Res. 122, 749–767.

Boffetta, P., Couto, E., Wichmann, J., Ferrari, P., Trichopoulos, D., Bueno-de-Mesquita, H.B., van Duijnhoven, F.J.B., Büchner, F.L., Key, T., Boeing, H., Nöthlings, U., Linseisen, J., Gonzalez, C.A., Overvad, K., Nielsen, M.R.S., Tjønneland, A., Olsen, A., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Morois, S., Lagiou, P., Naska, A., Benetou, V., Kaaks, R., Rohrmann, S., Panico, S., Sieri, S., Vineis, P., Palli, D., van Gils, C.H., Peeters, P.H., Lund, E., Brustad, M., Engeset, D., Huerta, J.M., Rodríguez, L., Sánchez, M.-J., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Hallmans, G., Johansson, I., Manjer, J., Sonestedt, E., Allen, N.E., Bingham, S., Khaw, K.-T., Slimani, N., Jenab, M., Mouw, T., Norat, T., Riboli, E., Trichopoulou, A., 2010. Fruit and Vegetable Intake and Overall Cancer Risk in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). JNCI J. Natl. Cancer Inst. 102, 529–537.

Boulin, T., Fauvin, A., Charvet, C.L., Cortet, J., Cabaret, J., Bessereau, J.-L., Neveu, C., 2011. Functional reconstitution of Haemonchus contortus acetylcholine receptors in Xenopus oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. Br. J. Pharmacol. 164, 1421–1432.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161, 839–851.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Silva, A.R., Araujo, J.M., Carvalho, R.O., Tavela, A.O., Campos, A.K., Carvalho, G.R., 2009. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus Duddingtonia flagrans in tropical southeastern Brazil. Vet. Parasitol., Special Section: EVPC 2008: Veterinary parasitology and climate change 163, 335–340.

Brophy, P.M., Patterson, L.H., Brown, A., Pritchard, D.I., 1995. Glutathione S-transferase (GST) expression in the human hookworm Necator americanus: potential roles for excretory-secretory forms of GST. Acta Trop. 59, 259–263.

Brophy, P.M., Pritchard, D.I., 1992. Metabolism of lipid peroxidation products by the gastro-intestinal nematodes Necator americanus, Ancylostoma ceylanicum and Heligmosomoides polygyrus. Int. J. Parasitol. 22, 1009–1012.

Bruschi, F., Solfanelli, S., Binaghi, R.A., 1992. Trichinella spiralis: modifications of the cuticle of the newborn larva during passage through the lung. Exp. Parasitol. 75, 1–9.

Bucknell, D.G., Gasser, R.B., Beveridge, I., 1995. The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. Int. J. Parasitol. 25, 711–724.

Buono, F., Pacifico, L., Piantedosi, D., Sgroi, G., Neola, B., Roncoroni, C., Genovese, A., Rufrano, D., Veneziano, V., 2019. Preliminary Observations of the Effect of Garlic on Egg Shedding in Horses Naturally Infected by Intestinal Strongyles. J. Equine Vet. Sci. 72, 79–83.

Burlou-Nagy, C., Bănică, F., Jurca, T., Vicaş, L.G., Marian, E., Muresan, M.E., Bácskay, I., Kiss, R., Fehér, P., Pallag, A., 2022. Echinacea purpurea (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties. A Review. Plants 11, 1244.

Buza, V., Cătană, L., Andrei, S.M., Ştefănuţ, L.C., Răileanu, Ş., Matei, M.C., Vlasiuc, I., Cernea, M., 2020. In vitro anthelmintic activity assessment of six medicinal plant aqueous extracts against donkey strongyles. J. Helminthol. 94.

Caner, A., Döşkaya, M., Değirmenci, A., Can, H., Baykan, Ş., Üner, A., Başdemir, G., Zeybek, U., Gürüz, Y., 2008. Comparison of the effects of Artemisia vulgaris and Artemisia absinthium growing in western Anatolia against trichinellosis (Trichinella spiralis) in rats. Exp. Parasitol. 119, 173–179.

Canever, R.J., Braga, P.R.C., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M.B., 2013. Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. Vet. Parasitol. 194, 35–39.

Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP 146, 60–78.

Carminatti, A., Chitolina, M.B., Ribeiro, A.B., Forest, M., Collet, S.G., Prestes, A.M., Camillo, G., 2023. Occurrence and risk factors associated with gastrointestinal parasitism in horses reared in different systems. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep. 42, 100890.

Carvalho, C.O., Chagas, A.C.S., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L.G., Chaves, F.C.M., Stephan, M.P., Bizzo, H.R., Amarante, A.F.T., 2012. The anthelmintic effect of plant extracts on

Haemonchus contortus and Strongyloides venezuelensis. Vet. Parasitol. 183, 260–268.

Cayzer, C.J., Dobson, C., 1983. Suppression of antibody production in mice given multiple concurrent infections with Nematospiroides dubius. Int. J. Parasitol. 13, 61–65.

Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R., 2003. PREVALENCE OF STRONGYLE NEMATODES IN NATURALLY INFECTED PONIES OF DIFFERENT AGES AND DURING DIFFERENT SEASONS OF THE YEAR IN LOUISIANA. J. Parasitol. 89, 309–314.

Chapman, M.R., French, D.D., Klei, T.R., 2001. SEASONAL TRANSMISSION OF GASTROINTESTINAL PARASITES OF EQUIDS IN SOUTHERN LOUISIANA. J. Parasitol. 87, 1371–1378.

Chapman, M.R., French, D.D., Monahan, C.M., Klei, T.R., 1996. Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population. Vet. Parasitol. 66, 205–212.

Chatelain, R., Varkila, K., Coffman, R.L., 1992. IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 148, 1182–1187.

Chattopadhyay, C., Chakrabarti, N., Chatterjee, M., Mukherjee, S., Sarkar, K., Chaudhuri, A.R., 2012. Black tea (Camellia sinensis) decoction shows immunomodulatory properties on an experimental animal model and in human peripheral mononuclear cells. Pharmacogn. Res. 4, 15–21.

Chini, C., Bilia, A.R., Keita, A., Morelli, I., 1992. Protoalkaloids from Boscia angustifolia. Planta Med. 58, 476–476.

Claude, N., Goldfain-Blanc, F., Guillouzo, A., 2009. La place des méthodes in silico, in vitro, in omic dans l'évaluation de la sécurité des médicaments. médecine/sciences 25, 105–110.

Clement, F., Pramod, S.N., Venkatesh, Y.P., 2010. Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (Allium sativum) with the major garlic lectins or agglutinins. Int. Immunopharmacol. 10, 316–324. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.12.002

Coles, G.C., Tritschler, J.P., Giordano, D.J., Laste, N.J., Schmidt, A.L., 1988. Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. Res. Vet. Sci. 45, 50–53.

Collas, C., Fleurance, G., Cabaret, J., Martin-Rosset, W., Wimel, L., Cortet, J., Dumont, B., 2014. How does the suppression of energy supplementation affect herbage intake, performance and parasitism in lactating saddle mares? Anim. Int. J. Anim. Biosci. 8, 1290–1297.

Collas, C., Sallé, G., Dumont, B., Cabaret, J., Cortet, J., Martin-Rosset, W., Wimel, L., Fleurance, G., 2018. Are sainfoin or protein supplements alternatives to control small strongyle infection in horses? Anim. Int. J. Anim. Biosci. 12, 359–365.

Colvin, A.F., Walkden-Brown, S.W., Knox, M.R., Scott, J.M., 2008. Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. Vet. Parasitol. 153, 108–120.

Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., Dartigues, J.F., 2000. Intake of flavonoids and risk of dementia. Eur. J. Epidemiol. 16, 357–363.

Cookson, E., Blaxter, M.L., Selkirk, M.E., 1992. Identification of the major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of glutathione peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 5837–5841.

Coop, R.L., Kyriazakis, I., 1999. Nutrition-parasite interaction. Vet. Parasitol. 84, 187–204.

Corbett, C.J., Love, S., Moore, A., Burden, F.A., Matthews, J.B., Denwood, M.J., 2014. The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. Parasit. Vectors 7, 48.

Corning, S., 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. Parasit. Vectors 2, S1.

Cornwell, R.L., Jones, R.M., 1968. Field trials in horses with pyrantel tartrate. Vet. Rec. 82, 586–587.

Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Calatayud, S., Hernández, C., Esplugues, J.V., Barrachina, M.D., 2016. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. Mucosal Immunol. 9, 986–998.

Courtot, É., Boisseau, M., Dhorne-Pollet, S., Serreau, D., Gesbert, A., Reigner, F., Basiaga, M., Kuzmina, T., Lluch, J., Annonay, G., Kuchly, C., Diekmann, I., Krücken, J., Samson-Himmelstjerna, G. von, Mach, N., Sallé, G., 2023. Comparison of two molecular barcodes for the study of equine strongylid communities with amplicon sequencing. PeerJ 11, e15124.

Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 12, 564–582.

Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., Basu, C., 2019. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes, in: Joshee, N., Dhekney, S.A., Parajuli, P. (Eds.), Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy. Springer International Publishing, Cham, pp. 333–359.

Cribb, N.C., Cote, N.M., Bouré, L.P., Peregrine, A.S., 2006. Acute small intestinal obstruction associated with Parascaris equorum infection in young horses: 25 cases (1985-2004). N. Z. Vet. J. 54, 338–343.

Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from Caenorhabditis elegans. Nature 371, 707–711.

Currie, G.M., 2018. Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. J. Nucl. Med. Technol. 46, 221–230.

Das, Q., Islam, Md.R., Lepp, D., Tang, J., Yin, X., Mats, L., Liu, H., Ross, K., Kennes, Y.M., Yacini, H., Warriner, K., Marcone, M.F., Diarra, M.S., 2020. Gut Microbiota, Blood Metabolites, and Spleen Immunity in Broiler Chickens Fed Berry Pomaces and Phenolic-Enriched Extractives. Front. Vet. Sci. 7.

Davidson, A.J., Hodgkinson, J.E., Proudman, C.J., Matthews, J.B., 2005. Cytokine responses to Cyathostominae larvae in the equine large intestinal wall. Res. Vet. Sci. 78, 169–176.

De Graef, J., Demeler, J., Skuce, P., Mitreva, M., Samson-Himmelstjerna, G.V., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2013. Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant Cooperia oncophora isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones. Parasitology 140, 499–508.

de la Rosa, L.A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E., 2019. Chapter 12 - Phenolic Compounds, in: Yahia, E.M. (Ed.), Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Woodhead Publishing, pp. 253–271.

de Lima Cherubim, D.J., Buzanello Martins, C.V., Oliveira Fariña, L., da Silva de Lucca, R.A., 2020. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. J. Cosmet. Dermatol. 19, 33–37.

Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J.A.M., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., De Meester, L., 2007. Host-parasite "Red Queen" dynamics archived in pond sediment. Nature 450, 870–873.

Deng, J., Zhu, X., Chen, Z., Fan, C.H., Kwan, H.S., Wong, C.H., Shek, K.Y., Zuo, Z., Lam, T.N., 2017. A Review of Food–Drug Interactions on Oral Drug Absorption. Drugs 77, 1833–1855.

Devore, E.E., Kang, J.H., Breteler, M.M.B., Grodstein, F., 2012. Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline. Ann. Neurol. 72, 135–143.

Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B.M., Bhakta, T., Dash, S., Kim, H.S., 2020. Chapter 15 - Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids), in: Sanches Silva, A., Nabavi, S.F., Saeedi, M., Nabavi, S.M. (Eds.), Recent Advances in Natural Products Analysis. Elsevier, pp. 505–567.

Dias De Castro, L.L., Oliveira Júnior, G.A., Perez, B.C., Carvalho, M.E., De Souza Ramos, E.A., Ferraz, J.B.S., Molento, M.B., 2022. Genome-wide association study in thoroughbred horses naturally infected with cyathostomins. Anim. Biotechnol. 0, 1–13.

Dicker, A.J., Nisbet, A.J., Skuce, P.J., 2011. Gene expression changes in a P-glycoprotein (Tci-pgp-9) putatively associated with ivermectin resistance in Teladorsagia circumcincta. Int. J. Parasitol. 41, 935–942.

Divekar, P.A., Narayana, S., Divekar, B.A., Kumar, R., Gadratagi, B.G., Ray, A., Singh, Achuit Kumar, Rani, V., Singh, V., Singh, Akhilesh Kumar, Kumar, A., Singh, R.P., Meena, R.S., Behera, T.K., 2022. Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. Int. J. Mol. Sci. 23, 2690.

Dobson, R.J., Hosking, B.C., Jacobson, C.L., Cotter, J.L., Besier, R.B., Stein, P.A., Reid, S.A., 2012. Preserving new anthelmintics: A simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. Vet. Parasitol. 186, 79–92.

Donald, A.D., Waller, P.J., Dobson, R.J., Axelsen, A., 1980. The effect of selection with levamisole on benzimidazole resistance in Ostertagia spp. of sheep. Int. J. Parasitol. 10, 381–389.

Donaldson, J., Houtert, M.F.J. van, Sykes, A.R., 2001. The effect of dietary fish-meal supplementation on parasite burdens of periparturient sheep. Anim. Sci. 72, 149–158.

Dormont, L., Rapior, S., McKey, D.B., Lumaret, J.-P., 2007. Influence of dung volatiles on the process of resource selection by coprophagous beetles. Chemoecology 17, 23–30.

Douhard, F., Doeschl-Wilson, A.B., Corbishley, A., Hayward, A.D., Marcon, D., Weisbecker, J.-L., Aguerre, S., Bordes, L., Jacquiet, P., McNeilly, T.N., Sallé, G., Moreno-Romieux, C.,

2022. The cost of host genetic resistance on body condition: Evidence from divergently selected sheep. Evol. Appl. 15, 1374–1389.

Drudge, J.H., Elam, G., 1961. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. J. Parasitol. 47, 38–39.

Drudge, J.H., Lyons, E.T., Tolliver, S.C., 1981. Parasite control in horses: a summary of contemporary drugs. Vet. Med. Small Anim. Clin. VM SAC 76, 1479–1489.

Drudge, J.H., Szanto, J., Wyant, Z.N., Elam, G., 1963. Critical tests of thiabendazole as an anthelmintic in the horse. Am. J. Vet. Res. 24, 1217–1222.

Du, Z.-A., Sun, M.-N., Hu, Z.-S., 2018. Saikosaponin a Ameliorates LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. Inflammation 41, 193–198.

Dudeney, A., Campbell, C., Gerald, C., 2008. Macrocyclic lactone resistance in cyathostomins. Vet. Rec. 163, 163–164.

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.

Dybdahl, M.F., Lively, C.M., 1998. HOST-PARASITE COEVOLUTION: EVIDENCE FOR RARE ADVANTAGE AND TIME-LAGGED SELECTION IN A NATURAL POPULATION. Evol. Int. J. Org. Evol. 52, 1057–1066.

Edward, C.L., Hoffmann, A.A., 2008. Ivermectin resistance in a horse in Australia. Vet. Rec. 162, 56–57.

Egerton, J.R., Brokken, E.S., Suhayda, D., Eary, C.H., Wooden, J.W., Kilgore, R.L., 1981. The antiparasitic activity of ivermectin in horses. Vet. Parasitol. 8, 83–88.

El-Abdellati, A., De Graef, J., Van Zeveren, A., Donnan, A., Skuce, P., Walsh, T., Wolstenholme, A., Tait, A., Vercruysse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2011. Altered avr-14B gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, Cooperia oncophora and Ostertagia ostertagi. Int. J. Parasitol. 41, 951–957.

Elghryani, N., McOwan, T., Mincher, C., Duggan, V., de Waal, T., 2023. Estimating the Prevalence and Factors Affecting the Shedding of Helminth Eggs in Irish Equine Populations. Anim. Open Access J. MDPI 13, 581.

Erb, M., Kliebenstein, D.J., 2020. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. Plant Physiol. 184, 39–52.

Errouissi, F., Lumaret, J.-P., 2010. Field effects of faecal residues from ivermectin slow-release boluses on the attractiveness of cattle dung to dung beetles. Med. Vet. Entomol. 24, 433–440.

Etter, E., Hoste, H., Chartier, C., Pors, I., Koch, C., Broqua, C., Coutineau, H., 2000. The effect of two levels of dietary protein on resistance and resilience of dairy goats experimentally infected with Trichostrongylus colubriformis: comparison between high and low producers. Vet. Res. 31, 247–258.

Eysker, M., Mirck, M.H., 1986. The distribution of inhibited early third stage Cyathostominae larvae in the large intestine of the horse. Z. Für Parasitenkd. 72, 815–820.

Fabiani, J.V., Lyons, E.T., Nielsen, M.K., 2016. Dynamics of Parascaris and Strongylus spp. parasites in untreated juvenile horses. Vet. Parasitol. 230, 62–66.

Faquim-Mauro, E.L., Macedo, M.S., 1998. The immunosuppressive activity of Ascaris suum is due to high molecular weight components. Clin. Exp. Immunol. 114, 245–251.

Fausto, G.C., Fausto, M.C., Vieira, Í.S., Freitas, S.G. de, Carvalho, L.M. de, Oliveira, I. de C., Silva, E.N., Campos, A.K., Araújo, J.V. de, 2021. Formulation of the nematophagous fungus Duddingtonia flagrans in the control of equine gastrointestinal parasitic nematodes. Vet. Parasitol. 295, 109458.

Felippelli, G., Cruz, B.C., Gomes, L.V.C., Lopes, W.D.Z., Teixeira, W.F.P., Maciel, W.G., Buzzulini, C., Bichuette, M.A., Campos, G.P., Soares, V.E., Bergamasco, P.L.F., Oliveira, G.P. de, Costa, A.J. da, 2015. Susceptibility of helminth species from horses against different chemical compounds in Brazil. Vet. Parasitol. 212, 232–238.

Feng, X.-P., Hayashi, J., Beech, R.N., Prichard, R.K., 2002. Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by ivermectin. J. Neurochem. 83, 870–878.

Ferreira, L.E., Benincasa, B.I., Fachin, A.L., França, S.C., Contini, S.S.H.T., Chagas, A.C.S., Beleboni, R.O., 2016. Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep. Vet. Parasitol. 228, 70–76.

Fincher, G.T., 1992. Injectable Ivermectin for Cattle: Effects on Some Dung-Inhabiting Insects. Environ. Entomol. 21, 871–876.

Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C.A., Morris, S.C., Madden, K.B., Gause, W.C., Urban, J.F., 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. Annu. Rev. Immunol. 15, 505–533. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.505

Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., Urban Jr, J.F., 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. Immunol. Rev. 201, 139–155.

Fletcher, D.A., Mullins, R.D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature 463, 485–492.

Fleurance, G., Sallé, G., Lansade, L., Wimel, L., Dumont, B., 2022. Comparing the effects of horse grazing alone or with cattle on horse parasitism and vegetation use in a mesophile pasture. Grass Forage Sci. 77, 175–188.

Flores, A.G., Osmari, V., Ramos, F., Marques, C.B., Ramos, D.J., Botton, S. de A., Vogel, F.S.F., Sangioni, L.A., 2020. Multiple resistance in equine cyathostomins: a case study from military establishments in Rio Grande do Sul, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 29, e003820.

Flota-Burgos, G.J., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Arjona-Cambranes, K.A., 2017. Anthelminthic activity of methanol extracts of Diospyros anisandra and Petiveria alliacea on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching. Vet. Parasitol. 248, 74–79.

Forteau, L., Dumont, B., Sallé, G., Bigot, G., Fleurance, G., 2020. Horses grazing with cattle have reduced strongyle egg count due to the dilution effect and increased reliance on macrocyclic lactones in mixed farms. animal 14, 1076–1082.

Foster, J.G., Cassida, K.A., Sanderson, M.A., 2011. Seasonal variation in sesquiterpene lactone concentration and composition of forage chicory (Cichorium intybus L.) cultivars. Grass Forage Sci. 66, 424–433.

Foster, J.G., Clapham, W.M., Belesky, D.P., Labreveux, M., Hall, M.H., Sanderson, M.A., 2006. Influence of Cultivation Site on Sesquiterpene Lactone Composition of Forage Chicory (Cichorium intybus L.). J. Agric. Food Chem. 54, 1772–1778.

Fritzen, B., Rohn, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010. Endoparasite control management on horse farms--lessons from worm prevalence and questionnaire data. Equine Vet. J. 42, 79–83.

Gabhe, S.Y., Tatke, P.A., Khan, T.A., 2006. Evaluation of the immunomodulatory activity of the methanol extract of Ficus benghalensis roots in rats. Indian J. Pharmacol. 38, 271.

Gárate-Gallardo, L., Torres-Acosta, J.F. de 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., 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.

Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F., Thompson, D.P., 1993. Haemonchus contortus: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. Exp. Parasitol. 77, 88–96.

Geldhof, P., Claerebout, E., Knox, D.P., Agneessens, J., Vercruysse, J., 2001. Proteinases released in vitro by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode Ostertagia ostertagi. Parasitology 121, 639–647.

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V.S., Taylor, N., Maizels, R.M., Jay, P., 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. Nature 529, 226–230.

Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S., Simon, H.-U., 2019. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. Cell Death Differ. 26, 715–727.

Geurden, T., Hodge, A., Noé, L., Winstanley, D., Bartley, D.J., Taylor, M., Morgan, C., Fraser, S.J., Maeder, S., Bartram, D., 2012. The efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against anthelmintic resistant gastro-intestinal nematodes of sheep in the UK. Vet. Parasitol. 189, 308–316.

Gibbs, H.C., 1986. Hypobiosis in Parasitic Nematodes—An Update, in: Baker, J.R., Muller, R. (Eds.), Advances in Parasitology. Academic Press, pp. 129–174.

Gibson, T.E., 1975. Veterinary Anthelmintic Medication. Commonwealth Agricultural Bureaux.

Gibson, T.E., 1960. Some experiences with small daily doses of phenothiazine as a means of control of strongylid worms in the horse. Vet. Rec. 72, 37–41.

Gibson, T.E., 1953. The Effect of Repeated Anthelmintic Treatment with Phenothiazine on the Faecal Egg Counts of Housed Horses, with Some Observations on the Life Cycle of Trichonema spp. in the Horse. J. Helminthol. 27, 29–40.

Giles, C.J., Urquhart, K.A., Longstaffe, J.A., 1985. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): A report of 15 clinical cases. Equine Vet. J. 17, 196–201.

Gill, J.H., Lacey, E., 1992. The kinetics of mebendazole binding to Haemonchus contortus tubulin. Int. J. Parasitol. 22, 939–946.

Goh, Y.P.S., Henderson, N.C., Heredia, J.E., Red Eagle, A., Odegaard, J.I., Lehwald, N., Nguyen, K.D., Sheppard, D., Mukundan, L., Locksley, R.M., Chawla, A., 2013. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 9914–9919.

González-Andrés, P., Fernández-Peña, L., Díez-Poza, C., Barbero, A., 2022. The Tetrahydrofuran Motif in Marine Lipids and Terpenes. Mar. Drugs 20, 642.

Greer, A.W., 2008. Trade-offs and benefits: implications of promoting a strong immunity to gastrointestinal parasites in sheep. Parasite Immunol. 30, 123–132.

Grimm, P., Laroche, N., Julliand, S., Sorci, G., 2022. Inclusion of Sainfoin in the Diet Might Alter Strongyle Infection in Naturally Infected Horses. Animals 12, 955.

Grosso, G., Micek, A., Godos, J., Pajak, A., Sciacca, S., Galvano, F., Giovannucci, E.L., 2017. Dietary Flavonoid and Lignan Intake and Mortality in Prospective Cohort Studies: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. Am. J. Epidemiol. 185, 1304–1316.

Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., Nogueira, E., 2021. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. Int. J. Pharm. 601, 120571.

Habermann, R.T., Harwood, P.D., Hunt, W.H., 1941. Critical tests with phenothiazine as an anthelmintic in horses. North Am. Vet. 22.

Hall, M.C., Wilson, R.H., Wigdor, M., 1918. The anthelmintic treatment of equine intestinal strongylidosis. J. Comp. Pathol. Ther. 31, 272–278.

Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2015. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. Immunity 43, 29–40. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007

Harborne, J.B., 1999. Classes and functions of secondary products from plants, in: Chemicals from Plants. WORLD SCIENTIFIC / IMPERIAL COLLEGE PRESS, pp. 1–25.

Harrington, S., Pyche, J., Burns, A.R., Spalholz, T., Ryan, K.T., Baker, R.J., Ching, J., Rufener, L., Lautens, M., Kulke, D., Vernudachi, A., Zamanian, M., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Roy, P.J., 2023. Nemacol is a small molecule inhibitor of C. elegans vesicular acetylcholine transporter with anthelmintic potential. Nat. Commun. 14, 1816.

Hasnain, S.Z., Gallagher, A.L., Grencis, R.K., Thornton, D.J., 2013. A new role for mucins in immunity: Insights from gastrointestinal nematode infection. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 364–374. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.10.011

Hayes, K.S., Bancroft, A.J., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I.S., Grencis, R.K., 2010. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode Trichuris muris. Science 328, 1391–1394.

Hayward, A.D., 2022. Genetic parameters for resistance to gastrointestinal nematodes in sheep: a meta-analysis. Int. J. Parasitol. 52, 843–853.

Healey, K., Lawlor, C., Knox, M.R., Chambers, M., Lamb, J., Groves, P., 2018. Field evaluation of Duddingtonia flagrans IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Pasture larval studies in horses, cattle and goats. Vet. Parasitol. 258, 124–132.

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.

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 lambs. Vet. Parasitol. 142, 293–300.

Hellman, S., Tydén, E., Hjertner, B., Nilsfors, F., Hu, K., Morein, B., Fossum, C., 2021. Cytokine responses to various larval stages of equine strongyles and modulatory effects of the adjuvant G3 in vitro. Parasite Immunol. 43, e12794.

Herbert, D.R., Yang, J.-Q., Hogan, S.P., Groschwitz, K., Khodoun, M., Munitz, A., Orekov, T., Perkins, C., Wang, Q., Brombacher, F., Urban, J.F., Rothenberg, M.E., Finkelman, F.D., 2009. Intestinal epithelial cell secretion of RELM-β protects against gastrointestinal worm infection. J. Exp. Med. 206, 2947–2957. http

Herd, R.P., Gabel, A.A., 1990. Reduced efficacy of anthelmintics in young compared with adult horses. Equine Vet. J. 22, 164–169.

Herd, R.P., Miller, T.B., Gabel, A.A., 1981. A field evaluation of pro-benzimidazole, benzimidazole, and non-benzimidazole anthelmintics in horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 179, 686–691.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D., Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. The Lancet, Originally published as Volume 2, Issue 8878 342, 1007–1011.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1995. Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. Arch. Intern. Med. 155, 381–386.

Hilligan, K.L., Ronchese, F., 2020. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. Cell. Mol. Immunol. 17, 587–599.

Himejima, M., Hobson, K.R., Otsuka, T., Wood, D.L., Kubo, I., 1992. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine treePinus ponderosa: A defense mechanism against microbial invasion. J. Chem. Ecol. 18, 1809–1818.

Hirvonen, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Albanes, D., Pietinen, P., 2001. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). Cancer Causes Control CCC 12, 789–796.

Ho, E.N.M., Leung, D.K.K., Leung, G.N.W., Wan, T.S.M., Wong, A.S.Y., Wong, C.H.F., Soma, L.R., Rudy, J.A., Uboh, C., Sams, R., 2009. Aminorex and rexamino as metabolites of levamisole in the horse. Anal. Chim. Acta 638, 58–68.

Hodgkinson, J.E., Clark, H.J., Kaplan, R.M., Lake, S.L., Matthews, J.B., 2008. The role of polymorphisms at β tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. Int. J. Parasitol. 38, 1149–1160.

Holden-Dye, L., Walker, R.J., 2007. Anthelmintic drugs. WormBook Online Rev. C Elegans Biol. 1–13.

Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. Vet. Parasitol., Special issue: Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock 186, 18–27.

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., Special Issue: Towards good management practises in parasite control 180, 144–154.

Houdijk, J.G.M., Kyriazakis, I., Jackson, F., Huntley, J.F., Coop, R.L., 2003. Is the allocation of metabolisable protein prioritised to milk production rather than to immune functions in Teladorsagia circumcincta-infected lactating ewes? Int. J. Parasitol. 33, 327–338.

Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S.V., Weinstock, J.V., Gallini, C.A., Redding, K., Margolskee, R.F., Osborne, L.C., Artis, D., Garrett, W.S., 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. Science 351, 1329–1333.

Hui, C., Qi, X., Qianyong, Z., Xiaoli, P., Jundong, Z., Mantian, M., 2013. Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. PLOS ONE 8, e54318.

Hümer, M., Scheller, G., Kapellen, T., Gebauer, C., Schmidt, H., Kiess, W., 2010. [Use of herbal medicine in German children - prevalence, indications and motivation]. Dtsch. Med. Wochenschr. 1946 135, 959–964.

Hung, G.-C., Chilton, N.B., Beveridge, I., Zhu, X.Q., Lichtenfels, J.R., Gasser, R.B., 1999. Molecular evidence for cryptic species within Cylicostephanus minutus (Nematoda: Strongylidae)fn1fn1Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the embl, GenBankTM and DDBJ databases under the accession numbers AJ228241, AJ005831, AJ228239, AJ228240, aj 004843, AJ005832, AJ004841 and AJ004842. Int. J. Parasitol. 29, 285–291.

Imani-Baran, A., Abdollahi, J., Akbari, H., Jafarirad, S., Moharramnejad, S., 2020. Anthelmintic activity of crude powder and crude aqueous extract of Trachyspermum ammi on gastrointestinal nematodes in donkey (Equus asinus): An in vivo study. J. Ethnopharmacol. 248, 112249.

Jacobs, C.T., Scholtz, C.H., 2015. A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. Onderstepoort J. Vet. Res. 82, 858.

Jacques, P.F., Cassidy, A., Rogers, G., Peterson, J.J., Meigs, J.B., Dwyer, J.T., 2013. Higher Dietary Flavonol Intake Is Associated with Lower Incidence of Type 2 Diabetes. J. Nutr. 143, 1474–1480.

James, C.E., Davey, M.W., 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode Caenorhabditis elegans. Int. J. Parasitol. 39, 213–220.

Janssen, I.J.I., Krücken, J., Demeler, J., Basiaga, M., Kornaś, S., Samson-Himmelstjerna, G. von, 2013. Genetic Variants and Increased Expression of Parascaris equorum P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility. PLOS ONE 8, e61635.

Jatzlau, A., Abdel-Ghaffar, F., Gliem, G., Mehlhorn, H., 2014. Nature helps: food addition of micronized coconut and onion reduced worm load in horses and sheep and increased body weight in sheep. Parasitol. Res. 113, 305–310.

Jayachandran, M., Chandrasekaran, B., Namasivayam, N., 2015. Geraniol attenuates fibrosis and exerts anti-inflammatory effects on diet induced atherogenesis by NF-κB signaling pathway. Eur. J. Pharmacol. 762, 102–111.

Jiang, J.-B., Guo, X.-B., Li, G.-Q., Cheung Kong, Y., Arnold, K., 1982. ANTIMALARIAL ACTIVITY OF MEFLOQUINE AND QINGHAOSU. The Lancet 320, 285–288.

Johnson, V.J., He, Q., Osuchowski, M.F., Sharma, R.P., 2003. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. Planta Med. 69, 44–49.

Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 28, 27–30.

Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol. 20, 477–481.

Kaplan, R.M., Klei, T.R., Lyons, E.T., Lester, G., Courtney, C.H., French, D.D., Tolliver, S.C., Vidyashankar, A.N., Zhao, Y., 2004. Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. J. Am. Vet. Med. Assoc. 225, 903–910.

Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. Vet. Parasitol., Special issue: Novel Approaches to the Control of Helminth Parasites of Livestock 186, 70–78.

Kassie, F., Pool-Zobel, B., Parzefall, W., Knasmüller, S., 1999. Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. Mutagenesis 14, 595–604.

Kebeta, M.M., Hine, B.C., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., Doyle, E.K., 2020. Evaluation of Barbervax® vaccination for lambing Merino ewes. Vet. Parasitol. 283, 109187.

Kern, F., Birkner, H.J., Ostrower, V.S., 1978. Binding of bile acids by dietary fiber. Am. J. Clin. Nutr. 31, S175–S179.

Kidane, A., Houdijk, J.G.M., Athanasiadou, S., Tolkamp, B.J., Kyriazakis, I., 2010. Effects of maternal protein nutrition and subsequent grazing on chicory (Cichorium intybus) on parasitism and performance of lambs. J. Anim. Sci. 88, 1513–1521.

Klei, T.R., Chapman, M.R., 1999. Immunity in equine cyathostome infections. Vet. Parasitol. 85, 123–133; discussion 133-136, 215–225.

Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. BMJ 312, 478–481.

Knight, P.A., Wright, S.H., Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y., Miller, H.R., 2000. Delayed expulsion of the nematode Trichinella spiralis in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. J. Exp. Med. 192, 1849–1856.

Kodama, N., Komuta, K., Sakai, N., Nanba, H., 2002. Effects of D-Fraction, a Polysaccharide from Grifola frondosa on Tumor Growth Involve Activation of NK Cells. Biol. Pharm. Bull. 25, 1647–1650.

Kooyman, F.N.J., van Doorn, D.C.K., Geurden, T., Mughini-Gras, L., Ploeger, H.W., Wagenaar, J.A., 2016. Species composition of larvae cultured after anthelmintic treatment indicates reduced moxidectin susceptibility of immature Cylicocyclus species in horses. Vet. Parasitol. 227, 77–84.

Kopp, S.R., Coleman, G.T., Traub, R.J., McCarthy, J.S., Kotze, A.C., 2009. Acetylcholine receptor subunit genes from Ancylostoma caninum: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. Int. J. Parasitol. 39, 435–441.

Kornaś, S., Cabaret, J., Skalska, M., Nowosad, B., 2010. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. Vet. Parasitol. 174, 285–291.

Koski, K., Scott, M., 2003. Gastrointestinal Nematodes, Trace Elements, and Immunity. J. Trace Elem. Exp. Med. 16, 237–251.

Krüger, K., Scholtz, C.H., 1998a. Changes in the structure of dung insect communities after ivermectin usage in a grassland ecosystem. I. Impact of ivermectin under drought conditions. Acta Oecologica 19, 425–438.

Krüger, K., Scholtz, C.H., 1998b. Changes in the structure of dung insect communities after ivermectin usage in a grassland ecosystem. II. Impact of ivermectin under high-rainfall conditions. Acta Oecologica 19, 439–451.

Krüger, K., Scholtz, C.H., 1997. Lethal and sublethal effects of ivermectin on the dung-breeding bettles Euoniticellus intermedius (Reiche) and Onitis alexis Klug (Coleoptera, Scarabaeidae). Agric. Ecosyst. Environ. 61, 123–131.

Kusano, M., Tohge, T., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Otsuki, H., Kondou, Y., Goto, H., Kawashima, M., Matsuda, F., Niida, R., Matsui, M., Saito, K., Fernie, A.R., 2011. Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of Arabidopsis to UV-B light. Plant J. 67, 354–369.

Kuzmina, T., 2011. Strongylids (Nematoda: Strongylidae) of domestic horses in Ukraine: modern state of Fauna and structure of the parasite community. Parazitologiia 46, 127–38.

Lacey, E., 1990. Mode of action of benzimidazoles. Parasitol. Today 6, 112–115.

Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., Grønvold, J., Henriksen, S.A., Zorn, A., 1995. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus Duddingtonia flagrans fed to animals under natural grazing conditions. Vet. Parasitol. 60, 321–330.

Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., Dorchies, P., 2003. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. Vet. Parasitol. 110, 77–83.

Laugier, C., Sallé, G., 2015. La résistance aux anthelminthiques chez les nématodes des équidés. Bull. Académie Vét. Fr. 168, 303–313.

Laugier, C., Sevin, C., Ménard, S., Maillard, K., 2012. Prevalence of Parascaris equorum infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant P. equorum populations in France. Vet. Parasitol. 188, 185–189.

Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y.W., Wright, S.H., Knight, P.A., Miller, H.R.P., 2004. Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. Gastroenterology 127, 155–165.

Le Jambre, L.F., Lenane, I.J., Wardrop, A.J., 1999. A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in Haemonchus1Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBankTM database under accession numbers AF182011–AF182013.1. Int. J. Parasitol. 29, 1979–1985.

Leandro, A., Pereira, L., Gonçalves, A.M.M., 2019. Diverse Applications of Marine Macroalgae. Mar. Drugs 18, 17.

Leathwick, D.M., 2013. Managing anthelmintic resistance – Parasite fitness, drug use strategy and the potential for reversion towards susceptibility. Vet. Parasitol. 198, 145–153.

Leathwick, D.M., 2012. Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination. Vet. Parasitol. 186, 93–100.

Lee, D.L., 1966. The structure and composition of the helminth cuticle. Adv. Parasitol. 4, 187–254.

Lee, T.K., Roh, H.-S., Yu, J.S., Baek, J., Lee, S., Ra, M., Kim, S.Y., Baek, K.-H., Kim, K.H., 2017. Pinecone of Pinus koraiensis Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Activating Caspase-3 and its Chemical Constituents. Chem. Biodivers. 14, e1600412.

Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J., Barberger-Gateau, P., 2007. Flavonoid Intake and Cognitive Decline over a 10-Year Period. Am. J. Epidemiol. 165, 1364–1371.

Lewis, L.A., McCourt, R.M., 2004. Green algae and the origin of land plants. Am. J. Bot. 91, 1535–1556.

Li, Z.-J., Zheng, X., Wan, C.-P., Cai, L., Li, Y., Huang, L., Ding, Z.-T., 2016. A new phenolic compound with antioxidant activity from the branches and leaves of Pyrus pashia. Nat. Prod. Res. 30, 1136–1143.

Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Dvojnos, G.M., 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). Vet. Parasitol. 156, 4–161.

Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Krecek, R.C., Gibbons, L.M., 1998. An annotated checklist by genus and species of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostominea) of horses, asses and zebras of the world. Vet. Parasitol. 79, 65–79.

Lignon, J.S., Gonçalves, N.F., Cunha, L.L., Antunes, T.A., Leão, M.S., Camassola, J.L.T., Pellegrin, T.G., Ripoll, P.K., Pappen, F.G., Pinto, D.M., 2021. Anthelmintic resistance in Creole horses in the South of Rio Grande do Sul, Brazil. Arq. Bras. Med. Veterinária E Zootec. 73, 598–604.

Liu, Y.-J., Zhan, J., Liu, X.-L., Wang, Y., Ji, J., He, Q.-Q., 2014. Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis of prospective cohort studies. Clin. Nutr. 33, 59–63.

Loreto, F., Delfine, S., 2000. Emission of Isoprene from Salt-Stressed Eucalyptus globulus Leaves1. Plant Physiol. 123, 1605–1610.

Loukas, A., Hotez, P.J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J.S., Correa-Oliveira, R., Croese, J., Bethony, J.M., 2016. Hookworm infection. Nat. Rev. Dis. Primer 2, 16088.

Love, S., Duncan, J.L., 1992. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. Vet. Parasitol. 44, 127–142.

Love, S., Murphy, D., Mellor, D., 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. Vet. Parasitol. 85, 113–121; discussion 121-122, 215–225.

Lu, H., Wu, L., Liu, L., Ruan, Q., Zhang, X., Hong, W., Wu, S., Jin, G., Bai, Y., 2018. Quercetin ameliorates kidney injury and fibrosis by modulating M1/M2 macrophage polarization. Biochem. Pharmacol. 154, 203–212. htt

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.

Lumaret, J.P., Galante, E., Lumbreras, C., Mena, J., Bertrand, M., Bernal, J.L., Cooper, J.F., Kadiri, N., Crowe, D., 1993. Field Effects of Ivermectin Residues on Dung Beetles. J. Appl. Ecol. 30, 428–436.

Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., 2000a. Larval Cyathostomiasis. Vet. Clin. North Am. Equine Pract., Emerging Infectious Diseases 16, 501–513.

Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., Granstrom, D.E., 1990. Anthelmintic resistance in equids. Resist. Parasites Antiparasit. Drugs Round Table Conf. ICOPA VII Paris 1990 67–80.

Lyons, E.T., Swerczek, T.W., Tolliver, S.C., Bair, H.D., Drudge, J.H., Ennis, L.E., 2000b. Prevalence of selected species of internal parasites in equids at necropsy in central Kentucky (1995-1999). Vet. Parasitol. 92, 51–62.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Drudge, J.H., 1999. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. Vet. Parasitol. 85, 97–112.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A., Collins, S.S., 2010. Critical tests evaluating efficacy of moxidectin against small strongyles in horses from a herd for which reduced activity had been found in field tests in Central Kentucky. Parasitol. Res. 107, 1495–1498.

Lyu, J.I., Ryu, J., Jin, C.H., Kim, D.-G., Kim, J.M., Seo, K.-S., Kim, J.-B., Kim, S.H., Ahn, J.-W., Kang, S.-Y., Kwon, S.-J., 2020. Phenolic Compounds in Extracts of Hibiscus acetosella (Cranberry Hibiscus) and Their Antioxidant and Antibacterial Properties. Molecules 25.

Maclean, J.M., Lewis, D., Holmes, P.H., 1987. The pathogenesis of benzimidazole-resistant and benzimidazole-susceptible strains of Trichostrongylus colubriformis in the Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). J. Helminthol. 61, 179–189.

Madsen, M., Nielsen, B.O., Holter, P., Pedersen, O.C., Jespersen, J.B., Jensen, K.-M.V., Nansen, P., Gronvold, J., 1990. Treating Cattle with Ivermectin: Effects on the Fauna and Decompsition of Dung Pats. J. Appl. Ecol. 27, 1–15.

Maestrini, M., Tava, A., Mancini, S., Salari, F., Perrucci, S., 2019. In Vitro Anthelmintic Activity of Saponins Derived from Medicago spp. Plants against Donkey Gastrointestinal Nematodes. Vet. Sci. 6, 35.

Mahieu, M., 2013. Effects of stocking rates on gastrointestinal nematode infection levels in a goat/cattle rotational stocking system. Vet. Parasitol. 198, 136–144.

Mahon, R., Wardhaugh, K., 1991. Impact of dung from ivermectin-treated sheep on oogenesis and survival of adult Lucilia cuprina. Aust. Vet. J. 68, 173–177.

Maizels, R.M., Bundy, D.A., Selkirk, M.E., Smith, D.F., Anderson, R.M., 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. Nature 365, 797–805.

Maizels, R.M., Hewitson, J.P., Murray, J., Harcus, Y.M., Dayer, B., Filbey, K.J., Grainger, J.R., McSorley, H.J., Reynolds, L.A., Smith, K.A., 2012. Immune modulation and modulators in Heligmosomoides polygyrus infection. Exp. Parasitol. 132, 76–89.

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.

Marjanović, D.S., Trailović, S.M., Milovanović, M., 2021. Interaction of agonists of a different subtype of the nAChR and carvacrol with GABA in Ascaris suum somatic muscle contractions. J. Nematol. 53, e2021-22.

Marjanović, D.S., Zdravković, N., Milovanović, M., Trailović, J.N., Robertson, A.P., Todorović, Z., Trailović, S.M., 2020. Carvacrol acts as a potent selective antagonist of different types of nicotinic acetylcholine receptors and enhances the effect of monepantel in the parasitic nematode Ascaris suum. Vet. Parasitol. 278, 109031.

Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003. The effect of birdsfoot trefoil (Lotus corniculatus) and chicory (Cichorium intybus) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. Vet. Parasitol. 112, 147–155.

Martin-Rosset, W.W., 2012. Nutrition et alimentation des chevaux. Editions Quae.

Martins, N.S., Pinto, D.M., Cunha, L.L. da, Lignon, J.S., Santos, T.C. dos, Evaristo, T.A., Pappen, F.G., Nizoli, L.Q., 2021. Assessment of the efficacy of commercial anthelmintics in horses naturally infected with gastrointestinal nematodes. Med. Veterinária UFRPE 15, 28–32.

Matthee, S., Krecek, R.C., Milne, S.A., Boshoff, M., Guthrie, A.J., 2002. Impact of management interventions on helminth levels, and body and blood measurements in working donkeys in South Africa. Vet. Parasitol. 107, 103–113.

McCavera, S., Rogers, A.T., Yates, D.M., Woods, D.J., Wolstenholme, A.J., 2009. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode Haemonchus contortus. Mol. Pharmacol. 75, 1347–1355.

McCullough, M.L., Peterson, J.J., Patel, R., Jacques, P.F., Shah, R., Dwyer, J.T., 2012. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. Am. J. Clin. Nutr. 95, 454–464.

McDermott, J.R., Bartram, R.E., Knight, P.A., Miller, H.R.P., Garrod, D.R., Grencis, R.K., 2003. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 7761–7766.

McKellar, Q., Jackson, F., 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. Trends Parasitol. 20, 456–461.

McKellar, Q.A., Scott, E.W., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents - a review. J. Vet. Pharmacol. Ther. 13, 223–247.

McKenzie, G.J., Bancroft, A., Grencis, R.K., McKenzie, A.N., 1998. A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. Curr. Biol. CB 8, 339–342.

McRae, K.M., Stear, M.J., Good, B., Keane, O.M., 2015. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. Parasite Immunol. 37, 605–613.

Mehrotra, S., Mishra, K.P., Maurya, R., Srimal, R.C., Singh, V.K., 2002. Immunomodulation by ethanolic extract of Boerhaavia diffusa roots. Int. Immunopharmacol. 2, 987–996.

Merly, L., Smith, S.L., 2017. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? Immunopharmacol. Immunotoxicol. 39, 55–58.

Mfitilodze, M.W., Hutchinson, G.W., 1987. Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. Vet. Parasitol. 23, 121–133.

Michel, J.F., 1976. The Epidemiology and Control of some Nematode Infections in Grazing Animals, in: Dawes, B. (Ed.), Advances in Parasitology. Academic Press, pp. 355–397.

Michel, J.F., 1969. The Epidemiology and Control of Some Nematode Infections of Grazing Animals, in: Dawes, B. (Ed.), Advances in Parasitology. Academic Press, pp. 211–282.

Miclon, M., Courtot, É., Guégnard, F., Lenhof, O., Boudesocque-Delaye, L., Matard-Mann, M., Nyvall Collén, P., Castagnone-Sereno, P., Neveu, C., 2023. The Brown Alga Bifurcaria bifurcata Presents an Anthelmintic Activity on All Developmental Stages of the Parasitic Nematode Heligmosomoides polygyrus bakeri. Pathog. Basel Switz. 12, 540.

Migdal, C., Serres, M., 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. médecine/sciences 27, 405–412.

Miguel, M.G., 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour Fragr. J. 25, 291–312.

Milillo, P., Boeckh, A., Cobb, R., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Bartolini, R., Traversa, D., 2009. Faecal Cyathostomin Egg Count distribution and efficacy of anthelmintics against cyathostomins in Italy: a matter of geography? Parasit. Vectors 2, S4.

Miller, J.A., Lang, J.E., Ley, M., Nagle, R., Hsu, C.-H., Thompson, P.A., Cordova, C., Waer, A., Chow, H.-H.S., 2013. Human Breast Tissue Disposition and Bioactivity of Limonene in Women with Early-Stage Breast Cancer. Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.) 6, 577–584.

Miller, J.E., Horohov, D.W., 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep1. J. Anim. Sci. 84, E124–E132.

Mirza, Z., Soto, E.R., Hu, Y., Nguyen, T.-T., Koch, D., Aroian, R.V., Ostroff, G.R., 2020. Anthelmintic Activity of Yeast Particle-Encapsulated Terpenes. Molecules 25, 2958.

Mithöfer, A., Boland, W., 2012. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. Annu. Rev. Plant Biol. 63, 431–450.

Molan, A.L., Hoskin, S.O., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2000. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. Vet. Rec. 147, 44–48.

Molento, M.B., Prichard, R.K., 1999. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of Haemonchus contortus in jirds (Meriones unguiculatus). Parasitol. Res. 85, 1007–1011.

Morris, M.E., Zhang, S., 2006. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. Life Sci., 78, 2116–2130.

Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. Annu. Rev. Immunol. 7, 145–173.

Nair, M.G., Guild, K.J., Du, Y., Zaph, C., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A., Stevens, S., Karow, M., Artis, D., 2008. Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 181, 4709–4715.

Näreaho, A., Vainio, K., Oksanen, A., 2011. Impaired efficacy of ivermectin against Parascaris equorum, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. Vet. Parasitol. 182, 372–377.

Nath, S., Pal, S., Sanyal, P., Roy, S., Mandal, S., Nayak, Y., 2019. Anthelminthic Activity of Curcuma Longa Ethanolic Extract against Benzimidazole Resistant Gastrointestinal Nematodes in Goats. Int. J. Livest. Res. 1.

Nielsen, M.K., 2022. Anthelmintic resistance in equine nematodes: Current status and emerging trends. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 20, 76–88.

Nielsen, M.K., 2014. Integrated parasite control - how to strike that balance. Proc. 60th Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract. Salt Lake City Utah USA Dec. 6-10 2014 401–406.

Nielsen, M.K., Banahan, M., Kaplan, R.M., 2020. Importation of macrocyclic lactone resistant cyathostomins on a US thoroughbred farm. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 14, 99–104.

Nielsen, M.K., Branan, M.A., Wiedenheft, A.M., Digianantonio, R., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Garber, L.P., Kopral, C.A., Phillippi-Taylor, A.M., Traub-Dargatz, J.L., 2018a. Risk factors associated with strongylid egg count prevalence and abundance in the United States equine population. Vet. Parasitol. 257, 58–68.

Nielsen, M.K., Branan, M.A., Wiedenheft, A.M., Digianantonio, R., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Garber, L.P., Kopral, C.A., Phillippi-Taylor, A.M., Traub-Dargatz, J.L., 2018b. Anthelmintic efficacy against equine strongyles in the United States. Vet. Parasitol. 259, 53–60.

Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J., Olsen, S.N., 2007. Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles:

Implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. Vet. J. 174, 23–32.

Nielsen, M.K., Pfister, K., von Samson-Himmelstjerna, G., 2014a. Selective therapy in equine parasite control--application and limitations. Vet. Parasitol. 202, 95–103.

Nielsen, M.K., Reinemeyer, C.R., Donecker, J.M., Leathwick, D.M., Marchiondo, A.A., Kaplan, R.M., 2014b. Anthelmintic resistance in equine parasites—Current evidence and knowledge gaps. Vet. Parasitol., SpeciaI Issue: Antiparasitic Drug Use and Resistance in Cattle, Small Ruminants and Equines in the United States - Current Status and Global Perspectives 204, 55–63.

Nielsen, M.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Kuzmina, T.A., van Doorn, D.C.K., Meana, A., Rehbein, S., Elliott, T., Reinemeyer, C.R., 2022. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): Third edition of guideline for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. Vet. Parasitol. 303, 109676.

Njue, A.I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X.-P., Prichard, R.K., 2004. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel α3 and β subunits from ivermectin-resistant Cooperia oncophora affect agonist sensitivity. J. Neurochem. 89, 1137–1147.

Notari, L., Riera, D.C., Sun, R., Bohl, J.A., McLean, L.P., Madden, K.B., Rooijen, N. van, Vanuytsel, T., Jr, J.F.U., Zhao, A., Shea-Donohue, T., 2014. Role of Macrophages in the Altered Epithelial Function during a Type 2 Immune Response Induced by Enteric Nematode Infection. PLOS ONE 9, e84763.

Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A.A., Alka, O., Allard, P.-M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo-Rodriguez, A.M., Da Silva, R.R., Dang, T., Garg, N., Gauglitz, J.M., Gurevich, A., Isaac, G., Jarmusch, A.K., Kameník, Z., Kang, K.B., Kessler, N., Koester, I., Korf, A., Le Gouellec, A., Ludwig, M., Martin H., C., McCall, L.-I., McSayles, J., Meyer, S.W., Mohimani, H., Morsy, M., Moyne, O., Neumann, S., Neuweger, H., Nguyen, N.H., Nothias-Esposito, M., Paolini, J., Phelan, V.V., Pluskal, T., Quinn, R.A., Rogers, S., Shrestha, B., Tripathi, A., Van Der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Weldon, K.C., Witting, M., Yang, H., Zhang, Z., Zubeil, F., Kohlbacher, O., Böcker, S., Alexandrov, T., Bandeira, N., Wang, M., Dorrestein, P.C., 2020. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. Nat. Methods 17, 905–908.

O'Doherty, J.V., Dillon, S., Figat, S., Callan, J.J., Sweeney, T., 2010. The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from Laminaria spp. on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 157, 173–180.

Ogbourne, C.P., 1978. Pathogenesis of Cyathostome (Trichonema) Infections of the Horse: A Review. Commonwealth Agricultural Bureaux.

Ogbourne, C.P., 1976. The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. J. Helminthol. 50, 203–214.

Ohno, M., Kimura, M., Miyazaki, H., Okawa, K., Onuki, R., Nemoto, C., Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Nukina, N., Bauer, P.O., Oyama, F., 2016.

Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. Sci. Rep. 6, 37756.

Ohtsu, A., Shibutani, Y., Seno, K., Iwata, H., Kuwayama, T., Shirasuna, K., 2017. Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6 secretion via the RAGE/TLR4-NF-κB-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages. Exp. Ther. Med. 14, 4363–4370.

Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 55, 315–327.

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.

Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. Vet. Rec. 152, 600–601.

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.

Papada, E., Gioxari, A., Brieudes, V., Amerikanou, C., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., Smyrnioudis, I., Kaliora, A.C., 2018. Bioavailability of Terpenes and Postprandial Effect on Human Antioxidant Potential. An Open-Label Study in Healthy Subjects. Mol. Nutr. Food Res. 62, 1700751.

Papalexi, E., Satija, R., 2018. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. Nat. Rev. Immunol. 18, 35–45.

Papini, R.A., Orsetti, C., Sgorbini, M., 2020. Evaluation of a Marketed Polyherbal Dewormer Against Intestinal Strongyles in Naturally Infected Donkeys. Helminthologia 57, 78–82.

Paterson, J.C.M., Garside, P., Kennedy, M.W., Lawrence, C.E., 2002. Modulation of a heterologous immune response by the products of Ascaris suum. Infect. Immun. 70, 6058–6067.

Payne, S.E., Flematti, G.R., Reeder, A., Kotze, A.C., Durmic, Z., Vercoe, P.E., 2018. Procyanidin A2 in the Australian plant Alectryon oleifolius has anthelmintic activity against equine cyathostomins in vitro. Vet. Parasitol. 249, 63–69.

Payne, S.E., Kotze, A.C., Durmic, Z., Vercoe, P.E., 2013. Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins in vitro. Vet. Parasitol. 196, 153–160.

Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Matthews, J.B., Burden, F.A., Behnke, J.M., Hodgkinson, J.E., 2016. Papaya latex supernatant has a potent effect on the free-living stages of equid cyathostomins in vitro. Vet. Parasitol. 228, 23–29.

Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Matthews, J.B., Burden, F.A., Lespine, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J., Hodgkinson, J.E., 2017. P-glycoproteins play a role in ivermectin resistance in cyathostomins. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 7, 388–398.

Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Matthews, J.B., Burden, F.A., Mulugeta, G., Scantlebury, C.E., Hodgkinson, J.E., 2015. An evidence-based approach to the evaluation of

ethnoveterinary medicines against strongyle nematodes of equids. Vet. Parasitol. 210, 40–52.

Peña-Espinoza, M., Boas, U., Williams, A.R., Thamsborg, S.M., Simonsen, H.T., Enemark, H.L., 2015. Sesquiterpene lactone containing extracts from two cultivars of forage chicory (Cichorium intybus) show distinctive chemical profiles and in vitro activity against Ostertagia ostertagi. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 5, 191–200.

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.

Peña-Espinoza, M., Valente, A.H., Thamsborg, S.M., Simonsen, H.T., Boas, U., Enemark, H.L., López-Muñoz, R., Williams, A.R., 2018. Antiparasitic activity of chicory (Cichorium intybus) and its natural bioactive compounds in livestock: a review. Parasit. Vectors 11, 475.

Peña-Espinoza, M., Williams, A.R., Thamsborg, S.M., Simonsen, H.T., Enemark, H.L., 2017. Anthelmintic effects of forage chicory (Cichorium intybus) against free-living and parasitic stages of Cooperia oncophora. Vet. Parasitol. 243, 204–207.

Peregrine, A.S., McEwen, B., Bienzle, D., Koch, T.G., Weese, J.S., 2006. Larval cyathostominosis in horses in Ontario: An emerging disease? Can. Vet. J. 47, 80–82.

Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? Vet. Parasitol. 201, 1–8.

Pérez-Lloréns, J.L., Critchley, A.T., Cornish, M.L., Mouritsen, O.G., 2023. Saved by seaweeds (II): Traditional knowledge, home remedies, medicine, surgery, and pharmacopoeia. J. Appl. Phycol.

Perkins, G.A., Wagner, B., 2015. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. Equine Vet. J. 47, 267–274.

Poissant, J., Gavriliuc, S., Bellaw, J., Redman, E.M., Avramenko, R.W., Robinson, D., Workentine, M.L., Shury, T.K., Jenkins, E.J., McLoughlin, P.D., Nielsen, M.K., Gilleard, J.S., 2021. A repeatable and quantitative DNA metabarcoding assay to characterize mixed strongyle infections in horses. Int. J. Parasitol. 51, 183–192.

Poynter, D., 1959. Control of worm infestation. Comparative efficiency of modern compounds. Br. Raceh. 11, 241–245.

Poynter, D., Hughes, D.L., 1958. Phenothiazine and piperazine, an efficient anthelmintic mixture for horses. Vet. Rec. 70, 1183–1188.

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement. Altern. Med. 6, 1–8.

Prasanna, V.K., Venkatesh, Y.P., 2015. Characterization of onion lectin (Allium cepa agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. Int. Immunopharmacol. 26, 304–313.

Puri, A., Saxena, R., Saxena, R.P., Saxena, K.C., Srivastava, V., Tandon, J.S., 1993. Immunostimulant agents from Andrographis paniculata. J. Nat. Prod. 56, 995–999.

Puttachary, S., Trailovic, S.M., Robertson, A.P., Thompson, D.P., Woods, D.J., Martin, R.J., 2013. Derquantel and abamectin: Effects and interactions on isolated tissues of Ascaris suum. Mol. Biochem. Parasitol. 188, 79–86.

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.

R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Rao, V.T.S., Siddiqui, S.Z., Prichard, R.K., Forrester, S.G., 2009. A dopamine-gated ion channel (HcGGR3*) from Haemonchus contortus is expressed in the cervical papillae and is associated with macrocyclic lactone resistance. Mol. Biochem. Parasitol. 166, 54–61.

Raza, A., Kopp, S.R., Jabbar, A., Kotze, A.C., 2015. Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of Haemonchus contortus to anthelmintics in vitro. Vet. Parasitol. 211, 80–88.

Raza, A., Qamar, A.G., Hayat, K., Ashraf, S., Williams, A.R., 2019. Anthelmintic resistance and novel control options in equine gastrointestinal nematodes. Parasitology 146, 425–437.

Reese, T.A., Liang, H.-E., Tager, A.M., Luster, A.D., Van Rooijen, N., Voehringer, D., Locksley, R.M., 2007. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature 447, 92–96.

Reinemeyer, C.R., Smith, S.A., Gabel, A.A., Herd, R.P., 1984. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. Vet. Parasitol. 15, 75–83.

Relf, V.E., Lester, H.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B., 2014. Anthelmintic efficacy on UK Thoroughbred stud farms. Int. J. Parasitol. 44, 507–514.

Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B., 2013. Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. Parasitology 140, 641–652.

Reynolds, L.A., Smith, K.A., Filbey, K.J., Harcus, Y., Hewitson, J.P., Redpath, S.A., Valdez, Y., Yebra, M.J., Finlay, B.B., Maizels, R.M., 2014. Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract. Gut Microbes 5, 522–532.

Ridsdill-Smith, T.J., 1988. Survival and Reproduction of Musca Vetustissima Walker (diptera: Muscidae) and a Scarabaeine Dung Beetle in Dung of Cattle Treated with Avermectin B1. Aust. J. Entomol. 27, 175–178.

Robertson, S.J., Pennington, A.J., Evans, A.M., Martin, R.J., 1994. The action of pyrantel as an agonist and an open channel blocker at acetylcholine receptors in isolated Ascaris suum muscle vesicles. Eur. J. Pharmacol. 271, 273–282.

Rohmer, M., 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants†. Nat. Prod. Rep. 16, 565–574.

Roma, E.H., Macedo, J.P., Goes, G.R., Gonçalves, J.L., Castro, W. de, Cisalpino, D., Vieira, L.Q., 2016. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. Parasit. Vectors 9, 193.

Romagnani, S., 1999. Th1/Th2 cells. Inflamm. Bowel Dis. 5, 285–294.

Römbke, J., Coors, A., Fernández, Á.A., Förster, B., Fernández, C., Jensen, J., Lumaret, J.-P., Cots, M.Á.P., Liebig, M., 2010. Effects of the parasiticide ivermectin on the structure

and function of dung and soil invertebrate communities in the field (Madrid, Spain). Appl. Soil Ecol. 45, 284–292.

Rosales, M.C., M, I.M., López-Collado, J., Vargas-Mendoza, M., González-Hernández, H., Fajersson, P., 2012. Effect of ivermectin on the survival and fecundityb of Euoniticellus intermedius (Coleoptera: Scarabaeidae). Rev. Biol. Trop. 60, 333–345.

Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M.J., Hauschildt, S., 2011. LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. Crit. Rev. Immunol. 31, 379–446.

Rouers, A., Jeger-Madiot, R., Moris, A., Graff-Dubois, S., 2017. Lymphocytes T folliculaires helper et VIH - Unis pour le meilleur et pour le pire. médecine/sciences 33, 878–886.

Rynkiewicz, E.C., Pedersen, A.B., Fenton, A., 2015. An ecosystem approach to understanding and managing within-host parasite community dynamics. Trends Parasitol. 31, 212–221.

Sales, N., Love, S., 2016. Resistance of Haemonchus sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. Vet. Parasitol. 228, 193–196.

Sallé, G., Courtot, É., Cabau, C., Parrinello, H., Serreau, D., Reigner, F., Gesbert, A., Jacquinot, L., Lenhof, O., Aimé, A., Picandet, V., Kuzmina, T., Holovachov, O., Bellaw, J., Nielsen, M.K., Samson-Himmelstjerna, G. von, Valière, S., Gislard, M., Lluch, J., Kuchly, C., Klopp, C., 2023. Spatio-temporal diversity and genetic architecture of pyrantel resistance in Cylicocyclus nassatus, the most abundant horse parasite.

Sallé, G., Deiss, V., Marquis, C., Tosser-Klopp, G., Cortet, J., Serreau, D., Koch, C., Marcon, D., Bouvier, F., Jacquiet, P., Blanchard, A., Mialon, M.-M., Moreno-Romieux, C., 2021. Genetic × environment variation in sheep lines bred for divergent resistance to strongyle infection. Evol. Appl. 14, 2591–2602.

Sallé, G., Guillot, J., Tapprest, J., Foucher, N., Sevin, C., Laugier, C., 2020. Compilation of 29 years of postmortem examinations identifies major shifts in equine parasite prevalence from 2000 onwards. Int. J. Parasitol. 50, 125–132.

Sallé, G., Jacquiet, P., Gruner, L., Cortet, J., Sauvé, C., Prévot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Schibler, L., Tircazes, A., François, D., Pery, C., Bouvier, F., Thouly, J.C., Brunel, J.C., Legarra, A., Elsen, J.M., Bouix, J., Rupp, R., Moreno, C.R., 2012. A genome scan for QTL affecting resistance to Haemonchus contortus in sheep1. J. Anim. Sci. 90, 4690–4705.

Sallé, G., Laing, R., Cotton, J.A., Maitland, K., Martinelli, A., Holroyd, N., Tracey, A., Berriman, M., Smith, W.D., Newlands, G.F.J., Hanks, E., Devaney, E., Britton, C., 2018. Transcriptomic profiling of nematode parasites surviving vaccine exposure. Int. J. Parasitol., Molecular and cellular biology of helminth parasites XI 48, 395–402.

Saltveit, M.E., 2017. Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds, in: Fruit and Vegetable Phytochemicals. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 115–124.

Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., Gonzalez-Paramas, A.M., 2012. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds, in: Sarker, S.D., Nahar, L. (Eds.), Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 427–464.

Scales, G.H., Knight, T.L., Saville, D.J., 1995. Effect of herbage species and feeding level on internal parasites and production performance of grazing lambs. N. Z. J. Agric. Res. 38, 237–247.

Schuh, G., Heiden, A.C., Hoffmann, Th., Kahl, J., Rockel, P., Rudolph, J., Wildt, J., 1997. Emissions of Volatile Organic Compounds from Sunflower and Beech: Dependence on Temperature and Light Intensity. J. Atmospheric Chem. 27, 291–318.

Selkirk, M.E., Smith, V.P., Thomas, G.R., Gounaris, K., 1998. Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. Int. J. Parasitol. 28, 1315–1332.

Sen, T., Samanta, S.K., 2015. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 147, 59–110.

Shalaby, H.A., 2013. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? Iran. J. Parasitol. 8, 18–32.

Sharifi-Rad, M., Mnayer, D., Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N.P., Bezerra, C.F., Coutinho, H.D.M., Salehi, B., Martorell, M., Del Mar Contreras, M., Soltani-Nejad, A., Uribe, Y.A.H., Yousaf, Z., Iriti, M., Sharifi-Rad, J., 2018. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. Phytother. Res. 32, 1653–1663.

Sharma, K., Porat, Z., Gedanken, A., 2021. Designing Natural Polymer-Based Capsules and Spheres for Biomedical Applications—A Review. Polymers 13, 4307.

Shepherd, C., 2017. Exploring low molecular weight molecules produced by hookworms (Ancylostoma caninum) and their use as anti-inflammatory agents (phd). James Cook University.

Sheriff, J.C., Kotze, A.C., Sangster, N.C., Martin, R.J., 2002. Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in Trichostrongylus colubriformis in vitro. Parasitology 125, 477–484.

Sleigh, J.N., 2010. Functional analysis of nematode nicotinic receptors. Biosci. Horiz. Int. J. Stud. Res. 3, 29–39.

Smets, K., Shaw, D.J., Deprez, P., Vercruysse, J., 1999. Diagnosis of larval cyathostominosis in horses in Belgium. Vet. Rec. 144, 665–668. ht

Smith, T., Kawa, K., Eckl, V., Morton, C., Stredney, R., 2018. Herbal Supplement Sales in US Increase 8.5% in 2017, Topping $8 Billion. Strongest sales growth in more than 15 years bolstered by continued popularity of Ayurvedic herbs and new formulations of botanicals with general health and nutrition benefits. HerbalGram 62–71.

Sobral, M.V., Xavier, A.L., Lima, T.C., de Sousa, D.P., 2014. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. Sci. World J. 2014, e953451.

Sorobetea, D., Svensson-Frej, M., Grencis, R., 2018. Immunity to gastrointestinal nematode infections. Mucosal Immunol. 11, 304–315.

Soto, E.R., Rus, F., Mirza, Z., Ostroff, G.R., 2023. Yeast Particles for Encapsulation of Terpenes and Essential Oils. Mol. Basel Switz. 28, 2273.

Southwood, L., Baxter, G., Bennett, D.G., Ragle, C., 1998. Ascarid impaction in young horses. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 20, 100–106.

Souza, V.M.O., Jacysyn, J.F., Macedo, M.S., 2004. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from Ascaris suum. Cytokine 28, 92–100.

Srivastava, J.K., Pandey, M., Gupta, S., 2009. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. Life Sci. 85, 663–669.

Srivastava, S., Srivastava, A.K., 2013. Biotechnology and Genetic Engineering for Alkaloid Production. Nat. Prod. 213–250.

Stear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C., 1999. Mechanisms underlying resistance to nematode infection. Int. J. Parasitol., Second International Conference Novel Approaches to the Control of the Helminth Parasites of Livestock 29, 51–56.

Strauch, S., Wichert, B., Greef, J.M., Hillegeist, D., Zeyner, A., Liesegang, A., 2017. Evaluation of an in vitro system to simulate equine foregut digestion and the influence of acidity on protein and fructan degradation in the horse's stomach. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 101, 51–58.

Štrbac, F., Bosco, A., Maurelli, M.P., Ratajac, R., Stojanović, D., Simin, N., Orčić, D., Pušić, I., Krnjajić, S., Sotiraki, S., Saralli, G., Cringoli, G., Rinaldi, L., 2022. Anthelmintic Properties of Essential Oils to Control Gastrointestinal Nematodes in Sheep—In Vitro and In Vivo Studies. Vet. Sci. 9, 93.

Strong, L., Wall, R., Woolford, A., Djeddour, D., 1996. The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonisation of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses. Vet. Parasitol. 62, 253–266.

Sunil, M.A., Sunitha, V.S., Santhakumaran, P., Mohan, M.C., Jose, M.S., Radhakrishnan, E.K., Mathew, J., 2021. Protective effect of (+)-catechin against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells through downregulation of NF-κB and p38 MAPK. Inflammopharmacology 29, 1139–1155.

Svetić, A., Madden, K.B., Zhou, X.D., Lu, P., Katona, I.M., Finkelman, F.D., Urban, J.F., Gause, W.C., 1993. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. J. Immunol. Baltim. Md 1950 150, 3434–3441.

Swerdlow, J.L., 2000. Nature's Medicine: Plants that Heal: A chronicle of mankind's search for healing plants through the ages. National Geographic, Washington, D.C.

Taki, A.C., Brkljača, R., Wang, T., Koehler, A.V., Ma, G., Danne, J., Ellis, S., Hofmann, A., Chang, B.C.H., Jabbar, A., Urban, S., Gasser, R.B., 2020. Natural Compounds from the Marine Brown Alga Caulocystis cephalornithos with Potent In Vitro-Activity against the Parasitic Nematode Haemonchus contortus. Pathog. Basel Switz. 9, 550.

Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., Xiong, L., 2019. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. BioMed Res. Int. 2019, 7039802.

Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S., 2009. Anthelmintic activity of extracts of Artemisia absinthium against ovine nematodes. Vet. Parasitol. 160, 83–88.

Tatz, A.J., Segev, G., Steinman, A., Berlin, D., Milgram, J., Kelmer, G., 2012. Surgical treatment for acute small intestinal obstruction caused by Parascaris equorum infection in 15 horses (2002–2011). Equine Vet. J. 44, 111–114.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2013. Veterinary Parasitology. John Wiley & Sons.

Telford, G., Wheeler, D.J., Appleby, P., Bowen, J.G., Pritchard, D.I., 1998. Heligmosomoides polygyrus immunomodulatory factor (IMF), targets T-lymphocytes. Parasite Immunol. 20, 601–611.

Tetali, S.D., 2019. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. Planta 249, 1–8.

Thamsborg, S.M., Jørgensen, R.J., Waller, P.J., Nansen, P., 1996. The influence of stocking rate on gastrointestinal nematode infections of sheep over a 2-year grazing period. Vet. Parasitol. 67, 207–224.

Thomas, C., Tampé, R., 2020. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. Annu. Rev. Biochem. 89, 605–636. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105201

Tian, C., Shao, Y., Jin, Z., Liang, Y., Li, C., Qu, C., Sun, S., Cui, C., Liu, M., 2022. The protective effect of rutin against lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice based on the pharmacokinetic and pharmacodynamic combination model. J. Pharm. Biomed. Anal. 209, 114480.

Torres-Acosta, J.F.J., Jacobs, D.E., Aguilar-Caballero, A., Sandoval-Castro, C., May-Martinez, M., Cob-Galera, L.A., 2004. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. Vet. Parasitol. 124, 217–238.

Torres-Acosta, J.F.J., Jacobs, D.E., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., 2006. Improving resilience against natural gastrointestinal nematode infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. Vet. Parasitol. 135, 163–173.

Toscan, G., Cezar, A.S., Pereira, R.C.F., Silva, G.B., Sangioni, L.A., Oliveira, L.S.S., Vogel, F.S.F., 2012. Comparative performance of macrocyclic lactones against large strongyles in horses. Parasitol. Int. 61, 550–553.

Trailovic, S.M., Rajkovic, M., Marjanovic, D.S., Neveu, C., Charvet, C.L., 2021. Action of Carvacrol on Parascaris sp. and Antagonistic Effect on Nicotinic Acetylcholine Receptors. Pharm. Basel Switz. 14, 505.

Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'Espois, M., 2012. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. Vet. Parasitol. 188, 294–300.

Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schürmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Boeckh, A., Cobb, R., 2009. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. Parasit. Vectors 2, S2.

Tresserra-Rimbau, A., Guasch-Ferré, M., Salas-Salvadó, J., Toledo, E., Corella, D., Castañer, O., Guo, X., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Fitó, M., Babio, N., Martínez-González, M.A., Sorli, J.V., López-Sabater, M.C., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., 2016. Intake of Total Polyphenols and Some

Classes of Polyphenols Is Inversely Associated with Diabetes in Elderly People at High Cardiovascular Disease Risk123. J. Nutr. 146, 767–777.

Tritten, L., Silbereisen, A., Keiser, J., 2011. In Vitro and In Vivo Efficacy of Monepantel (AAD 1566) against Laboratory Models of Human Intestinal Nematode Infections. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1457.

Tu, Y., 2011. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. Nat. Med. 17, 1217–1220.

Tydén, E., Skarin, M., Höglund, J., 2014. Gene expression of ABC transporters in Cooperia oncophora after field and laboratory selection with macrocyclic lactones. Mol. Biochem. Parasitol. 198, 66–70.

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.

Valente, A.H., de Roode, M., Ernst, M., Peña-Espinoza, M., Bornancin, L., Bonde, C.S., Martínez-Valladares, M., Ramünke, S., Krücken, J., Simonsen, H.T., Thamsborg, S.M., Williams, A.R., 2021. Identification of compounds responsible for the anthelmintic effects of chicory (Cichorium intybus) by molecular networking and bio-guided fractionation. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 15, 105–114.

van den Anker, J., Reed, M.D., Allegaert, K., Kearns, G.L., 2018. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. J. Clin. Pharmacol. 58, S10–S25.

Van Dyken, S.J., Mohapatra, A., Nussbaum, J.C., Molofsky, A.B., Thornton, E.E., Ziegler, S.F., McKenzie, A.N.J., Krummel, M.F., Liang, H.-E., Locksley, R.M., 2014. Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and γδ T cells. Immunity 40, 414–424.

Vannella, K.M., Ramalingam, T.R., Hart, K.M., de Queiroz Prado, R., Sciurba, J., Barron, L., Borthwick, L.A., Smith, A.D., Mentink-Kane, M., White, S., Thompson, R.W., Cheever, A.W., Bock, K., Moore, I., Fitz, L.J., Urban, J.F., Wynn, T.A., 2016. Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. Nat. Immunol. 17, 538–544.

Vassilieva, L.L., Hook, A.M., Lynch, M., 2000. The fitness effects of spontaneous mutations in Caenorhabditis elegans. Evol. Int. J. Org. Evol. 54, 1234–1246.

Vertzoni, M., Augustijns, P., Grimm, M., Koziolek, M., Lemmens, G., Parrott, N., Pentafragka, C., Reppas, C., Rubbens, J., Van Den Abeele, J., Vanuytsel, T., Weitschies, W., Wilson, C.G., 2019. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An UNGAP review. Eur. J. Pharm. Sci. 134, 153–175.

Víctor Álvarez, C., Hernández, J., WingChing, R., 2007. Eficacia de aserrines para inhibir el desarrollo in vitro de larvas de parásitos gastrointestinales de ovinos. Agron. Costarric. 31, 71–75.

Villa-Mancera, A., Aldeco-Pérez, M., Molina-Mendoza, P., Hernández-Guzmán, K., Figueroa-Castillo, J.A., Reynoso-Palomar, A., 2021. Prevalence and risk factors of gastrointestinal nematode infestation of horses, donkeys and mules in tropical, dry and temperate regions in Mexico. Parasitol. Int. 81, 102265.

Voehringer, D., 2011. Basophils in immune responses against helminths. Microbes Infect. 13, 881–887.

von Samson-Himmelstjerna, G., 2012. Anthelmintic resistance in equine parasites – detection, potential clinical relevance and implications for control. Vet. Parasitol., Special Issue: Equine Drug Resistance 185, 2–8.

von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schürmann, S., Rohn, K., Schnieder, T., Epe, C., 2007. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of Parascaris equorum egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. Vet. Parasitol. 144, 74–80.

Vorburger, C., Perlman, S.J., 2018. The role of defensive symbionts in host–parasite coevolution. Biol. Rev. 93, 1747–1764. ht

Wagner, B., Burton, A., Ainsworth, D., 2010. Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. Vet. Res. 41, 47.

Wall, R., Strong, L., 1987. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. Nature 327, 418–421.

Waller, P.J., Donald, A.D., Dobson, R.J., Lacey, E., Hennessy, D.R., Allerton, G.R., Prichard, R.K., 1989. Changes in anthelmintic resistance status of Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis exposed to different anthelmintic selection pressures in grazing sheep. Int. J. Parasitol. 19, 99–110.

Walshe, N., Duggan, V., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P., Feehan, O., Mulcahy, G., 2019. Removal of adult cyathostomins alters faecal microbiota and promotes an inflammatory phenotype in horses. Int. J. Parasitol. 49, 489–500.

Walshe, N., Mulcahy, G., Crispie, F., Cabrera-Rubio, R., Cotter, P., Jahns, H., Duggan, V., 2021. Outbreak of acute larval cyathostominosis - A “perfect storm” of inflammation and dysbiosis. Equine Vet. J. 53, 727–739.

Wan, M.L.Y., Co, V.A., El-Nezami, H., 2021. Dietary polyphenol impact on gut health and microbiota. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61, 690–711. htt

Wang, F., Kong, W., Wong, G., Fu, L., Peng, R., Li, Z., Yao, Q., 2016. AtMYB12 regulates flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana. Mol. Genet. Genomics 291, 1545–1559.

Wang, L., Jiang, Y., Yaseen, A., Li, F., Chen, B., Shen, X.-F., Zheng, C., Zhang, G.-L., Wang, M.-K., 2021. Steroidal alkaloids from the bulbs of Fritillaria pallidiflora Schrenk and their anti-inflammatory activity. Bioorganic Chem. 112, 104845.

Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P,

C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Linington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nat. Biotechnol. 34, 828–837.

Wang, X., Liu, R., Zhang, W., Zhang, X., Liao, N., Wang, Z., Li, W., Qin, X., Hai, C., 2013. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. Mol. Cell. Endocrinol. 376, 70–80.

Wang, Z.-M., Zhao, D., Nie, Z.-L., Zhao, H., Zhou, B., Gao, W., Wang, L.-S., Yang, Z.-J., 2014. Flavonol intake and stroke risk: A meta-analysis of cohort studies. Nutrition 30, 518–523.

Wardhaugh, K.G., Rodriguez-Menendez, H., 1988. The effects of the antiparasitic drug, ivermectin, on the development and survival of the dung-breeding fly, Orthelia cornicina (F.) and the scarabaeine dung beetles, Copris hispanus L., Bubas bubalus (Oliver) and Onitis belial F. J. Appl. Entomol. 106, 381–389.

White, S.R., Sottos, N.R., Geubelle, P.H., Moore, J.S., Kessler, M.R., Sriram, S.R., Brown, E.N., Viswanathan, S., 2001. Autonomic healing of polymer composites. Nature 409, 794–797.

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.

Whittaker, J.H., Carlson, S.A., Jones, D.E., Brewer, M.T., 2017. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. J. Vet. Pharmacol. Ther. 40, 105–115.

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.

Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J., 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of Haemonchus contortus. Mol. Biochem. Parasitol. 180, 99–105.

Xiao, J.B., Högger, P., 2015. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. Curr. Med. Chem. 22, 23–38.

Yamada, T., Tani, Y., Nakanishi, H., Taguchi, R., Arita, M., Arai, H., 2011. Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice. FASEB J. 25, 561–568.

Zamora-Ros, R., Forouhi, N.G., Sharp, S.J., González, C.A., Buijsse, B., Guevara, M., van der Schouw, Y.T., Amiano, P., Boeing, H., Bredsdorff, L., Fagherazzi, G., Feskens, E.J., Franks, P.W., Grioni, S., Katzke, V., Key, T.J., Khaw, K.-T., Kühn, T., Masala, G., Mattiello, A., Molina-Montes, E., Nilsson, P.M., Overvad, K., Perquier, F., Redondo, M.L., Ricceri, F., Rolandsson, O., Romieu, I., Roswall, N., Scalbert, A., Schulze, M., Slimani, N., Spijkerman, A.M.W., Tjonneland, A., Tormo, M.J., Touillaud, M., Tumino, R., van der A, D.L., van Woudenbergh, G.J., Langenberg, C., Riboli, E., Wareham, N.J., 2014. Dietary Intakes of Individual Flavanols and Flavonols Are Inversely Associated with Incident Type 2 Diabetes in European Populations1, 2, 3. J. Nutr. 144, 335–343.

Zandalinas, S.I., Balfagón, D., Gómez-Cadenas, A., Mittler, R., 2022. Plant responses to climate change: metabolic changes under combined abiotic stresses. J. Exp. Bot. 73, 3339–3354.

Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E.A., Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., Eckmann, L., Karin, M., Artis, D., 2007. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. Nature 446, 552–556.

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H., Bahadar, K., 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microb. Pathog. 124, 198–202.

Zepka, L.Q., Nascimento, T.C.D., Jacob-Lopes, E., 2021. Bioactive Compounds: Biosynthesis, Characterization and Applications. BoD – Books on Demand.

Zhang, J., Zheng, Y., Luo, Y., Du, Y., Zhang, X., Fu, J., 2019. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF-κB pathways in BV2 cells. Mol. Immunol. 116, 29–37.

Zhang, X., Niu, M., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, Y., Yuan, Y., Jia, Y., Xiao, Y., Li, Y., Fang, L., Zeng, S., Ma, G., 2019. Identification and functional characterization of three new terpene synthase genes involved in chemical defense and abiotic stresses in Santalum album. BMC Plant Biol. 19, 115.

Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R.J., Kim, Y.-K., Chen, N.Y., Cohn, L., Hamid, Q., Elias, J.A., 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. Science 304, 1678–1682.

Annexes

Tableau S1_Tests *in vitro* d'activité anthelminthique des plantes

Plante, MbS ou huile essentielle	Parasite étudié	Test réalisé	Concentration testée	Résultat observé	Référence
Acétate de carvacrol	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	1 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 26,2 ± 1,2% des œufs	Andre et al., 2016
		Test d'inhibition du développement larvaire	1 mg/mL	Inhibition de 97,7 ± 0,3% du développement	
Acétate de thymol	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	1 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 7,5±1,0% des œufs	Andre et al., 2017
		Test d'inhibition du développement larvaire	4 mg/mL	Inhibition de 99,3±0,2% du développement	
Anethole	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,070 (0,068 – 0,076) LC50 = 0,070 (0,068-0,076)	Katiki et al., 2014
Carapa guianensis	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 2,03 × 10−6 (3,78 × 10−17–4,86 × 10−4)	Carvalho et al., 2012
		Test d'inhibition du développement larvaire	LC50	LC50 = 17,65 (7,39–93,01) mg/mL	
Carvacrol	*C. elegans*	Test d'inhibition de l'éclosion	1,2 mM	Inhibitionde l'éclosion de 50% des œufs	Hernando et al., 2019
		Test de mortalité	50 µg/mL	6,9 ± 9,1 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
	H. contortus	Test d'inhibition de l'éclosion	1 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 99,7 ± 0,1% des œufs	Andre et al., 2016
			5 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 100% des œufs	Zhu et al., 2013
			IC50	IC50 = 186 µg/mL	Silva et al., 2018
			LC50	LC50 = 0,11 (0,10 – 0,12)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,11 (0,107-0,125)	Katiki et al., 2017
		Test d'inhibition de la migration larvaire	5 mg/mL	Inhibition de 89,67 ± 4,72% de la migration	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition du développement larvaire	1 mg/mL	Inhibition de 99,5 ± 0,1% du développement	Andre et al., 2016
			5 mg/mL	Inhibition de 96,5% du développement	Zhu et al., 2013
Carvone	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,085 (0,081 – 0,088)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,085 (0,081-0,088)	Katiki et al., 2017
Cinamaldéhyde	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,018 (0,017 – 0,019)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,018 (0,017-0,019)	Katiki et al., 2017
Citronellol	*C. elegans*	Test de mortalité	50 µg/mL	83,6 ± 10,9 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
Combinaison de linalool et estragole (1:1)	*NGIs de mouton*	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 29,5 ± 2,65% des œufs	Štrbac et al., 2022
Eucalyptol	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 4,74 (3,28 – 9,04)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 4,74 (3,281-9,044)	Katiki et al., 2017
Eugenol	*C. elegans*	Test d'inhibition de l'éclosion	1,2 mM	Inhibitionde l'éclosion de 20% des œufs	Hernando et al., 2019
		Test de mortalité	(50 mg/mL)	82,8 ± 11,8 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
		Test de létalité	ED50	ED50 = 62,1 µg/mL	Asha et al., 2001
	H. contortus	Test d'inhibition de l'éclosion	0,50%	Inhibition de l'éclosion de 100% des œufs	Pessoa et al., 2002
			LC50	LC50 = 0,57 (0,53 – 0,62)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,57 (0,537-0,623)	Katiki et al., 2017
Farnésol	*C. elegans*	Test de mortalité	50 µg/mL	77,0 ± 7,1 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
Géraniol	*C. elegans*	Test de mortalité	50 µg/mL	81,1 ± 8,5 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
Huile essentielle de l'achillée millefeuille (*Achillea millefolium*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 46,5 ± 3,0% des œufs	Štrbac et al., 2022

Huile essentielle de *Arisaema franchetianum*	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	5 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 89,67 ± 4,72% des œufs	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition de la migration larvaire	5 mg/mL	Inhibition de 50,2% de la migration	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition du développement larvaire	5 mg/mL	Inhibitionde 86,4 ± 4,39% du développement	Zhu et al., 2013
Huile essentielle de *Arisaema lobatum*	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	5 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 100% des œufs	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition de la migration larvaire	5 mg/mL	Inhibitionde 93,5% de la migration	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition du développement larvaire	5 mg/mL	Inhibitionde 99,6 ± 0,89% du développement	Zhu et al., 2013
Huile essentielle de fenouil (*Foeniculum vulgare*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 100% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle d'immortelle des sables (*Helichrysum arenarium*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 59,8 ± 0,96% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle de Genévrier commun (*Juniperus communis*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 81,0 ± 1,63% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle de Menthe poivrée (*Mentha x piperita*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 72,5 ± 1,29% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 100% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle de sariette d'été (*Satureja hortensis*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 99,3 ± 0,96% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle de sarriette des montagnes (*Satureja montana*)	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 100% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*)	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	IC50	IC50 = 0,436 mg/mL	Ferreira et al., 2016
		Test d'inhibition de la migration larvaire	IC50	IC50 = 0,338 mg/mL	Ferreira et al., 2016
		Test d'inhibition du développement larvaire	IC50	IC50 = 0,0131 mg/mL	Ferreira et al., 2016
	NGIs de mouton	Test d'inhibition de l'éclosion	0,049 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 96,8 ± 2,22% des œufs	Štrbac et al., 2022
Huile essentielle de feuille de poivrier du Sichuan (*Zanthoxylum simulans*)	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	20 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 95,6% des œufs	Qi et al., 2015
		Test d'inhibition de la migration larvaire	40 mg/mL	Inhibition de 79,6% de la migration	Qi et al., 2015
		Test d'inhibition du développement larvaire	40 mg/mL	Inhibition de 99,8% du développement	Qi et al., 2015
Arbre bombardier (*Hura crepitans*)	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 2,16 (1,60–3,40) mg/mL	Carvalho et al., 2012
		Test d'inhibition du développement larvaire	LC50	LC50 = 0,36 (0,33–0,40) mg/mL	Carvalho et al., 2012
Limonène	*C. elegans*	Test de mortalité	50 µg/mL	79,8 ± 7,5 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
	H. contortus	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 207,56 (80,31 – 760,69)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 207,56 (80,31-760,69)	Katiki et al., 2017
Linalool	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,29 (0,27 – 0,31)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,29 (0,279-0,319)	Katiki et al., 2017
			5 mg/mL	Inhibitionde l'éclosion de 46,67 ± 6,39% des œufs	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition de la migration larvaire	5 mg/mL	Inhibitionde 40,7% de la migration	Zhu et al., 2013
		Test d'inhibition du développement larvaire	5 mg/mL	Inhibitionde 37,6 ± 5,27% du développement	Zhu et al., 2013
Lippia (*Lippia sidoides*)	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,04 (0,038–0,053) mg/mL	Carvalho et al., 2012
		Test d'inhibition du développement larvaire	LC50	LC50 = 0,002 (0,0016–0,0025) mg/mL	Carvalho et al., 2012

Menthe poivrée (*Mentha x piperita*)	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,037 (0,035–0,039) mg/mL	Carvalho et al., 2012
		Test d'inhibition du développement larvaire	LC50	LC50 = 0,018 (0,0166–0,0186) mg/mL	Carvalho et al., 2012
Nerolidol	*C. elegans*	Test de mortalité	50 µg/mL	74,0 ± 2,7 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
Piper tuberculatum	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,031 (0,029–0,033) mg/mL	Carvalho et al., 2012
		Test d'inhibition du développement larvaire	LC50	LC50 = 0,020 (0,0197–0,0206) mg/mL	Carvalho et al., 2012
Thymol	*C. elegans*	Test d'inhibition de l'éclosion	1,2 mM	Inhibitionde l'éclosion de 40% des œufs	Hernando et al., 2019
		Test de mortalité	50 µg/mL	89,1 ± 8,2 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013
	H. contortus	Test d'inhibition de l'éclosion	0,25 mg/mL	Inhibition de l'éclosion de 93,8 ± 1,3% des œufs	Andre et al., 2017
			IC50	IC50 = 0,442 mg/mL	Ferreira et al., 2016
				IC50 = 187 µg/mL	Silva et al., 2018
			LC50	LC50 = 0,13 (0,12 – 0,14)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,13 (0,123-0,140)	Katiki et al., 2017
		Test d'inhibition de la migration larvaire	IC50	IC50 = 0,497 mg/mL	Ferreira et al., 2016
		Test d'inhibition du développement larvaire	IC50	IC50 = 0,0221 mg/mL	Ferreira et al., 2016
			4 mg/mL	Inhibition de 98,4 ± 0,4% du développement	Andre et al., 2017
Vanilline	*H. contortus*	Test d'inhibition de l'éclosion	LC50	LC50 = 0,57 (0,47 – 0,71)	Katiki et al., 2014
				LC50 = 0,57 (0,475-0,716)	Katiki et al., 2017
α-terpinène	*C. elegans*	Test de mortalité	50 µg/mL	87,44 ± 7,1 % de mortalité	Abdel-Rahman et al., 2013

Tableau S2_ Tests *in vitro* d'activité anthelminthique des plantes sur les strongles équins

Référence	Plante, MbS ou huile essentielle étudiée	Traitement effectué	Âne ou cheval	Parasite évalué	Test réalisé	Concentration testé	Résultat observé
Payne et al., 2013 [Les auteurs ont évalué 30 autres plantes avec des effets moins importants.]	Mimosa de Bailey (*Acacia baileyana*) Mimosa à bois noir (*Acacia melanoxylon*) Mimosa du Queensland (*Acacia podalyriifolia*) Eucalyptus (*Eucalyptus.gomphocephala*) Boonaree (*Alectryon oleifolius*) Bois de santal australien (*Santalum spicatum*) Duboisia (*Duboisia hopwoodii*)	Extrait aqueux	Cheval	Cyathostomes	Test de développement larvaire	10 µL d'extrait de plante	0,0 % ± 0,0 du développement inhibé
Peachey et al., 2016	Papaye (*Carica papaya*)	Papaïne	Âne	Cyathostomes	Test d'éclosion larvaire	CI50	CI_{50} = 0,12 µM [95% IC = 0,12 ; 0,13]
					Test de migration larvaire		CI_{50} = 67,35 µM [95% IC = 58,11 ; 78,24]
			Cheval		Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 0,20 µM [95% IC = 0,20 ; 0,21]
					Test de migration larvaire		CI_{50} = 106,31 µM [95% IC = 93,23 ; 121,52]
Buza et al., 2020 [Les auteurs ont évalué 6 plantes différentes. Ils ont pu déterminer des CI50 uniquement sur quelques-unes d'entre elles.]	Grande Aunée (*Inula helenium*)	Extrait aqueux	Âne	Cyathostominae et Strongylinae	Test d'éclosion larvaire	CI50	CI_{50} = 0.041 mg/mL [95% IC =0.010 ; 0.164]
	Absinthe (*Artemisia absinthium*)				Test d'activité larvicide		CI_{50} = 0.408 mg/mL [95% IC =0.271 ; 0.615]
	Gentiane à feuilles d'asclépiade (*Gentiana asclepiadea*)						CI_{50} = 0.486 mg/mL [95% IC =0.215 ; 1.099]
							CI_{50} = 0.366 mg/mL [95% IC =0.187 ; 0.718]
Peachey et al., 2015 [Les auteurs ont testé 9 plantes au total. Uniquement les résultats ayant un effet supérieur à 60% sont présentés dans le tableau.]	*Acacia nilotica* (L.) *Delile*	Extrait aqueux	Âne	Cyathostomes	Test d'éclosion larvaire	CI50	CI_{50} = 0,18 mg/mL [95% IC = 0,06 ; 0,3]
		Extrait dans du DMSO			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 0,2 mg/mL [95% IC = 0,0 ; 2,6]
	Concombre du prophète (*Cucumis prophetarum L.*)	Extrait aqueux			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 1,1 mg/mL [95% IC = 0,9 ; 1,4]
	Patience d'Abyssinie (*Rumex abyssinicus Jacq.*)	Extrait dans du DMSO			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 1,1 mg/mL [95% IC = 0,2 ; 2,2]
	Ail (*Allium sativum L.*)	Extrait aqueux			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 2,0 mg/mL [95% IC = 1,6 ; 2,3]
		Extrait dans du DMSO			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 1,1 mg/mL [95% IC = 0,9 ; 1,3]
	Chénopode blanc (*Chenopodium album L.*)	Extrait aqueux			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 2,3 mg/mL [95% IC = 1,9 ; 2,7]
		Extrait aqueux			Test de migration larvaire		CI_{50} = 8,9 mg/mL [95% IC = 7,1 ; 13,2]
	Gingembre officinal (*Zingiber officinale Roscoe.*)	Extrait aqueux			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 0,9 mg/mL [95% IC = 0,6 ; 1,3]
		Extrait dans du DMSO			Test d'éclosion larvaire		CI_{50} = 0,3 mg/mL [95% IC = 0,2 ; 0,4]
Collas et al., 2018	Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*)	Granulés	Cheval	Cyathostomes	Test d'éclosion larvaire	30, 15, 7,5 ou 3,6 mg de sainfoin/ml	37% de diminution pour les concentrations supérieures à 7,5 mg/mL
					Test de développement larvaire	6%, 12% ou 29%	Diminution du développement larvaire de 82% à la concentration de 29%
Payne et al., 2018	Boonaree (Alectryon oleifolius)	Extraction du MbS (*i.e.* Procyanidine A2)	Cheval	Cyathostomes	Test de migration larvaire	CI50	CI_{50} = 52,3 µg/mL [95% IC = 40,2 ; 68,2]
					Test de développement larvaire		CI_{50} = 12,6 µg/mL [95% IC = 11,5 ; 13,7]
Maestrini et al., 2019	Luzerne polymorphe (*Medicago polymorpha* cv. Luzerne polymorphe (*Medicago polymorpha* cv. Luzerne cultivée (*Medicago sativata*) Luzerne cultivée (*Medicago sativata*) Luzerne arborescente (*Medicago arborea*)	Extrait aqueux et 1% de DMSO Extrait de Extrait de saponine	Âne	Cyathostomes	Test d'éclosion larvaire	1%	80% d'inhibition 88,1% d'inhibition 100% d'inhibition 90% d'inhibition 100% d'inhibition

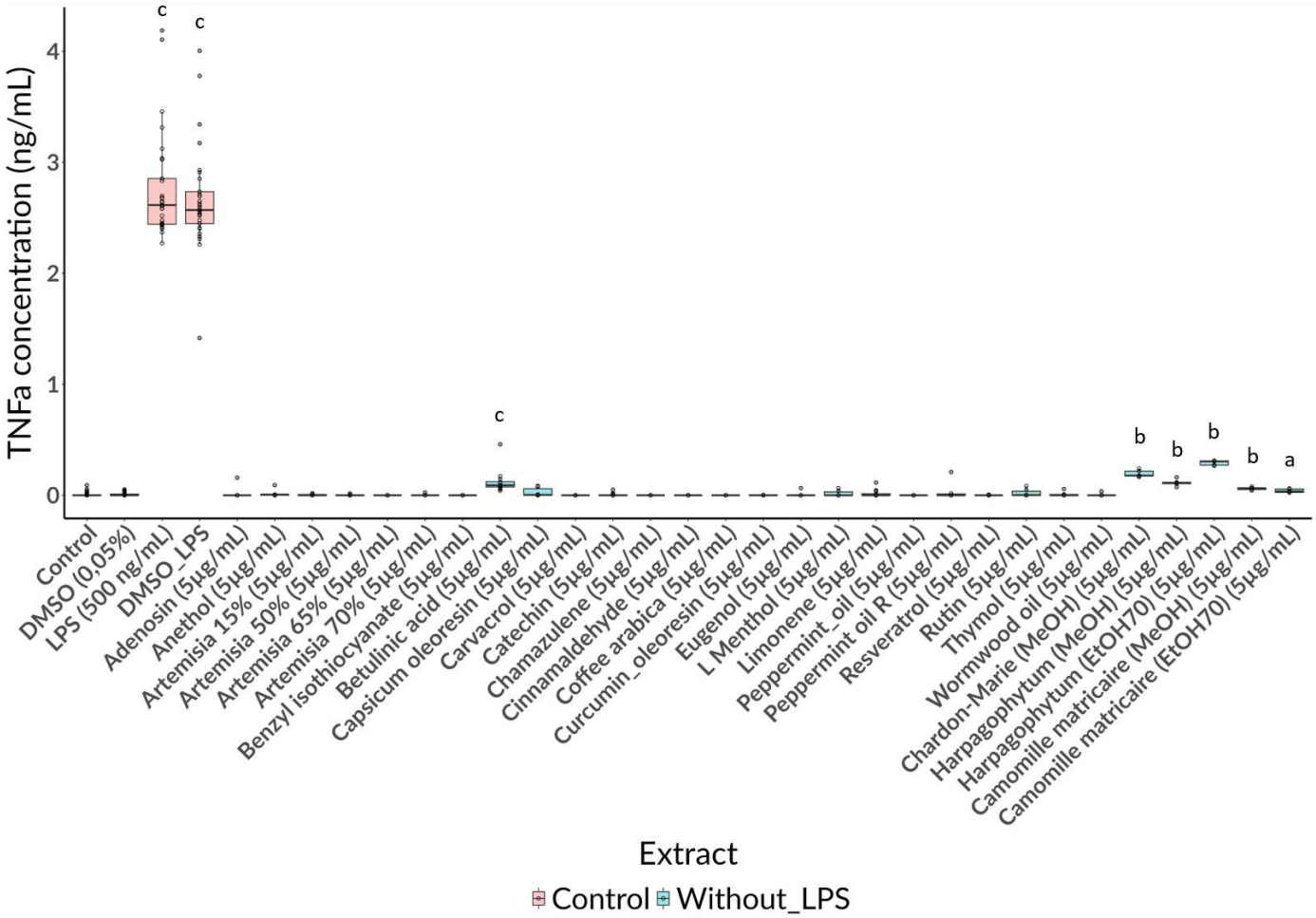
Tableau S3_Tests *in vitro*/*in vivo* d'activité d'immunostimulation des plantes

[1] Lignée de cellule de rein embryonnaire humain

[2] Acides lipotéichoïques, constituants importants des parois bactériennes (bactéries à Gram positif).

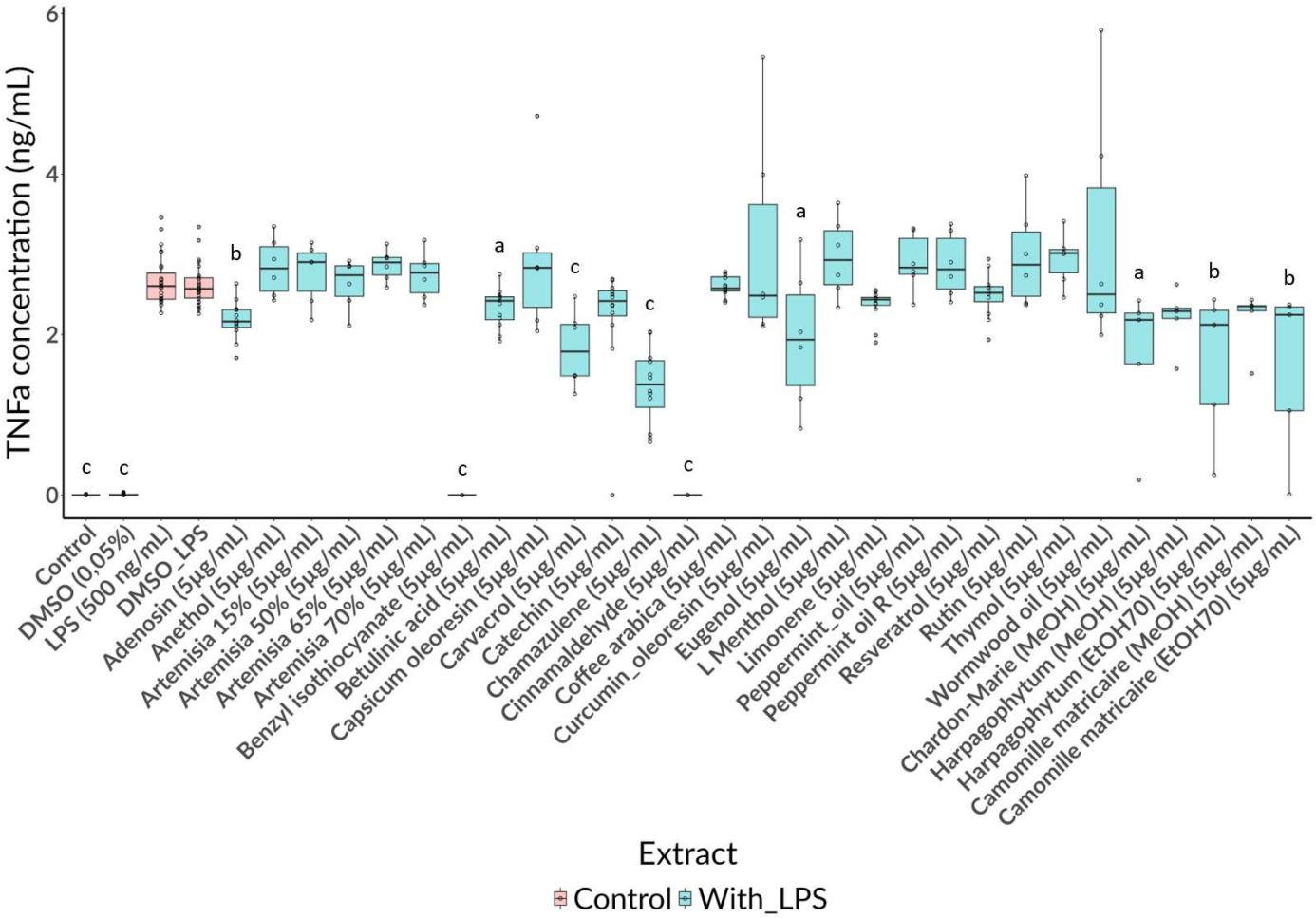
Plante ou MbS	*In vitro* / *in vivo*	Lignée cellulaire ou animal	Test réalisé	Résultat observé	Référence
Adénosine	*In vitro*	RAW 264,7	Culture cellulaire avec des concentrations allant de 10 à 300 µM en présence de LPS	Inhibition de la production d'IL-10, de TNFα et de NO induite par le LPS	Haskó et al., 1996
	In vivo	Souris endotoxémiques	Traité avec une concentration de 0,1 mL/10g PV	Augmentation du taux d'IL-10 et réduction du taux de TNFα et de la production de NO dans le plasma.	
Isothiocyanate de benzyle	*In vitro*	RAW 264,7	Culture cellulaire avec des concentrations allant de 0 à 10 µmol/L en présence de LPS	Réduction de l'expression de IL-1β, TNFα, IL-6, iNOS et COX2 induite par le LPS. Réduction de la production de PGE2 et de NO.	Lee et al., 2009
	In vitro	PBMC humain	Culture cellulaire avec des concentrations allant de 1,5 à 100 µM en présence de LPS	3 µM a iduit la réduction de PGE2 et de TNFα et la phosphorylation de c-Jun. 10 µM a induit la réduction de la phosphorylation de ERK 1/2.	Herz et al., 2016
Acide bétulinique	*In vitro*	RAW 264,7	Culture cellulaire avec des concentrations de 0,625, 1,25, 2,5 et 5 pg/mL	Augmentation de la production de TNFα et IL-1β et inhibition de la production de NO.	Yun et al., 2003
			Culture cellulaire avec des concentrations de 5,10, 20, 40 et 80 µM en présence de LPS	Inhibition des médiateurs pro-inflammatoires tels que PGE2, NO, IL-1β, IL-6, IL-12 et TNFα et suppression de la voie de signalisation NF-κB	Kim et al., 2016
Carvacrol	*In vitro*	RAW 264,7	Culture cellulaire avec des concentrations de 100 µM en présence de LPS	Diminution de TNFα et IL-1β.	Somensi et al., 2019
	In vivo	Modèle murin d'œdème de la patte	Traité avec une concentration de 50 et 100 mg/kg	Atténuation de l'œdème à la patte et réduction au niveaux local d'IL-1β et de PGE2, mais pas de TNFα. Réduction de l'expression de l'ARNm de la COX-2 et de l'IL-1β.	da Silva Lima et al., 201
Cinnamaldéhyde	*In vitro*	RAW 264,7	Culture cellulaire avec des concentrations de 0, 6,3, 12,5, 25, 50 et 100 µM en présence de LPS (1µg/mL).	Réduction de l'activité transcriptionnelle de NFkB dépendament des concentrations en extrait.	Reddy et al., 2004
			Pré-traitement des cellules avec 20 ou 50 µM de cinnamaldehyde.	Supression de l'activation de NF-κB et de IRF3 induite par le LPS.	Youn et al., 2008
			Pré-traitement des cellules avec 10 µg/ml de cinnamaldehyde et 0,1 µg/ml de LPS.	Réduction de la concentration en IL-6 et augmentation de l'expréssion d'iNOS.	Lang et al., 2019
		RAW 264,7 et HEK 293[1] (exprimant un TLR4)	Pré-traitement des cellules avec 20 ou 50 µM de cinnamaldehyde et 1 µg/ml de LPS.	Inhibition de la production NO et l'augmentation des niveaux de surface des molécules de costimulation (CD80 et CD69) et des récepteurs TLR2 et du complément (CR3). De plus, diminution de l'activation transcriptionnelle de NF-κB.	Kim et al., 2010
		Macrophage murin (J774A.1), Monocytes humains (THP-1)	Culture cellulaire avec des concentrations de 0, 24, 40 et 80 µM (macrophages murins) ou de 0, 8, 24 et 80 µM (monocytes humains) en présence de LTA[2] (10 µg/mL) ou de LPS (1µg/mL).	Réduction de TNFα et d'IL-1 sur des deux différents types de cellule.	Chao et al., 2008
Chamazulène	*In vivo*	Rats Wistar	Administration par voie oral du chamazulène 1 heure avant l'administration d'éthanol à raison de 25 ou 50 mg/kg PV par jour, pendant 6 semaines.	Diminution du TNF-α et IL-6 contre les lésions hépatiques induites par l'éthanol.	Wang et al., 2020
Eugénol	*In vitro*	RAW 264,7	Pré-traitement des cellules avec 1, 10, 50 ou 100 µM de d'eugénol et 0,1 µg/ml de LPS.	Réduction de l'expression de NO, TNFα, IL-1ß, NF-κB et iNOS et diminution des voies de signalisation ERK1/2 et p38 MAPK	Yeh et al., 2011
	In vivo	Souris BALB/c	Injection par voie intrapéritonéale de 160 mg/kg PV d'eugénol.	Réduction du recrutement des neutrophiles et l'expression du TNFα et NF-κB.	Magalhães et al., 2010
			Injection par voie intragastrique de 5 ou 10 mg/kg d'eugénol.	Réduction de l'expression du TNFα et d'IL-6 et supression de la voie de signalisation NF-κB.	Huang et al., 2015
Chardon Marie (*Silybum marianum*)	*In vitro*	Splénocytes murin	Incubation pendant 5 jours en présence de 25 ou 250 µg/mL d'extrait séché ajouté dans le milieu.	Augmentation d'Il-4, IL-10 et d'IFN-γ.	Wilasrusmee et al, 2002
Harpagophytum	*In vitro*	Monocytes humains primaire	Incubaiton avec un extrait éthanolique (60%) à 1, 10,100 et 1000 µg/mL et du LPS (10 ng/mL) durant 24h.	Diminution du TNF-α.	Fiebich et al, 2001
Camomille matricaire (*Matricaria chamomilla L.*)	*In vitro*	RAW 264,7	Incubaiton avec un extrait aqueu à 0, 10,20, 30 et 40 µg/mL et du LPS (1 µg/mL) durant 24h.	Inhibition de la libération de PGE2 induite par le LPS.	Srivastava et al., 2009

Figure S1_Activité pro-inflammatoire des extraits criblés *in vitro* sur une lignée cellulaire de macrophages murin (RAW 264.7)



Les lettres minuscules indiquent une différence significative avec le groupe DMSO :
a $P < 0.05$, b $P = 0.01$, c. $P < 0.001$

Figure S2_Activité anti-inflammatoire des extraits criblés *in vitro* sur une lignée cellulaire de macrophages murin (RAW 264.7)



Les lettres minuscules indiquent une différence significative avec le groupe DMSO :
a. $P < 0.05$; b. $P < 0.01$; c. $P \leq 0.001$

Communication orale + article congrès francophone JSIE 2021

(https://mediatheque.ifce.fr/index.php?lvl=notice_display&id=68832)





Joshua Malsa

A la suite de mon stage de master 2 visant à identifier des molécules actives contre *Plasmodium falciparum* j'ai commencé mon doctorat en octobre 2020 au centre INRAE Val de Loire. J'ai pour projet d'identifier des plantes ou extraits ayant un effet anthelminthique sur les petits strongles et/ou stimulant la réponse immunitaire des chevaux vis-à-vis de ces parasites. Ceci permettrait d'envisager de limiter le recours aux anthelminthiques chimiques.

joshua.malsa@inrae.fr

Partenaire

Multifolia
L'EXPERTISE INNOVATION SAINFOIN

Financeurs

ifce | Fonds Éperon

Le sainfoin pour la gestion des petits strongles équins

J. Malsa[1], G. Fleurance[2,3], B. Dumont[3], P. Gombault[4], L Wimel[5], C. Dubois[5], D. Serreau[1], G Sallé[1]

[1]INRAE, Université de Tours, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France
[2]IFCE, Pôle Développement Innovation et Recherche, Exmes, France
[3]INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, Saint-Genès-Champanelle, France
[4]Multifolia, Viâpres-le-Petit, France
[5]IFCE, Plateau technique de la Station Expérimentale, Chamberet, France

Type de présentation : oral

Ce qu'il faut retenir

Le contrôle des petits strongles repose sur l'utilisation d'anthelminthiques chimiques dont l'efficacité est affectée par l'émergence de populations résistantes. Le sainfoin, légumineuse riche en tanins, fait l'objet de travaux évaluant son efficacité comme aliment à vertu anthelminthique.
Ont été comparé deux lots de 10 poulains de selle (2 ans) naturellement infestés au pâturage : l'un recevait un régime composé de 70% MS de granulés déshydratés de sainfoin (var. Perly, Multifolia ; 2.4% MS de tanins condensés dans la ration) tandis que le lot témoin recevait un régime iso-énergétique et iso-protéique à base de granulés de luzerne (28 jours). Le niveau d'excrétion d'œufs et le développement larvaire étaient mesurés chaque semaine. A l'issue de la cure, les poulains ont été traités à l'ivermectine et nous avons suivi pendant 60 jours la ré-excrétion des œufs. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet du régime « sainfoin » sur l'excrétion fécale des œufs de strongles. Leur développement larvaire chez les poulains nourris au sainfoin a diminué de 19% 7 jours après le début de la cure, mais la différence avec le régime témoin ne s'est ensuite pas maintenue. Les trois quarts des individus du lot « sainfoin » ont ré-excrété des œufs à partir du 50ème jour post-traitement à l'ivermectine contre un quart dans le lot témoin. L'obtention prochaine de la concentration plasmastique de l'ivermectine chez les poulains des deux lots permettra de déterminer si le sainfoin a affecté la pharmacocinétique de cette molécule.



Image de cheval (© Google image) & image de granulé de sainfoin (© Claire Collas)

© Institut français du cheval et de l'équitation 2021

Communication orale congrès francophone JSIE 2023

(https://mediatheque.ifce.fr/index.php?lvl=notice_display&id=73260)





Joshua Malsa

Originaire de Strasbourg, j'y ai réalisé mes études jusqu'à l'obtention de mon Master en microbiologie fondamentale. Par la suite, j'ai effectué mes premiers travaux de recherche sur le parasite responsable de la malaria *Plasmodium falciparum* à Marseille. Développant un intérêt pour la parasitologie, je réalise une thèse à l'INRAE centrée sur l'étude d'alternatives aux vermifuges chimiques chez les équins.

joshua.malsa@inrae.fr

Partenaire(s)

INRAE ifce

Financeur(s)

ifce Fonds Éperon

La chicorée fourragère pour le contrôle des petits strongles ?

Joshua Malsa[1], Guillaume Sallé[1], Laurence Wimel[2], Juliette Auclair-Ronzaud[2], Bertrand Dumont[3], Leslie Boudesocque-Delaye[4], Nuria Mach[5], Fabrice Reigner[6], Fabrice Guégnard[1], Angélique Chereau[1], Delphine Serreau[1], Géraldine Fleurance[3,7]

[1] INRAE, Université de Tours, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique
[2] Institut français du cheval et de l'équitation, Plateau technique de Chamberet
[3] INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores
[4] Université de Tours, Eq. 7502 Synthèse et Isolement de Molécules Bioactives
[5] IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT
[6] INRAE, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière
[7] Institut français du cheval et de l'équitation, Pôle développement, innovation et recherche

Type de présentation : oral – projet de R&D

Ce qu'il faut retenir :

Cette étude visait à quantifier l'effet anthelminthique putatif de la chicorée (var. Puna II) pour le contrôle des petits strongles chez les chevaux. Dix poulains de selle de deux ans naturellement infestés ont été conduits en rotation, soit (i) sur une prairie semée avec de la chicorée, (ii) sur une prairie permanente à même chargement (2.4 UGB/ha). Les chevaux pâturant la chicorée ont présenté des niveaux d'excrétion inférieurs à ceux des chevaux témoins dès le 16e jour de pâturage. En fin d'essai, l'efficacité du pâturage de la chicorée en comparaison du lot témoin était de 82 %. Le développement des œufs en larves dans les crottins des chevaux pâturant la chicorée a également diminué significativement à partir du 31e jour d'étude par rapport à celui observé dans le lot témoin. Des analyses à venir permettront d'élucider les mécanismes en jeu et les valeurs nutritionnelles de la chicorée chez le cheval.



© Géraldine Fleurance

En partenariat avec :

INRAE RESPE LeTROT hippolia AVEF FFE SFET INSEP idele FCC FRANCE GALOP

© Institut français du cheval et de l'équitation

Communication orale congrès européen EAAP 2023

Chicory (*Cichorium intybus*) reduces cyathostomin egg excretion and development in grazing horses

Joshua Malsa[1], Leslie Boudesocque-Delaye[2], Laurence Wimel[3], Juliette Auclair-Ronzaud[3], Bertrand Dumont[4], Núria Mach[5], Fabrice Reigner[6], Fabrice Guégnard[1], Angélique Chereau[1], Delphine Serreau[1], Isabelle Théry-Koné[2], Guillaume Sallé[1*], Géraldine Fleurance[4,7*]

[1]INRAE, Université de Tours, UMR 1282 ISP, France
[2]Université de Tours, EA 7502 SIMBA, France
[3]IFCE, Plateau technique de Chamberet, France
[4]INRAE, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMRH 1213, France
[5]IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, France
[6]INRAE, UEPAO, France
[7]IFCE, Pôle développement, innovation et recherche, France
*These authors contributed equally to this work



Poster au congrès mondial WAAVP 2021

INRAE ifce Fonds Éperon Multifolia L'EXPERTISE INNOVATION SAINFOIN

WAAVP Dublin 2021 — 28th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology — 19th-22nd July 2021, Dublin Ireland

Dehydrated sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) for the sustainable control of equine strongyles

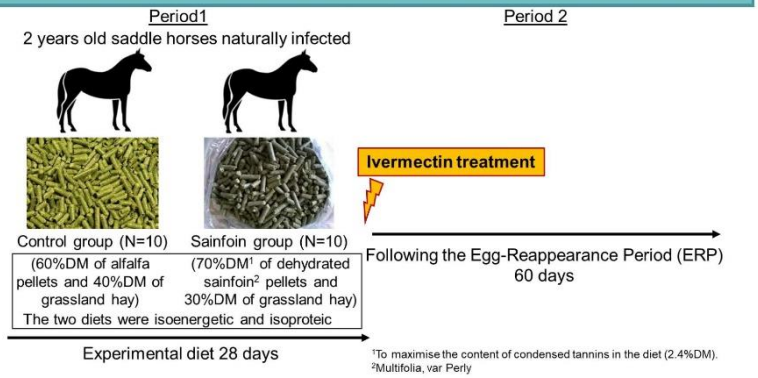
J. Malsa[1], G. Fleurance[2,3], B. Dumont[3], P. Gombault[4], L Wimel[5], C. Dubois[5], D. Serreau[1], G. Sallé[1]

[1] INRAE, U. de Tours, UMR 1282 ISP, Nouzilly, France
[2] IFCE, Pôle Développement Innovation et Recherche, Exmes, France
[3] INRAE, U. Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMRH 1213, Saint-Genès-Champanelle, France
[4] Multifolia, Viâpres-le-Petit, France
[5] IFCE, Plateau technique de la Station Expérimentale, Chamberet, France

Introduction

- Fenbendazole and pyrantel failures are widespread in equine strongyle populations while ivermectin and moxidectin have toxic effects on the environment [1, 2, 3].
- Extracts from dehydrated sainfoin pellets (var Perly) show potency against free-living stages *in vitro* [4].
- Does a cure of these tannin-rich pellets in the horse diet limit the development of strongyles? Can we combine it with an ivermectin treatment to reduce the dose used?

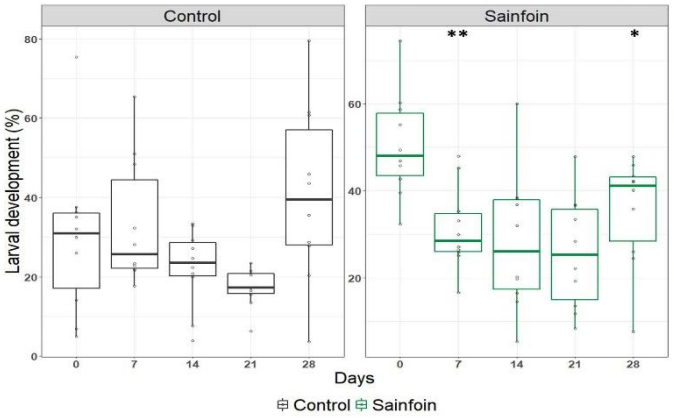
Materials and methods

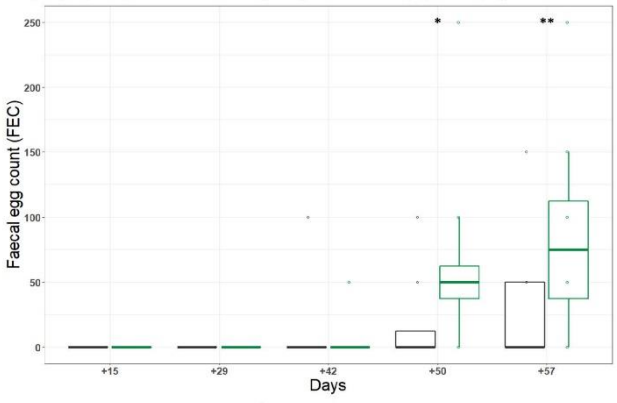


- Fecal egg counts (periods 1 & 2) and larval development rate in L3 (period 1) were measured.

Results & Discussion

- FEC were similar between both groups throughout the study period (day×group, $P = 0.756$; group, $P = 0.76$) (as in [4]).





- Larval development rate decreased in the sainfoin treated group with significant differences found at day 7 (-19±13%, $P = 0.006$) and day 28 (-15±10%, $P = 0.027$) relative to the control group.
- The ERP was different for both groups
  → day+15 x day+50, group control $P = 0.197$
  → day+15 x day+50, group sainfoin $P = 0.045$
- FEC were higher in horses that were fed with sainfoin pellets at days 50 and 57 after treatment ($P = 0.04$ and 0.03 respectively).
- From the 50th day post-treatment, more sainfoin-fed horses were FEC positive than in the control group (75% vs. 25%, $P = 0.05$).

Conclusion & Perspectives

- The sainfoin diet has a transient impact on larval development
  → An identification of the strongyle species is in progress to determine if their composition varied during the experiment.
- The sainfoin diet seems to reduce the efficacy of ivermectin treatment
  → Plasmatic ivermectin dosage is undergoing to test if the sainfoin diet may be associated with reduced residence time of ivermectin (as in sheep [5]).

[1] Sallé G, Cortet J, Bois I, Dubès C, Guyot-Sionest Q, Larrieu C, et al. (2017) Risk factor analysis of equine strongyle resistance to anthelmintics. Inte J Parasitol-Drugs 7: 407-415.
[2] Lumaret J-P, Errouissi F, Floate K, Rombke J, Wardhaugh K. (2012) A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. Curr Pharm Biotechno 13: 1004-1060.
[4] Verdú J.R, Lobo J.M, Sánchez-Piñero F, Gallego B, Numa C, Lumaret J.P *et al.* (2018) Ivermectin residues disrupt dung beetle diversity, soil properties and ecosystem functioning: An interdisciplinary field study Sci Total Environ 618: 219-228
[4] Collas C, Sallé G, Dumont B, Cabaret J, Cortet J, Martin-Rosset W, *et al.* (2018) Are sainfoin or protein supplements alternatives to control small strongyle infection in horses? Animal 12: 359–365.
[5] Gaudin E, Simon M, Quijada J, Schelcher F, Sutra J-F, Lespine A, et al. (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.

Copyright © 2021 Malsa Joshua - joshua.malsa@inrae.fr

Poster congrès régional FéRi 2022

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

FéRI
FÉDÉRATION DE RECHERCHE EN INFECTIOLOGIE
CENTRE - LOIRE

Evaluation of the direct and immunomodulatory activity of new plants extracts as a potential food additive

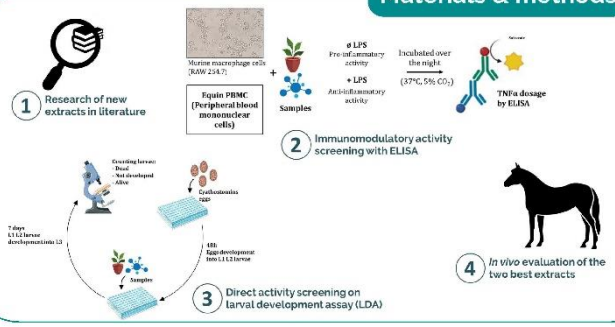
J. Malsa[1], A. Wiliams[2], A. Chereau[1], D. Serreau[1], F. Guégnard[1], A. Gesbert[3], F. Reigner[3], Y. Le Vern[1], A. Sausset[1], G. Fleurance[4,5], G. Sallé[1]

[1] INRAE, U. de Tours, UMR 1282 ISP, Nouzilly, France
[2] IVH, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark
[3] INRAE, UEPAO 1297, Nouzilly, France
[4] IFCE, Pôle Développement Innovation et Recherche, Exmes, France
[5] INRAE, U. Clermont Auvergne, VetAgro Sup, UMRH 1213, Saint-Genès-Champanelle, France

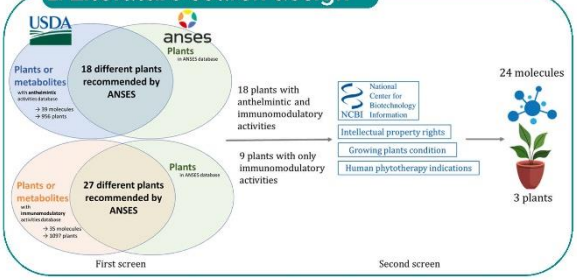
Context

To deal with the efficacy reduction of chemical antiparasitic in horses, the research and evaluation of alternative strategies focused on natural plant extracts was conducted. **The objective was to identify candidates with antiparasitic and immunomodulatory activity that could be used as a food additive to prevent infection.**

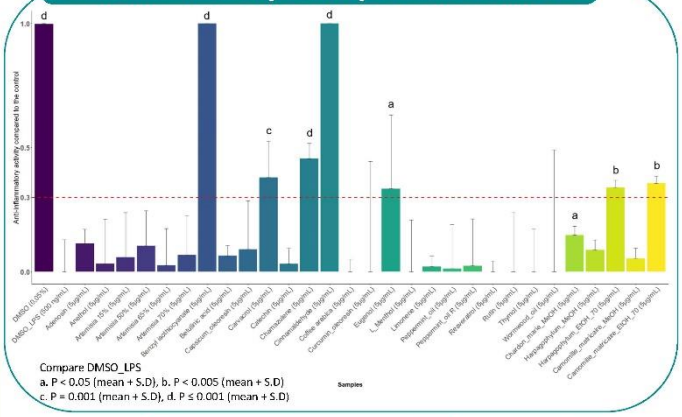
Materials & methods



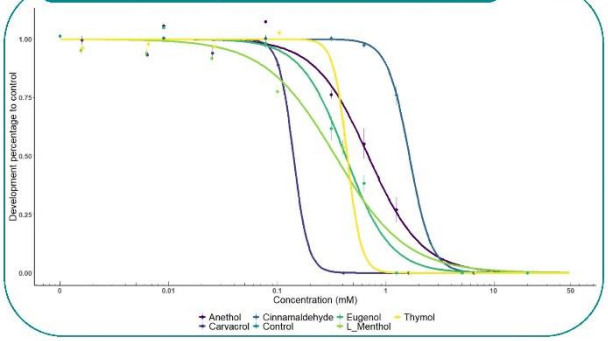
1. Literature search design



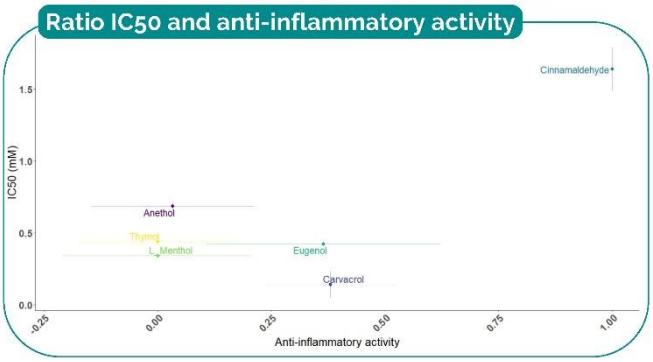
2. Anti-inflammatory activity of extracts (RAW 264.7)



3. Direct activity on larval development



Ratio IC50 and anti-inflammatory activity

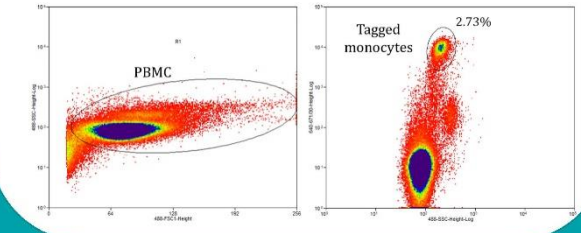


Conclusion & perspectives

- Two extracts were identified as interesting candidate, **cinnamaldehyde and carvacrol.**

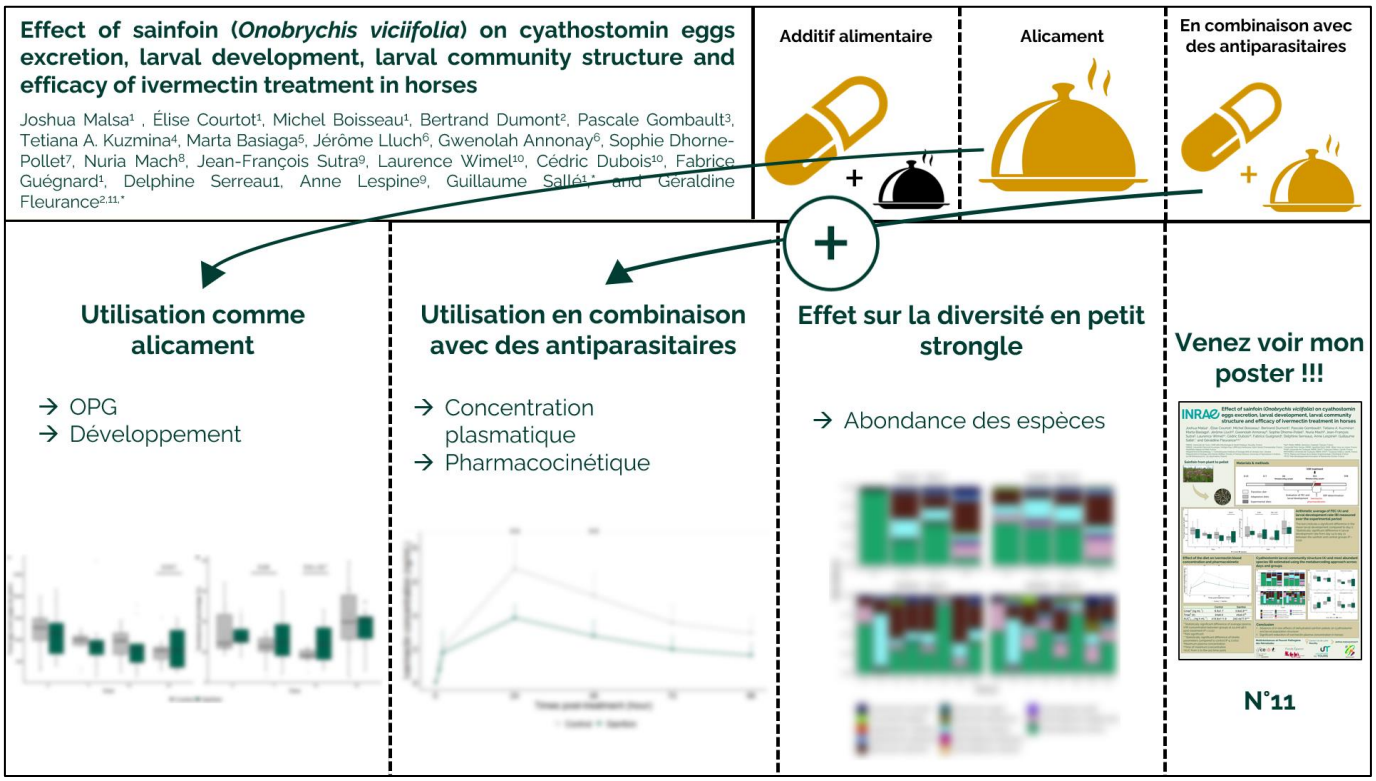
→ Evaluate potential combination with anthelmintic.
→ As a follow-up to the observations (Sallé *et al.*, 2021 *Sci Rep.*), investigated the antiparasitic response of equine monocytes.
→ Identify an encapsulation strategy for extracts to cross the stomach.
→ Perform the *in vivo* experiment.

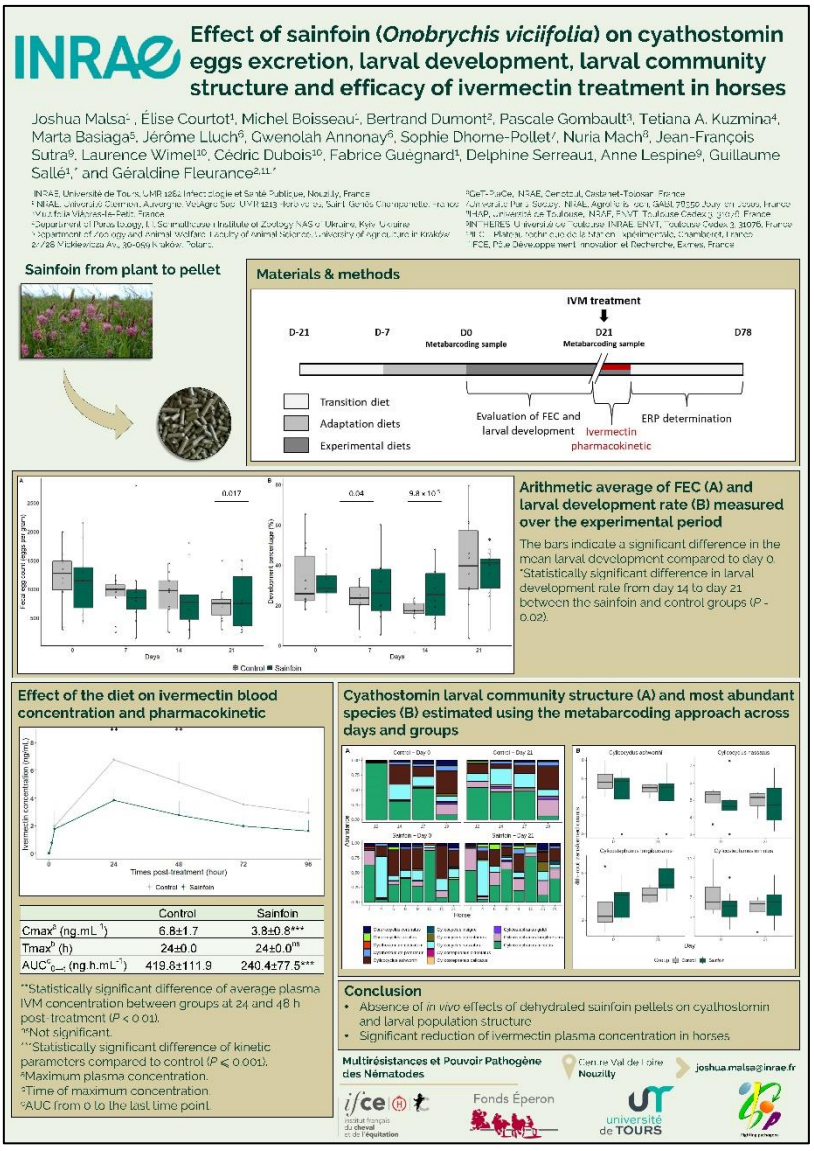
First step of monocyte cell purification



Multirésistances et Pouvoir Pathogène des Nématodes
Centre Val de Loire Nouzilly
joshua.malsa@inrae.fr

Premier prix short communication aux journées d'animation scientifique du département santé animale 2022





Joshua MALSA

IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE PLANTES BIOACTIVES POUR LA GESTION DES PETITS STRONGLES CHEZ LES CHEVAUX

Résumé en français :

Les petits strongles, parasites gastro-intestinaux courants chez les chevaux en pâturage, posent un problème particulier pour les jeunes animaux. Ils sont associés à des pertes de poids et, dans les cas graves, à la mort provoquée par l'émergence en masse de stades larvaires enkystés dans la muqueuse caeco-colique. Le contrôle de ces parasites repose principalement sur l'utilisation d'antiparasitaires chimiques, dont l'usage intensif a conduit à l'émergence d'isolats résistants à l'ensemble des molécules disponibles.

Dans ce contexte et dans un souci de gestion des parasites respectueux de l'environnement, ce travail de thèse vise à identifier et caractériser le potentiel bioactif de plantes. Ainsi, les effets anthelminthiques directs (*i.e.* altérant la biologie des cyathostomes) et indirects (*i.e.* stimulant les défenses immunitaires du cheval contre les parasites) de différentes plantes ou de leurs métabolites secondaires (MbS) ont été étudiés. En complément de cette approche fondamentale, l'activité anthelminthique de produits du commerce à base de plante, du sainfoin et de la chicorée a été évaluée. Seule la chicorée utilisée comme fourrage a présenté une efficacité suffisamment élevée pour envisager une utilisation en élevage. Différents tests ont permis d'identifier des MbS présentant une activité antiparasitaire directe et anti-inflammatoire *in vitro*, bien que leur efficacité *in vivo* n'ait pas été observée.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont mis en lumière les difficultés à concilier les observations *in vitro* et *in vivo*, mais également à optimiser l'utilisation des plantes en conditions *in vivo*. Différentes pistes de recherche pour combler l'écart entre les connaissances actuelles et leur application pratique au quotidien sont proposées.

Mots clés : Cyathostomes, Alicament, Additif alimentaire, anthelminthique, Immunomodulation, RNA-seq

Summary :

Small strongyles, common gastrointestinal parasites of grazing horses, impose a severe burden to horse health. They are associated with weight loss and, in severe cases, death caused by the massive emergence of encysted larval stages from the caeco-colic mucosa. Control of these parasites mostly relies on the frequent use of chemical anthelmintics, that has selected drug-resistant isolates to every drug class available on a global scale.

In this context and with the very objective of environment-friendly parasite control strategies, this thesis aims to identify and characterize bioactive plants with regard to cyathostomins control. First, the direct anthelmintic effects (*i.e.* altering the biology of cyathostomes) and indirect effects (*i.e.* stimulating the horse's immune defenses against parasites) of different plants or their secondary metabolites (SMs) were studied. Second, the anthelmintic activity of commercial plant-based products, sainfoin and chicory were tested. Out of these, only chicory used as forage showed significant efficacy for field application. Various tests have identified SMs with direct anti-parasitic and anti-inflammatory *in vitro* activity, but preliminary *in vivo* tests were inconclusive regarding their anthelmintic potential.

The results obtained from this work have highlighted the difficulties of conciliating *in vitro* and *in vivo* observations, as well as optimizing the use of plants under *in vivo* conditions. Research lines for bridging the gap between current knowledge and practical field application have been discussed.

Keywords : Cyathostomins, Nutraceutical, Feed additive, Anthelmintic, Immunomodulation, RNA-seq