

Rapport final

No projet : IA222725

Titre : Nouveaux additifs phytogéniques comme alternatives aux anticoccidiens chez le poulet de chair, étude de leur efficacité et de leurs effets sur la santé intestinale

Responsable scientifique : Carl Julien, PhD

Établissement : Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD)

Rédigé le 15 février 2025. Révisé le 21 février 2025.

Section 1 - Chercheurs impliqués et responsable autorisé de l'établissement (ces personnes doivent également faire parvenir un courriel pour attester qu'ils ont lu et approuvent le rapport.)

Carl Julien, chercheur scientifique, responsable scientifique
Daniel Rico, directeur scientifique, responsable de l'établissement

ÉQUIPE DE RÉALISATION

Étudiante à la maîtrise : Sara Aouissi, Université Laval
Directrice de l'étudiante : Marie-Pierre Létourneau-Montminy, Université Laval
Stagiaire : Mohamed El Amine Khatir, Université Laval
Professionnels de recherche : Jacinthe Julien, CRSAD; Vincent Demers-Caron, CRSAD
Gestion financière du projet : Hassina Yacini, CRSAD

Section 2 - Partenaires

Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD)

Probiotech International Inc.

Mitacs

Section 3 – Fiche de transfert (max 2 à 3 pages)

Veuillez noter que cette fiche sera mise sur le site Web du MAPAQ pour une diffusion grand public. Merci de ne pas faire référence à des tableaux ou des annexes qui sont ailleurs dans le rapport puisqu'ils ne seront pas annexés à la fiche de transfert.

Des additifs pour améliorer la santé intestinale des poulets de chair

Carl Julien

No de projet : IA222725

Durée : 04/2022 – 02/2025

FAITS SAILLANTS

Le projet de recherche ici présenté vise à répondre aux besoins de l'industrie du poulet de chair. La demande pour les produits de consommation sans médicament est en croissance constante. Cependant, certaines infections communes chez le poulet de chair affectent la santé et la production, exigeant l'utilisation d'alternatives aux médicaments. Parmi ces infections communes, la coccidiose aviaire engendre des pertes économiques considérables pour les producteurs. Elle diminue l'absorption des nutriments, augmente le taux de conversion alimentaire et représente le facteur de risque principal pour l'entérite nécrotique. Pour l'instant, les alternatives efficaces aux anticoccidiens pour la production de poulet de chair sont manquantes. Même si des vaccins se sont développés et sont disponibles, leur efficacité nécessite des pratiques d'élevage supplémentaires et une gestion à la ferme plus stricte.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de nouveaux additifs alimentaires à base d'ingrédients végétaux fonctionnels pour contrer la coccidiose et déterminer leurs effets sur la santé intestinale chez le poulet de chair. Deux essais en cages de 34 jours avec 12 répétitions de 12 oiseaux/cage ont été réalisés. Les poulets de chair mâles (Ross 308) ont été assignés au hasard à 8 traitements par essai. Des challenges d'inflammation intestinale et de coccidiose ont été utilisés. L'infection à *Eimeria* a été induite par une administration orale au jour 14 de 2×10^5 oocystes sporulés d'espèces mixtes d'*Eimeria* provenant d'isolats de champs. Les performances de croissance ont été évaluées par le poids corporel, la prise et la conversion alimentaires et le gain moyen quotidien. L'effet sur la coccidiose a été évalué par des scores lésionnels de l'intestin et par des décomptes d'oocystes totaux par microscopie et par PCR quantitative. Une évaluation technico-économique a été réalisée en fonction des coûts des additifs et du poids des oiseaux. Des analyses d'expression génique et de quantifications protéiques ont été réalisées pour étudier la santé intestinale.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

Comme attendu, le challenge coccidien a réduit les performances de croissance et augmenté l'excrétion du parasite et les scores lésionnels caractéristiques. Les résultats en laboratoire ont montré que plusieurs composés, comme les polyphénols et les extraits de cannelle, de thym, d'ail, d'anis, de basilic et de pin, ont diminué la capacité d'invasion des parasites *Eimeria* à des concentrations qui n'ont pas entraîné une toxicité des cellules hôtes. Des additifs alimentaires et dans l'eau de boisson qui contiennent ces composés actifs, à savoir l'Alterna Poultry®, le CAPS C2PG® et l'Enterov-V Poultry®, ont amélioré la perméabilité intestinale, et l'Enterov-V Poultry® a diminué l'excrétion du parasite dans un contexte de challenge inflammatoire ou de challenge à la coccidiose chez le poulet de chair.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET/OU SUIVI À DONNER

Les additifs phytogéniques Alterna Poultry®, CAPS C2PG® et Entero-V Poultry®, peuvent améliorer la santé intestinale dans un contexte d'inflammation intestinale. L'Entero-V Poultry®, diminuant aussi l'excrétion du parasite qui cause la coccidiose peut être utilisé dans une stratégie de lutte à la coccidiose. Ces additifs peuvent donc être utiles pour réduire l'utilisation des antimicrobiens dans les poulaillers. Des essais dans les poulaillers commerciaux permettraient de valider ces résultats.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Carl Julien
Téléphone : (418) 286-3353
Courriel : carl.julien@crsad.qc.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme Innov'Action agroalimentaire, un programme issu de l'Accord Canada-Québec de mise en œuvre du Partenariat canadien pour l'agriculture conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada. Le Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD), Mitacs et Probiotech International Inc ont aussi contribué financièrement à ce projet.

Section 4 - Activité de transfert et de diffusion scientifique (joindre en annexe la documentation en appui si applicable.)

Section 5 - Activités de diffusion et de transfert aux utilisateurs (joindre en annexe la documentation en appui. Au moins une preuve de réalisation d'une activité de transfert aux utilisateurs est obligatoire pour l'acceptation du rapport final.)

- 2023-01-12, présentation à Probiotech International. Les résultats du premier essai chez les poulets ont été présentés à l'entreprise sous forme de webinaire.
- 2023-09-14, présentation à Probiotech International. Les résultats du deuxième essai chez les poulets ont été présentés à l'entreprise sous forme de webinaire.
- Rapport des activités 2022-2023 (page 35) du CRSAD. Ce rapport est disponible au public sur le site Internet du CRSAD à savoir :
https://crsad.qc.ca/fileadmin/Fichiers/centre_recherche/Rapports_annuels/Rapport_d_acti_vites_CRSAD_2022-2023.pdf

Section 6 – Grille de transfert des connaissances

1. Résultats Présentez les faits saillants (maximum de 3) des principaux résultats de votre projet.	2. Utilisateurs Pour les résultats identifiés, ciblez les utilisateurs qui bénéficieront des connaissances ou des produits provenant de votre recherche.	3. Message Concrètement, quel est le message qui devrait être retenu pour chacune des catégories d'utilisateurs identifiées? Présentez un message concret et vulgarisé. Quels sont les gains possibles en productivité, en rendement, en argent, etc.?	4. Cheminement des connaissances a) Une fois le projet terminé, outre les publications scientifiques, quelles sont les activités de transfert les mieux adaptées aux utilisateurs ciblés? (conférences, publications écrites, journées thématiques, formation, etc.) b) Selon vous, quelles pourraient être les étapes à privilégier en vue de maximiser l'adoption des résultats par les utilisateurs.
Des polyphénols et les extraits de cannelle, de thym, d'ail, d'anis, de basilic et de pin ont diminué l'invasion des parasites <i>Eimeria in vitro</i> à des doses qui ne sont pas cytotoxiques.	Éleveurs de poulets de chair, vétérinaires, nutritionnistes, scientifiques, entreprises développant des additifs pour la volaille et autres et intervenants dans le secteur avicole.	Pour tous, des polyphénols et les extraits de cannelle, de thym, d'ail, d'anis, de basilic et de pin diminuent l'invasion des parasites <i>Eimeria in vitro</i> à des doses qui ne sont pas cytotoxiques	a) Présentation des résultats lors de symposiums pour les producteurs, comme le Rendez-vous avicole de l'AQINAC et diffusion des résultats (Bulletin des agriculteurs, site Internet du CRAAQ, CRSAD et Agri-réseau). b) Diffusion des résultats positifs.
Les additifs Alterna Poultry®, CAPS C2PG® et Entero-V Poultry® ont amélioré la perméabilité intestinale, et l'Entero-V Poultry® a diminué l'excrétion du parasite dans un contexte de challenge inflammatoire ou de challenge à la coccidiose chez le poulet de chair.	Éleveurs de poulets de chair, vétérinaires, scientifiques, nutritionnistes, entreprises développant des additifs pour la volaille et autres et intervenants dans le secteur avicole.	Pour tous, les additifs Alterna Poultry®, CAPS C2PG® et Entero-V Poultry® ont amélioré la perméabilité intestinale, et l'Entero-V Poultry® a diminué l'excrétion du parasite dans un contexte de challenge inflammatoire ou de challenge à la coccidiose chez le poulet de chair.	a) Présentation des résultats lors de symposiums pour les producteurs, comme le Rendez-vous avicole de l'AQINAC et diffusion des résultats (Bulletin des agriculteurs, site Internet du CRAAQ, CRSAD et Agri-réseau). b) Diffusion des résultats positifs.
Le challenge de coccidiose que nous avons développé a réduit les performances et a affecté l'intégrité intestinale des poulets de chair.	Scientifiques, nutritionnistes, entreprises développant des additifs pour la volaille et autres et intervenants dans le secteur avicole.	Pour tous, le challenge de coccidiose que nous avons développé a réduit les performances et a affecté l'intégrité intestinale des poulets de chair. Ce challenge peut être utilisé pour étudier des anticoccidiens ou leurs alternatives.	a) Présentation des résultats lors de symposiums pour les producteurs, comme le Rendez-vous avicole de l'AQINAC et diffusion des résultats (Bulletin des agriculteurs, site Internet du CRAAQ, CRSAD et Agri-réseau). b) Diffusion des résultats positifs.

Section 7 - Contribution et participation de l'industrie réalisées

Probiotech International Inc a contribué comme prévu au projet pour un montant total de 29 740 \$ (16 000 \$ en argent, 13 740 \$ en nature). L'entreprise a fourni les additifs alimentaires et dans l'eau de boisson et a contribué financièrement à une partie des charges animales et des analyses de laboratoire. Bertrand Medina de Probiotech International Inc a suivi l'essai, participé aux rencontres scientifiques, a participé à la rédaction scientifique des travaux effectués jusqu'à maintenant.

Mitacs a contribué avec 7 500 \$ en argent pour la bourse de l'étudiante au doctorat Sara Aouissi.

Section 8 - Rapport scientifique et/ou technique (format libre réalisé selon les normes propres au domaine d'étude)

1. Introduction

Les consommateurs recherchent de plus en plus des produits d'alimentation certifiés biologiques, qui ne sont pas génétiquement modifiés et qui sont exempts de médicaments. La production de poulet de chair n'échappe pas à ce courant, entraînant ainsi des contraintes d'élevage pour les producteurs. Ainsi, le développement d'alternatives naturelles aux médicaments et aux additifs alimentaires est nécessaire pour la filière avicole afin de limiter l'impact des infections communes chez le poulet de chair. Parmi ces maladies, la coccidiose aviaire entraîne des pertes économiques considérables pour l'industrie, avec une estimation en 2020 à 14 milliards de dollars à l'échelle mondiale (Blake et al., 2020).

La coccidiose aviaire affecte la santé digestive et la conversion alimentaire des poulets, est le principal facteur de risque de l'entérite nécrotique, cause des excréments liquides, et peut mener à des taux de mortalité importants (Chapman, 2014). Neuf espèces *Eimeria*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. mitis*, *E. tenella*, *E. mivati*, et *E. hagani*, ont été identifiées comme responsables de la coccidiose chez le poulet (Joyner and Long, 1974). Ces parasites peuvent infecter et se multiplier dans l'épithélium muqueux à différents endroits de l'intestin selon l'espèce (Conway and McKenzie, 2007). En plus de n'être pas compatibles avec une production biologique, les anticoccidiens chimiques, les coccidiostats, et les ionophores, bien qu'encore largement utilisés en production avicole, peuvent entraîner de la résistance aux médicaments (Chapman et al., 2010). La vaccination, composée d'une ou de plusieurs souches sauvages ou atténuées d'espèces *Eimeria* s'est développée au cours des années pour contrer la coccidiose, mais son efficacité n'est pas optimale et est difficile à exploiter en raison, notamment, du bas âge des poulets à l'abattage (Muthamilselvan et al., 2016).

Des produits naturels peuvent représenter une alternative pour prévenir la coccidiose. Ces dernières années, des produits d'extrait de plante ont été développés spécifiquement pour la coccidiose, comme le Cocc-Guard (DPI Global, É-U), l'Apacox (GreenVet, Italie), un mélange de *Quercus infectoria*, *Rhus chinensis* et *Terminalia chebula* (Kemin Industries, É-U), et une formulation de *Bidens pilosa* et d'autres plantes (Ta-Fong, Taiwan) (Thangavel et al., 2014; Yang et al., 2015). L'effervescence des alternatives naturelles aux médicaments se constate aussi par plusieurs travaux de recherche qui ont rapporté des effets anticoccidiens d'extraits de plus d'une trentaine de plantes (Muthamilselvan et al., 2016). L'inhibition de la sporulation, la destruction protéolytique des oocystes, la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte et des effets sur l'oxydation ont été rapportés comme mécanismes sous-jacents l'effet anticoccidien d'extraits de plantes (Akhtar et al., 2012; Bortoluzzi et al., 2021; Lee et al., 2018; Molan et al., 2009; Muthamilselvan et al., 2016; Nghanjuyi et al., 2015; Wang et al., 2017, 2008).

Un autre produit naturel, l'huile de coque de noix de cajou (*Anacardium occidentale*) a montré des effets bénéfiques sur les performances de croissance et sur la concentration d'*E. coli* intestinale chez le poulet de chair en croissance (López et al., 2012). L'acide anacardique qu'il contient agit comme ionophage dans la mitochondrie (Toyomizu et al., 2000) et ses niveaux de cardanol et de cardol lui confèrent une activité antioxydante (Andrade et al., 2011; Oliveira et al., 2011). Ces propriétés suggèrent donc que cette huile puisse présenter des activités anticoccidiennes. D'ailleurs, un essai chez le poulet de chair rapporte des effets anticoccidiens d'un mélange d'huiles d'*Anacardium occidentale* et d'huile de ricin (Murakami et al., 2014). Récemment, nos résultats ont montré que l'huile d'*Anacardium occidentale* en combinaison avec des huiles essentielles et qu'un mélange d'extraits d'anis étoilé (*Illicium verum*), de thym (*Thymus vulgaris*), de cannelle (*Cinnamomum verum*), de romarin (*Salvia rosmarinus*), d'orange (*Citrus sinensis* L.) et de curcuma (*Curcuma longa*) améliorent les performances de croissance et présentent des effets anticoccidiens. Une étude récente a montré que des huiles essentielles de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) ou d'origan (*Origanum vulgare*) améliorent les performances de croissance et mitigent partiellement les dommages intestinaux chez des poulets de chair soumis à un challenge de coccidiose (Zhang et al., 2023).

Une meilleure connaissance des effets de la coccidiose sur son hôte pourrait permettre d'orienter la découverte de nouveaux additifs pour la contrer. Parmi ces effets, il est déjà bien établi que l'infection à *E. tenella* peut affecter négativement le microbiome cœcal, ce qui entraîne une diminution de la production d'acides gras volatiles (AGV) chez les poulets de chair (Kley et al., 2012; Macdonald et al., 2017). En particulier, la concentration d'acide acétique diminue, les niveaux d'acides butyrique et isovalérique augmentent et la concentration d'acide isobutyrique augmente ou n'est pas affectée (Choi et al., 2021; Oakley et al., 2014). L'acide acétique est l'AGV le plus abondant, qui est produit par fermentation bactérienne dans le cœcum des poulets de chair (Aljumaah et al., 2020), et puisque les AGV fournissent environ 11 à 18% de la production totale d'énergie chez les oiseaux (Gasaway, 1976), l'effet d'une diminution des AGV causée par la coccidiose peut expliquer en partie son impact sur les performances de croissance. De plus, l'acide acétique possède des effets antibactériens à large spectre, agissant comme inhibiteur contre *E. coli*,

Salmonella, *Streptococcus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans l'intestin (Liévin et al., 2000). Une réduction de l'acide acétique conduit donc souvent à une infection secondaire par des coccidies. L'infection par *E. tenella* réduit aussi considérablement le *Subdoligranulum* producteur de butyrate dans le cæcum (Bjerrum et al., 2006). Cet AGV joue un rôle important dans la santé animale en régulant le système immunitaire et en réduisant l'inflammation chronique. Par conséquent, une diminution du butyrate peut conduire à une prévalence élevée d'inflammation chronique et à des troubles immunitaires (Lund et al., 2010). De façon plus générale, la coccidiose provoque un déséquilibre du microbiote intestinal (Cui et al., 2017; Kim et al., 2015; Kimura et al., 1976; Oakley et al., 2014), ce qui non seulement entraîne une diminution de la prise alimentaire et une altération de l'absorption (Turk, 1972), mais également augmente la susceptibilité de l'organisme aux infections secondaires, comme l'entérite nécrotique (Hofacre et al., 1998), et entraîne une réponse inflammatoire aiguë et une perte d'intégrité intestinale (Tomal et al., 2023). Nos données récentes ont aussi montré que la coccidiose entraîne un déséquilibre du microbiote cæcal et augmente les teneurs des genres *Clostridium sensu stricto 1* et *Shigella*, (projet #IA221665).

Par ailleurs, des études récentes ont aussi montré l'impact de l'infection à la coccidiose sur l'intégrité intestinale. L'infection régule considérablement à la baisse l'expression du gène MUC2 (Jiang et al., 2013), nécessaire à la reconstitution de la couche de mucus au niveau de la muqueuse intestinale, et affecte les niveaux d'expression des protéines de jonction serrée claudin1 (CLDN1) et occludin (OCLN) (Criado-Mesas et al., 2021). Des études récentes avec un challenge de coccidiose en combinaison ou non avec un challenge d'entérite nécrotique ont montré que des additifs à base d'huiles essentielles ont restauré les niveaux d'expression de ces marqueurs d'intégrité intestinale et la perméabilité intestinale (Stefanello et al., 2020; Zhang et al., 2023). D'autres travaux récents ont aussi mis en lumière que les huiles essentielles modulent les immunoglobulines Y, IL8, IL-12, IL6 et PTX3 dans un contexte de coccidiose aviaire (Bortoluzzi et al., 2021; Felici et al., 2023).

Ainsi, il est possible de croire que des additifs qui auraient des effets directs sur le parasite ou indirects en maintenant l'intégrité intestinale et la microflore normale de l'intestin du poulet pourraient lutter contre la coccidiose. Les additifs phytogéniques à l'étude, qui contiennent aussi un mélange d'huiles essentielles, de saponines et de polyphénols, nous laissent supposer qu'ils pourraient présenter aussi ces effets bénéfiques sur la santé intestinale. Nos données préliminaires ont montré que les additifs à l'étude présentent des effets anticoccidiens, mais les meilleures combinaisons des ingrédients et leurs doses restaient à établir, et leurs effets sur l'hôte demeuraient à être élucidés.

Cette étude visait donc à étudier l'efficacité des additifs à base d'ingrédients naturels contre la coccidiose chez le poulet de chair, comprendre leurs effets, particulièrement en lien avec la santé intestinale, et évaluer leur rentabilité. De plus, les additifs à base d'ingrédients naturels à l'étude pourraient représenter des alternatives naturelles aux anticoccidiens, tout en diminuant le développement de résistance.

2. Objectif

Évaluer l'effet de nouveaux additifs alimentaires à base d'ingrédients végétaux fonctionnels pour contrer la coccidiose et déterminer leurs effets sur la santé intestinale chez le poulet de chair.

Objectifs spécifiques

1) Identifier les combinaisons optimales d'ingrédients et de leurs doses pour les nouveaux additifs alimentaires; 2) Déterminer l'effet anticoccidien des additifs alimentaires; 3) Évaluer leurs effets sur l'intégrité et la perméabilité intestinales, 4) sur l'inflammation; 5) Évaluer leurs effets sur les performances de croissance et leurs impacts technico-économiques.

3. Hypothèse

Nous émettons l'hypothèse que des mélanges d'ingrédients naturels montrent des effets anticoccidiens, améliorent la perméabilité intestinale et réduisent l'inflammation, et ainsi peuvent représenter des additifs alimentaires naturels pour contrer la coccidiose et diminuer son impact chez le poulet de chair.

4. Méthodologie

D'abord, nous avons réalisé un criblage de mélanges d'ingrédients actifs naturels dans des modèles en culture cellulaire que nous avons mis au point pour déterminer les meilleures combinaisons ingrédient/dose. Ensuite, nous avons réalisé des essais expérimentaux avec des poulets de chair en conditions contrôlées pour valider les meilleures combinaisons et étudier leurs effets sur la santé intestinale. Notre challenge de coccidiose a été comparé à celui de modèles de dysfonctionnement de la barrière intestinale, et nous avons mesuré des biomarqueurs d'intégrité intestinale, de perméabilité intestinale et des marqueurs d'inflammation. Une analyse technico-économique a permis de connaître les impacts économiques de l'utilisation de ces additifs comme substitut aux anticoccidiens communément utilisés sur le terrain.

4.1 Essais *in vitro*

Les modèles *in vitro* que nous avons récemment mis au point permettent d'évaluer rapidement l'effet anticoccidien de plusieurs conditions, sans la nécessité d'utiliser des poulets de chair. Nous avons donc utilisé ces avantages pour l'objectif 1). Les effets sur la sporulation, la viabilité et la capacité d'invasion des parasites *Eimeria* ont été évalués grâce à des doses-réponses avec sept doses des produits réparties sur plus de $2 \log_{10}$ (Kabir et al., 2022), 0.5-200 µg/mL). Deux anticoccidiens (5 µg/mL salinomycine et 5 µg/mL amprolium) ont été utilisés comme témoins positifs, en plus d'un témoin mort ou sporulé et d'un témoin vivant ou sporulé non traité. Les produits testés contiennent des saponines (#1), des polyphénols (#2-4) et des extraits de cannelle (#5), de thym (#6), d'ail (#7), d'anis (#8), de basilic (#9) et de pin (#10). Ces extraits ont été testés individuellement *in vitro* pour évaluer quels ingrédients des produits finaux utilisés dans l'essai chez les poulets de chair sont efficaces contre le parasite. Les oocystes utilisés provenaient de propagations récentes de moins de deux mois d'isolats de souches *E. acervulina* et *E. tenella* de terrain récoltées au CRSAD en 2018.

4.1.1. Sporulation des oocystes

Les taux de sporulation des oocystes ont été déterminés *in vitro* selon les procédures décrites dans Fatemi et al. (2015). Brièvement, 1×10^5 oocystes d'*Eimeria* mixtes ont été incubés avec les produits à 29°C dans 2% de dichromate de potassium avec aération pendant 48 h. Les nombres d'oocystes sporulés et non sporulés ont été mesurés par la méthode d'hématimètre (Conway and McKenzie, 2007). Au moins 100 oocystes ont été évalués par répétition.

4.1.2. Viabilité des sporozoïtes

Les pourcentages de viabilité ont été déterminés *in vitro* selon les procédures décrites dans Kim et al. (2013). Brièvement, les oocystes d'*Eimeria* de terrain ont été lysés pour libérer les sporozoïtes, 1×10^6 sporozoïtes ont été traités et la viabilité a été mesurée par l'exclusion du bleu de trypan et par la motilité en comptant au moins 100 sporozoïtes par condition.

4.1.3. Tests de cytotoxicité sur des cellules MDBK

Selon les méthodes adaptées de Kabir et al. (2022), les cellules Madin-Darby bovine kidney (MDBK, Institut DSMZ, Braunschweig, Allemagne) cultivées en plaque 96 puits pendant 24 h à raison de 4×10^4 cellules par puits ont été traitées avec les sept doses pendant 48 h, puis équilibrées à la température de la pièce pendant 30 min. La viabilité cellulaire a ensuite été déterminée par le réactif CellTiter-Glo 2.0 (Promega, Madison, WI) selon les directives du fabricant. Le signal de luminescence des puits témoins contenant 0.1% DMSO a été fixé à une viabilité cellulaire de 100%.

4.1.4. Capacité d'invasion des sporozoïtes

Les taux d'invasion des sporozoïtes ont été déterminés *in vitro* selon les procédures décrites dans Burt et al. (2013). Brièvement, des cellules épithéliales bovines de rein MDBK à 70-80% de confluence ont été exposées à 2×10^5 sporozoïtes et incubées à 37°C avec 5% CO₂ pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été lavées et récupérées. L'ADN a été extrait et une qPCR a été réalisée pour évaluer l'effet différentiel sur les espèces *Eimeria*. Un traitement témoin, sans sporozoïte, a aussi été utilisé.

4.1.5. Analyses des tests *in vitro*.

Les valeurs des concentrations maximales inhibitrices (EC₅₀) et des concentrations cytotoxiques cellulaires semi-maximales (CC₅₀) ont été calculées par un ajustement de la courbe dose-réponse sigmoïdale par régression non linéaire (GraphPad Prism, version 10). Les différences de parasitème entre les traitements et le témoin ont été considérées significatives avec un p < 0.05 en utilisant une ANOVA à un facteur, suivie de tests post-hoc de Tukey. Pour tous les essais *in vitro*, trois répétitions par condition ont été utilisées.

4.2. Essais chez les poulets de chair

4.2.1. Traitements

Pour le premier essai (modèle d'inflammation chronique intestinale), les traitements ont été :

T1 = Témoin non infecté à *Eimeria*, non médicamenté

T2 = Témoin infecté à *Eimeria*, non médicamenté

T3 = Témoin négatif modèle d'inflammation au sulfate de sodium de dextrane (SSD),

T4 = SSD + médicamenté aux anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate j0-j20 suivi de 125 ppm zoalène j20-j35)

T5 = SSD + Synbiotec®, 500 g/T démarrage/croissance, 250 g/T finition) (Probiotech International, Saint-Hyacinthe, QC)

T6 = SSD + Alterna Poultry®, 400 g/T démarrage/croissance, 300 g/T finition) (Probiotech International)

T7 = SSD + CAPS C2PG®, 35 g/T démarrage/croissance/finition) (Probiotech International)
T8 = SSD + Entero-V Poultry® dans l'eau de boisson (Probiotech International) (250 mL/1000 L d'eau de boisson, du j8 au j14, puis du j22 au j28 (pendant les périodes de gavage SSD, inflammation).

Pour le deuxième essai (challenge de coccidiose), les traitements ont été :

T1 = Témoin non infecté à *Eimeria*, non médicamenté

T2 = Témoin infecté *Eimeria*, non médicamenté

T3 = Témoin modèle d'inflammation, SSD, 0,45 g aux j19 et j20, non médicamenté

T4 = *Eimeria* + médicamenté aux anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate j0-j20 suivi de 125 ppm zoalène j20-j35),

T5 = *Eimeria* + Synbiotec®, 500 g/T démarrage/croissance, 250 g/T finition (Probiotech International)

T6 = *Eimeria* + Alterna Poultry®, 400 g/T démarrage/croissance, 300 g/T finition + Synbiotec®, 500 g/T démarrage/croissance, 250 g/T finition (Probiotech International)

T7 = SSD + CAPS C2PG, 35 g/T démarrage/croissance/finition (Probiotech International)

T8 = *Eimeria* + Entero-V Poultry® dans l'eau de boisson (Probiotech International) (250 mL/1000 L d'eau de boisson, du j13-j23, pendant l'infection).

Pour les deux essais, le programme alimentaire en trois phases a été : 1) Début (j0-j10), 2) Croissance (j10-j20), 3) Finition (j20-j35). Les aliments de base ont été fabriqués en granules et les traitements expérimentaux ont été formulés à l'aide de pré-mélanges 40X au laboratoire. De sorte à limiter les variations dues à la fabrication, les traitements alimentaires ont été formulés avec le même aliment de base. Les oiseaux n'ont pas été vaccinés contre la coccidiose.

4.2.2. Animaux

L'utilisation des animaux a été approuvée par le comité de protection des animaux du CRSAD (CPA-CRSAD, #467AV). Pour chacun des deux essais avec les poulets de chair, mille cent cinquante-deux (1,152) Ross 308 mâles d'un jour ont été distribués aléatoirement à l'un des 8 traitements expérimentaux, selon un plan complet en 12 blocs, à raison de 12 oiseaux par cage, pour un total de 96 cages. Afin de respecter la densité maximale autorisée fixée à 31 kg/m², des oiseaux ont été retirés pour atteindre 6 poulets à compter du j21 jusqu'au j34. Les blocs ont été désignés par section du bâtiment pour tenir compte des effets du bâtiment. Les oiseaux ont été hébergés pendant 35 jours au poulailler DC-0149 du CRSAD selon les conditions d'élevage suivantes habituelles. La température a été initialement fixée à 33°C et puis progressivement réduite chaque semaine pour atteindre 20.5°C à 35 jours. La moulée à servir aux animaux a été formulée par la meunerie (Agri-Marché, Saint-Isidore, QC) de sorte à répondre aux besoins nutritionnels de la race.

4.2.3. Challenge coccidien

Les oiseaux qui ont été challengés par la coccidiose ont reçu au j14 un inoculum d'isolats mixtes de champs. Les dilutions de l'inoculum de coccidies ont été préparées de sorte à atteindre les niveaux d'oocystes sporulés suivants par oiseau : 160 000 *E. acervulina* et 40 000 d'*E. tenella* (pour un total de 200 000 oocystes par oiseau). Les oocystes d'espèces mixtes d'*Eimeria* ont été isolés à partir d'échantillons de fiente d'oiseaux non vaccinés au poulailler du CRSAD en 2018 (même source que les tests *in vitro*). Les oocystes ont été propagés dans des poulets sains, sporulés à 30°C dans 2% de dichromate de potassium pendant 48 heures et lavés 3 fois avec de l'eau, avant d'être inoculés aux oiseaux. 1 mL de la suspension d'oocystes à 200 000 oocystes/ml a été inoculé par oiseau par gavage oral.

4.2.4. Modèle d'inflammation chronique intestinale chez les poulets

Les oiseaux qui ont été utilisés dans le modèle d'inflammation chronique intestinale (essai #1) ont reçu 0.35 mg/mL de SSD par gavage oral en deux cycles de 5 jours consécutifs, interrompus par une période de récupération de 9 jours (administration aux j9-j14 et j23-j27), comme décrit dans Pont et al. (2021).

4.2.5. Prélèvements et euthanasie

Aux j21 et j35, 2 oiseaux représentatifs par cage ont été euthanasiés pour réaliser l'évaluation des lésions intestinales, les analyses *Eimeria* et microbiologiques et les mesures d'inflammation, de perméabilité et d'intégrité intestinales et d'acides gras volatiles (voir section 4.2.6).

4.2.6. Mesures et observations

4.2.6.1. Performances zootechniques et suivi de l'état de santé

Tous les oiseaux et l'aliment par cage ont été pesés au début et à la fin de chaque phase alimentaire pour déterminer le poids, l'apport alimentaire, la conversion alimentaire et le gain moyen quotidien (GMQ). Les aliments ont été échantillonnés pour analyse afin de déterminer leur composition. Les oiseaux ont été inspectés au moins deux fois par jour pour l'enregistrement de la santé générale et de la mortalité des oiseaux.

4.2.6.2. Oocystes et coccidiose

Un suivi du décompte des coccidies a été assuré grâce à la collecte de trois échantillons de fientes cœcales et fécales collectés dans les douze cages par traitement, deux fois par semaine. Les échantillons ont été groupés par traitement et le décompte d'oocystes a été réalisé par microscopie grâce à des lames McMaster. Aux j17 et j20, des échantillons de fientes ont été collectés pour des décomptes coccidiens par cage. Au j21, deux oiseaux par cage (un total de 192 oiseaux) ont été euthanasiés pour évaluer macroscopiquement les lésions de coccidiose (avec l'aide de Services Vétérinaires Ambulatoires Triple-V inc.). Des analyses par qPCR ont été réalisées à partir d'échantillons de fientes des oiseaux qui ont été euthanasiés au j21 et à partir d'échantillons de fientes au moment du pic de coccidies, pour déterminer les populations d'*E. acervulina* et *E. tenella*, selon Vrba et al. (2010) et Peek et al. (2017). Pour les valeurs plus faibles que le seuil de quantification, la moitié du seuil de quantification sera utilisée. Les courbes standard seront construites grâce à des dilutions d'ADN double-brin linéarisé correspondant aux amplicons de chaque espèce.

4.2.6.3. Santé intestinale et marqueurs d'inflammation

L'évaluation de la perméabilité intestinale a été réalisée par des mesures de fluorescence de dextrane couplé à la fluorescéine (Fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-d) préalablement administrée aux poulets, selon Barekatain et al. (2020). L'évaluation de l'intégrité intestinale a été déterminée par les mesures d'expression génique de mucin2 (MUC2), claudin-1 (CLDN1), et occludin (OCLN) dans le jéjunum, selon les procédures décrites dans Stefanello et al. (2020). Mucin2 a été utilisé comme marqueur de l'intégrité intestinale et CLDN1 et OCLN ont été utilisés comme marqueurs de la régulation de la barrière de perméabilité paracellulaire des jonctions serrées. Les mesures d'acides gras volatiles (AGV) (acides lactique, acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, isovalérique et caproïque) ont été déterminées à partir des échantillons de cæcum par une méthode que nous avons mise au point par chromatographie liquide. Les niveaux fécaux de calprotectin (CALP) et de lipocalin-2 (LCN-2) des oiseaux euthanasiés ont été déterminés par des kits de test immuno-enzymatique ELISA tel que décrits par Pont et al. (2021).

4.2.6.4. Données technico-économiques

Pour évaluer les effets des produits sur les coûts, les différences des coûts de l'aliment ingéré et des additifs ont été calculées par rapport au gain de poids des témoins infectés non médicamentés (T2) pour toute la durée de l'élevage (j0-j34). Les coûts suivants ont été utilisés : Deccox® à un taux d'inclusion de 0,5 kg/t d'aliment, 45 \$/kg; Zoamix® à un taux d'inclusion de 0,5 kg/t d'aliment, 40 \$/kg; Synbiotec®, 16,5 \$/kg; Alterna Poultry®, 35 \$/kg; CAPS C2PG®, 25 \$/kg, Entero-V Poultry®, 60 \$/L).

4.2.5. Analyses statistiques

Les données zootechniques et les décomptes des oocystes ont été analysés à l'aide d'un modèle mixte incluant l'effet fixe du traitement, du parquet le cas échéant, et le bloc, représentant la section du bâtiment, comme effet aléatoire. Les procédures de modèles linéaires et des méthodes des moindres carrés standard et du maximum de vraisemblance restreint (REML) des logiciels JMP Pro (version 17, The SAS Institute, Cary, NY, États-Unis) et R (R Core Team (2024)) ont été utilisées. La normalité des résidus, l'homogénéité de la variance et l'absence de données aberrantes (résidus studentisés $\pm 3,0$) ont été vérifiées pour toutes les variables. Des comparaisons entre toutes les paires des traitements ont été réalisées à l'aide de tests Tukey des différences des moindres carrés, en suivi (post hoc) du modèle linéaire. Les données des scores lésionnels de coccidiose ont été analysées par des analyses non paramétriques Kruskal-Wallis et les comparaisons entre les traitements par des analyses post-hoc Wilcoxon, grâce aux logiciels JMP Pro et R. Les moyennes ajustées par le modèle statistique (moyennes des moindres carrées) accompagnées de leurs erreurs standard seront présentées. Les unités expérimentales pour les données de performances zootechniques et les décomptes d'oocytes ont été les parquets, tandis que les unités expérimentales pour les données des scores lésionnels ont été les oiseaux.

5. Résultats

5.1 In vitro

Les données des essais *in vitro* sont résumées aux Figures 1 à 5. Les 10 ingrédients à l'étude n'ont pas eu d'effet sur la sporulation des oocystes *Eimeria* (Figure 1). Les ingrédients 2, 4, et 10 (polyphénols et extrait de pin) ont diminué la viabilité des sporozoïtes de façon dose-dépendante (Figure 2). L'ingrédient 1 (saponines) a diminué la viabilité des sporozoïtes à seulement 200 µg/mL (Figure 2). Tous les ingrédients ont montré une CC₅₀ >200 µg/mL, à l'exception de l'ingrédient 3 (polyphénols), avec une CC₅₀ calculée à 113 µg/mL (Figure 3). À l'exception de l'ingrédient 1 (saponines), tous les ingrédients ont montré une diminution de la capacité d'invasion d'*E. acervulina* aux cellules hôtes MDBK (Figure 4). Les ingrédients 4, 5, 9 et 10 (polyphénols et extraits de basilic et de pin) ont montré les plus grandes diminutions (Figure 4). Les ingrédients 1, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 (saponines et extraits de cannelle, de thym, d'ail, d'anis, de basilic et de pin) ont diminué la capacité d'invasion d'*E. tenella* aux cellules hôtes MDBK (Figure 5). Les ingrédients 5, 7, 9 et 10 (extraits de cannelle, d'ail, de basilic et de pin) ont montré les plus grandes diminutions (Figure 5).

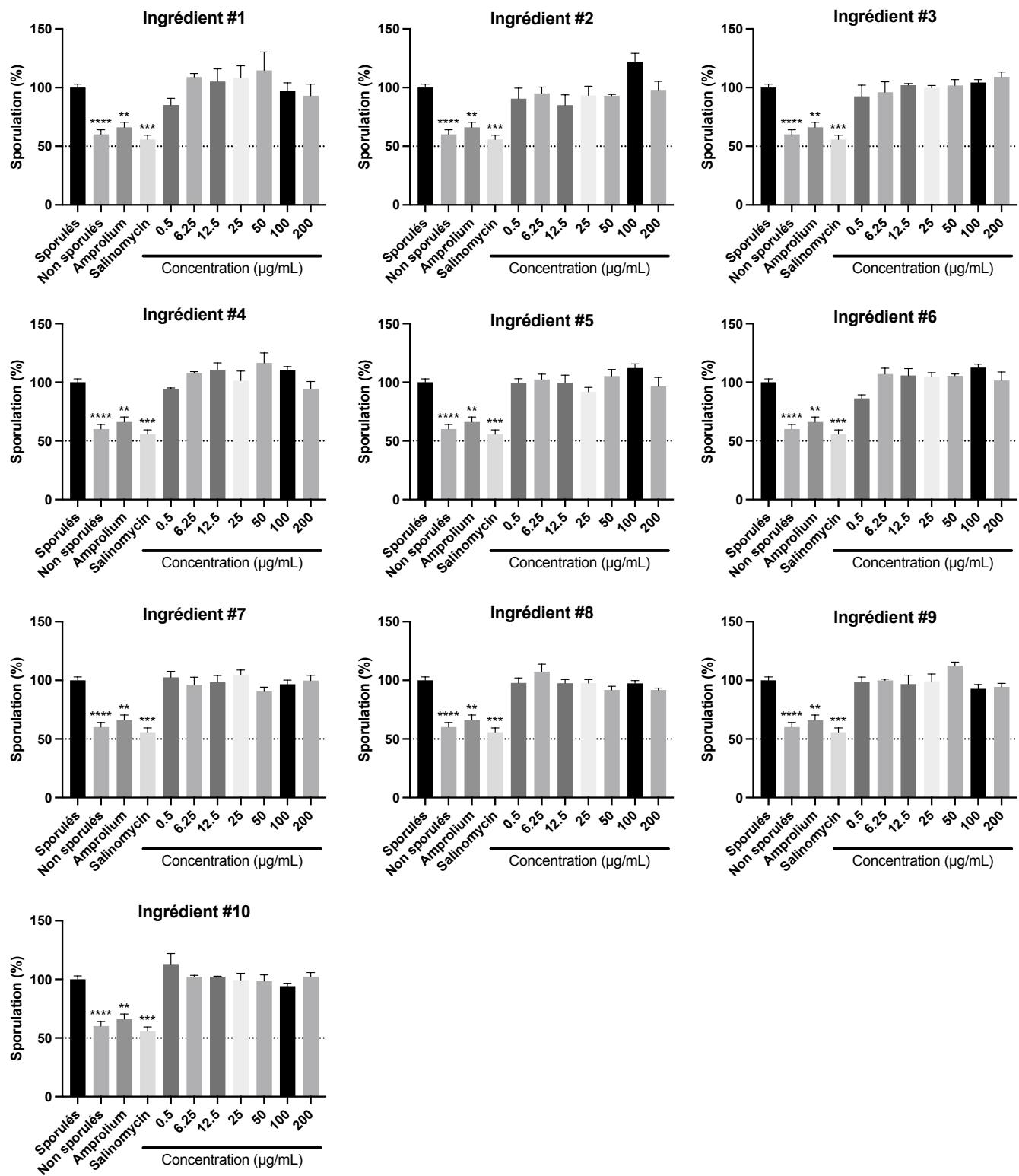


Figure 1. Taux de sporulation des oocystes *Eimeria* exposés à 7 doses (0,5-200 $\mu\text{g/mL}$) des 10 ingrédients. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs oocystes sporulés sans traitement.

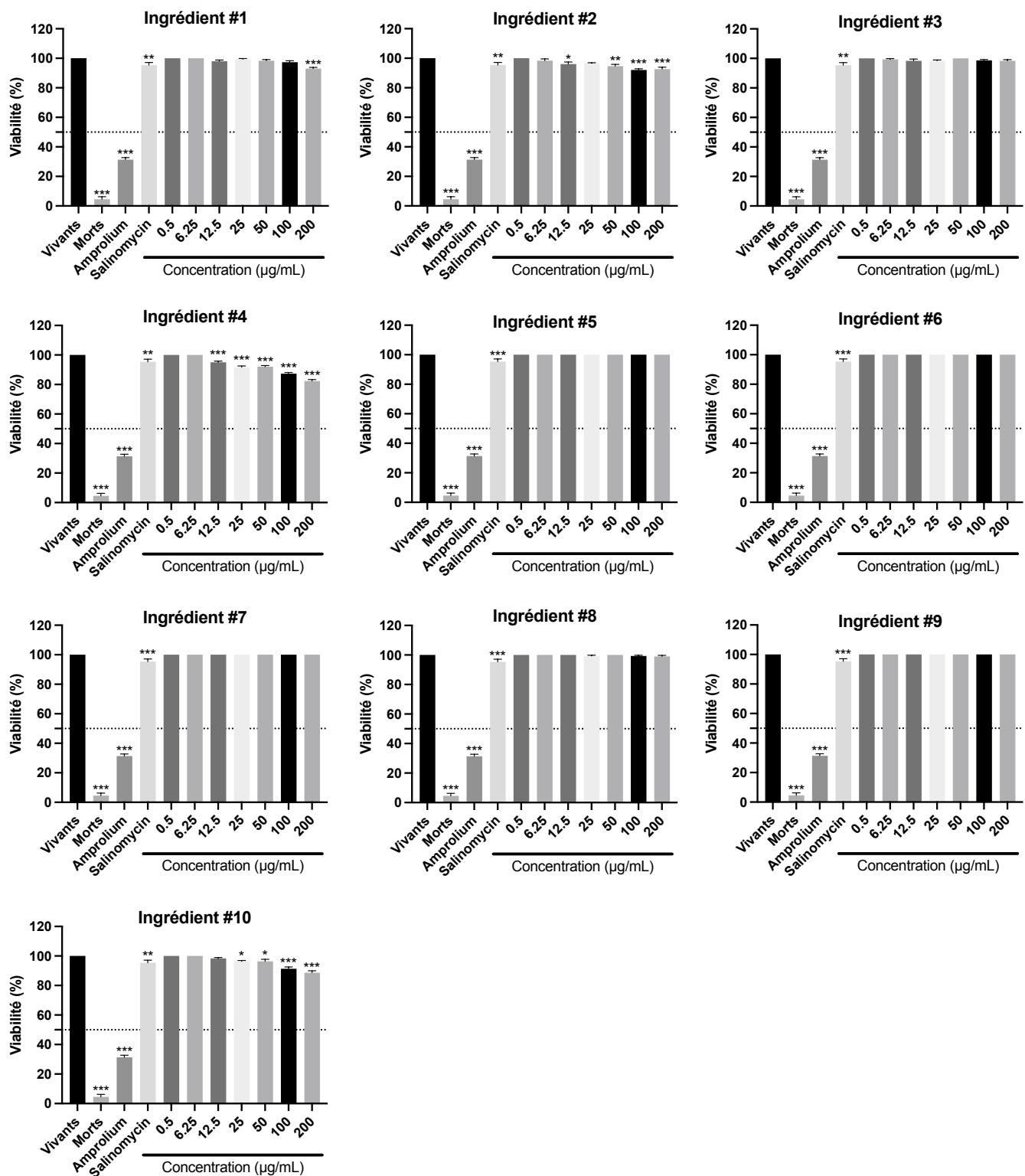


Figure 2. Viabilité des sporozoïtes *Eimeria* exposés à 7 doses (0,5-200 $\mu\text{g/mL}$) des 10 ingrédients. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs témoin vivant sans traitement.

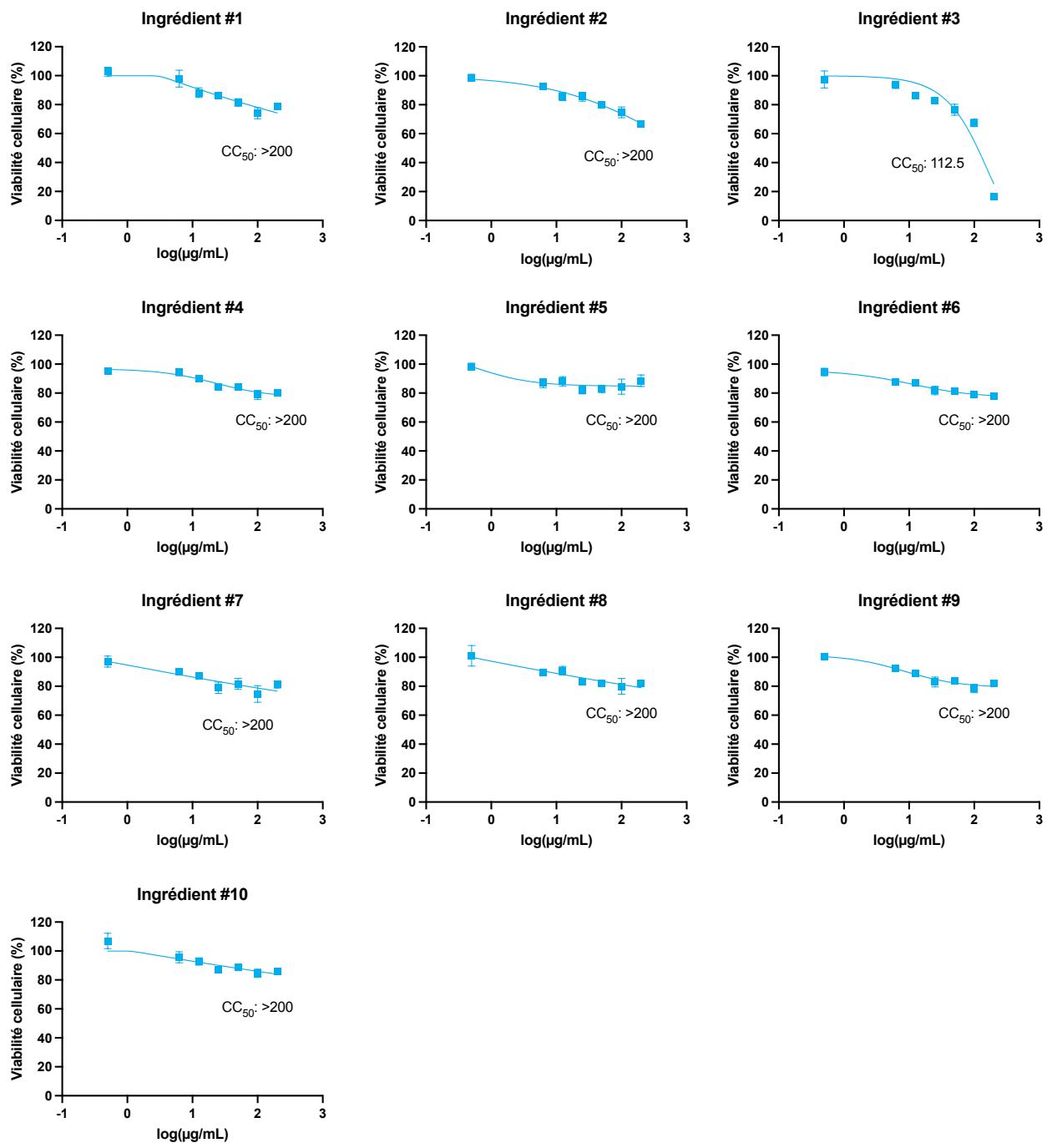


Figure 3. Données de viabilité des cellules MDBK exposées à 7 doses (0,5-200 $\mu\text{g/mL}$) des 10 ingrédients. Les concentrations cytotoxiques semi-maximales (CC_{50}) sont présentées.

E. acervulina

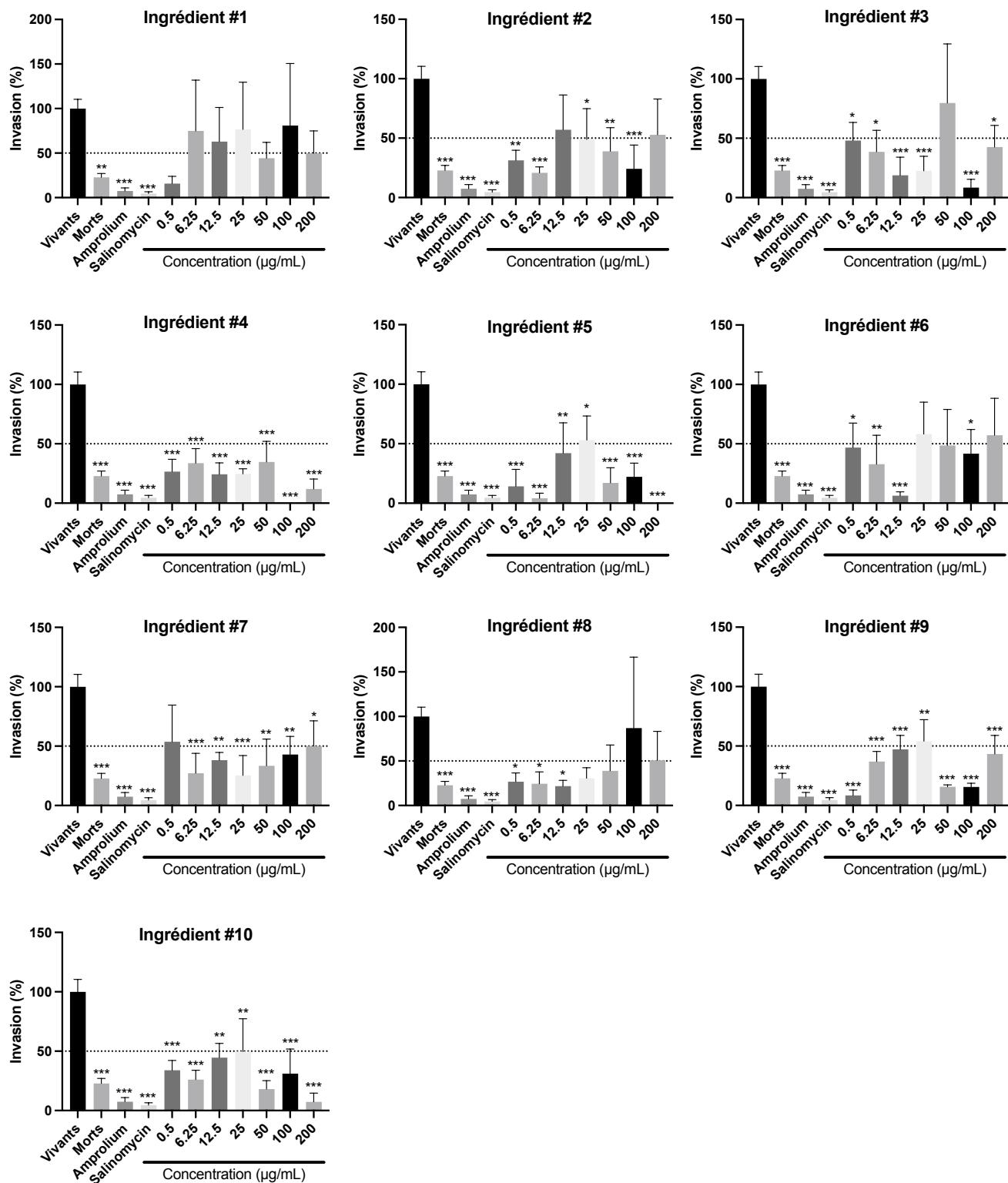


Figure 4. Capacité d'invasion des sporozoïtes *E. acervulina* aux cellules MDBK exposés à 7 doses (0.5-200 µg/mL) des 10 ingrédients. Les barres représentent les moyennes ± l'erreur standard de la moyenne. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs témoin vivant sans traitement.

E. tenella

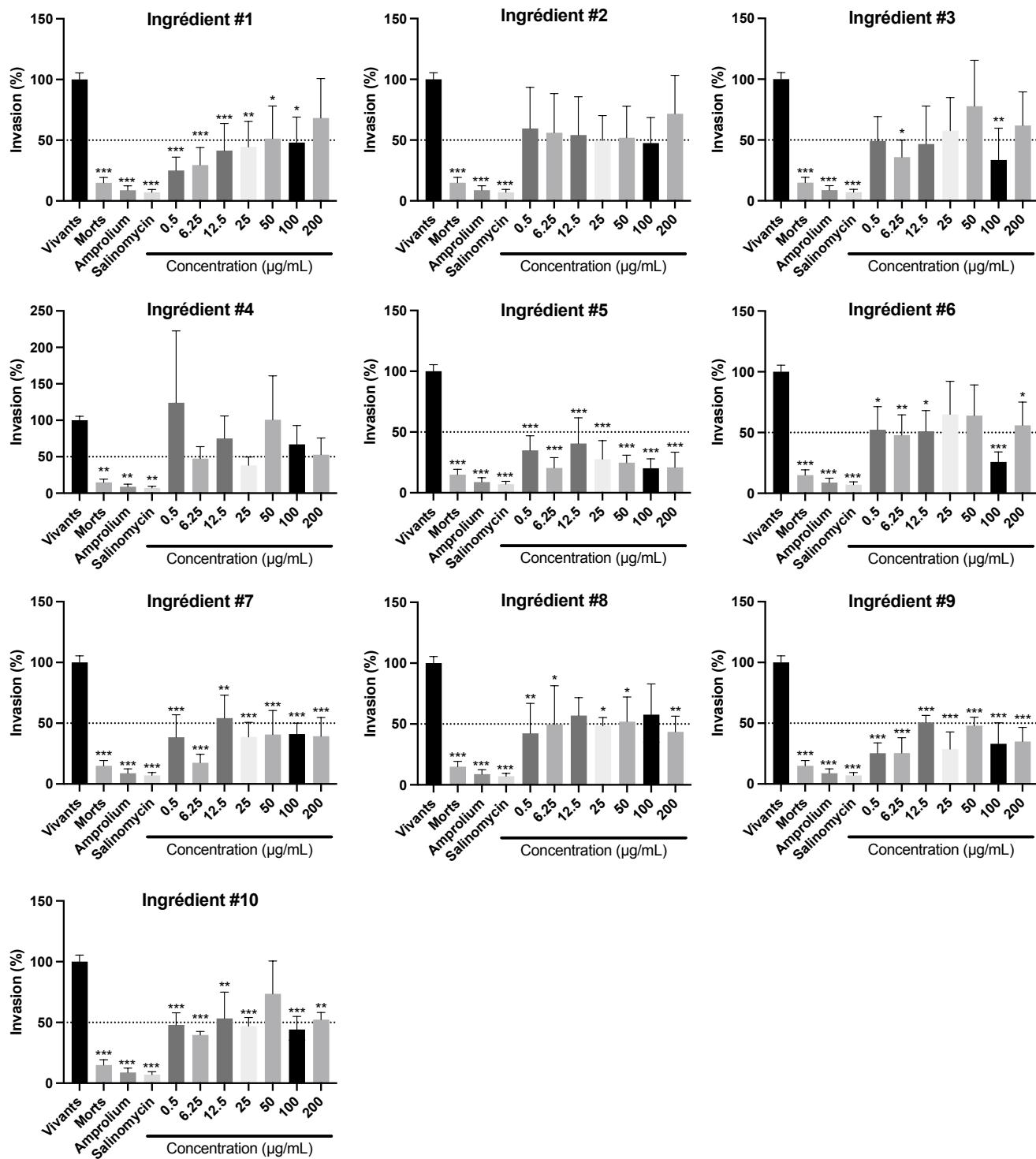


Figure 5. Capacité d'invasion des sporozoïtes *E. tenella* aux cellules MDBK exposés à 7 doses (0,5-200 $\mu\text{g/mL}$) des 10 ingrédients. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs témoin vivant sans traitement.

5.2 Modèle d'inflammation chronique intestinale

À moins que spécifié autrement, les données rapportées dans cette section sont comparées à celles des oiseaux ayant reçu le challenge inflammatoire et non traités (T3).

Performances de croissance

Le challenge coccidien (T2) a diminué le poids des oiseaux au j20 (Figure 6A), aggravé la conversion alimentaire pendant la phase 10-20 j (Figure 6C) et a montré une tendance à la réduction du poids corporel au j34 (Figure 6B). Le challenge inflammatoire (T3) et les autres traitements n'ont pas eu d'effet sur le poids des oiseaux au j20, comparativement aux oiseaux non challengés (T1) (Figure 6A). Au j34, tous les traitements incluant les anticoccidiens (T4 à T8) ont diminué le poids des oiseaux, comparativement aux oiseaux challengés (T3) (Figure 6B). Durant la période 10-20 j, le CAPS C2PG® (T7) a amélioré la conversion alimentaire, comparativement aux oiseaux challengés (T3) (Figure 6C). Au cours de l'élevage (0-34 j), le traitement aux anticoccidiens conventionnels (décoquinate-zoalène) (T4) et les T5 et T7 ont détérioré la conversion alimentaire, comparativement aux oiseaux challengés (T3) (Figure 6D).

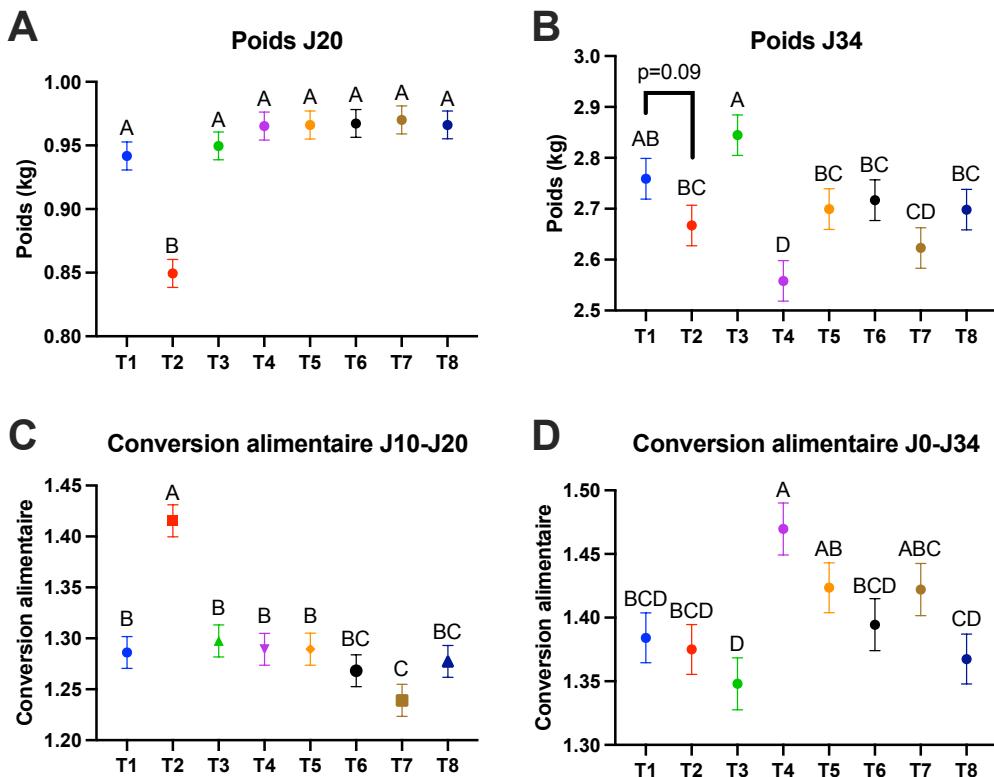


Figure 6. Données de performances zootechniques de l'essai #1. Poids des oiseaux au j20 (**A**), au j34 (**B**), et conversion alimentaire pendant la période 10-20 j (**C**) globalement (0-34 j) (**D**). Les barres représentent les moyennes des moindres carrées \pm l'erreur standard. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

Impacts technico-économiques

Les différences en \$ par t produite par rapport au T3 sont résumées à la Figure 7. Le traitement aux anticoccidiens (T4) a augmenté le coût (+148 \$/t produite, $p<0,05$). Les additifs alimentaires (T5 à T7) ont aussi augmenté le coût, mais de façon moins importante (+73 à +81 \$/t, $p<0,05$), alors que l'Entero-V Poultry® (T8) ne l'a pas augmenté (Figure 7).

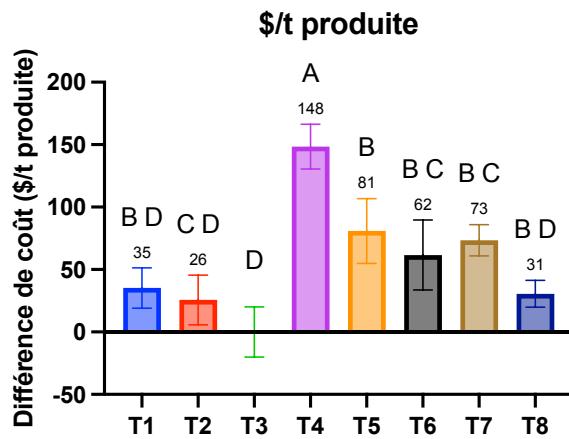


Figure 7. Différences des coûts de l'aliment ingéré et des additifs de l'essai par rapport au gain de poids produit (\$/t produite) par rapport au T3. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

Oocystes et coccidiose

Le challenge coccidien (T2) a augmenté les scores lésionnels associés à *E. acervulina* (Figure 8A) et à *E. tenella* (Figure 8B) au jour 21 et a augmenté les décomptes d'oocystes totaux excrétés au jour 20 (Figure 8C). Les oiseaux soumis au challenge inflammatoire SSD (T3 à T8) n'ont pas modifié les scores lésionnels et les décomptes d'oocystes totaux excrétés (Figure 8C).

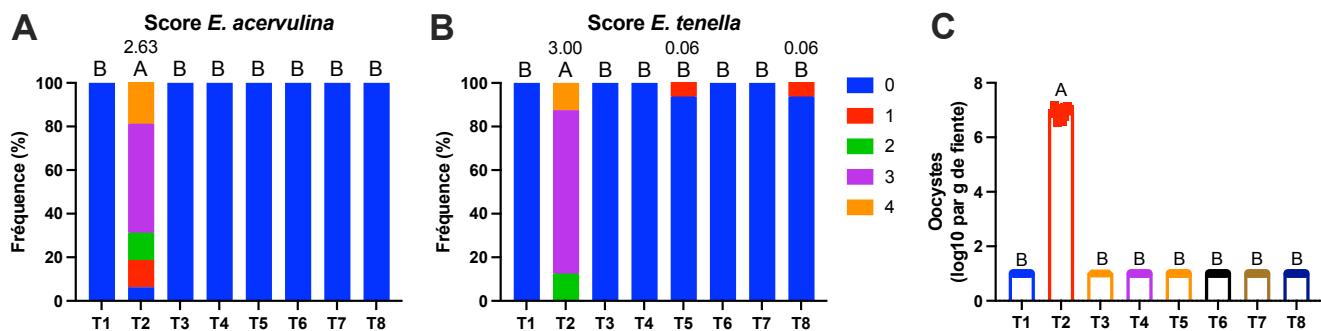


Figure 8. Lésions de coccidiose et excrétion d'oocystes d'*Eimeria*. Lésions caractéristiques d'*E. acervulina* (A) et d'*E. tenella* (B) aux j21 et décompte d'oocystes excrétés au j20 (C). Les données présentées sont les fréquences pour chaque score lésionnel. Les moyennes des scores lésionnels sont affichées au-dessus des barres. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

Santé intestinale et marqueurs inflammatoires

Des mesures sériques de fluorescence de dextrane couplé à la fluorescéine (Fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-d) ont montré que le challenge inflammatoire (T3) a augmenté la perméabilité intestinale au j28 (Figure 9B). Les traitements T4, T6, T7 et T8 ont prévenu cette augmentation de perméabilité (Figure 9B).

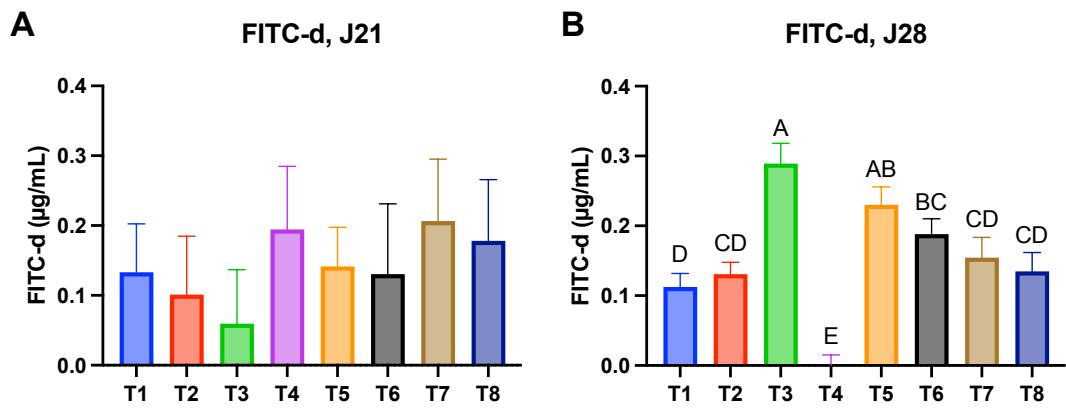


Figure 9. Perméabilité intestinale par des mesures sérielles de fluorescence de dextrane couplé à la fluorescéine (Fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-d). Les données présentées sont les mesures de FITC-d aux j21 (A) et j28 (B). Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

Le challenge *Eimeria* (T2) a augmenté les scores d'altérations histologiques macroscopiques au j21, comparativement aux oiseaux non challengés (T1) (Figure 10A). Au j28, le challenge inflammatoire (T3) a montré une tendance à augmenter les scores d'altérations histologiques macroscopiques, comparativement aux oiseaux non challengés (T1) ($p=0,0783$, Figure 10B). Le traitement aux anticoccidiens a diminué les scores macroscopiques au j28 et le T6 a montré presque une tendance à les diminuer ($p=0,1061$) (Figure 10B).

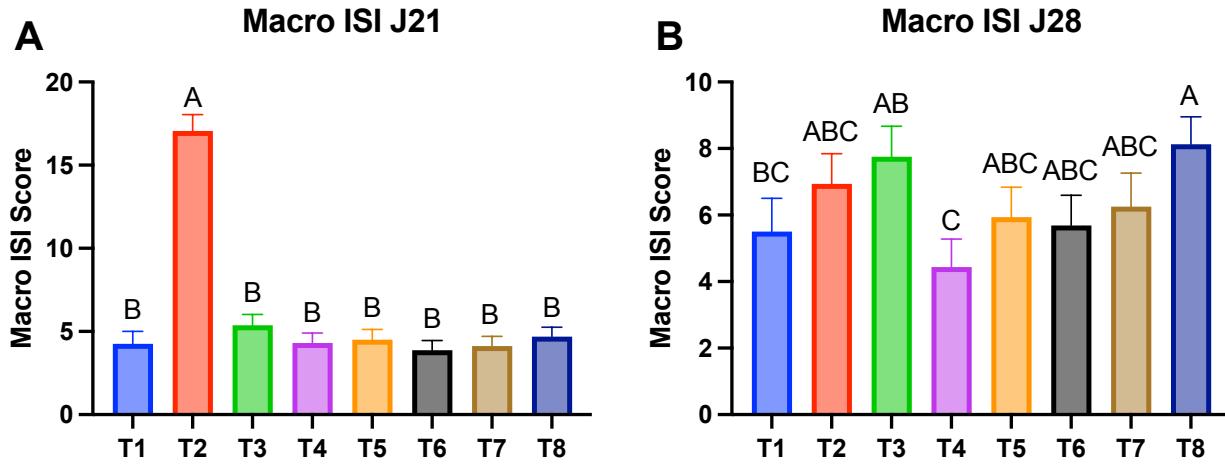


Figure 10. Lésions intestinales macroscopiques. Les données présentées sont les scores aux j21 (A) et j28 (B). Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

Les traitements n'ont pas eu d'effet sur les niveaux fécaux de calprotectine et de lipocaline (Figure 11), ni sur l'expression génique de MUC2 et OCLN au niveau du jéjunum au j28 (Figure 12). Les niveaux de CLDN1 ont été sous le seuil de détection et ne sont pas présentés.

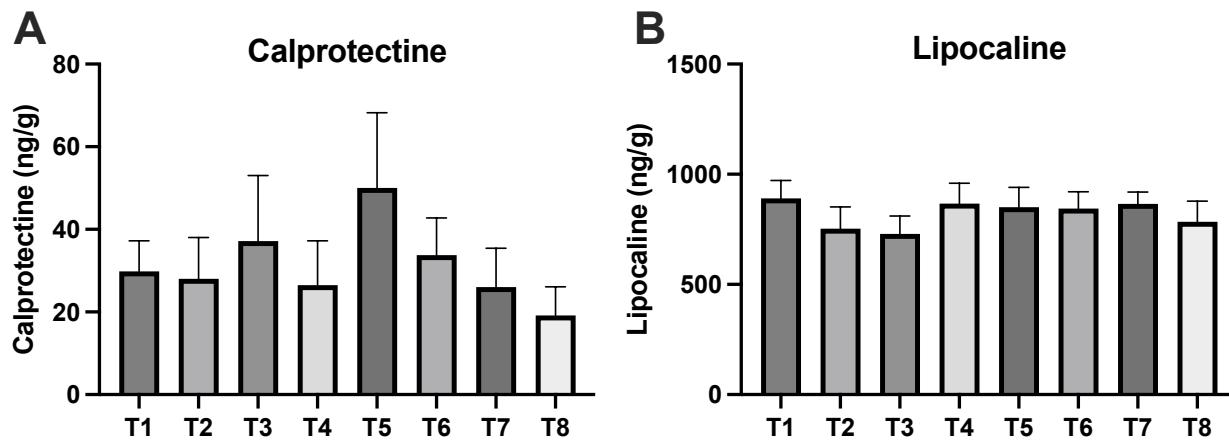


Figure 11. Mesures fécales de la calprotectine (**A**) et de la lipocaline (**B**) par ELISA au j28. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

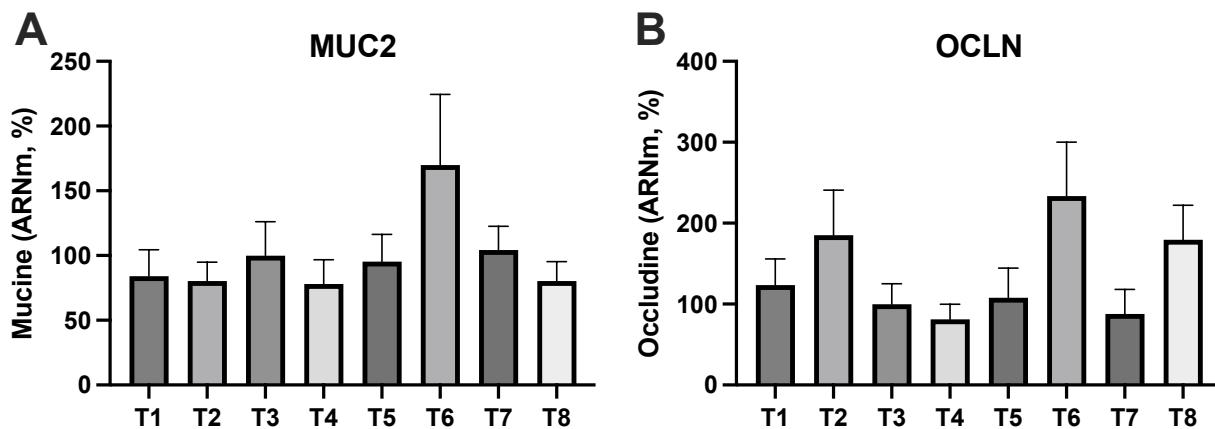


Figure 12. Niveaux d'expression de MUC2 et OCLN au jéjunum au j28. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

Les données des AGV cœcaux sont présentées au Tableau 1. Le challenge de coccidiose a diminué les niveaux d'acide butyrique.

Tableau 1. Acides gras volatiles des contenus cœcaux au j28.

AGV	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	Erreur-type	valeur de p
Acétique	10.55	8.58	8.86	8.81	9.78	9.15	9.87	9.80	1.14	0.943
Butyrique	3.16 ^a	1.65 ^c	2.56 ^{ab}	2.63 ^{ab}	2.32 ^{bc}	2.02 ^{bc}	2.74 ^{ab}	2.70 ^{ab}	0.33	0.047
Caproïque	10.54	9.92	10.70	9.08	12.10	13.63	5.75	9.97	2.38	0.526
Isobutyrique	13.30	12.35	15.35	14.58	14.40	14.96	18.00	15.92	2.13	0.466
Isovalélique	2.48 ^{bcd}	1.73 ^d	2.86 ^{abc}	3.58 ^a	2.81 ^{abc}	2.12 ^{cd}	2.36 ^{bcd}	3.15 ^{ab}	0.34	0.012
Lactique	3.93	2.44	3.73	3.54	3.66	3.72	4.13	3.79	0.40	0.214
Propionique	1.20 ^c	1.66 ^{abc}	1.65 ^{abc}	1.75 ^{ab}	1.25 ^{bc}	1.51 ^{bc}	2.05 ^a	1.31 ^{bc}	0.19	0.035
Valérique	3.24	3.88	3.88	3.13	3.37	4.17	2.83	2.29	0.56	0.145
Total	48.40	36.56	49.60	45.13	49.70	48.75	44.88	46.47	4.81	0.449

AGV, acide gras volatile. T1, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; T3, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; T4, oiseaux SSD + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; T5, oiseaux SSD + Synbiotec® ; T6, oiseaux SSD + Alterna Poultry® ; T7, oiseaux SSD +CAPS C2PG®; T8, oiseaux SSD + Entero-V Poultry®.

5.3 Challenge de coccidiose

À moins que spécifié autrement, les données rapportées dans cette section sont comparées à celles des oiseaux ayant reçu le challenge de coccidiose et non traités (EI), à l'exception du traitement SSD+CAPS qui est comparé au témoin du challenge inflammatoire (SSD).

Performances de croissance

Le challenge coccidien (EI) a diminué le poids des oiseaux aux j20 (-10,6%, Figure 13A) et j34 (-6,8%, Figure 13B) et a aggravé la conversion alimentaire pendant la phase 10-20 j (+4,7%, Figure 13C). Le challenge inflammatoire (SSD) et les additifs à l'étude n'ont pas eu d'effet sur les performances des oiseaux.

Impacts technico-économiques

Les différences en \$ par t produite par rapport au EI sont résumées à la Figure 14. Le challenge à la coccidiose (EI) a augmenté les coûts par t produite (+59 \$/t) comparativement aux oiseaux témoins (NI). Seul le traitement aux anticoccidiens (EI+Rx) a diminué les coûts (-58 \$/t) (Figure 14).

Oocystes et coccidiose

Le challenge coccidien (EI) a augmenté les scores lésionnels associés à *E. acervulina* (+2.38, Figure 15A) et à *E. tenella* (+2.38, Figure 15B) au jour 21, et a augmenté les décomptes d'oocystes totaux excrétés au jour 20 (+6.7 log₁₀, Figure 15C). L'Entero-V Poultry® a diminué l'excrétion des oocystes (-0.8 log₁₀, Figure 15C). Les données de qPCR montrent que les anticoccidiens (EI+Rx) ont diminué les excréptions d'*E. acervulina* (Figure 16A), d'*E. tenella* (Figure 16F) et la somme des deux (Figure 16C). Les additifs à l'étude n'ont pas diminué l'excrétion d'*E. acervulina*, et d'*E. tenella* (Figure 16A, 16B, 16C). Une tendance à la diminution des copies d'*Eimeria* totales a été observée pour Alterna Poultry® ($p=0.0748$, Figure 16C). *E. maxima* n'a pas été détecté par qPCR dans les échantillons.

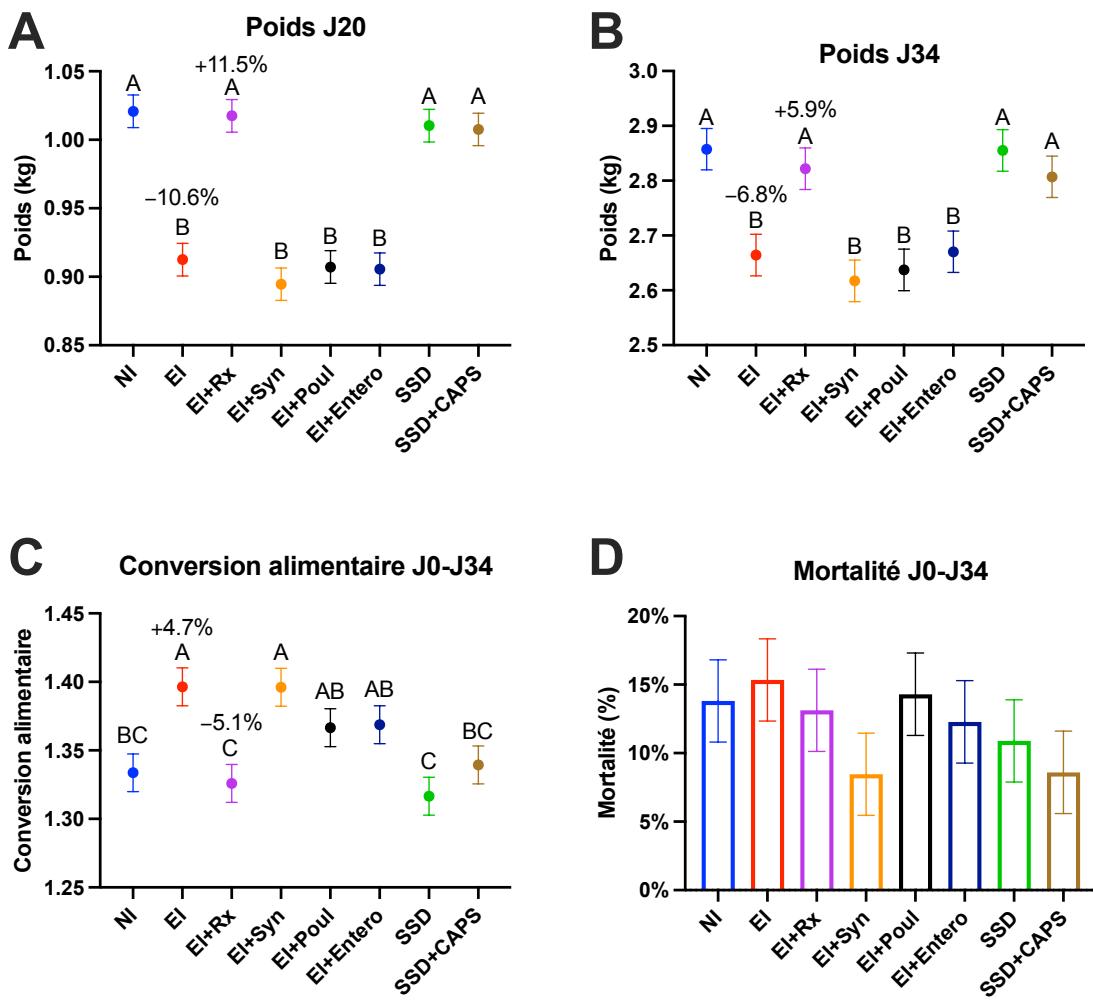


Figure 13. Données de performances zootechniques de l'essai #2. Poids des oiseaux au j20 (**A**), au j34 (**B**), et conversion alimentaire globale (0-34 j) (**C**), et taux de mortalité globale (0-34 j) (**D**). Les barres représentent les moyennes des moindres carrées \pm l'erreur standard. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+RX, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Enter-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

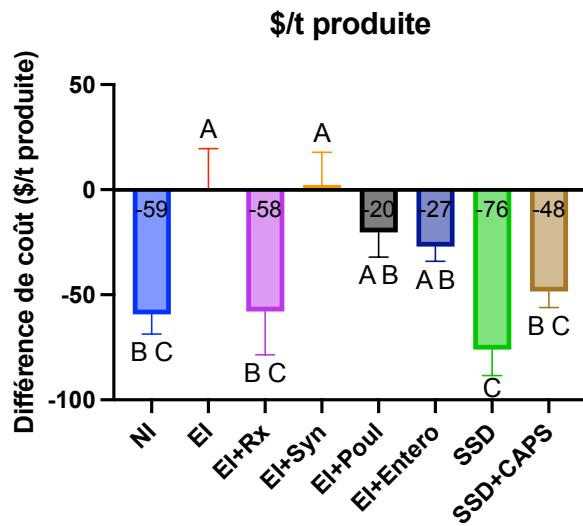


Figure 14. Différences des coûts de l'aliment ingéré et des additifs de l'essai par rapport au gain de poids produit (\$/t produite) par rapport au témoin EI. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35 ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Enter-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

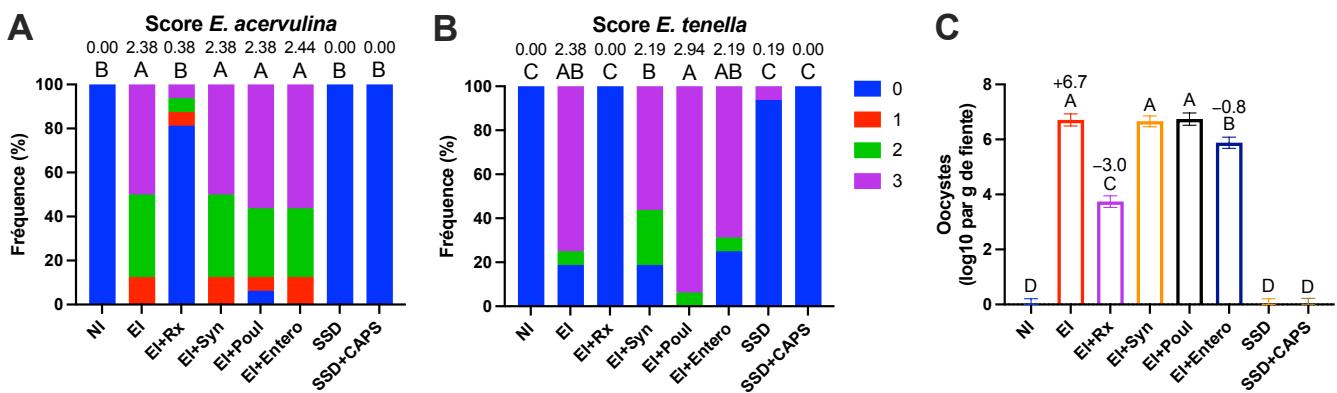


Figure 15. Lésions de coccidiose et excrétion d'oocystes d'*Eimeria*. Lésions caractéristiques d'*E. acervulina* (A) et d'*E. tenella* (B) aux j21 et décompte d'oocystes excrétés au j20 (C). Les données présentées sont les fréquences pour chaque score lésionnel. Les moyennes des scores lésionnels sont affichées au-dessus des barres. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35 ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Enter-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

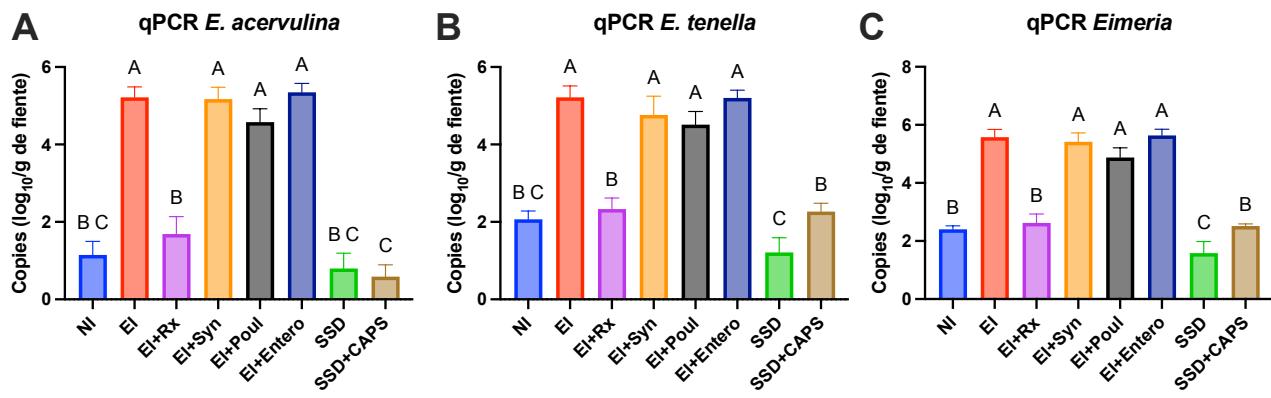


Figure 16. Nombre de copies excrétées d'*Eimeria* spp. (*E. acervulina* **(A)**, *E. tenella* **(B)** et le total *Eimeria* **(C)**) au j20. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35 ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Enter-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

Santé intestinale et marqueurs inflammatoires

Des mesures séries de fluorescence de dextrane couplé à la fluorescéine (Fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-d) ont montré que les challenges de coccidiose (EI, +19%) et inflammatoire (SSD, +30%) ont augmenté la perméabilité intestinale au j28 (Figure 17B). L'Alterna Poultry® (-23%) et le CAPS C2PG® (-28%) ont diminué cette augmentation de perméabilité (Figure 17B). L'Enter-V Poultry a montré une tendance à la diminution ($p=0.0933$).

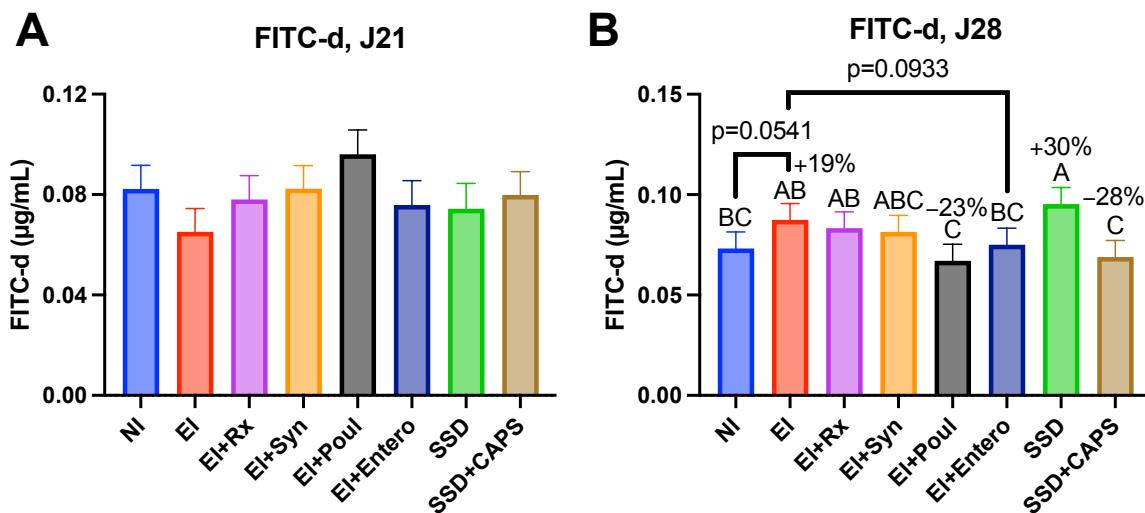


Figure 17. Perméabilité intestinale par des mesures séries de fluorescence de dextrane couplé à la fluorescéine (Fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-d). Les données présentées sont les mesures de FITC-d aux j21 **(A)** et j28 **(B)**. Les barres représentent les moyennes ± l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35 ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Enter-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

Le challenge *Eimeria* (EI) a augmenté les scores d'altérations histologiques macroscopiques au j21, mais pas le challenge inflammatoire, comparativement aux oiseaux non challengés (NI) (Figure 18A). Au j28, le challenge inflammatoire (SSD) n'a pas montré d'effet sur les scores d'altérations histologiques macroscopiques (Figure 18B). Le traitement aux anticoccidiens (EI+Rx) a diminué les scores macroscopiques au j21, mais les a augmentés au j28. Les additifs à l'étude n'ont pas eu d'effet sur ces scores (Figure 18).

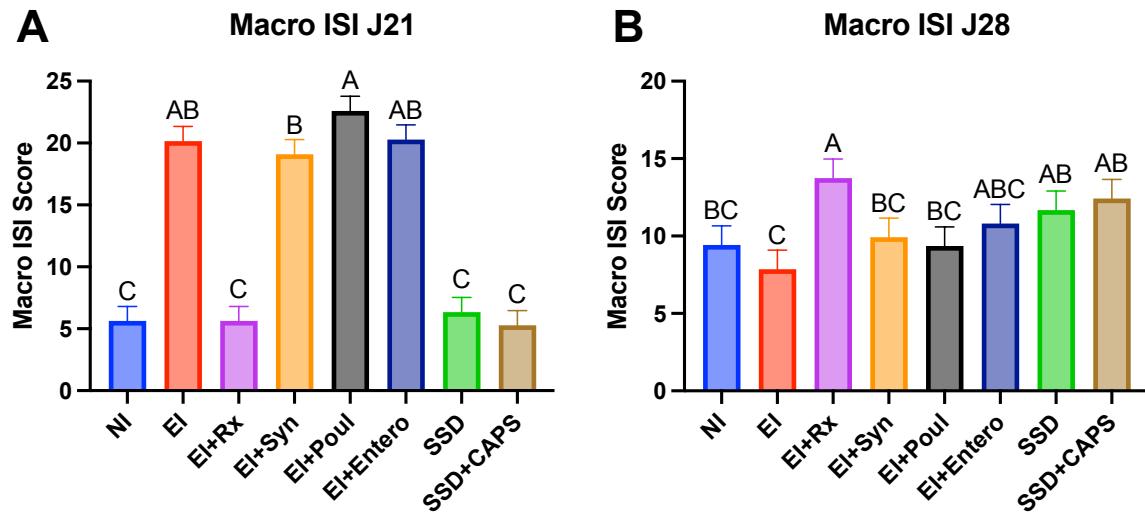


Figure 18. Lésions intestinales macroscopiques. Les données présentées sont les scores aux j21 (**A**) et j28 (**B**). Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enterov, EI + Enterov-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

Les traitements n'ont pas eu d'effet sur les niveaux fécaux de lipocaline (Figure 19). Les niveaux de calprotectine ont été sous le seuil de quantification (non présentés).

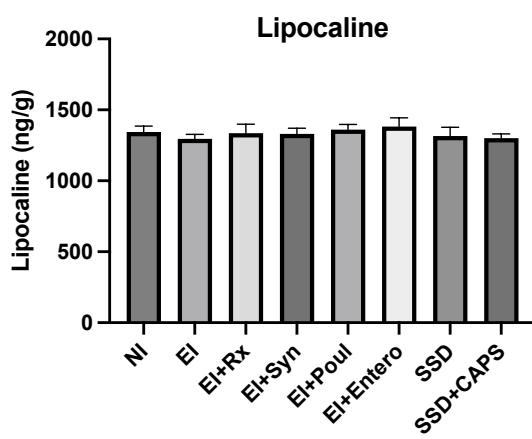


Figure 19. Mesures fécales de la lipocaline par ELISA au j28. Les barres représentent les moyennes \pm l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enterov, EI + Enterov-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

Le challenge de coccidiose (EI) n'a pas modifié l'expression génique de MUC2 et d'OCLN au niveau du jéjunum au j28 (Figure 20). Le challenge inflammatoire (SSD) a augmenté l'expression de MUC2 (Figure 20A) sans affecter OCLN (Figure 20B). Les anticoccidiens (EI+Rx) ont augmenté MUC2 et OCLN, mais les additifs n'ont pas eu d'effet (Figure 20). Synbiotec® a montré une tendance à augmenter MUC2 ($p=0,10$, Figure 20A) et Entero-V Poultry® a montré une tendance à augmenter OCLN ($p=0,08$, Figure 20B). Les niveaux de CLDN1 ont été sous le seuil de détection et ne sont pas présentés.

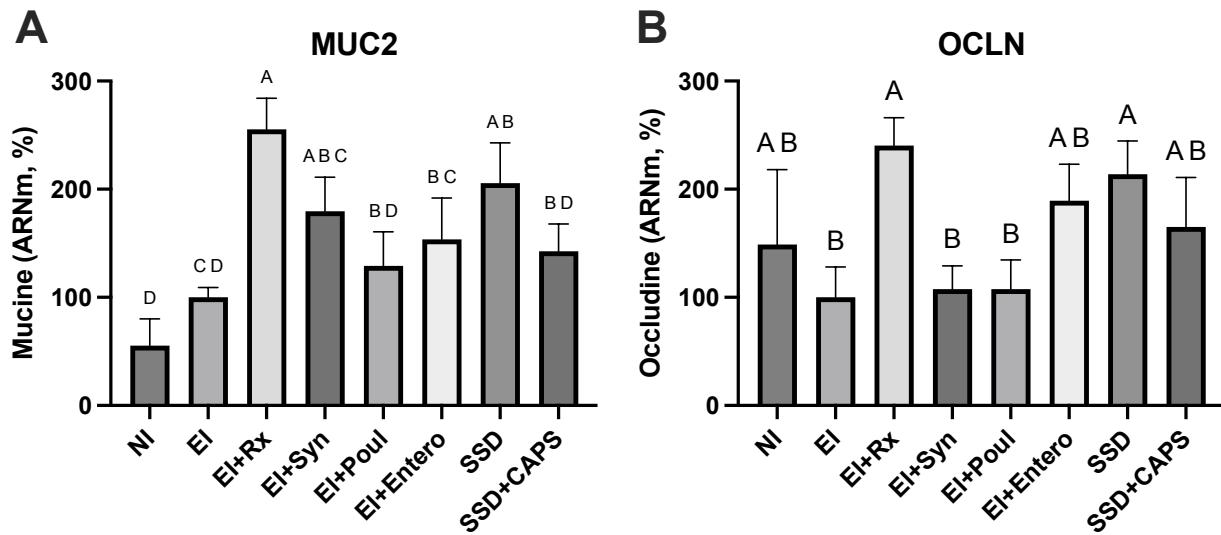


Figure 20. Niveaux d'expression de MUC2 et OCLN au jéjunum au j28. Les barres représentent les moyennes ± l'erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $p < 0,05$. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Entero-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

Les données des AGV cœcaux sont présentées au Tableau 2. Le challenge de coccidiose a diminué les niveaux d'acide lactique. Le challenge inflammatoire n'a pas modifié les niveaux d'AGV. Les anticoccidiens ont augmenté les niveaux des acides acétique, isobutyrique et lactique. L'Entero-V Poultry® a augmenté l'acide valérique. CAPS C2PG® a diminué l'acide isovalérique.

Tableau 2. Acides gras volatiles des contenus cœcaux au j28.

AGV	NI	EI	EI+RX	EI+Syn	EI+Poul	EI+Enter	SSD	SSD+CAPS	Erreur-type	valeur de p
Acétique	11.47 ^{ab}	9.78 ^{bc}	12.30 ^a	11.45 ^{ab}	7.56 ^c	10.00 ^{abc}	11.68 ^{ab}	10.48 ^{ab}	0.87	0.012
Butyrique	2.86	2.24	2.76	2.48	1.86	2.38	2.90	2.56	0.27	0.113
Caproïque	7.85	11.38	3.99	8.81	7.50	11.58	11.81	8.46	2.51	0.292
Isobutyrique	10.06 ^{ab}	8.31 ^{bc}	11.54 ^a	6.75 ^c	8.45 ^{bc}	9.29 ^{abc}	10.85 ^{ab}	8.99 ^{abc}	1.05	0.029
Isovalérique	2.15 ^{ab}	1.70 ^{bcd}	1.99 ^{abc}	1.59 ^{cd}	1.44 ^d	1.59 ^{cd}	2.23 ^a	1.63 ^{cd}	0.17	0.006
Lactique	1.56 ^{ab}	1.05 ^c	1.87 ^a	1.36 ^{bc}	1.22 ^{bc}	1.26 ^{bc}	1.81 ^a	1.61 ^{ab}	0.15	0.003
Propionique	1.40	1.50	1.79	1.44	1.62	1.85	1.78	1.69	0.19	0.533
Valérique	2.29 ^{bcd}	2.05 ^{cd}	2.33 ^{bcd}	2.31 ^{bcd}	1.99 ^d	3.41 ^a	3.10 ^{ab}	2.92 ^{abc}	0.33	0.020
Total	38.33 ^{abc}	36.05 ^{bcd}	38.09 ^{abc}	31.85 ^{cd}	28.74 ^d	41.37 ^{ab}	44.87 ^a	38.35 ^{abc}	2.90	0.012

AGV, acide gras volatile. NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés ; EI+Rx, EI + anticoccidiens conventionnels (30 ppm décoquinate J0-J20 suivi de 125 ppm zoalène J20-J35) ; EI+Syn, EI + Synbiotec® ; EI+Poul, EI + Alterna Poultry® ; EI+Enter, EI + Entero-V Poultry® ; SSD, oiseaux challengés au modèle inflammatoire (sodium sulfate dextran, SSD) ; SSD+CAPS, SSD +CAPS C2PG®.

6. Conclusion

En résumé, les résultats de cette étude ont permis d'étudier *in vitro* des ingrédients d'additifs qui visent le contrôle de la coccidiose aviaire et de déterminer l'effet de ces additifs sur les performances zootechniques et sur la santé intestinale chez le poulet de chair. Plusieurs composés, comme des polyphénols et des extraits de cannelle, de thym, d'ail, d'anis, de basilic et de pin, ont montré des effets sur le parasite *Eimeria* à des doses sécuritaires *in vitro*. Dans ces essais réalisés en cages, les additifs alimentaires et dans l'eau de boisson n'ont pas eu, de façon évidente, d'effet sur les performances de croissance des poulets de chair. Cependant, des additifs alimentaires et dans l'eau de boisson qui contiennent les composés actifs démontrés *in vitro*, à savoir l'Alterna Poultry®, le CAPS C2PG® et l'Enter-V Poultry®, ont amélioré la perméabilité intestinale, et l'Enter-V Poultry® a diminué l'excrétion du parasite dans un contexte de challenge inflammatoire ou de challenge à la coccidiose chez le poulet de chair. Des essais au sol et des essais dans des poulaillers commerciaux pourraient permettre de mieux étudier l'effet zootechnique des additifs.

7. Références

- Akhtar, M., Tariq, A.F., Awais, M.M., Iqbal, Z., Muhammad, F., Shahid, M., Hiszczynska-Sawicka, E., 2012. Studies on wheat bran Arabinoxylan for its immunostimulatory and protective effects against avian coccidiosis. Carbohyd Polym 90, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.048>
- Aljumaah, M.R., Alkhulaifi, M.M., Abudabos, A.M., Alabdullatif, A., El-Mubarak, A.H., Suliman, A.R.A., Stanley, D., 2020. Organic acid blend supplementation increases butyrate and acetate production in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* challenged broilers. Plos One 15, e0232831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232831>
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol. 26, 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Andrade, T. de J.A. dos S., Araújo, B.Q., Citó, A.M. das G.L., Silva, J. da, Saffi, J., Richter, M.F., Ferraz, A. de B.F., 2011. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). Food Chemistry 126, 1044–1048. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.122>
- Barekatain, R., Howarth, G.S., Willson, N.-L., Cadogan, D., Wilkinson, S., 2020. Excreta biomarkers in response to different gut barrier dysfunction models and probiotic supplementation in broiler chickens. Plos One 15, e0237505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237505>
- Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., Pedersen, K., 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. Poultry Sci 85, 1151–1164. <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1151>
- Blake, D.P., Knox, J., Dehaeck, B., Huntington, B., Rathinam, T., Ravipati, V., Ayoade, S., Gilbert, W., Adebambo, A.O., Jatau, I.D., Raman, M., Parker, D., Rushton, J., Tomley, F.M., 2020. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. Vet. Res. 51, 115. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00837-2>
- Bokulich, N.A., Kaehler, B.D., Rideout, J.R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G.A., Caporaso, J.G., 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. Microbiome 6, 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Silva, R.D., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolék, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., Hooft, J.J.J. van der, Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., Hippel, M. von, Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang,

- Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bortoluzzi, C., Lahaye, L., Oxford, J., Detzler, D., Eyang, C., Barbieri, N.L., Santin, E., Kogut, M.H., 2021. Protected Organic Acid and Essential Oils for Broilers Raised Under Field Conditions: Intestinal Health Biomarkers and Cecal Microbiota. *Front. Physiol.* 12, 722339. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.722339>
- Burt, S.A., Tersteeg-Zijderveld, M.H.G., Jongerius-Gortemaker, B.G.M., Vervelde, L., Vernooij, J.C.M., 2013. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Veterinary parasitology* 191, 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.001>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chapman, H.D., 2014. Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poultry science* 93, 501–511. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03634>
- Chapman, H.D., Jeffers, T.K., Williams, R.B., 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry science* 89, 1788–1801. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00931>
- Choi, J., Ko, H., Tompkins, Y.H., Teng, P.-Y., Lourenco, J.M., Callaway, T.R., Kim, W.K., 2021. Effects of *Eimeria tenella* Infection on Key Parameters for Feed Efficiency in Broiler Chickens. *Animals* 11, 3428. <https://doi.org/10.3390/ani11123428>
- Conway, D.P., McKenzie, M.E., 2007. *Poultry Coccidiosis*, John Wiley & Sons. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470344620>
- Criado-Mesas, L., Abdelli, N., Noce, A., Farré, M., Pérez, J.F., Solà-Oriol, D., Martin-Venegas, R., Forouzandeh, A., González-Solé, F., Folch, J.M., 2021. Transversal gene expression panel to evaluate intestinal health in broiler chickens in different challenging conditions. *Sci Rep-uk* 11, 6315. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85872-5>
- Cui, N., Wang, X., Wang, Q., Li, H., Wang, F., Zhao, X., 2017. Effect of Dual Infection with *Eimeria tenella* and Subgroup J Avian Leukosis Virus on the Cecal Microbiome in Specific-Pathogen-Free Chicks. *Frontiers Vet Sci* 4, 177. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00177>
- Fatemi, A., Razavi, S.M., Asasi, K., Goudarzi, M.T., 2015. Effects of *Artemisia annua* extracts on sporulation of *Eimeria* oocysts. *Parasitology research* 114, 1207–1211. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4304-z>
- Felici, M., Tugnoli, B., Ghiselli, F., Baldo, D., Ratti, C., Piva, A., Grilli, E., 2023. Investigating the effects of essential oils and pure botanical compounds against *Eimeria tenella* in vitro. *Poult. Sci.* 102, 102898. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102898>
- Gasaway, W.C., 1976. Volatile fatty acids and metabolizable energy derived from cecal fermentation in the willow ptarmigan. *Comp Biochem Physiology Part Physiology* 53, 115–121. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(76\)80022-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(76)80022-9)
- Hofacre, C.L., Froyman, R., Gautriás, B., George, B., Goodwin, M.A., Brown, J., 1998. Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Dis* 42, 579–84. <https://doi.org/10.2307/1592685>
- Jiang, Z., Applegate, T.J., Lossie, A.C., 2013. Cloning, annotation and developmental expression of the chicken intestinal MUC2 gene. *Plos One* 8, e53781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053781>
- Joyner, L.P., Long, P.L., 1974. The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the Coccidia of the fowl. *Avian Pathol* 3, 145–157. <https://doi.org/10.1080/03079457409353827>
- Kabir, M.H.B., Recuenco, F.C., Zin, N.K.M., Watanabe, N., Fukuda, Y., Bando, H., Watanabe, K., Bochimoto, H., Xuan, X., Kato, K., 2022. Identification of potent anti-Cryptosporidium new drug leads by screening traditional Chinese medicines. *PLOS Neglected Trop. Dis.* 16, e0010947. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010947>
- Kim, D.K., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Lillehoj, E.P., Bravo, D., 2013. Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *The British journal of nutrition* 109, 76–88. <https://doi.org/10.1017/s0007114512000530>

- Kim, J.E., Lillehoj, H.S., Hong, Y.H., Kim, G.B., Lee, S.H., Lillehoj, E.P., Bravo, D.M., 2015. Dietary Capsicum and Curcuma longa oleoresins increase intestinal microbiome and necrotic enteritis in three commercial broiler breeds. *Res Vet Sci* 102, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.022>
- Kimura, N., Mimura, F., Nishida, S., Kobayashi, A., Mitsuoka, T., 1976. Studies on the Relationship between Intestinal Flora and Cecal Coccidiosis in Chicken. *Poultry Sci* 55, 1375–1383. <https://doi.org/10.3382/ps.0551375>
- Kley, M.A.M.-V., Oviedo-Ron, E.O., Dowd, S.E., Hume, M., Nalian, A., 2012. Effect of *Eimeria* Infection on Cecal Microbiome of Broilers Fed Essential Oils. *Int J Poult Sci* 11, 747–755. <https://doi.org/10.3923/ijps.2012.747.755>
- Lee, Y.S., Lee, S.H., Gadde, U.D., Oh, S.T., Lee, S.J., Lillehoj, H.S., 2018. Allium hookeri supplementation improves intestinal immune response against necrotic enteritis in young broiler chickens. *Poultry science* 97, 1899–1908. <https://doi.org/10.3382/ps/pey031>
- Liévin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.-R., Servin, A.L., 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646–652. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.646>
- López, C.A.A., Lima, K.R.S., Manno, M.C., Tavares, F.B., Neto, D.L.F., Jesus, M.L.C., Viana, M.A.O., Fonseca, L.A.B., 2012. Effects of cashew nut shell liquid (CNSL) on the performance of broiler chickens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64, 1027–1035. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352012000400032>
- Lund, M., Bjerrum, L., Pedersen, K., 2010. Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*- and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. *Poultry Sci* 89, 1217–1224. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00653>
- Macdonald, S.E., Nolan, M.J., Harman, K., Boulton, K., Hume, D.A., Tomley, F.M., Stabler, R.A., Blake, D.P., 2017. Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. *Plos One* 12, e0184890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184890>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetJ.* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Molan, A.L., Liu, Z., De, S., 2009. Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitologica* 56, 1–5. <https://doi.org/10.14411/fp.2009.001>
- Murakami, A.E., Eyang, C., Torrent, J., 2014. Effects of functional oils on coccidiosis and apparent metabolizable energy in broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 27, 981–989. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13449>
- Muthamilselvan, T., Kuo, T.-F., Wu, Y.-C., Yang, W.-C., 2016. Herbal Remedies for Coccidiosis Control: A Review of Plants, Compounds, and Anticoccidial Actions. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2016, 2657981–19. <https://doi.org/10.1155/2016/2657981>
- Nghonjui, N.W., Tiambo, C.K., Kimbi, H.K., Manka'a, C.-A.N., Juliano, R.S., Lisita, F., 2015. Efficacy of Ethanolic Extract of *Carica papaya* leaves as a Substitute of Sulphanomide for the Control of Coccidiosis in KABIR Chickens in Cameroon. *J Animal Heal Prod* 3, 21–27. <https://doi.org/10.14737/journal.jahp/2015/3.1.21.27>
- Oakley, B.B., Buhr, R.J., Ritz, C.W., Kiepper, B.H., Berrang, M.E., Seal, B.S., Cox, N.A., 2014. Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. *Bmc Vet Res* 10, 282. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0282-8>
- Oliveira, M.S.C., Morais, S.M. de, Magalhães, D.V., Batista, W.P., Vieira, I.G.P., Craveiro, A.A., Manezes, J.E.S.A. de, Carvalho, A.F.U., Lima, G.P.G. de, 2011. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Tropica* 117, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.003>
- Peek, H.W., Veen, C.T., Dijkman, R., Landman, W.J.M., 2017. Validation of a quantitative *Eimeria* spp. PCR for fresh droppings of broiler chickens. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 46, 615–622. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1337269>
- Pont, G.C.D., Belote, B.L., Lee, A., Bortoluzzi, C., Eyang, C., Sevastiyanova, M., Khadem, A., Santin, E., Farnell, Y.Z., Gougloulias, C., Kogut, M.H., 2021. Novel Models for Chronic Intestinal Inflammation in Chickens: Intestinal Inflammation Pattern and Biomarkers. *Front Immunol* 12, 676628. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676628>

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Stefanello, C., Rosa, D.P., Dalmoro, Y.K., Segatto, A.L., Vieira, M.S., Moraes, M.L., Santin, E., 2020. Protected Blend of Organic Acids and Essential Oils Improves Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Intestinal Health of Broiler Chickens Undergoing an Intestinal Challenge. *Frontiers Vet Sci* 6, 491. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00491>
- Thangavel, G., Mukkalil, R., Chirakkal, H., Kurian, H., Inc, K.I., 2014. Plant Parts and Extracts Having Anticoccidial Activity.
- Tomal, F., Sadrin, G., Gaboriaud, P., Guittot, E., Sedano, L., Lallier, N., Rossignol, C., Larcher, T., Rouille, E., Ledevin, M., Guabiraba, R., Silvestre, A., Lacroix-Lamandé, S., Schouler, C., Laurent, F., Bussière, F.I., 2023. The caecal microbiota promotes the acute inflammatory response and the loss of the intestinal barrier integrity during severe *Eimeria tenella* infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1250080. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1250080>
- Toyomizu, M., Okamoto, K., Ishibashi, T., Chen, Z., Nakatsu, T., 2000. Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Life sciences* 66, 229–234. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00585-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00585-8)
- Turk, D.E., 1972. Protozoan Parasitic Infections of the Chick Intestine and Protein Digestion and Absorption. *J Nutrition* 102, 1217–1221. <https://doi.org/10.1093/jn/102.9.1217>
- Vrba, V., Blake, D.P., Poplstein, M., 2010. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Vet Parasitol* 174, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.006>
- Wang, D., Zhou, L., Li, W., Zhou, H., Hou, G., 2017. Anticoccidial effects of areca nut (*Areca catechu* L.) extract on broiler chicks experimentally infected with *Eimeria tenella*. *Experimental parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.11.002>
- Wang, M.L., Suo, X., Gu, J.H., Zhang, W.W., Fang, Q., Wang, X., 2008. Influence of Grape Seed Proanthocyanidin Extract in Broiler Chickens: Effect on Chicken Coccidiosis and Antioxidant Status. *Poultry science* 87, 2273–2280. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00077>
- Yang, W.C., Tien, Y.J., Chung, C.Y., Chen, Y.C., Chiou, W.H., Hsu, S.Y., Liu, H.Y., Liang, C.L., Chang, C.L.T., 2015. Effect of *Bidens pilosa* on infection and drug resistance of *Eimeria* in chickens. *Research in veterinary science* 98, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.11.002>
- Zhang, L., Wang, X., Huang, S., Huang, Y., Shi, H., Bai, X., 2023. Effects of dietary essential oil supplementation on growth performance, carcass yield, meat quality, and intestinal tight junctions of broilers with or without *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* 102, 102874. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102874>