# Rapport final

No projet : IA220580

Titre : Développement et accès à des modèles de coccidiose aviaire représentatifs des poulaillers commerciaux

Responsable scientifique : Carl Julien

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

3 juin 2022

**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
Yan Martel-Kennes, directeur scientifique, responsable de l'établissement

**Section 2 - Partenaires**

Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD)

Jefo Nutrition Inc.

**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.**

# Modèles de coccidiose aviaire pour évaluer le statut de résistance et de nouveaux produits

**Carl Julien**

**No de projet : IA220580** **Durée :** 04/2020 – 05/2022

## FAITS SAILLANTS

La coccidiose aviaire engendre des pertes de plusieurs milliards de dollars à l'échelle mondiale. La maladie causée par le parasite *Eimeria* affecte la santé digestive et la conversion alimentaire des poulets, est le principal facteur de risque de l'entérite nécrotique et peut mener à des taux de mortalité importants. Depuis les années 70, les médicaments anticoccidiens sont utilisés, mais pour la production biologique, pour se conformer aux réglementations et aux demandes des consommateurs, et pour limiter la résistance aux médicaments, des alternatives médicamenteuses sont nécessaires. Les vaccins se sont développés, mais leur rapport risque/bénéfice n'est pas toujours clair. De nos jours, pour évaluer l'efficacité de leurs produits en développement, les entreprises se tournent souvent vers des challenges coccidiens composés de plusieurs doses de vaccins commerciaux. Cependant, les souches *Eimeria* retrouvées dans ces vaccins sont des souches parfois atténuées, sensibles aux anticoccidiens, peu virulentes et surtout non représentatives des souches retrouvées dans des poulaillers commerciaux. De plus, la proportion des espèces *Eimeria* retrouvées dans les doses de vaccin varie de lot en lot. Afin d'évaluer correctement l'efficacité d'anticoccidiens couramment utilisés et de nouveaux produits, ce projet a permis de développer une méthode pour modéliser une coccidiose aviaire représentative des poulaillers commerciaux. Dans cette étude, des souches *Eimeria* de terrain ont montré une diminution de leur sensibilité à certains anticoccidiens.

## OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Le but de cette étude était de développer et offrir une méthode pour évaluer la résistance d'*Eimeria* aux anticoccidiens et pour évaluer des alternatives aux anticoccidiens. Six anticoccidiens (amprolium, décoquinate, monensine, nicarbazine, salinomycine, zoalène) ont été évalués en triplicata sur le cycle pathogénique d'*Eimeria* en étudiant la sporulation des oocystes, la viabilité des sporozoïtes et leur invasion des cellules hôtes. Deux essais en parquet de 35 jours avec 9 répétitions de 55 oiseaux/parquet ont également été menés chez des poulets de chair utilisant les mêmes médicaments. Des oiseaux non infectés et infectés par *Eimeria* ont été utilisés dans les deux essais comme témoins. L'infection à *Eimeria* a été induite par une administration orale à j14 de 200 000 oocystes sporulés d'une population d'espèces mixtes d'*Eimeria* récoltée à partir d'isolats de terrain.

## RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

Dans les deux essais, le challenge coccidien a diminué les performances de croissance des poulets de chair et a augmenté l'excrétion du parasite et les lésions intestinales caractéristiques de ce dernier pendant la période d'infection à *Eimeria* (Figure 1). La monensine a empêché la diminution des performances de croissance, l'excrétion oocytaire et les lésions intestinales associées à *E. acervulina* et à *E. tenella*. Même s'ils ont bloqué l'excrétion oocytaire et les lésions intestinales, la salinomycine et la nicarbazine ont montré des effets indésirables sur le poids corporel par rapport aux oiseaux infectés par *Eimeria*. Le zoalène et

l'amprolium n'ont pas prévenu l'excrétion du parasite et les analyses qPCR ont confirmé que ces deux anticoccidiens n'ont pas réduit pas l'excrétion d'*E. acervulina* (*P*>0,05), par rapport aux oiseaux infectés. En utilisant la population d'*Eimeria* de terrain, les tests *in vitro* ont montré un effet dose-réponse des anticoccidiens sur le cycle pathogénique du parasite en diminuant la viabilité des sporozoïtes (−60 %), la sporulation des oocystes (−80%) et l'invasion des cellules hôtes par les sporozoïtes (−90%) (Figure 2). Cependant, lors de l'invasion des cellules hôtes, l'amprolium a présenté des variations non linéaires en fonction des concentrations d'exposition (de −37% à −92%) et le zoalène a montré une tendance à réduire l'efficacité avec des concentrations plus élevées (de −95% à −67%). Dans l'ensemble, la souche d'*E. acervulina* dans la population d'*Eimeria* de terrain testée semblait résistante à l'amprolium et au zoalène.

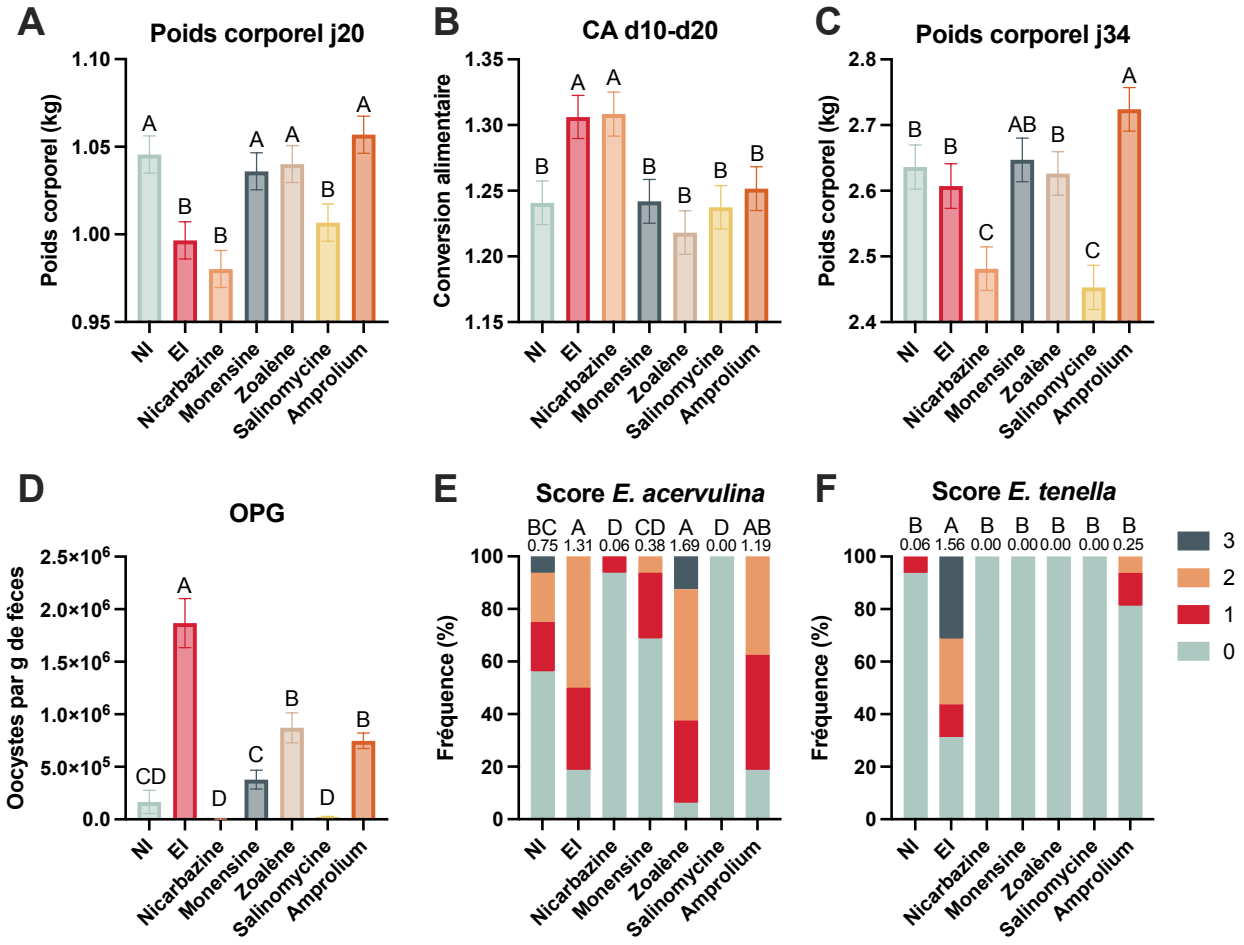


**Figure 1.** Effets des anticoccidiens sur les performances de croissance (**A-C**), l'excrétion des oocystes (**D**) et les scores lésionnels d'*Eimeria* (**E-F**). Les données présentées sont les fréquences pour chaque score lésionnel. Les moyennes des scores lésionnels sont affichées au-dessus des barres. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $P < 0,05$. CA, conversion alimentaire; EI, oiseaux infectés à *Eimeria* et non médicamentés; NI, oiseaux non infectés et non médicamentés; OPG, oocystes par g de fiente.

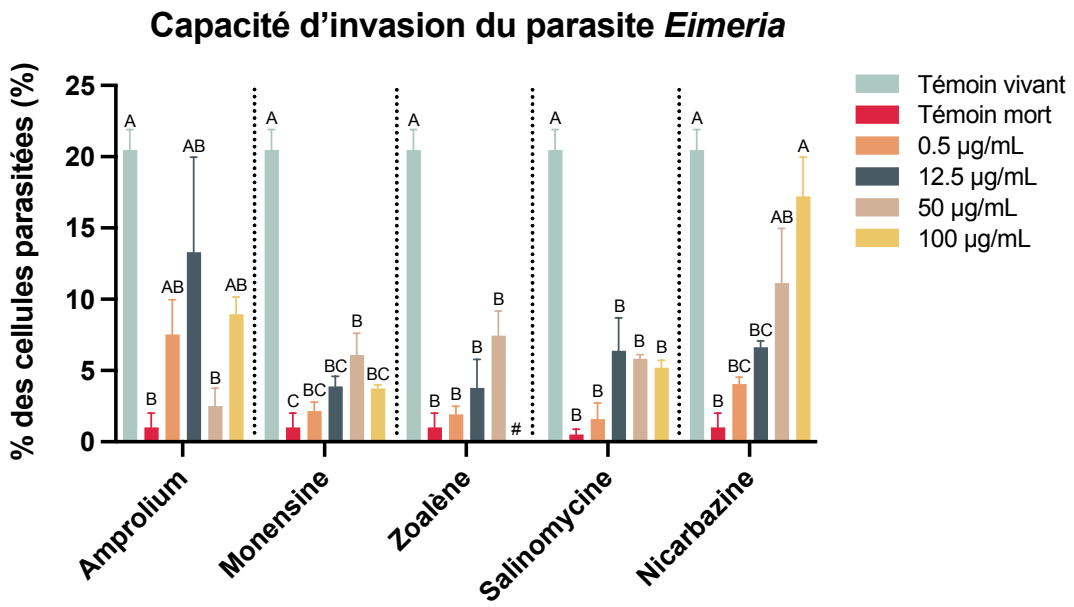


**Figure 2.** Test *in vitro* de l'effet des anticoccidiens sur la capacité d'invasion des sporozoïtes de souches *Eimeria* de terrain. Les barres représentent les moyennes ± leur erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $P<0,05$. #, les cellules hôtes ont été tuées par le traitement.

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

Les modèles que nous avons mis au point pourront permettre d'évaluer le statut de résistance des souches *Eimeria* présentes dans les poulaillers et permettre d'évaluer rapidement l'effet anticoccidien d'ingrédients et de produits destinés à la lutte à la coccidiose aviaire.

## POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom du responsable du projet : Carl Julien
Téléphone : (418) 286-3353 poste 236
Télécopieur : (418) 286-3597
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) et Jefo Nutrition 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.)

À ce jour, les résultats de ce projet seront présentés à un congrès scientifique. Un article scientifique est aussi en préparation. Les autres activités de transfert se dérouleront comme prévu au cours des prochains mois.

- Pierron, J; Julien, C. (2022) A method to evaluate anticoccidial drug resistance. Poultry Science Association Annual Meeting, 11-14 juillet.

**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.)

Les résultats du projet ont été diffusés dans le rapport des activités 2020-2021 (page 38). Les autres activités de transfert se dérouleront comme prévu au cours des prochains mois.

## Section 6 – Grille de transfert des connaissances

| **1. Résultats**<br>Présentez les faits saillants (maximum de 3) des principaux résultats de votre projet. | **2. Utilisateurs**<br>Pour les résultats identifiés, ciblez les utilisateurs qui bénéficieront des connaissances ou des produits provenant de votre recherche. | **3. Message**<br>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**<br>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.)<br><br>b) Selon vous, quelles pourraient être les étapes à privilégier en vue de maximiser l'adoption des résultats par les utilisateurs. |
|---|---|---|---|
| Les modèles que nous avons mis au point permettent d'évaluer le statut de résistance des souches *Eimeria* et permettent d'évaluer l'effet anticoccidien d'ingrédients et de produits destinés à la lutte à la coccidiose aviaire. | Éleveurs de poulets de chair, vétérinaires, nutritionnistes, entreprises développant des additifs pour la volaille et autres et intervenants dans le secteur avicole. | Les modèles que nous avons mis au point permettent d'évaluer le statut de résistance des souches *Eimeria* et permettent d'évaluer l'effet anticoccidien d'ingrédients et de produits destinés à la lutte à la coccidiose aviaire. | 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).<br><br>b) Essais avec des ingrédients et des produits visant la lutte à la coccidiose aviaire. |
| | | | |
| | | | |

## Section 7 - Contribution et participation de l’industrie réalisées

Elizabeth Santin de Jefo Nutrition Inc. a suivi les travaux de l’étude, a participé aux rencontres et aux visites scientifiques. Jefo Nutrition Inc a aussi contribué aux charges animales et aux analyses et consommables de laboratoire. Au total, Jefo Nutrition Inc a contribué comme prévu avec 24 250 $, dont 12 000 $ en argent.

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

**1. Introduction**

La coccidiose aviaire engendre des pertes totalisant plus de 3 milliards de dollars à l'échelle mondiale pour la production avicole (Quiroz-Castañeda and Dantán-González, 2015). 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 compatible avec une production biologique, les anticoccidiens, 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).

Lors d'essais précédents, nous avons observé que certains anticoccidiens classiques, à savoir la nicarbazine, la monensine et la zoalène n'offraient pas la même efficacité contre notre challenge coccidien, composé de souches *Eimeria* de champs. De nos jours, pour évaluer l'efficacité de leurs produits en développement, les entreprises se tournent souvent vers des challenges coccidiens composés de plusieurs doses de vaccins commerciaux. Cependant, les souches *Eimeria* retrouvées dans ces vaccins sont des souches parfois atténuées, sensibles aux anticoccidiens, peu virulentes et surtout non représentatives des souches retrouvées dans des poulaillers commerciaux. De plus, la proportion des espèces *Eimeria* retrouvées dans les doses de vaccin varie de lot en lot.

Afin d'évaluer correctement l'efficacité d'anticoccidiens couramment utilisés et de nouveaux produits, des modèles de coccidiose aviaire représentatifs des poulaillers commerciaux sont nécessaires. Ce projet permettra d'offrir au secteur de la volaille du Canada des outils pour mieux évaluer l'efficacité des anticoccidiens et de nouveaux produits pour contrer la coccidiose. Parmi ces nouveaux produits figurent les additifs alimentaires à base d'ingrédients naturels. Ces produits représentent une alternative pour combattre la coccidiose. Ces dernières années, des produits d'extrait de plante ont été développés spécifiquement pour la coccidiose, comme le Cocci-Guard (DPI Global, É-U), l'Apacox (GreenVet, Italie), un mélange de *Quercus infectoria*, de *Rhus chinensis* et de *Terminalia chebula* (Kemin Industries, É-U), et une formulation de *Bidens p*ilosa et d'autres plantes (Ta-Fong, Taiwan) (Thangavel et al., 2014; Yang et al., 2015). L'effervescence de ces produits 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). Des travaux récents rapportent des effets anticoccidiens de *Beta vulgaris* (Abbas et al., 2017), d'*Areca catechu* (Wang et al., 2017) et d'*Artemisia annua* (Fatemi et al., 2017) et d'*Allium hookeri* (Lee et al., 2018). 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; Lee et al., 2018; Molan et al., 2009; Muthamilselvan et al., 2016; Nghonjuyi et al., 2015; Wang et al., 2017, 2008). Plus spécifiquement, les niveaux des transcrits des cytokines IL-8, IL-17α, iNOS et LITAF ont été en diminués par un extrait d'*Allium hookeri* chez des poulets soumis à un challenge à *E. maxima* suivi de *C. perfringens* (Lee et al., 2018), et les niveaux d'IL-2 ont été augmentés par un extrait d'*Areca catechu* chez des poulets infectés avec *E. tenella* (Wang et al., 2017). Un autre produit naturel, l'huile de coque de noix de cajou (*Anacardium occidentale*) (CNSL, pour Cashew nut shell liquid) 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 ionophore 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). Un essai chez le poulet de chair rapporte des effets anticoccidiens d'un mélange de CNSL et d'huile de ricin (Murakami et al., 2014). Récemment, nous avons démontré que le CNSL en combinaison avec des huiles essentielles a amélioré les performances de croissance et présente des effets anticoccidiens.

**2. Objectif**

Développer et offrir des modèles de coccidiose aviaire représentatifs des poulaillers commerciaux.

**Objectifs spécifiques**

1) Caractériser les souches *Eimeria* utilisées comme modèles quant à leur virulence et leur sensibilité aux anticoccidiens classiques; 2) Évaluer l'effet de produits naturels sur les modèles développés et les comparer aux anticoccidiens classiques; 3) Déterminer le statut de résistance aux anticoccidiens de poulaillers commerciaux; 4)

Étudier les mécanismes d'action des anticoccidiens étudiés; 5) Rendre accessibles les modèles de coccidiose aviaire pour la filière.

**3. Hypothèse**

Les souches *Eimeria* de champs montreront une sensibilité différente aux anticoccidiens, comparativement aux souches vaccinales, et les produits naturels montreront des effets anticoccidiens et des effets bénéfiques sur les performances de croissance dans un contexte de coccidiose aviaire.

**4. Méthodologie**

Nous avons réalisé deux essais expérimentaux avec des poulets de chair en conditions contrôlées et nous avons développé des modèles de coccidiose représentatifs de poulaillers commerciaux. L'utilisation des animaux a été approuvée par le comité de protection des animaux du CRSAD (CPA-CRSAD) (#AV416).

**4.1 Essai #1.**

4.1.1 Animaux

Trois mille neuf cent soixante (3960) poulets de chair (Ross 308) mâles de 0 jour d'âge ont été distribués aléatoirement à l'un des 9 traitements expérimentaux, selon un plan complet en 8 blocs, à raison de 55 oiseaux par parquet, pour un total de 72 parquets. Les blocs ont été désignés par section du bâtiment pour tenir en compte les effets du bâtiment. Les oiseaux ont été hébergés pendant 35 jours au poulailler DC-0149 du CRSAD selon les conditions d'élevage suivantes : la température a été initialement fixée à 33°C et puis progressivement réduite chaque semaine pour atteindre 20.5°C à 35 jours d'âge. Les poussins ont été exposés à la lumière pendant 24 heures le 1er jour, 23 h au 2e jour, 20 h du 3e au 10e jour, 18 h du 11e au 25e jour et 16 h du 26e au 35e jour. La moulée à servir aux animaux a été formulée de sorte à répondre aux besoins nutritionnels des poulets de chair.

4.1.2 Traitements alimentaires

Les traitements ont été :
T1 = témoin non infecté, non médicamenté
T2 = témoin infecté, non médicamenté
T3 = 100 g/t nicarbazine, dose selon les recommandations du vétérinaire
T4 = 100 g/t monensine, dose selon les recommandations du vétérinaire
T5 = 125 g/t zoalène, dose selon les recommandations du vétérinaire
T6 = 60 g/t salinomycine, dose selon les recommandations du vétérinaire
T7 = 125 g/t amprolium, dose selon les recommandations du vétérinaire
T8 = 2 kg/t extrait végétal protégé #1 (mélange d'huiles essentielles et d'extrait de plantes)
T9 = 2 kg/t extrait végétal protégé #2 (mélange d'huiles essentielles et d'extrait de plantes)

Le programme alimentaire en trois phases a été : 1) début (j0-10), 2) croissance (j10-20), 3) finition (j20-35). Les aliments de base ont été fabriqués en granules et les traitements expérimentaux ont été formulés à l'aide de prémélanges 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.

**4.2 Essai #2.**

4.2.1 Animaux

Deux mille six cent quarante (2640) poulets de chair (Ross 308) mâles de 0 jour d'âge ont été distribués aléatoirement à l'un des 6 traitements expérimentaux, selon un plan complet en 8 blocs, à raison de 55 oiseaux par parquet, pour un total de 48 parquets. Les blocs ont été désignés par section du bâtiment pour tenir en compte les effets du bâtiment. Les oiseaux ont été hébergés pendant 35 jours au poulailler DC-0149 du CRSAD selon les conditions d'élevage suivantes : la température a été initialement fixée à 33°C et puis progressivement réduite chaque semaine pour atteindre 20.5°C à 35 jours d'âge. Les poussins ont été exposés à la lumière pendant 24 heures le 1er jour, 23 h au 2e jour, 20 h du 3e au 10e jour, 18 h du 11e au 25e jour et 16 h du 26e au 35e jour. La moulée à servir aux animaux a été formulée de sorte à répondre aux besoins nutritionnels des poulets de chair.

4.2.2 Traitements alimentaires

Les traitements ont été :
T1 = témoin non infecté, non médicamenté
T2 = témoin infecté, non médicamenté
T3 = 60 g/t salinomycine, dose selon les recommandations du vétérinaire
T4 = 30 g/t décoquinate, dose selon les recommandations du vétérinaire

T5 = 2 kg/t extrait végétal protégé #1 (mélange d'huiles essentielles et d'extrait de plantes)
T6 = 2 kg/t extrait végétal protégé #2 (mélange d'huiles essentielles et d'extrait de plantes)

Le programme alimentaire en trois phases a été : 1) début (j0-10), 2) croissance (j10-20), 3) finition (j20-35). Les aliments de base seront fabriqués en granules et les traitements expérimentaux ont été formulés à l'aide de prémélanges 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.

**4.3 Challenge coccidien comme modèle *in vivo***

Tous les animaux, à l'exception de ceux soumis au témoin blanc non infecté et non médicamenté, ont reçu au j14 un inoculât d'isolats mixtes de champs mélangé à l'aliment, après une mise à jeun d'une heure. Les dilutions de l'inoculât de coccidies ont été préparées de sorte à atteindre les niveaux d'oocystes suivants par oiseau : 1 x $10^5$ d'*Eimeria acervulina*, 6 x $10^4$ d'*Eimeria maxima* et 4 x $10^4$ d'*Eimeria tenella* (pour un total de 2 x $10^5$ 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. 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. Pour chaque enclos, 1 kg d'aliment a été mouillé avec 0,7 L d'eau. La suspension d'oocystes à 1 x $10^5$ oocystes/ml a été ajoutée à l'aliment mouillé, à raison de 2 ml par oiseau, afin d'obtenir une inoculation de 2 x $10^5$ oocystes par oiseau. Par exemple, pour 49 oiseaux, 98 ml de la suspension d'oocystes a été ajouté à l'aliment mouillé. Les oiseaux ont eu accès à seulement cette nourriture jusqu'à ce qu'elle soit complètement consommée (environ 4 h après).

**4.4. Mesures et observations**

4.4.1 Performances zootechniques et suivi de l'état de santé

Tous les oiseaux et l'aliment par parquet 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). De plus, quatre oiseaux représentatifs par parquet ont été euthanasiés à la fin de chaque phase alimentaire pour évaluer les masses graisseuse et musculaire et le contenu minéral osseux par ostéodensitométrie (Discovery W, Hologic, Bedford, MA, États-Unis). 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.

4.4.2 Oocystes et coccidiose

Un suivi du décompte des coccidies a été assuré grâce à la collecte d'échantillons de fientes fécales et cæcales (3 :1) collectés dans les huit parquets 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 fiente ont été collectés pour des décomptes coccidiens par parquet. Au j21, deux oiseaux par parquet ont été euthanasiés pour évaluer les lésions de coccidiose (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 pour déterminer les populations d'*E. acervulina*, *E. maxima* 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 a été utilisée. Les courbes standard ont été construites grâce à des dilutions d'ADN double-brin linéarisé correspondant aux amplicons de chaque espèce (gBlocks Gene Fragments, Integrated DNA Technologies, Mississauga, ON).

**4.5 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, et le bloc, représentant la section du bâtiment, comme effet aléatoire. La procédure Modèle linéaire et la méthode des moindres carrés standard et du maximum de vraisemblance restreint (REML) du logiciel JMP Pro (version 16.0, The SAS Institute, Cary, NY, États-Unis) ont été utilisées. La normalité des résidus, l'homogénéité de la variance et l'absence de données aberrantes (résidus studentisés ± 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 au logiciel JMP Pro. Les moyennes ajustées par le modèle statistique (moyennes des moindres carrées) accompagnées de leurs erreurs standard sont présentées. Les unités expérimentales pour les données de performances zootechniques et les décomptes d'oocytes sont les parquets, tandis que les unités expérimentales pour les données des scores lésionnels sont les oiseaux.

**4.6 Modèles *in vitro***

4.6.1 Viabilité des oocystes

Les pourcentages de viabilité des oocystes ont été déterminés *in vitro* selon les procédures décrites dans Kim et al., 2013. Brièvement, les oocystes d'*Eimeria* mixtes ont été lysés pour libérer les sporozoïtes. $10^6$ sporozoïtes ont été

traités et la viabilité a été mesurée par microscopie par l'exclusion du bleu de trypan en comptant au moins 100 sporozoïtes.

4.6.2 Sporulation des oocystes

Les taux de sporulation des oocystes ont été déterminés *in vitro* selon les procédures décrites dans Fatemi et al. (2015). Brièvement, $10^5$ oocystes d'*Eimeria* mixtes ont été incubés avec les additifs et les anticoccidiens à 30°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 par microscopie (Conway and McKenzie, 2007). Au moins 100 oocystes par puits ont été analysés.

4.6.3 Capacité d'invasion des oocystes

Les taux d'invasion des oocystes ont été déterminés *in vitro* selon les procédures décrites dans Burt et al. (2013) et Hessenberger et al. (2016). Brièvement, les sporozoïtes ont été incubés avec 2,5 µM 5(6)-Carboxyfluorescéine diacétate N-succinimidyl ester (CFSE) pendant 30 min à 41°C et des cellules épithéliales bovines de rein MDBK (Madin-Darby bovine kidney) à 70-80% de confluence ont été exposées à 2 x $10^5$ de ces sporozoïtes marqués et ont été incubées à 37°C avec 5% CO2 pendant 2h, 4h et 20h. Les cellules ont ensuite été lavées puis analysées par analyse microscopique en fluorescence (400x). Au moins 100 cellules par puits ont été analysées.

Pour tous les essais *in vitro*, trois répétitions par traitement ont été réalisées.

## 5. Résultats

### 5.1 Essais *in vivo*

À moins que spécifié autrement, les données rapportées dans cette section sont comparées à celles des oiseaux infectés, mais non traités (T2).

5.1.1 Essai #1, nicarbazine, monensine, zoalène, salinomycine, amprolium et additifs.

*Performances de croissance*

Les données de performance de croissance et du taux de mortalité de l'essai #1 sont résumées au Tableau 1. Le challenge coccidien (T2) a réduit le poids corporel 6 jours après l'infection (6 jpi, j20) et a aggravé l'indice de conversion alimentaire (CA) pendant la phase de croissance (10-20d). Le monensin a empêché la perte de poids corporel induite par *Eimeria* et l'augmentation de la CA. La salinomycine et la nicarbazine ont montré des effets indésirables sur le poids corporel avec des nombres similaires à j20 ($P$>0,05) et avec des diminutions à j34 (2,45-2,48 vs 2,61 kg, $P$=0,0009), par rapport aux oiseaux infectés par *Eimeria* (T2).

*Oocystes et coccidiose*

Le challenge coccidien (T2) a augmenté l'excrétion d'*Eimeria* 6 jpi (Figure 1A) et les scores lésionnels d'*E. acervulina* (Figure 1B) et d'*E. tenella* (Figure 1C) 7 jpi, comparés aux oiseaux non-infectés (T1) ($P$<0,01). La nicarbazine, la monensine et la salinomycine a diminué l'excrétion oocytaire (Figure 1A) et les lésions intestinales causées par *E. acervulina* (Figure 1D) et *E. tenella* (Figure 1F). Le zoalène et l'amprolium ont montré des augmentations totales d'oocystes par gramme de fèces (OPG) (8,7 et 7,5 contre 1,6 $10^5$ OPG, $P$<0,003) et n'ont pas empêché les lésions intestinales d'*E. acervulina* (1,7 et 1,2 contre 1,3, $P$>0,05), par rapport aux oiseaux infectés (T2). Les additifs à l'étude n'ont pas diminué l'excrétion oocytaire ni les scores lésionnels, par rapport aux oiseaux infectés par *Eimeria* (T2). L'additif #2 a aussi augmenté les scores lésionnels causés par *E. maxima* (0,38 contre 0,06, $P$<0,05) (Figure 1D). Les données de qPCR montrent que la nicarbazine, la monensine et la salinomycine ont diminué l'excrétion d'*E. acervulina* (Figure 1C) et l'excrétion d'*E. maxima* (Figure 1E), alors que le zoalène et l'amprolium ne les ont pas diminuées (Figure 1C). La nicarbazine, le zoalène, la salinomycine et l'amprolium ont diminué l'excrétion d'*E. tenella*, mais pas la monensine (Figure 1G). Les additifs à l'étude n'ont pas diminué l'excrétion d'*E. acervulina*, d'*E. maxima* et d'*E. tenella*.

*Composition corporelle et minéralisation osseuse*

Les données de composition corporelle et de minéralisation osseuse sont résumées au Tableau 2. À l'exception du traitement à la nicarbazine qui a diminué la masse maigre des oiseaux par rapport aux T2 et T9 au j20, les autres anticoccidiens et les additifs n'ont pas affecté les mesures du contenu minéral osseux, de la densité minérale osseuse, des masses maigre et grasse et du pourcentage de matière grasse.

**Tableau 1.** Données de performances zootechniques et de mortalité de l'essai #1.

| Mesures | Traitements | | | | | | | | | Erreur std | Effet Tx Valeur de p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | | |
| **Poids (kg)** | | | | | | | | | | | |
| J0 | 0.0477 | 0.0472 | 0.0472 | 0.0476 | 0.0470 | 0.0474 | 0.0470 | 0.0476 | 0.0467 | 0.0003 | 0.3047 |
| J10 | 0.308$^{c}$ | 0.307$^{c}$ | 0.301$^{d}$ | 0.313$^{bc}$ | 0.316$^{ab}$ | 0.308$^{c}$ | 0.319$^{a}$ | 0.311$^{bc}$ | 0.307$^{cd}$ | 0.002 | <0.0001 |
| J20 | 1.046$^{a}$ | 0.997$^{c}$ | 0.920$^{c}$ | 1.036$^{ab}$ | 1.040$^{a}$ | 1.007$^{bc}$ | 1.057$^{a}$ | 0.988$^{c}$ | 1.003$^{c}$ | 0.011 | <0.0001 |
| J34 | 2.636$^{bc}$ | 2.607$^{bc}$ | 2.481$^{de}$ | 2.647$^{ab}$ | 2.626$^{bc}$ | 2.453$^{e}$ | 2.724$^{a}$ | 2.562$^{cd}$ | 2.574$^{bc}$ | 0.034 | <0.0001 |
| **Poids du parquet (kg)** | | | | | | | | | | | |
| J0 | 2.624 | 2.596 | 2.595 | 2.603 | 2.585 | 2.607 | 2.585 | 2.620 | 2.569 | 0.016 | 0.3417 |
| J10 | 16.43$^{b}$ | 16.47$^{b}$ | 16.37$^{b}$ | 16.67$^{b}$ | 17.06$^{a}$ | 16.70$^{b}$ | 17.30$^{a}$ | 16.60$^{b}$ | 16.48$^{b}$ | 0.12 | <0.0001 |
| J20 | 50.03$^{a}$ | 46.21$^{c}$ | 47.64$^{bc}$ | 49.45$^{ab}$ | 49.51$^{ab}$ | 46.99$^{c}$ | 51.12$^{a}$ | 45.79$^{c}$ | 47.16$^{c}$ | 0.67 | <0.0001 |
| J34 | 109.17$^{ab}$ | 100.65$^{cd}$ | 90.73$^{e}$ | 108.88$^{ab}$ | 107.51$^{abc}$ | 99.32$^{d}$ | 113.52$^{a}$ | 101.45$^{cd}$ | 104.07$^{bcd}$ | 2.61 | <0.0001 |
| **Gain moyen quotidien (g/j)** | | | | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 25.97$^{cd}$ | 26.05$^{c}$ | 25.43$^{d}$ | 26.49$^{bc}$ | 26.89$^{ab}$ | 26.06$^{c}$ | 27.19$^{a}$ | 26.30$^{bc}$ | 26.05$^{c}$ | 0.21 | <0.0001 |
| J10-J20 (Phase 2) | 73.82$^{a}$ | 68.88$^{c}$ | 67.84$^{c}$ | 72.37$^{ab}$ | 72.42$^{ab}$ | 69.90$^{bc}$ | 73.79$^{a}$ | 67.86$^{c}$ | 69.60$^{bc}$ | 1.02 | <0.0001 |
| J20-J34 (Phase 3) | 113.83$^{ab}$ | 114.81$^{ab}$ | 107.22$^{cd}$ | 115.14$^{ab}$ | 113.35$^{ab}$ | 103.24$^{d}$ | 118.93$^{a}$ | 112.50$^{bc}$ | 112.20$^{bc}$ | 2.34 | 0.0002 |
| J0-J20 | 49.89$^{a}$ | 47.47$^{c}$ | 46.65$^{c}$ | 49.42$^{ab}$ | 49.66$^{a}$ | 47.97$^{bc}$ | 50.50$^{a}$ | 47.02$^{c}$ | 47.84$^{c}$ | 0.53 | <0.0001 |
| J10-J34 | 97.05$^{abc}$ | 95.79$^{bc}$ | 90.80$^{de}$ | 97.30$^{ab}$ | 96.26$^{bc}$ | 89.39$^{e}$ | 100.21$^{a}$ | 93.84$^{cd}$ | 94.41$^{bc}$ | 1.41 | <0.0001 |
| J0-J34 | 76.13$^{bc}$ | 75.29$^{bc}$ | 71.59$^{de}$ | 76.45$^{ab}$ | 75.86$^{bc}$ | 70.74$^{e}$ | 78.74$^{a}$ | 73.96$^{cd}$ | 74.32$^{bc}$ | 1.00 | <0.0001 |
| **Consommation (g/j)** | | | | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 31.06 | 31.12 | 30.89 | 30.52 | 30.47 | 31.13 | 30.50 | 29.74 | 30.69 | 0.40 | 0.2728 |
| J10-J20 (Phase 2) | 89.04$^{ab}$ | 89.17$^{abcd}$ | 92.22$^{abcd}$ | 86.26$^{abc}$ | 88.11$^{cd}$ | 89.94$^{d}$ | 89.11$^{a}$ | 89.40$^{abcd}$ | 91.56$^{bcd}$ | 1.12 | 0.0201 |
| J20-J34 (Phase 3) | 182.25$^{a}$ | 180.19$^{a}$ | 158.27$^{b}$ | 180.49$^{a}$ | 178.08$^{a}$ | 163.17$^{b}$ | 185.15$^{a}$ | 177.79$^{a}$ | 176.70$^{a}$ | 3.46 | <0.0001 |
| J0-J20 | 59.61$^{a}$ | 57.79$^{bc}$ | 58.33$^{ab}$ | 58.92$^{ab}$ | 57.75$^{bc}$ | 56.67$^{c}$ | 59.93$^{a}$ | 58.33$^{ab}$ | 58.40$^{ab}$ | 0.57 | 0.0071 |
| J10-J34 | 140.89$^{ab}$ | 138.07$^{ab}$ | 125.41$^{c}$ | 139.34$^{ab}$ | 136.79$^{b}$ | 127.84$^{c}$ | 142.94$^{a}$ | 136.95$^{b}$ | 136.50$^{b}$ | 2.11 | <0.0001 |
| J0-J34 | 103.93$^{ab}$ | 100.82$^{b}$ | 92.71$^{c}$ | 102.90$^{ab}$ | 100.88$^{b}$ | 94.62$^{c}$ | 105.39$^{a}$ | 100.68$^{b}$ | 100.73$^{b}$ | 1.47 | <0.0001 |
| **Conversion alimentaire** | | | | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 1.184$^{ab}$ | 1.142$^{bc}$ | 1.198$^{a}$ | 1.177$^{abc}$ | 1.133$^{c}$ | 1.172$^{abc}$ | 1.135$^{c}$ | 1.184$^{ab}$ | 1.192$^{a}$ | 0.016 | 0.0219 |
| J10-J20 (Phase 2) | 1.241$^{bc}$ | 1.306$^{a}$ | 1.308$^{a}$ | 1.242$^{bc}$ | 1.218$^{c}$ | 1.237$^{bc}$ | 1.252$^{bc}$ | 1.313$^{a}$ | 1.281$^{ab}$ | 0.017 | 0.0004 |
| J20-J34 (Phase 3) | 1.600 | 1.572 | 1.479 | 1.571 | 1.565 | 1.592 | 1.563 | 1.586 | 1.572 | 0.032 | 0.2961 |
| J0-J20 | 1.195$^{bcd}$ | 1.224$^{ab}$ | 1.249$^{a}$ | 1.192$^{bcd}$ | 1.163$^{d}$ | 1.183$^{cd}$ | 1.187$^{bcd}$ | 1.239$^{a}$ | 1.221$^{abc}$ | 0.013 | 0.0005 |
| J10-J34 | 1.450 | 1.444 | 1.383 | 1.433 | 1.419 | 1.431 | 1.429 | 1.461 | 1.445 | 0.020 | 0.1924 |
| J0-J34 | 1.364 | 1.341 | 1.297 | 1.347 | 1.329 | 1.337 | 1.341 | 1.363 | 1.355 | 0.018 | 0.1978 |
| **Mortalités (%)** | | | | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 2.84 | 2.60 | 1.29 | 2.38 | 1.74 | 1.33 | 1.45 | 2.95 | 2.51 | 0.62 | 0.3805 |
| J10-J20 (Phase 2) | 3.27 | 6.33 | 3.19 | 3.32 | 4.75 | 6.96 | 3.72 | 6.27 | 5.23 | 1.41 | 0.3361 |
| J20-J34 (Phase 3) | 1.17$^{b}$ | 4.13$^{b}$ | 14.01$^{a}$ | 1.51$^{b}$ | 1.80$^{b}$ | 0.92$^{b}$ | 1.83$^{b}$ | 2.18$^{b}$ | 1.52$^{b}$ | 1.31 | <0.0001 |
| J0-J20 | 6.15 | 9.26 | 4.60 | 6.05 | 6.65 | 8.42 | 5.03 | 8.89 | 7.73 | 1.41 | 0.1436 |
| J10-J34 | 4.26$^{c}$ | 10.32$^{b}$ | 17.25$^{a}$ | 4.71$^{bc}$ | 6.52$^{bc}$ | 7.83$^{bc}$ | 5.77$^{bc}$ | 8.55$^{bc}$ | 6.88$^{bc}$ | 2.01 | 0.0014 |
| J0-J34 | 7.14$^{c}$ | 13.08$^{ab}$ | 18.60$^{a}$ | 7.26$^{c}$ | 8.36$^{bc}$ | 9.19$^{bc}$ | 6.99$^{c}$ | 11.26$^{bc}$ | 9.31$^{bc}$ | 1.96 | 0.0014 |

Les moyennes des moindres carrées ± l'erreur standard sont présentées. 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 et non médicamentés ; T3, oiseaux infectés + nicarbazine ; T4, oiseaux infectés + monensine ; T5, oiseaux infectés + zoalène ; T6, oiseaux infectés + salinomycine ; T7, oiseaux infectés + amprolium ; T8, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #1 ; T8, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #2.

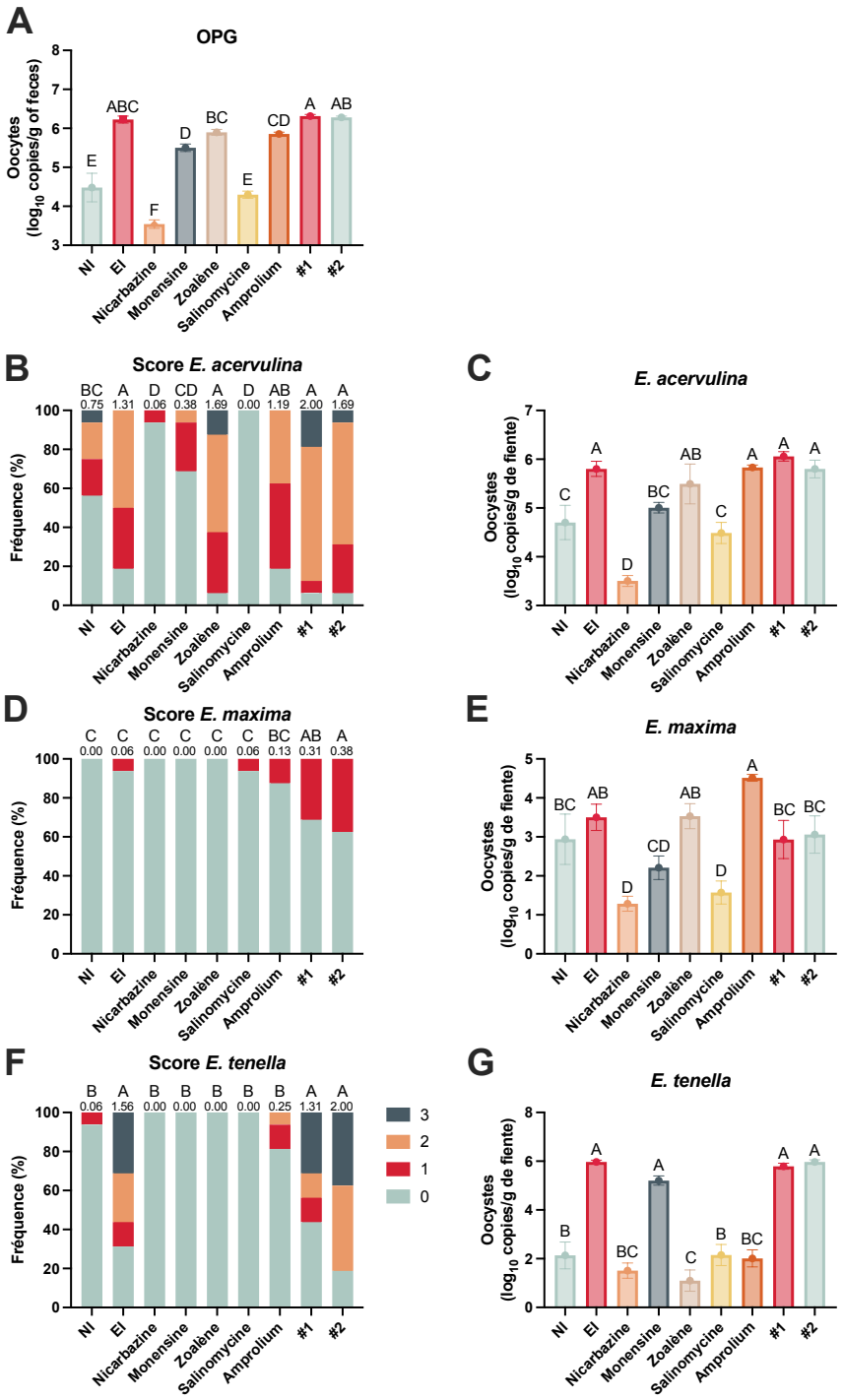


**Figure 1**. Lésions de coccidiose et excrétion oocytaire de l'essai #1. (**A**) Oocystes par g de fiente (OPG) au j20, (**B**) lésions caractéristiques et (**C**) nombre de copies excrétées d'*E. acervulina*, (**D**, **E**) d'*E. maxima et* (**F**, **G**) d'*E. tenella* au j21. Les données présentées 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 ou NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2 ou EI, oiseaux infectés et non médicamentés ; T3, oiseaux infectés + nicarbazine ; T4, oiseaux infectés + monensine ; T5, oiseaux infectés + zoalène ; T6, oiseaux infectés + salinomycine ; T7, oiseaux infectés + amprolium ; T8, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #1 ; T8, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #2.

**Tableau 2.** Données de composition corporelle et de minéralisation osseuse de l'essai #1.

| Mesures | Traitements | | | | | | | | | Effet Tx | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | Erreur std | Valeur de p |
| **Contenu minéral osseux (g)** | | | | | | | | | | | |
| J10 | 3.23 | 2.97 | 2.93 | 3.17 | 3.22 | 3.13 | 3.15 | 3.08 | 3.16 | 0.11 | 0.5463 |
| J20 | 11.84 | 11.39 | 11.24 | 11.50 | 11.71 | 11.31 | 11.93 | 11.64 | 11.98 | 0.32 | 0.7723 |
| J34 | 36.43 | 35.05 | 34.61 | 35.67 | 34.56 | 34.06 | 36.58 | 34.98 | 35.07 | 0.90 | 0.4877 |
| **Contenu minéral osseux/poids (g/kg)** | | | | | | | | | | | |
| J10 | 0.0104 | 0.0095 | 0.0098 | 0.0099 | 0.0099 | 0.0099 | 0.9775 | 0.0097 | 0.0102 | 0.0003 | 0.5778 |
| J20 | 0.0114 | 0.0112 | 0.0115 | 0.0112 | 0.0111 | 0.0112 | 0.0113 | 0.0113 | 0.0107 | 0.0002 | 0.4700 |
| J34 | 0.0134 | 0.0132 | 0.0129 | 0.0127 | 0.0131 | 0.0129 | 0.0130 | 0.1291 | 0.0133 | 0.0003 | 0.7037 |
| **Densité minérale osseuse ($g/cm^2$)** | | | | | | | | | | | |
| J10 | 0.074 | 0.070 | 0.072 | 0.072 | 0.072 | 0.072 | 0.072 | 0.073 | 0.071 | 0.002 | 0.9501 |
| J20 | 0.107 | 0.108 | 0.108 | 0.104 | 0.110 | 0.108 | 0.108 | 0.109 | 0.111 | 0.002 | 0.7280 |
| J34 | 0.144 | 0.150 | 0.146 | 0.142 | 0.140 | 0.140 | 0.149 | 0.138 | 0.141 | 0.004 | 0.2881 |
| **Masse maigre (g)** | | | | | | | | | | | |
| J10 | 265.2 | 268.0 | 257.3 | 278.4 | 278.9 | 271.0 | 273.0 | 273.3 | 268.6 | 4.7 | 0.0732 |
| J20 | 852.2[ab] | 869.5[a] | 812.6[b] | 846.1[ab] | 887.0[a] | 849.6[ab] | 887.5[a] | 860.0[a] | 880.8[a] | 17.7 | 0.0479 |
| J34 | 2225.9 | 2204.8 | 2190.0 | 2290.0 | 2175.1 | 2182.7 | 2342.2 | 2196.6 | 2114.1 | 48.3 | 0.0572 |
| **Masse grasse (g)** | | | | | | | | | | | |
| J10 | 46.2 | 46.2 | 40.9 | 41.6 | 46.8 | 45.9 | 49.2 | 43.6 | 41.6 | 2.4 | 0.1758 |
| J20 | 181.3 | 150.9 | 169.5 | 181.8 | 164.3 | 161.7 | 168.3 | 173.5 | 180.8 | 10.6 | 0.3449 |
| J34 | 498.8 | 451.7 | 486.0 | 513.7 | 462.8 | 466.1 | 483.6 | 510.9 | 516.0 | 21.1 | 0.1869 |
| **Pourcentage de matière grasse (%)** | | | | | | | | | | | |
| J10 | 14.9 | 14.6 | 13.6 | 13.0 | 14.3 | 14.5 | 15.2 | 13.5 | 13.5 | 0.7 | 0.3136 |
| J20 | 17.6 | 14.8 | 17.3 | 17.7 | 15.6 | 16.0 | 16.0 | 16.7 | 17.0 | 1.0 | 0.3386 |
| J34 | 18.3 | 17.0 | 18.2 | 18.4 | 17.6 | 17.6 | 17.1 | 18.9 | 19.7 | 0.8 | 0.2398 |

Les moyennes des moindres carrées ± l'erreur standard sont présentées. 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 et non médicamentés ; T3, oiseaux infectés + nicarbazine ; T4, oiseaux infectés + monensine ; T5, oiseaux infectés + zoalène ; T6, oiseaux infectés + salinomycine ; T7, oiseaux infectés + amprolium ; T8, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #1 ; T8, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #2.

### 5.1.2 Essai #2, décoquinate, salinomycine et additifs.

*Performances de croissance*

Les données de performance de croissance et du taux de mortalité de l'essai #2 sont résumées au Tableau 3. Comme pour l'essai #1, le challenge coccidien (T2) a réduit le poids corporel 6 jpi (j20) et a aggravé l'indice de conversion alimentaire (CA) pendant la phase de croissance (10-20d), comparés aux oiseaux non-infectés (T1) ($P$<0,01). De plus, le challenge a aussi diminué le poids des oiseaux au j34. La salinomycine et le décoquinate ont empêché la perte de poids corporel induite par *Eimeria* au j20 et l'augmentation de la CA pendant l'infection du j10 au j20. Comme dans l'essai #1, la salinomycine a montré des effets indésirables sur le poids corporel à j34 (2,53 vs 2,65 kg, $P$=0,0009), par rapport aux oiseaux infectés par *Eimeria* (T2).

*Oocystes et coccidiose*

Le challenge coccidien (T2) a augmenté l'excrétion d'*Eimeria* 6 jpi (Figure 2A) et les scores lésionnels d'*E. acervulina* (Figure 2C) et d'*E. tenella* (Figure 2E) 7 jpi, comparés aux oiseaux non-infectés (T1) ($P$<0,01). Le décoquinate a diminué l'excrétion oocytaire (Figure 1A) et les lésions intestinales causées *E. tenella* (Figure 2E), sans diminuer

significativement les scores lésionnels d'*E. acervulina* (0,69 contre 1,19, *P*>0,05) (Figure 2C). Comme dans l'essai #1, la salinomycine a diminué les OPG (Figure 2A) et les scores lésionnels d'*E. acervulina* (Figure 2C) et d'*E. tenella* (Figure 2E). Les additifs à l'étude n'ont pas diminué l'excrétion oocytaire ni les scores lésionnels, par rapport aux oiseaux infectés par *Eimeria* (T2). Les données de qPCR montrent que le décoquinate et la salinomycine ont diminué l'excrétion d'*E. acervulina* et *E. tenella*, mais que les additifs ne l'ont pas diminué (Figure 2D, 2F).

*Composition corporelle et minéralisation osseuse*

Les données de composition corporelle et de minéralisation osseuse sont résumées au Tableau 4. Le challenge *Eimeria* (T2) a diminué la densité minérale osseuse et les masses maigre et grasse à j20, sans affecter le pourcentage de matière grasse, comparativement aux oiseaux non-infectés (T1). La salinomycine et le décoquinate ont augmenté la densité minérale osseuse à j20. Le décoquinate a augmenté la masse maigre et la salinomycine a augmenté le pourcentage de matière grasse au j20.

**Tableau 3.** Données de performances zootechniques et de mortalité de l'essai #2.

| Mesures | Traitements | | | | | | Effet Tx | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | Erreur std | Valeur de p |
| **Poids (kg)** | | | | | | | | |
| J0 | 0.0421 | 0.0425 | 0.0421 | 0.0416 | 0.0421 | 0.0425 | 0.0003 | 0.1739 |
| J10 | 0.271$^{b}$ | 0.273$^{b}$ | 0.279$^{ab}$ | 0.285$^{a}$ | 0.276$^{b}$ | 0.273$^{b}$ | 0.003 | 0.0131 |
| J20 | 0.933$^{a}$ | 0.822$^{b}$ | 0.927$^{a}$ | 0.918$^{a}$ | 0.812$^{b}$ | 0.781$^{c}$ | 0.011 | <0.0001 |
| J35 | 2.816$^{a}$ | 2.653$^{bc}$ | 2.736$^{ab}$ | 2.526$^{d}$ | 2.569$^{cd}$ | 2.565$^{cd}$ | 0.033 | <0.0001 |
| **Poids du parquet (kg)** | | | | | | | | |
| J0 | 2.317 | 2.339 | 2.314 | 2.288 | 2.314 | 2.337 | 0.014 | 0.1739 |
| J10 | 14.65$^{c}$ | 14.81$^{bc}$ | 15.27$^{ab}$ | 15.51$^{a}$ | 15.08$^{abc}$ | 14.72$^{c}$ | 0.19 | 0.0058 |
| J20 | 46.67$^{a}$ | 40.86$^{b}$ | 47.03$^{a}$ | 46.38$^{a}$ | 41.01$^{b}$ | 38.81$^{c}$ | 0.63 | <0.0001 |
| J35 | 121.75$^{a}$ | 114.04$^{b}$ | 121.74$^{a}$ | 112.05$^{b}$ | 113.34$^{b}$ | 110.25$^{b}$ | 1.53 | <0.0001 |
| **Gain moyen quotidien (g/j)** | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 22.92$^{b}$ | 23.05$^{b}$ | 23.67$^{ab}$ | 24.36$^{a}$ | 23.40$^{b}$ | 23.01$^{b}$ | 0.33 | 0.0080 |
| J10-J20 (Phase 2) | 66.20$^{a}$ | 54.85$^{c}$ | 64.80$^{ab}$ | 63.31$^{b}$ | 53.60$^{c}$ | 50.87$^{d}$ | 0.86 | <0.0001 |
| J20-J35 (Phase 3) | 125.50$^{a}$ | 122.13$^{ab}$ | 120.62$^{ab}$ | 107.19$^{c}$ | 117.10$^{b}$ | 118.92$^{b}$ | 2.01 | <0.0001 |
| J0-J20 | 44.56$^{a}$ | 38.95$^{b}$ | 44.24$^{a}$ | 43.83$^{a}$ | 38.50$^{b}$ | 36.94$^{c}$ | 0.53 | <0.0001 |
| J10-J35 | 101.78$^{a}$ | 95.22$^{b}$ | 98.30$^{b}$ | 89.64$^{c}$ | 91.70$^{c}$ | 91.70$^{c}$ | 1.28 | <0.0001 |
| J0-J35 | 79.25$^{a}$ | 74.60$^{bc}$ | 76.97$^{ab}$ | 70.99$^{d}$ | 72.19$^{cd}$ | 72.07$^{cd}$ | 0.94 | <0.0001 |
| **Consommation (g/j)** | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 28.43$^{b}$ | 29.32$^{ab}$ | 29.07$^{ab}$ | 29.93$^{a}$ | 29.43$^{ab}$ | 28.60$^{b}$ | 0.36 | 0.0707 |
| J10-J20 (Phase 2) | 83.81$^{a}$ | 77.38$^{b}$ | 84.72$^{a}$ | 82.94$^{a}$ | 75.39$^{b}$ | 76.50$^{b}$ | 1.29 | <0.0001 |
| J20-J35 (Phase 3) | 182.02$^{a}$ | 176.38$^{b}$ | 182.62$^{a}$ | 156.68$^{d}$ | 174.20$^{bc}$ | 170.73$^{c}$ | 2.31 | <0.0001 |
| J0-J20 | 54.93$^{a}$ | 52.22$^{b}$ | 55.80$^{a}$ | 55.33$^{a}$ | 51.49$^{b}$ | 51.40$^{b}$ | 0.68 | <0.0001 |
| J10-J35 | 139.37$^{a}$ | 133.28$^{b}$ | 140.40$^{a}$ | 124.97$^{c}$ | 131.46$^{b}$ | 129.80$^{b}$ | 1.50 | <0.0001 |
| J0-J35 | 103.72$^{a}$ | 99.65$^{b}$ | 104.99$^{a}$ | 94.69$^{d}$ | 98.91$^{bc}$ | 97.06$^{cd}$ | 1.00 | <0.0001 |
| **Conversion alimentaire** | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 1.242 | 1.273 | 1.229 | 1.229 | 1.259 | 1.243 | 0.015 | 0.2467 |
| J10-J20 (Phase 2) | 1.266$^{c}$ | 1.411$^{b}$ | 1.308$^{c}$ | 1.310$^{c}$ | 1.406$^{b}$ | 1.506$^{a}$ | 0.017 | <0.0001 |
| J20-J35 (Phase 3) | 1.452 | 1.449 | 1.514 | 1.463 | 1.489 | 1.438 | 0.022 | 0.1960 |
| J0-J20 | 1.233$^{c}$ | 1.341$^{b}$ | 1.262$^{c}$ | 1.262$^{c}$ | 1.337$^{b}$ | 1.392$^{a}$ | 0.011 | <0.0001 |
| J10-J35 | 1.371$^{b}$ | 1.402$^{ab}$ | 1.428$^{a}$ | 1.394$^{ab}$ | 1.434$^{a}$ | 1.416$^{ab}$ | 0.016 | 0.0885 |
| J0-J35 | 1.310$^{b}$ | 1.338$^{ab}$ | 1.364$^{a}$ | 1.334$^{ab}$ | 1.371$^{a}$ | 1.347$^{ab}$ | 0.014 | 0.0648 |
| **Mortalités (%)** | | | | | | | | |
| J0-J10 (Phase 1) | 1.82 | 1.36 | 0.91 | 1.14 | 0.68 | 1.82 | 0.54 | 0.6271 |
| J10-J20 (Phase 2) | 0.25 | 1.00 | 0.00 | 0.00 | 0.25 | 0.77 | 0.34 | 0.1727 |
| J20-J35 (Phase 3) | 1.71 | 1.73 | 0.55 | 0.28 | 0.85 | 1.42 | 0.52 | 0.2797 |
| J0-J20 | 1.96 | 2.45 | 0.98 | 0.98 | 0.98 | 2.70 | 0.72 | 0.3204 |
| J10-J35 | 1.96$^{ab}$ | 2.73$^{a}$ | 0.55$^{b}$ | 0.28$^{b}$ | 1.10$^{ab}$ | 2.19$^{ab}$ | 0.66 | 0.0847 |
| J0-J35 | 3.78$^{ab}$ | 4.09$^{a}$ | 1.46$^{ab}$ | 1.41$^{b}$ | 1.78$^{ab}$ | 4.01$^{ab}$ | 0.92 | 0.0939 |

Les moyennes des moindres carrées ± l'erreur standard sont présentées. 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 et non médicamentés ; T3, oiseaux infectés + salinomycine ; T4, oiseaux infectés + décoquinate; T5, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #1 ; T6, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #2.

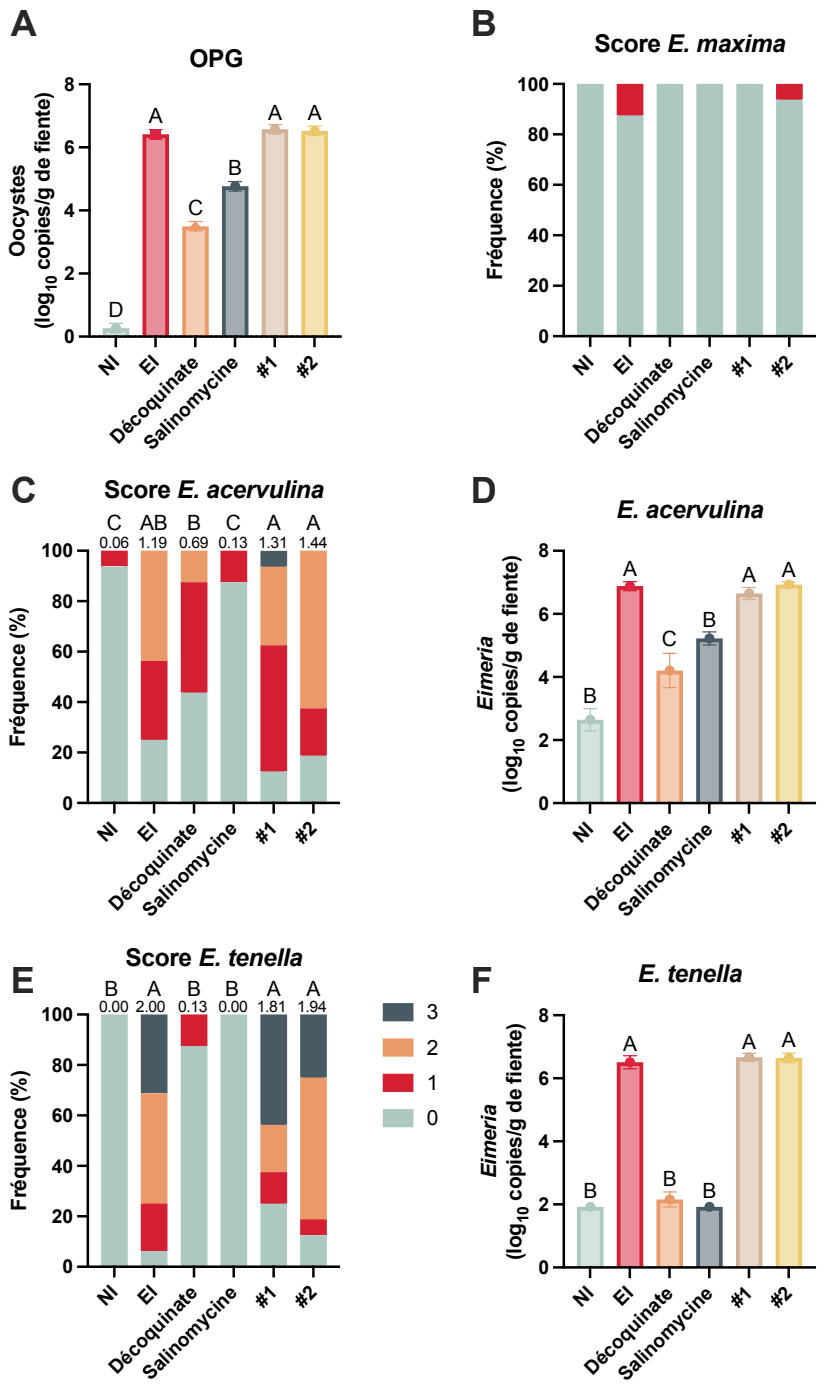


**Figure 2**. Lésions de coccidiose et excrétion oocytaire de l'essai #2. (**A**) Oocystes par g de fiente au j20, (**B**) lésions caractéristiques d'*E. maxima*, (**C**, **D**) lésions caractéristiques et nombre de copies excrétées d'*E. acervulina* et (**E**, **F**) d'*E. tenella* au j21. Les données 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 ou NI, oiseaux non infectés et non médicamentés ; T2 ou EI, oiseaux infectés et non médicamentés ; T3, oiseaux infectés + salinomycine ; T4, oiseaux infectés + décoquinate; T5, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #1 ; T6, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #2.

**Tableau 4.** Données de composition corporelle et de minéralisation osseuse de l'essai #2

| Mesures | Traitements | | | | | | Effet Tx | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | Erreur std | Valeur de p |
| **Contenu minéral osseux (g)** | | | | | | | | |
| J10 | 0.62 | 2.71 | 2.76 | 2.66 | 2.75 | 2.79 | 0.11 | 0.8676 |
| J20 | 11.01[a] | 9.37[b] | 10.77[a] | 10.78[a] | 9.18[b] | 8.87[b] | 0.33 | <0.0001 |
| J35 | 36.19 | 34.47 | 36.30 | 33.57 | 33.58 | 34.68 | 1.30 | 0.4192 |
| **Contenu minéral osseux/poids (g/kg)** | | | | | | | | |
| J10 | 0.0098 | 0.0101 | 0.0099 | 0.0096 | 0.0097 | 0.0098 | 0.0003 | 0.8285 |
| J20 | 0.0115[a] | 0.0111[ab] | 0.0115[a] | 0.0114[a] | 0.0110[ab] | 0.0108[b] | 0.0002 | 0.0716 |
| J35 | 0.0129 | 0.0128 | 0.0134 | 0.0126 | 0.0126 | 0.0131 | 0.0003 | 0.3091 |
| **Densité minérale osseuse ($g/cm^2$)** | | | | | | | | |
| J10 | 0.0164 | 0.0173 | 0.0177 | 0.0171 | 0.0174 | 0.0170 | 0.0005 | 0.4466 |
| J20 | 0.0276[a] | 0.0247[b] | 0.0270[a] | 0.0275[a] | 0.0244[b] | 0.0240[b] | 0.0006 | <0.0001 |
| J35 | 0.0382 | 0.0385 | 0.0391 | 0.0366 | 0.0370 | 0.0378 | 0.0008 | 0.2347 |
| **Masse maigre (g)** | | | | | | | | |
| J10 | 202.8[c] | 205.8[bc] | 214.7[abc] | 215.4[abc] | 221.7[a] | 218.2[ab] | 4.8 | 0.0751 |
| J20 | 770.6[a] | 686.0[bc] | 731.3[ab] | 753.4[a] | 677.8[c] | 662.8[c] | 18.4 | 0.0006 |
| J35 | 2307.2 | 2199.7 | 2167.7 | 2171.5 | 2173.9 | 2131.4 | 54.6 | 0.3036 |
| **Masse grasse (g)** | | | | | | | | |
| J10 | 64.0 | 62.6 | 64.6 | 63.5 | 60.5 | 67.0 | 2.8 | 0.6907 |
| J20 | 182.2[b] | 158.8[c] | 205.9[a] | 192.0[ab] | 158.7[c] | 159.5[c] | 7.8 | 0.0002 |
| J35 | 505.3 | 485.2 | 548.6 | 494.6 | 494.2 | 500.6 | 24.3 | 0.4671 |
| **Pourcentage de matière grasse (%)** | | | | | | | | |
| J10 | 6.0 | 5.8 | 5.8 | 5.7 | 5.4 | 5.9 | 0.2 | 0.4212 |
| J20 | 4.8[b] | 4.7[b] | 5.5[a] | 5.1[ab] | 4.7[b] | 4.9[b] | 0.2 | 0.0126 |
| J35 | 4.5 | 4.5 | 5.0 | 4.6 | 4.6 | 4.8 | 0.2 | 0.1463 |

Les moyennes des moindres carrées ± l'erreur standard sont présentées. 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 et non médicamentés ; T3, oiseaux infectés + salinomycine ; T4, oiseaux infectés + décoquinate; T5, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #1 ; T6, oiseaux infectés + 2 g/kg extrait végétal protégé #2.

## 5.1 Essais *in vitro*

Les données tirées des tests de viabilité ont montré que tous les anticoccidiens et les additifs à l'étude ont montré un effet dose-réponse (0,5, 12,5, 50 et 100 µg/mL) parasiticide contre les souches *Eimeria* vaccinales du Coccivac-B52® (Figure 3A). Par contre, la salinomycine et les additifs ont montré des effets différents avec les souches *Eimeria* de champs (Figure 3B), suggérant une perte de sensibilité de ces souches à ces produits.

Les tests de sporulation ont montré que tous les anticoccidiens, à l'exception de la plus forte dose (100 µg/mL) de salinomycine, ont réduit le taux de sporulation des oocystes *Eimeria* de champs (Figure 4). Des doses des additifs à l'étude ont aussi diminué les taux de sporulation à des niveaux comparables au témoin non sporulé.

Les tests d'invasion des cellules hôtes par les sporozoïtes *Eimeria* de champs ont montré des effets des anticoccidiens atteignant des diminutions de 90% (Figure 5). Les données suggèrent que les souches vaccinales et de champs sont sensibles pour la monensine et la salinomycine. L'amprolium n'a pas diminué la capacité d'invasion des sporozoïtes, à l'exception de la dose de 50 µg/mL chez les souches de champs. Le zoalène et la nicarbazine ont montré une

tendance à être moins efficaces avec des concentrations plus élevées. Parmi les deux additifs à l'étude, seul le #2 a montré des diminutions de la capacité d'invasion à certaines doses (Figure 5).

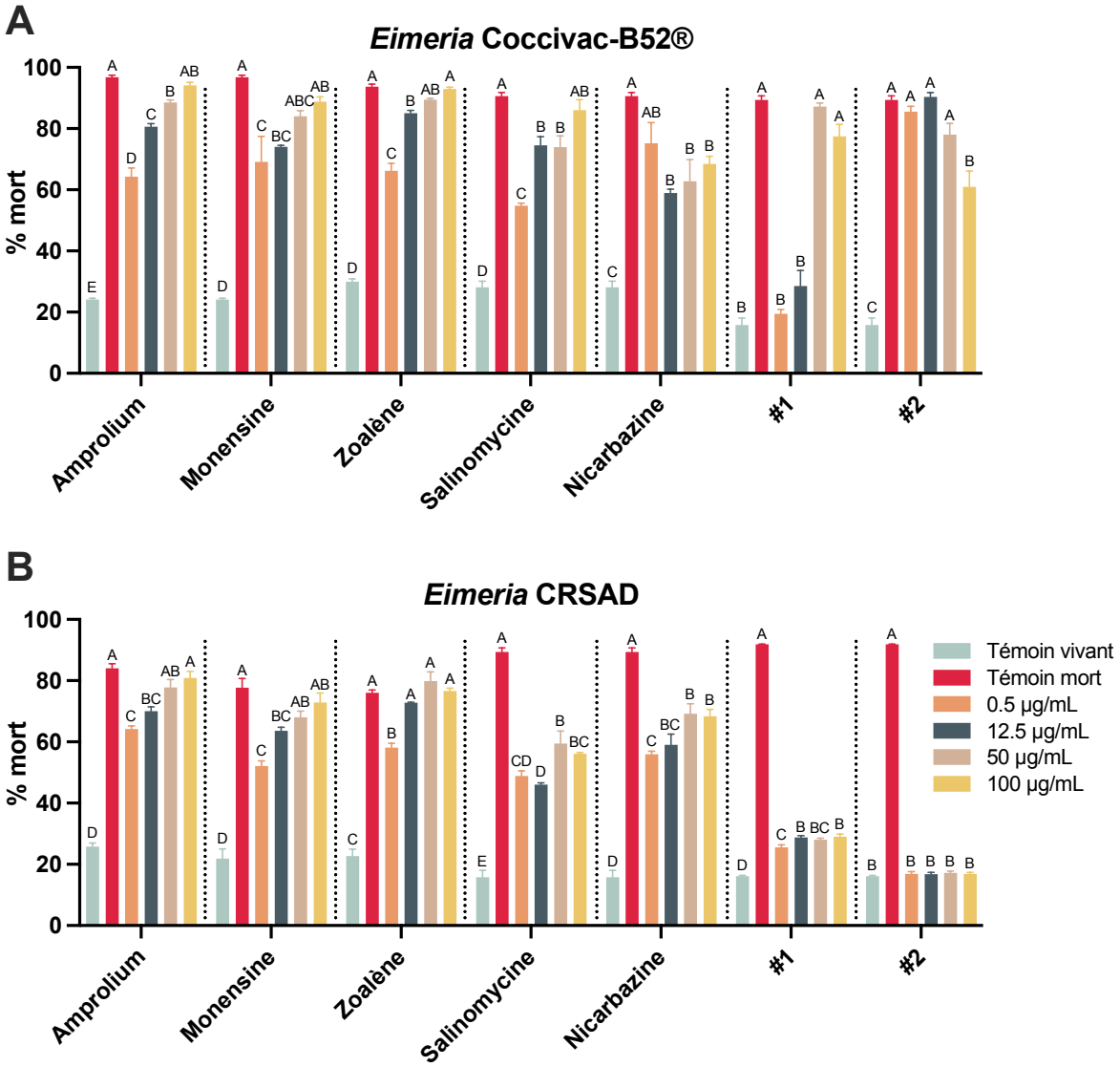


**Figure 3**. Tests *in vitro* de viabilité des sporozoïtes *Eimeria* (**A**) des souches vaccinales du Coccivac-B52® et (**B**) des souches de champs du CRSAD. Les barres représentent les moyennes ± leur erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de $P<0,05$. #1, extrait végétal protégé #1; #2, extrait végétal protégé #2.

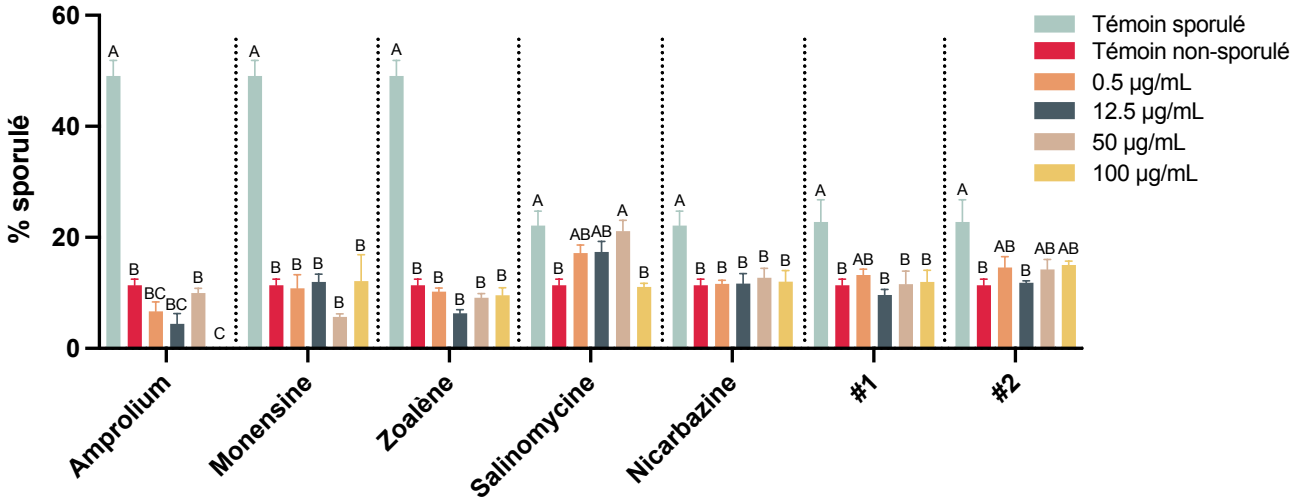


**Figure 4**. Tests *in vitro* de sporulation des oocystes *Eimeria* des souches de champs du CRSAD. Les barres représentent les moyennes ± leur erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de *P*<0,05. #1, extrait végétal protégé #1; #2, extrait végétal protégé #2.

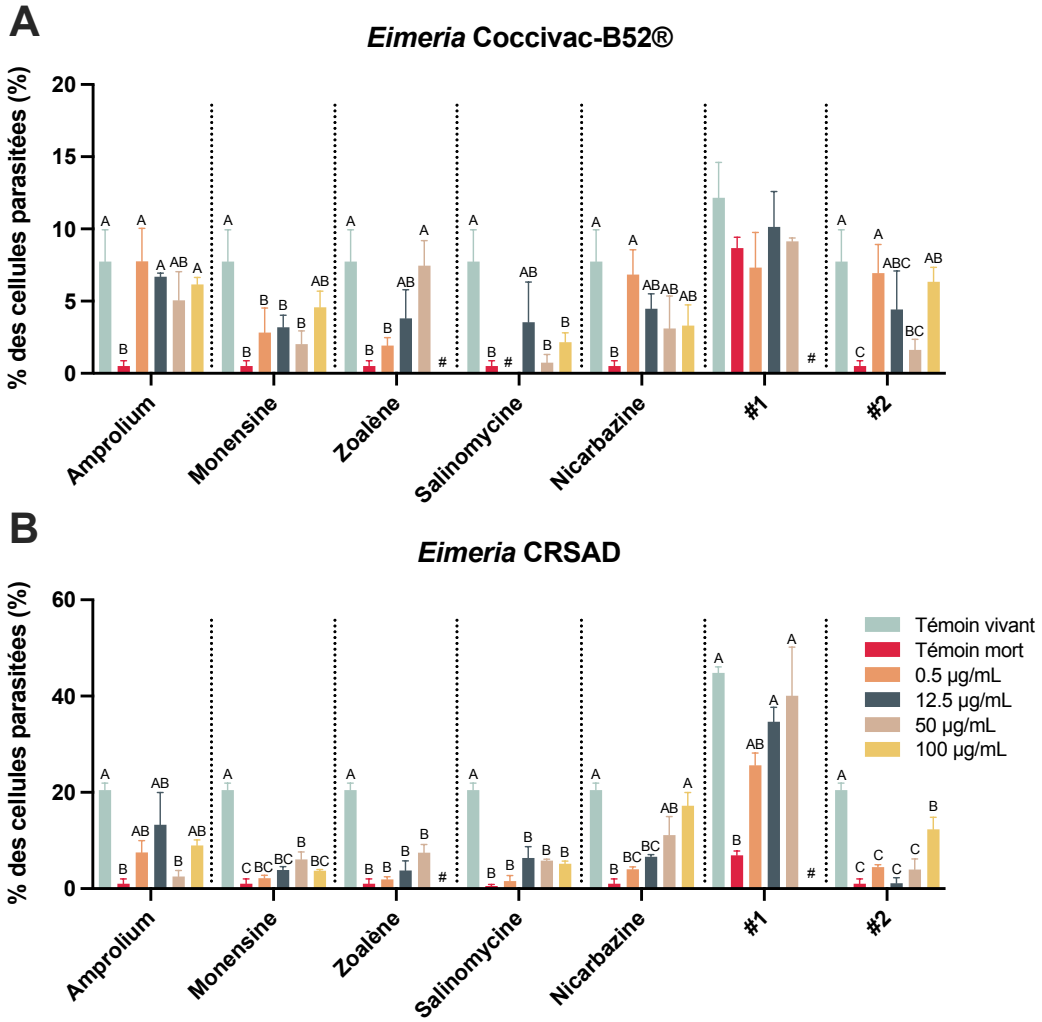


**Figure 5**. Tests *in vitro* d'invasion des cellules hôtes par les sporozoïtes *Eimeria* des souches de champs du CRSAD. Les barres représentent les moyennes ± leur erreur type. Les traitements non connectés par la même lettre sont significativement différents, selon une valeur de *P*<0,05. #, les cellules hôtes ont été tuées par le traitement. #1, extrait végétal protégé #1; #2, extrait végétal protégé #2.

## 6. Conclusion

En résumé, les résultats de cette étude ont permis de 1) développer des modèles permettant d'étudier le statut de sensibilité/résistance aux anticoccidiens, 2) de caractériser des souches *Eimeria* de champs quant à leur virulence et leur sensibilité à des anticoccidiens classiques et 3) d'évaluer l'effet de deux produits naturels sur les modèles développés et de les comparer aux anticoccidiens classiques. Dans l'ensemble, la souche d'*E. acervulina* dans la population d'*Eimeria* de champs que nous avons évaluée semblait résistante à l'amprolium et au zoalène. Les modèles *in vitro* que nous avons mis au point pourront permettre d'évaluer le statut de résistance des souches *Eimeria* présentes dans les poulaillers et permettre d'évaluer rapidement l'effet anticoccidien d'ingrédients et de produits destinés à la lutte à la coccidiose aviaire, sans la nécessité d'utiliser des poulets de chair.

## 7. Références


Abbas, A., Iqbal, Z., Abbas, R.Z., Khan, M.K., Khan, J.A., Sindhu, Z.U.D., Mahmood, M.S., Saleemi, M.K., 2017. In vivo anticoccidial effects of Beta vulgaris (sugar beet) in broiler chickens. Microbial pathogenesis 111, 139–144. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.052

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

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

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

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

Conway, D.P., McKenzie, M.E., 2007. Poultry Coccidiosis, John Wiley & Sons. John Wiley & Sons.

Fatemi, A., Asasi, K., Razavi, S.M., 2017. Anticoccidial effects of Artemisia annua ethanolic extract: prevention, simultaneous challenge-medication, and treatment. Parasitology research 116, 2581–2589. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5567-y

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

Hessenberger, S., Schatzmayr, G., Teichmann, K., 2016. In vitro inhibition of Eimeria tenella sporozoite invasion into host cells by probiotics. Vet Parasitol 229, 93–98. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.001

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

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

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

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., Eyng, 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

Nghonjuyi, 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

Oliveira, M.S.C., Morais, S.M. de, Magalhães, D.V., Batista, W.P., Vieira, Í.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

Quiroz-Castañeda, R.E., Dantán-González, E., 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. BioMed research international 2015, 430610–11. https://doi.org/10.1155/2015/430610

Thangavel, G., Mukkalil, R., Chirakkal, H., Kurian, H., Inc, K.I., 2014. Plant Parts and Extracts Having Anticoccidial Activity.

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.

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