

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للطب
البيطرية



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Etude de l'entérite nécrotique en élevage avicole
Algérien: facteurs prédisposants et moyens de lutte.**

Présentée par : **MERATI Rachid**

Soutenue le : **27 juin 2018**

Les membres du jury :

Mr. LAMARA Ali	MCA. ENSV, Alger	Président
Mme. TEMIM Soraya	Prof. ENSV, Alger	Directrice de thèse
Mr. MOHAMED A. A. A.	MCA. IRSVV, Egypte	Co-directeur de thèse
Mr. ALLOUI Nadir	Prof. Université de Batna	Examineur
Mr. MENOUEIRI Nabil	Prof. Université Saad Dahleb, Blida	Examineur

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Tout d'abord je remercie DIEU, le tout miséricordieux, qui m'a donné cette opportunité pour accomplir ce modeste travail de recherche.

*Je voudrais exprimer ma gratitude et mes plus sincères remerciements à mon encadreur le Professeur **TEMIM Soraya**, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH, la meilleure directrice de thèse que j'aurais pu avoir, pour son encadrement tant apprécié lors de la rédaction de la thèse, ses compétences scientifiques élevées, ses encouragements et ses conseils judicieux qui m'ont été de grande utilité, j'ai beaucoup appris pendant la période de mon doctorat, je vous suis reconnaissant la qualité de votre enseignement, qui me sera assurément utile dans le future.*

*Je remercie vivement, mon Co-encadreur le Docteur **Alaa Abd El-Fattah Mohammed Ali El-Meneisy**, directeur adjoint à l'Institut de Recherche des Sérums et Vaccins Vétérinaires, le Caire, d'avoir accepté la co-direction de mon projet de recherche et de m'avoir assuré les moyens nécessaires pour la réalisation de l'expérimentation 1. Sans qui, ce travail n'aurait pas été mené à terme.*

Nos Sincères remerciements :

*A Monsieur le Docteur **LAMARA ALI**, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'EL-HARRACH, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury. Hommage respectueux.*

*A Monsieur le Professeur **ALLOUI Nadir**, de l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques, Université de Batna 1, qui me fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

*A monsieur le Professeur **MENOUERI Nabíl**, de l'Institut des Sciences Vétérinaire, Blida, pour m'avoir fait l'honneur*

d'accepter de lire et d'évaluer ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

*J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur **AGGAD Hebib**, directeur du laboratoire d'Hygiène et Pathologie Animale, Université Ibn Khaldoun, Tiaret, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir assuré les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail, sans qui tout cela n'aurait pas été possible.*

*Au Docteur **ABDELHAMID Ahmed Maher**, je tiens à t'exprimer mes profonds remerciements pour ton aide précieuse et ton soutien tout le long de mes stages en Egypte, pour ton amitié et pour tes qualités humaines et professionnelles.*

*Au Docteur **ARFEN Ahmed**, Chef d'unité de Biotechnologie, Laboratoire de référence pour le contrôle vétérinaire de la qualité sur la production avicole, le Caire, pour son aide précieuse dans la partie biologie moléculaire (PCR).*

*A monsieur **ABDALI Mostapha**, ingénieure au niveau du laboratoire d'Hygiène et Pathologie Animale, Université Ibn Khaldoun, Tiaret, pour ton hospitalité légendaire et ta gentillesse. Tu trouves ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

Dédicaces

A la mémoire de mes parents

*Qui resteront un modèle pour moi parce qu'ils m'ont tout appris,
tout donné. Que Dieu, le Tout Puissant vous accorde son infinie
miséricorde et vous accueille dans son éternel paradis.*

*A mes frères et sœurs Hakima, Karim, Salim, Djamel, Amine,
Amel, que dieu le tout puissant vous protège.*

*A ma femme, pour ta patience, ton soutien, ta compréhension,
ton aide et surtout ton affection en toutes circonstances.*

A mes deux petites filles Nada et chérine, que dieu les protège

A tous mes amis et surtout mon équipe de Basketball.

*A tous ceux que je n'ai pas cités, tous ceux, qui par leur présence
à mes côtés, ont été d'une valeur inestimable, qu'ils trouvent ici
l'expression de mon immense estime et de mon affection.*

Résumé

Notre étude s'est articulée sur deux parties

Une première partie avait pour objectif de détecter la présence du *C. perfringens* chez le poulet de chair dans différentes régions au niveau de la wilaya de Tiaret et de caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB*. Un total de 180 échantillons de contenu intestinal prélevés à partir de 70 élevages de poulet de chair (2 à 3 prélèvements par élevage) présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par l'EN, sur une période de 12 mois (aout 2015 à juillet 2016), ont été analysés par des méthodes classiques d'isolement bactériologique et par PCR. *C. perfringens* a été isolé avec un taux de 34,44% (62/180) et confirmé par les caractères morphologiques, culturels et biochimiques. Sur les 62 souches de *C. perfringens*, 83,87% (52/62) étaient toxigènes et 16,13% (10/62) étaient non toxigènes. La PCR multiplex a été utilisée sur les 52 souches toxigènes afin de détecter les types de toxines sécrétées. Toutes les souches étaient positives pour le gène *cpa* et négatives pour les gènes *cpb*, *etx* et *iA*, indiquant ainsi que toutes les souches toxigènes correspondaient au *C. perfringens* de type A à 100% (52/52). Comme certaines études récentes ont mis en évidence un nouveau gène de virulence codant pour la toxine NetB, la PCR a été réalisée sur une sélection de 22 souches de type A afin de détecter ce dernier. Aucune souche n'a été positive pour le gène *netB*. Nos résultats indiquent que *C. perfringens*, agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que toutes les souches toxigènes sont de type A avec une absence du gène *NetB*. La deuxième partie avait pour but d'évaluer dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis à un facteur prédisposant (coccidies), l'impact de la supplémentation alimentaire en probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*) sur les performances de croissance, les paramètres cliniques et lésionnels ainsi que la morphométrie des intestins et de la bourse de Fabricius. Un total de 150 poussins de poulets de chair repartis en 5 groupes (6 répétitions de 5 sujets/cage) ont été élevés dans des cages durant 29 jours : groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté), groupe Cp (infecté clostridies, non supplémenté), groupe CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté), groupe CpCB (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *Pediococcus acidilactici*) et groupe CpCL (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *Saccharomyces cerevisiae*). L'infection expérimentale par *C. perfringens* avec ou sans le facteur prédisposant (coccidies) a engendré des indices de conversion alimentaire médiocres et un score lésionnel ne dépassant pas le 2. La supplémentation en probiotiques a permis une augmentation significative de l'efficacité de transformation alimentaire, même après infection, exprimée par un meilleur indice de consommation, une amélioration du score lésionnel ainsi qu'un accroissement de la longueur totale intestinale. Ces résultats suggèrent que la complémentation alimentaire par *Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae* est bénéfique pour atténuer les effets négatifs d'une entérite nécrotique sub-clinique chez les poulets de chair. Ces probiotiques pourraient servir comme une approche alternative intéressante aux antibiotiques dans la prévention contre cette maladie.

Mots-clés : *Clostridium perfringens*, Entérite nécrotique, Toxinotypage, NetB, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisiae*, Coccidies, Poulets de chair.

Abstract

Our study was divided into two parts.

A first part was aimed at the detection of *C. perfringens* in broiler chickens at different locations in Tiaret province, western Algeria, and characterization of *C. perfringens* isolates for the presence of *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* and *netB* gene. A total of 180 samples collected from 70 broiler chicken flocks (2 to 3 samples by flock) in a period of 12 months from august 2015 to July 2016 representing intestinal contents of broiler chickens showing clinical signs and lesions suspected to be NE were analyzed by conventional methods and PCR. *C. perfringens* was isolated at the rate of 34.44 % (62/180) confirmed by cultural and biochemical characterization, out of 62 *C. perfringens* isolates, 83.87% (52/62) isolates were toxigenic and 16.13 % (10/62) were non toxigenic. Multiplex polymerase chain reaction was performed for toxinotyping of the 52 toxigenic isolates, all isolates were positives for the gene *cpa* and negatives for *cpb*, *etx* and *iA*, indicating that all the toxigenic isolates were *C. perfringens* type A 100% (52/52). Recent studies have shown the involvement of NetB toxin in the pathogenesis of the disease, therefore, PCR was carried out on 22 types A isolates, and which showed that none of the isolates were positive for the gene *netB*. This result indicates that the *C. perfringens* causative agent of NE is detected in broiler chickens in Tiaret province and characterized by type A positive *netB* negative genotype. The second part was performed in order to evaluate in a model of experimental infection by *C. perfringens* subjected to a predisposing factor (coccidia), the impact of dietary supplementation with probiotics (*Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, clinical and lesional parameters and morphometry of the intestine and bursa of Fabricius. A total of 150, 0-day old broiler chickens allocated into 5 groups (6 repetitions of 5 birds / cage) were reared in cages for 28 days: group T (control, uninfected, unsupplemented), group Cp (infected clostridia, unsupplemented), group CpC (infected coccidia and clostridia, unsupplemented), group CpCB (infected coccidia and clostridia, supplemented with *Pediococcus acidilactici*) and group CpCL (infected coccidia and clostridia, supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*). Experimental infection by *C. perfringens* with or without predisposing factor (coccidia) resulted in poor feed conversion ratio and lesion score not exceeding 2. Probiotic supplementation allowed a significant increase in feed efficiency even after infection, expressed by a better feed conversion ratio, an improvement in the lesion score as well as an increase in the total intestinal length. These results suggest that dietary supplementation with *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae* is beneficial in mitigating the negative effects of subclinical necrotic enteritis in broiler chickens. These probiotics could serve as an interesting alternative approach to antibiotics in preventing this disease.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Necrotic enteritis, Toxinotyping, NetB, *Pediococcus acidilactici*, *Saccharomyces cerevisiae*, Coccidia, Broilers.

قسمت دراستنا إلى قسمين.

الجزء الأول يهدف إلى الكشف عن وجود كلوستريديوم بيرفرينجنس في دجاج التسمين وذلك في مناطق مختلفة في ولاية تيارت وتوصيف السلالات المعزولة لوجود الجينات *cpa*, *cpb*, *etx*, *ia*, *netB*. مجموع 180 عينة من محتويات الأمعاء تم أخذها من 70 مزرعة لتربية دجاج التسمين (2 إلى 3 عينات لكل مزرعة) تظهر فيها اعراض و الآفات المرضية التشريحية التي تدل على الإصابة الطبيعية بمرض التهاب الأمعاء التكرزي وذلك لمدة 12 شهرا في فترة الممتدة من أغسطس 2015 إلى يوليو 2016، حيث تم تحليلها عن طريق العزل البكتريولوجي و تفاعل البوليميراز المتكرر .تم عزل كلوستريديوم بيرفرينجنز بنسبة 34.44% (62/180) حيث تم تأكيدها عن طريق خصائص الزراعة البكتيريا و الخصائص البيوكيميائية. من 62 عزلة كلوستريديوم بيرفرينجنز ، 83.87% (52/62) عزلة كانت من العترات السامة و 16.13% (10/62) كانت غير سامة. تم تنفيذ تفاعل البوليميراز المتكرر و المتسلسل من أجل التعرف المصلي لي 52 عزلة سامة، فكانت جميع العزلات إيجابية لجين *cpa* و سلبية للجينات *cpb*, *etx*, *ia*، مما يدل على أن جميع العزلات السامة كانت كلوستريديوم بيرفرينجنس من النوع المصلي (1) 100% (52/52). أظهرت الدراسات الحديثة مشاركة جين *netB* في التسبب في المرض، وبالتالي، تم تنفيذ تفاعل البوليميراز المتكرر على 22 عزلة من النوع المصلي (1) ، والتي أظهرت أن كل العزلات كانت سلبية للجين *netB*. نتائجنا تشير إلى أن كلوستريديوم بيرفرينجنز، العامل المسبب لالتهاب الأمعاء التكرزي، قد تم الكشف عنه في دجاج التسمين في منطقة تيارت، وأن جميع العترات السامة المعزولة كانت من النوع المصلي (1) مع غياب الجين *netB*. تم تنفيذ الجزء الثاني من أجل تقييم في نموذج احداث المرض معمليا وتجريبيا باستعمال كلوستريديوم بيرفرينجنس في وجود عامل مؤهب (الكوكسيديا)، تأثير المكملات الغذائية بالبروبيوتيك (بيديوكوكوس أسيدولاكتيسي أو ساكارومييسز سيريفيسي) على أداء النمو، المعلمات الاكلينيكية و الآفات التشريحية وكذلك المقاييس المورفومترية للأمعاء و غدة فيريشي. مجموع 150 دجاجة تسمين مقسمة إلى 5 مجموعات (6 تكرار 5 طيور / قفص) تم تربيتها في أقفاص لمدة 28 يوما :مجموعة T (غير مصابة، غير مكملة)، مجموعة Cp (المصابة بكلوستريديا ، غير مكملة)، مجموعة CpC (المصابة بالكوكسيديا والكلوستريديا، غير مكملة)، CpCB (المصابة بالكوكسيديا والكلوستريديا ، مكمل بيديوكوكوس أسيدولاكتيسي) ومجموعة CpCL (المصابة بالكوكسيديا والكلوستريديا ، مكمل ساكارومييسز سيريفيسي).تسببت العدوى الصناعية باستعمال كلوستريديوم بيرفرينجنز مع أو بدون العامل المؤهب (الكوكسيديا) في سوء نسبة التحويل الغذائي و نتيجة الآفات التشريحية التي لم تتجاوز 2. استعمال المكملات الغذائية بالبروبيوتيك سمحت بزيادة كبيرة في كفاءة استغلال الأغذية ، حتى بعد العدوى، المتبين في مؤشر استهلاك افضل، تحسن في درجة الآفات التشريحية وكذلك الزيادة في طول الأمعاء. تشير هذه النتائج إلى أن المكملات الغذائية (بيديوكوكوس أسيدولاكتيسي أو ساكارومييسز سيريفيسي) قد تكون مفيدة في التخفيف من الآثار السلبية لمرض التهاب الأمعاء التكرزي تحت الاكلينيكي في دجاج التسمين. هذه البروبيوتيك يمكن أن تكون بديل لاستعمال المضادات الحيوية في الوقاية من هذا المرض.

الكلمات المفتاح : كلوستريديوم بيرفرينجنس، التهاب الأمعاء التكرزي، النوع المصلي، NetB، بيديوكوكوس أسيدولاكتيسي، ساكارومييسز سيريفيسي ، الكوكسيديا، دجاج التسمين.

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

α :	alpha
β :	bêta
ε :	epsilon
ι :	iota
ADN :	acide désoxyribonucléique
pb:	paires de base
<i>C. perfringens</i> :	<i>Clostridium perfringens</i>
CMV:	complément minérale et vitaminique
DFM:	Direct Fed Microbial (produits microbiens administrés directement)
EN:	Entérite Nécrotique
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)
MLST:	Multi locus sequence typing
NetB :	Necrotic enteritis B-like toxin
PCR:	polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PFGE:	Pulsed field gel electrophoresis (l'électrophorèse sur gel à champ pulsé)
rpm:	revolutions per minute (tours par minute)
SPF:	Specific Pathogen-Free (exempt d'organismes pathogènes spécifiques)
TBE:	Tris-Borate-EDTA
TSC:	Tryptone- Sulfate-Cyclosérine
TSI:	Triple-Sugar- Iron
TSN:	Tryptone-Sulfite-Neomycine
UFC:	Unité Formant Colonie
v/v:	volume/volume
WHO:	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

LISTE DES FIGURES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1. Schéma illustrant les mécanismes potentiels et connus par lesquels les bactéries probiotiques influencent le microbiote et la santé intestinale en général.	36
---	----

MATERIELS ET METHODES

Figure 2. Matériels utilisés pour générer une atmosphère anaérobique.	39
Figure 3. Animalerie utilisée pour l'expérimentation.	47
Figure 4. Protocole expérimental.	50
Figure 5. Vaccin anticoccidien utilisé.	51
Figure 6. La souche standard de <i>C. perfringens</i> sous forme lyophilisée	52
Figure 7. Dénombrement de <i>C. perfringens</i> sur gélose TSC (A : 10^{-4} ; B : 10^{-5} ; C : 10^{-6}).	53
Figure 8. Inoculation des poulets par la culture de <i>C. perfringens</i>	54
Figure 9. Mesure morphométrique intestinale.	57
Figure 10. Mesure du diamètre de la bourse de Fabricius.	57

RESULTATS

Figure 11. Parties d'intestins présentant des lésions évoquant une atteinte par l'EN.	59
Figure 12. Taux de détection de <i>C. perfringens</i>	60
Figure 13. Caractéristiques des colonies de <i>C. perfringens</i> sur gélose TSC et gélose au sang. ..	60
Figure 14. Photographie au microscope de <i>C. perfringens</i> Gr x 100.	61
Figure 15. Réaction de lécithinase.	61
Figure 16. Taux des souches toxigènes de <i>C. perfringens</i>	62
Figure 17. Réaction de Nagler.	62
Figure 18. Multiplex PCR pour le typage de <i>C. perfringens</i>	63
Figure 19. Uniplex PCR pour la détection du gène <i>netB</i>	63

LISTE DES TABLEAUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Classification des toxinotypes de *C. perfringens* selon les toxines majeures produites... **6**

Tableau 2. Les différentes maladies associées aux toxinotypes de *C. perfringens* **7**

MATERIELS ET METHODES

Tableau 3. Identification biochimique de *C. perfringens*. **40**

Tableau 4. Les séquences des amorces oligonucleotidiques utilisées dans cette étude..... **44**

Tableau 5. Distribution des groupes expérimentaux. **46**

Tableau 6. Composition et caractéristiques des aliments de base utilisés durant l’essai..... **48**

Tableau 7. Barème de la notation de la morbidité. **55**

Tableau 8. Notation des lésions d’EN. **56**

RESULTATS

Tableau 9. Poids vif et gain de poids des poulets mesurés durant l’essai..... **64**

Tableau 10. Ingéré alimentaire des poulets mesuré durant l’essai. **65**

Tableau 11. Indice de consommation des poulets mesuré durant l’essai. **67**

Tableau 12. Scores lésionnels mesurés chez les poulets à l’âge de 21 et 28 jours (n=12). **69**

Tableau 13. Mesures morphométriques de l’intestin à J 21 et J 28 (n=12). **70**

Tableau 14. Mesures morphométriques de la bourse de Fabricius à J 21 et J 28 (n=12). **72**

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1. <i>Clostridium perfringens</i>.....	4
1. Caractéristiques générales de la bactérie	4
2. Identification et classification	5
3. Caractérisation génétique de <i>C. perfringens</i>	7
Chapitre 2. L'entérite nécrotique chez le poulet.....	9
1. Etiologie.....	9
2. Epidémiologie	9
3. Source de contamination.....	10
4. Pathogénie.....	11
5. NetB et son rôle dans l'EN	12
6. Signes cliniques	14
7. Lésions macroscopiques	15
8. Lésion microscopiques.....	15
9. Diagnostic	16
10. Diagnostic différentiel	17
11. Traitement et prophylaxie	18
11.1. Méthodes conventionnelles.....	18
11.1.1. Antimicrobiens	18
11.1.2. Anticoccidiens ionophores	19
11.2. Méthodes alternatives	19
11.2.1. Acides organiques.....	19
11.2.2. Huiles essentielles.....	20
11.2.3. Probiotiques.....	21
11.2.4. Prébiotiques	21
11.2.5. Produits d'exclusion compétitive	22

11.2.6. Enzymes et formulation de la diète	23
11.2.7. Vaccination contre <i>C. perfringens</i>	24
Chapitre 3. Les modèles expérimentaux de l'EN	25
1. Facteurs nutritionnels	25
1.1. Alimentation à base de polysaccharides non-amylacés	25
1.2. Alimentation riche en protéines animales (farine de poisson).....	26
2. Rôle des coccidies	26
3. Facteur immunodépresseurs	27
4. Critères bactériologiques	27
4.1. Caractéristiques des souches de <i>C. perfringens</i> impliquées dans la reproduction de la maladie.....	27
4.2. Préparation de la culture de <i>C. perfringens</i>	28
4.2.1. Type de milieu de culture	28
4.2.2. Temps d'incubation.....	29
4.2.3. Quantité de bactéries	29
Chapitre 4. Probiotiques	30
1. Généralités	30
2. Utilisation des probiotiques en aviculture.....	31
3. Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez les volailles ...	32
3.1. Caractéristiques de <i>Pediococcus acidilactici</i>	33
3.2. Caractéristiques de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	34
4. Mode d'action des probiotiques.....	35
4.1. Effets immunologiques	35
4.2. Effets non immunologiques	36
MATERIELS ET METHODES	38
Expérimentation 1. Détection et caractérisation de <i>C. perfringens</i> isolé à partir de poulet de chair présentant des signes d'EN	38
1. Collecte des échantillons	38
2. Examen bactériologique.....	38

2.1. Isolement du <i>C. perfringens</i>	38
2.2. Identification du <i>C. perfringens</i>	40
3. Détermination des souches toxigènes de <i>C. perfringens</i>	41
3.1. Test de létalité sur souris.....	41
3.2. Test de la réaction de Nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique	41
4. Géotypage moléculaire des souches toxigènes de <i>C. perfringens</i>	41
4.1. Extraction d'ADN.....	41
4.2. La PCR multiplex pour la détection des toxines alpha, beta, epsilon et iota	43
4.3. La PCR uniplex pour la détection de la toxine NetB.....	43
Expérimentation 2. Evaluation <i>in vivo</i> de l'effet de <i>Pediococcus acidolactici</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur l'EN.	45
1. Lieu, durée et période de l'étude.....	45
2. Animaux	45
3. Traitements	46
4. Déroulement de l'essai.....	46
5. Condition d'élevage	47
5.1. Animalerie.....	47
5.2. Aliments.....	48
5.2.1. Aliments de base	48
5.2.2. Modalités de la supplémentation en probiotique.....	48
5.3. Nettoyage et désinfection de l'animalerie.....	49
6. Protocole expérimental	50
7. Préparation et inoculation du vaccin anticoccidien	51
8. Préparation et inoculation de <i>C. perfringens</i>	51
8.1. Technique de préparation de l'inoculum de <i>C. perfringens</i>	51
8.1.1. Pré-culture	51
8.1.2. Culture	52
8.1.3. Inoculum	52

8.1.4. <i>Dénombrement de l'inoculum</i>	52
8.2. Technique d'inoculation	53
9. Mesures réalisées	54
9.1. Mesures des performances zootechniques	54
9.1.1. <i>Ingéré alimentaire</i>	54
9.1.2. <i>Poids vif</i>	54
9.1.3. <i>Gain de poids</i>	54
9.1.4. <i>Indice de consommation</i>	55
10. Paramètres cliniques et lésionnels	55
10.1. Notation de la morbidité	55
10.2. Taux de mortalité	55
10.3. Notation des lésions d'EN	56
11. Mesures de la morphométrie intestinale	56
12. Mesures de la morphométrie de la bourse de Fabricius.....	57
13. Analyse statistique	58
RESULTATS	59
Experimentation1	59
1. Les observations de nécropsie	59
2. Examen bactériologique et biochimique.....	59
3. Activité toxigénique de <i>C. perfringens</i>	62
4. La caractérisation moléculaire des souches toxigènes de <i>C. perfringens</i>	63
4.1. Multiplex PCR pour le génotypage des souches toxigènes de <i>C. perfringens</i>	63
4.2. Uniplex PCR pour la détection du gène <i>netB</i>	63
Expérimentation 2	64
1. Effet des probiotiques <i>P. acidilactici</i> et <i>S. cerevisiae</i> sur les performances de croissance	64
1.1. Effet sur le poids vif et le gain de poids du poulet.....	64
1.2. Effet sur l'ingéré alimentaire	65
1.3. Effet sur l'indice de consommation du poulet	67

2. Effet des probiotiques <i>P. acidilactici</i> et <i>S. cerevisiae</i> sur les paramètres cliniques et lésionnels	68
2.1. Effet sur la morbidité et la mortalité	68
2.2. Effet sur les scores lésionnels	68
3. Effet des probiotiques <i>P. acidilactici</i> et <i>S. cerevisiae</i> sur la morphométrie intestinale	70
4. Effet des probiotiques <i>P. acidilactici</i> et <i>S. cerevisiae</i> sur la morphométrie de la bourse de Fabricius	71
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	74
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85
ANNEXES	106

INTRODUCTION GENERALE

Au cours des dernières décennies, l'industrie avicole nationale a connu d'énorme progrès pour couvrir les besoins en protéines animales. En 1970, le gouvernement a mis en place des offices nationaux ONAB (Office National des Aliments de Bétail), l'ORAC (Office Régional d'Aviculture du Centre)... ensuite, dès les années 1990, le secteur privé a pris le relais (Kirouani, 2015). L'offre en viande blanche est passée de 95000 à près de 340000 tonnes entre 1980 et 2011, soit une progression de + 257 % en 31 ans (MADR, 2012) et cela pour subvenir aux demandes des consommateurs qui ne cessent d'augmenter au fil des années. En effet, la viande de volaille représente une excellente source de protéine avec une faible teneur en matières grasses, ce qui lui confère la particularité d'être plus populaire.

En dépit des nombreuses stratégies utilisées pour le développement de la production avicole nationale, le processus de remontée de cette filière ne se réalise que partiellement et reste bloqué au stade de reproducteur chair et ponte, les métiers de base (multiplication des grands parentaux et des arrière grands parentaux ainsi que l'industrie des équipements avicoles) n'existent pas encore en Algérie (Belaid, 2015).

Néanmoins, ce développement de la filière a permis d'améliorer la ration alimentaire moyenne des algériens en protéine animales. En 2012, l'Algérie est devenue capable d'assurer 8 kg/habitant/an; ces taux restent, toutefois, en deçà de la moyenne mondiale qui est de 12,9 kg/habitant/an (Alloui et Bennoune, 2013). Parmi les facteurs responsables de cette situation, figure: la dépendance structurelle pour les matières premières alimentaires (maïs, tourteau de soja, additifs) et les divers facteurs de production (matériel biologique, produits vétérinaires); la fragilité économique et les faiblesses technologiques des industries d'amont; la volatilité des prix de poussins ainsi que les aliments; les coûts de production très élevés; le manque de professionnalisme de la part des intervenants dans cette filière qui induit l'émergence des pathologies et la diminution des performances zootechniques chez la volaille.

En Europe, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance a fait son apparition pendant l'ère d'industrialisation suite à la deuxième guerre mondiale (Jukes *et al.*, 1956). Depuis ce temps, ces antibiotiques ont été ajoutés à la ration des animaux d'élevages industriels afin de favoriser le maintien d'une santé globale, de prévenir certaines maladies

infectieuses, mais aussi à des fins économiques pour promouvoir la croissance et améliorer l'efficacité alimentaire (Van immerseel *et al.*, 2009).

Cependant, l'utilisation à grande échelle et en continu d'antibiotiques chez les animaux de consommation n'est pas sans conséquence, cette pratique a suscité des inquiétudes face aux risques d'émergence de résistance bactériennes. En janvier 2006, la commission européenne a interdit l'usage des antibiotiques comme promoteurs de croissance, cette loi a été appliquée par la suite en Algérie en décembre 2006 (Décision ministérielle n° 472 du 24 Décembre 2006, portant sur l'utilisation des additifs dans l'alimentation animales).

Une étude récente a examiné l'impact du retrait des antibiotiques dans l'aliment sur la santé et les performances de production d'un élevage de poulet de chair (Gaucher, 2016). Ces auteurs ont démontré qu'il était possible de produire des poulets à chair sans antibiotiques. Toutefois, les performances zootechniques et économiques restaient en deçà de celles mesurées dans les troupeaux élevés avec antibiotiques facteurs de croissance. Les principaux problèmes étaient reliés à l'entérite nécrotique (EN), une maladie intestinale, causée par la bactérie *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). En effet, suite au retrait des antibiotiques dans l'aliment pour volaille, les producteurs européens ont observé une recrudescence de l'EN au sein des élevages, particulièrement au Royaume Uni et dans les pays scandinaves (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Cette maladie est devenue un problème mondial émergent, et cela suite aux divers degrés de dysfonctions intestinales causées par cette dernière, qui se traduisent en une baisse de rendements des élevages et occasionnent un impact économique important sur l'industrie. La mauvaise conversion alimentaire et un ralentissement du gain de masse corporelle semblent être à l'origine de cet impact (Van Immerseel *et al.*, 2004).

En Algérie, très peu d'études ont été réalisées sur l'EN dans les élevages avicoles. Djouini (2006) ont enregistré, dans une étude faite sur cette maladie chez les poulets de chair dans la région de Tébessa, une prévalence de $30 \% \pm 0,09$. Ces auteurs ont constaté que cette pathologie était importante mais restait peu connue dans nos élevages, elle est considérée comme réservée à l'élevage de la dinde par les cliniciens et passe souvent pour une coccidiose, en absence de lésions assez spécifiques (dans le cas où les deux maladies coexistent).

La communauté scientifique a déployé beaucoup d'efforts au cours des dernières années afin d'identifier des stratégies alternatives pouvant être utilisées en remplacement à ces promoteurs de croissance afin d'assurer le contrôle de l'EN dans les élevages de poulets de chair (Hume, 2011). L'utilisation des probiotiques comme étant des alternatifs dans le contrôle de cette maladie ont été largement étudiés, plusieurs travaux réalisés sur l'effet de certaines bactéries lactiques et levures probiotiques sur l'EN chez les poulets de chair ont rapportés qu'ils pouvait jouer un rôle important dans l'atténuation des effets négatifs de cette maladie et l'amélioration des performances zootechniques de croissance (Eeckhaut *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2017).

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la caractérisation génétique des souches de *C. perfringens* provenant de troupeaux affectés par l'EN au niveau de l'Algérie. De plus, aucune étude n'a été menée sur l'effet des probiotiques comme alternatifs aux antibiotiques dans la prévention contre cette maladie en Algérie.

Dans ce contexte, notre travail de thèse vise deux objectifs :

- 1- Détecter la présence du *C. perfringens*, agent causal de l'EN chez le poulet de chair dans différentes régions de la wilaya de Tiaret et caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB* par la technique PCR.
- 2- Etudier l'intérêt de l'utilisation des probiotiques, *Pedicoccus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*, comme moyens de prévention dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* chez les poulets de chair soumis à un facteur prédisposant (coccidies).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1.

Clostridium perfringens

1. Caractéristiques générales de la bactérie :

C. perfringens connu auparavant sous le nom de *Clostridium welchii*, a été découverte pour la première fois par Welch et Flexner en 1891 (Welch et Flexner, 1896). Au milieu des années 1900, la bactérie avait été impliquée dans certaines maladies gastro-intestinales humaines. Des épidémies d'entérite nécrotique ont été rapportées dans le nord-est de l'Allemagne dans les années qui ont suivi la Seconde Guerre mondiale, cette maladie entérique chez l'homme a été soigneusement étudiée et *C. perfringens* a été identifié comme agent pathogène (Zeissler et Rassfeld-Sternberg, 1949; Murrell *et al.*, 1966; Johnson et Gerding, 1997). Chez les animaux plusieurs maladies entériques du bétail (moutons, bovins, chèvres et chevaux), ainsi que l'entérite nécrotique chez les volailles ont été attribuées à *C. perfringens* (Niilo, 1980; Quinn *et al.*, 1994; Songer, 1997).

C. perfringens est une bactérie à Gram-positif, large en forme de bâtonnet (1-1.5 µm de diamètre), à extrémité carré, immobile, à métabolisme anaérobie strict mais elle est tolérante dans les milieux microaérophiles, elle possède la capacité de former des spores, cette caractéristique lui confère une plus grande résistance. (Wells et Wilkins, 1996; Morris et Fernandez-Miyakawa, 2009). Elle est très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, eaux d'égout, lisiers, cadavres, poussières, surface des végétaux, etc.). Elle peut aussi être retrouvée dans la flore microbienne intestinale des humains et des animaux, Mais son nombre dans le contenu digestif est faible (Wells et Wilkins, 1996). *C. perfringens* est un contaminant fréquent des produits alimentaires, notamment ceux d'origine animale. Ces produits peuvent être contaminés soit lors de la phase d'éviscération à l'abattoir, soit à partir de l'environnement souillé (plan de travail, contact avec aliments souillés, poussières, etc.) (Nowell *et al.*, 2010), causant ainsi des toxi-infections alimentaires (Wells et Wilkins, 1996).

2. Identification et classification :

C. perfringens est une bactérie mésophile, sa croissance optimale s'effectue à des températures variant entre 25 – 40°C, nécessitant des milieux complexes à base de peptone et riches en hydrates de carbone, car la bactérie les fermente pour produire du dioxyde de carbone et de l'hydrogène (Morris et Fernandez-Miyakawa, 2009). Cela est essentiel pour maintenir un environnement anaérobique. Son développement est parmi celle des bactéries se divisant le plus rapidement, avec un temps de génération d'aussi peu que 8 à 20 minutes dans des conditions optimales (Lindstrom *et al.*, 2011). C'est une bactérie glucidolytique (acidification notamment du glucose, lactose, et maltose) et protéolytique. Son isolement nécessite une première inoculation dans un milieu d'enrichissement et une incubation dans un environnement anaérobique pendant 18 - 24 heures à 37 °C. Parmi les milieux d'enrichissement les plus communément utilisés, il y a le *cooked meat medium*, le *brain heart infusion* et le *tryptone glucose yeast* (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007). Ensuite une inoculation dans des géloses sélectives telles que le TSN ou le TSC, suivie d'une incubation en anaérobiose pendant 18 - 24 heure à 37°C, ces milieux de culture contiennent un critère de différenciation (sulfite de sodium) qui mis en évidence les micro-organismes sulfito-réducteurs qui réduisent le sulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies (Harmon, 1984). Les géloses d'agar avec 5% de sang sont aussi utilisées. Les colonies de *C. perfringens* produisent une hémolyse α et une hémolyse β , soit une double hémolyse caractéristique permettant de les identifier (Cruickshank *et al.*, 1975).

C. perfringens est responsable de la synthèse et la sécrétion de plus de 17 différentes toxines. Les souches de *C. perfringens* sont habituellement classées en 5 toxinotypes A, B, C, D et E en fonction de leurs capacités à produire des toxines possédant une activité létale majeure alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ) et iota (i) (Uzal *et al.*, 2014). Cette méthode de classification fut développée en 1931 à partir de tests effectués sur des souris, et est basée sur le pouvoir de létalité du surnageant de cultures pures de chacun des toxinotypes, ainsi que sur la capacité de séroprotection d'anticorps neutralisants isolés de ce même surnageant (Songer, 1996; petit *et al.*, 1999). Le *C. perfringens* type A est reconnu pour produire la toxine alpha. Le type B produit quant à lui les toxines alpha, bêta et epsilon, seules les toxines alpha et bêta

sont produites par les bactéries de type C, tandis que les toxines alpha et epsilon sont associées au type D. La production des toxines alpha et iota caractérise le type E (**Tableau 1**) (Songer, 1996).

Tableau 1. Classification des toxinotypes de *C. perfringens* selon les toxines majeures produites.

Toxinotype	Toxines			
	A	β	ϵ	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Suite à la différence des toxines secrétées, les toxinotypes peuvent engendrer plusieurs maladies et infecter différentes espèces, L'EN chez le poulet est causée principalement par le type A produisant la toxine alpha et parfois le type C produisant la toxine alpha et la toxine beta (Enstrom *et al.*, 2003). Les principales maladies causées par les cinq toxinotypes sont résumées dans le **Tableau 2** (Parent, 2015).

Tableau 2. Les différentes maladies associées aux toxinotypes de *C. perfringens*.

Toxinotype	Principales maladies
A	Gangrène gazeuse (Humain) Entérite nécrotique (Volaille) Entérocolite nécrotique (Porc) Gastroentérite hémorragique (Chien) Entérite hémorragique jéjunale (Bovin)
B	Dysenterie (Veau, agneau) Entérite (Veau, poulain) Entérotoxémie (Mouton)
C	Entérite nécrotique (Volaille) Mort subite (Chèvre, bovin de boucherie) Entérite (Porcelet, veau, poulain, agneau naissant) Entérotoxémie (Mouton)
D	Entérotoxémie (Veau, chèvre, agneau) Rein pulpeux (Mouton)
E	Entérite hémorragique (Veau) Entérotoxémie (Veau) Entérite (Lapin)

3. Caractérisation génétique de *C. perfringens* :

Avant le développement des méthodes modernes, les toxines de divers isolats de *C. perfringens* ont été caractérisées par l'utilisation des méthodes classiques de sérotypage qui consistaient à évaluer la neutralisation des toxines administrées à des cobayes ou des souris par des antisérums spécifiques (Niilo, 1980; Songer et Meer, 1996). Mais ces méthodes présentent plusieurs problèmes; la nature complexe et les dépenses élevées de ces dernières, les nouvelles réglementations sur la protection des animaux de laboratoire ainsi qu'une sensibilité et une spécificité insuffisantes (Songer et Meer, 1996). Au cours des dernière années, les chercheurs ont employé diverses méthodes pour la caractérisation des souches de *C. perfringens* telles que le rybotypage, l'électrophorèse en champ pulsé, le MLST (Multilocus Sequence Typing), le MLVA (multilocus variable number of tandem repeat analysis), ainsi que

le séquençage de génomes entiers ou même de plasmides appartenant à *C. perfringens* (Engstrom *et al.*, 2003; Nauerby *et al.*, 2003; Chalmers *et al.*, 2008; De Cesare *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2010; Lepp *et al.*, 2010; Parreira *et al.*, 2012; Lepp *et al.*, 2013). Mais la méthode de détection à base d'acide nucléique telle que la PCR reste la plus utilisée pour le génotypage de *C. perfringens*, et la détection de certains gènes de toxines utilisés pour présélectionner le toxinotype d'un isolat (Songer et Meer, 1996; Yoo *et al.*, 1997). Cette méthode présente les avantages d'être beaucoup plus rapide que la neutralisation des toxines, relativement peu coûteuse et très spécifique. Elle est effectuée en 2 étapes; La première étape implique l'amplification de segments constituant le gène ciblé par l'action du Taq polymérase. Deuxièmement, ces amplicons sont vérifiés pour une taille appropriée par électrophorèse sur gel d'agarose et sont visualisés à l'aide d'un composé fluorescent qui se lie à l'ADN, tel que le bromure d'éthidium. Pour amplifier un segment cible, deux amorces oligonucléotidiques sont conçues pour se lier spécifiquement au gène ciblé: une amorce (amorce inverse) se lie à l'extrémité 3' d'un brin de référence et la seconde amorce se lie à l'extrémité 3' du brin complémentaire (amorce directe). Tout d'abord, la température est portée à environ 95 °C pour dénaturer la double hélice d'ADN. Ensuite, la température est abaissée à la température optimale d'hybridation des amorces (généralement autour de 55°C), qui se fixent ensuite à leurs sites complémentaires. La température est ensuite portée à environ 72 °C, qui est la température optimale pour la fonction du Taq polymérase, qui incorpore les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) sur les extrémités 3' des amorces hybridées. Ce cycle de dénaturation, hybridation et extension est ensuite répété de 35 à 40 fois, répliquant le segment du gène ciblé et l'amplifiant de façon exponentielle. La concentration des réactifs, tels que les dNTP, le MgCl₂, le tampon de réaction, Taq polymérase et les amorces doivent tous être optimisés pour que l'amplification soit couronnée de succès. Dans une PCR multiplex, de multiples segments de gènes sont amplifiés dans une seule réaction. Par conséquent, des ensembles d'amorces séparés pour chaque séquence de gènes doivent être incorporés dans le mélange réactionnel. Cela rend plus difficile l'optimisation des concentrations de réaction, car des concentrations élevées d'amorces sont nécessaires lors de l'amplification de plusieurs loci différents en même temps (Baums *et al.*, 2004).

Chapitre 2.

L'entérite nécrotique chez le poulet

1. Etiologie

L'EN est une maladie dont le nom vient du fait que la bactérie provoque, dans les stades les plus avancés de l'infection, une nécrose extensive des villosités intestinales. Cette maladie a été découverte pour la première fois par Bennetts en 1930 en Australie, puis décrite par Parish en 1961 en Angleterre (Williams, 2005; Martin *et al.*, 2009), l'agent causal est *C. perfringens* de type A produisant la toxine alpha et parfois le type C produisant la toxine alpha et la toxine beta (Engtrom *et al.*, 2003), l'EN n'occupait pas une place prédominante parmi les maladies d'importance chez la volaille (Williams, 2005), et cela suite à l'utilisation des antibiotiques à faible dose dans l'alimentation des poulets. Ce n'est qu'après 1997, qu'une recrudescence de cette maladie au sein des élevages a été observée, suite au retrait des promoteurs de croissance dans plusieurs pays (Cooper et Songer, 2009). Des experts ont estimé que les couts attribués au traitement et à la prévention de la maladie sont de près de 2.6 milliards de dollars US chaque année surtout sous sa forme sub-clinique qui passe inaperçue pour les éleveurs (Keyburn *et al.*, 2010a), les pertes de production associées à cette forme sont principalement dues à une diminution de la conversion alimentaire ainsi qu'aux retards de croissance provoqués par la destruction de la muqueuse intestinale par *C. perfringens*, qui se traduit par une altération de la fonction digestive, cette forme est rencontrée à différents âges, mais elle se manifeste le plus souvent chez les sujets atteignant trois semaines d'âges (Keyburn *et al.*, 2010a).

2. Epidémiologie

La maladie a été rapportée dans plusieurs pays, incluant Royaume-uni (Parish, 1961), Australie (Nairn et Bamford, 1967), Canada (Helmbold et Bryant, 1971; Long, 1973) et France (Casewell *et al.*, 2003), Les données épidémiologiques sur l'incidence de l'EN sont limitées, bien que beaucoup d'investigations ont révélé que l'EN était une maladie commune dans le monde (Van der Sluis, 2000). Kalender et Ertas (2005) ont pu détecter le *C. perfringens* dans 5% des échantillons intestinaux prélevés sur des poulets de chair âgés de 45 jours provenant de huit troupeaux dans un abattoir en

Turquie, Une enquête menée par Hermans et Morgan (2007) sur 857 fermes au Royaume-Uni a révélé des cas d'EN dans au moins un troupeau en 2006, D'autres investigations menées par Tschirdewahn *et al.* (1991); Miwa *et al.* (1997) et Craven *et al.* (2001) ont rapporté que *C. perfringens* avait été isolé avec une prévalence de 75 à 95%.

La maladie peut se produire plus d'une fois par an dans une ferme. Au Canada, elle apparaît principalement en juillet, août, septembre et octobre (Long, 1973), tandis qu'au Royaume-Uni une fréquence d'apparition d'EN plus élevée en hiver a été enregistrée (Hermans et Morgan, 2007). La Norvège a présenté une fréquence similaire au Royaume-Uni avec une incidence maximale pendant l'hiver et une incidence plus faible pendant la saison plus chaude (Kaldhusdal et Skjerve, 1996; Hermans et Morgan, 2007). Il est généralement reconnu que la maladie n'est pas saisonnière, bien que les divergences d'apparition entre différentes latitudes qui semblent contredire ceci soient encore inexplicables.

3. Source de contamination

C. perfringens est un micro-organisme répandu dans l'environnement des poulets et sa capacité à sporuler lui permet de persister. Il peut se retrouver dans le sol autour des fermes, poussière, la litière, l'alimentation, l'eau, et même dans la flore digestive normale des humains et des animaux (Craven *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2011). Dans une étude au Brésil, il a été retrouvé à raison de 42% et 30% dans des échantillons d'alimentation et d'eau respectivement (Schocken-Iturrino *et al.*, 2009). *C. perfringens* est l'un des premiers colonisateurs de l'intestin des poussins, avec *E.coli*. Des chercheurs ont rapporté même qu'une transmission verticale à partir de la mère est possible, et les poussins pourraient éclore en ayant un tractus digestif déjà colonisé (Shane *et al.*, 1984; Williams, 2005). Le couvoir représente aussi une source de contamination considérable pour les poussins, *C. perfringens* a été isolé à partir de fragments de coquille d'œuf destinés à l'incubation, de duvet des poussins peu après l'éclosion, ainsi que du papier envoyé aux fermes pour y déposer de l'alimentation au sol (Craven *et al.*, 2001; Craven *et al.*, 2003). Plus encore, *C. perfringens* a été isolé dans des abattoirs de volaille, et les mêmes ribotypes ont été détectés dans une même chaîne de production suggérant ainsi une transmission des souches entre les différents milieux de production (Craven *et al.*, 2003). Il a été aussi montré que la bactérie

pouvait être présente dans la viande de poulet en vente au détail, Nowell *et al.* (2010) ont pu l'isoler dans 66% des carcasses échantillonnées. Selon Dhillon *et al.* (2004) les mouches peuvent représenter une source possible de contamination pour les poules pondeuses. Des mouches mortes ont été trouvées dans les chaînes d'alimentation et dans les voies intestinales des oiseaux morts, et l'examen bactériologique a révélé la présence des isolats de *C. perfringens*. Ainsi, les mouches peuvent être des porteurs de *C. perfringens*, ce qui entraîne une contamination des aliments ou une inoculation directe par les oiseaux.

4. Pathogénie

Malgré l'importance de l'EN du point de vue clinique et économique sur la production des volailles, la pathogénie de *C. perfringens* et de sa maladie associée n'est pas encore entièrement comprise (Van Immerseel *et al.*, 2009; Timbermont *et al.*, 2009). Le jéjunum est le site de prédilection de *C. perfringens* (Arbuckle, 1972), bien qu'il soit normalement présent dans le tractus intestinal des poulets sains (Smith, 1965; Van Immerseel *et al.*, 2009). Cependant, l'apparition de la maladie peut impliquer un certain nombre de facteurs prédisposant différents (coccidies, composition de la diète, facteurs immunosuppresseurs). On pense qu'un événement clé dans la pathogénie de l'EN est associé à l'adhésion de *C. perfringens* aux villosités intestinales, car une fois qu'il a été attaché, il commence à proliférer et à produire les toxines qui induisent la nécrose intestinale (Alsheikhly et Truscott, 1977a; Alsheikhly et Truscott, 1977b; Cooper *et al.*, 2009). Selon Timbermont *et al.* (2011) qui ont bien résumé la pathogénie de la maladie. Premièrement, l'infection se traduit par la mort des entérocytes, ce qui entraîne une destruction de l'intégrité cellulaire de la muqueuse intestinale, conduisant ainsi à une fuite du contenu cytoplasmique riche en protéines dans la lumière intestinale, permettant à la bactérie d'avoir un substrat adéquat pour sa croissance. Parmi les principales causes associées à la mort d'entérocytes est la coccidiose, une infection parasitaire due à *Eimeria spp.* La coccidiose intestinale entraîne des dommages aux cellules épithéliales associés à une surproduction de mucus par les cellules à gobelets. Ceci fournit une source de nutriments supplémentaire à *C. perfringens*. Ces deux effets permettent à la bactérie d'obtenir un milieu favorable à sa multiplication (Timbermont *et al.*, 2011). Timbermont *et al.*, 2014 ont démontré que certaines souches virulentes de *C. perfringens* pendant leurs phase de multiplication, inhibent la croissance des autres

souches grâce à la production de bactériocines. Ainsi, l'examen par PFGE ou par MLST des souches isolées des cas d'EN d'un même élevage a révélé peu de variation entre ces derniers (Nauerby *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2006; Chalmers *et al.*, 2008). Ensuite, les souches virulentes pourraient s'attacher à l'épithélium intestinal en s'adhérant à des molécules de la matrice extracellulaire des cellules comme le collagène de type III ou IV ainsi qu'au fibrinogène (Timbermont *et al.*, 2011). Finalement, la sécrétion de toxines létales pour les entérocytes produit des dommages intestinaux qui commencent en portion basolatérale des entérocytes pour ensuite se disséminer à toute la lamina propria (Timbermont *et al.*, 2011). Il en résulte une nécrose intestinale massive.

5. NetB et son rôle dans l'EN

La pathogénie moléculaire de l'EN est mal comprise, bien que certaines données impliquent certaines toxines dans le développement de la maladie. Pendant des années, la toxine α de *C. perfringens* a été considérée comme le principal facteur de virulence de l'EN (Keyburn *et al.*, 2008). Cette hypothèse était basée sur plusieurs points importants, en commençant par le fait que la toxine α a été identifiée dans les excréments d'oiseaux souffrant d'EN. En outre, les souches de *C. perfringens* isolées à partir des cas d'EN ont montré qu'elles produisaient plus de toxines α que les souches d'oiseaux sains (Songer, 1997). Certaines études ont démontré que les souches isolées d'oiseaux sains produisent si peu d'alpha toxine sur les milieux préparés et que leurs typages est difficile même en utilisant plusieurs méthodes traditionnelles de neutralisation des toxines (Niilo, 1980). Les extraits bruts de la toxine α sous forme de filtrat sans cellules provenant de cultures de *C. perfringens* de type A ont été capables d'induire une EN par perfusion intra-duodénale chez des poussins normaux provenant d'œuf SPF (Songer, 1997; Keyburn *et al.*, 2006). Les scientifiques qui ont réalisé ces expériences ont conclu que, parce que la toxine α était la toxine principale produite par ces souches de *C. perfringens*, cette dernière présente dans le filtrat doit être responsable de leurs pathogénicité (Keyburn *et al.*, 2006). En ajoutant de l'importance à ces révélations, l'administration d'anticorps anti-toxine α aux filtrats de culture avant l'inoculation des oiseaux a montré qu'ils les protégeaient contre l'EN (Songer, 1997; Lovland *et al.*, 2004). Cette série de preuves a conduit les chercheurs à conclure que la toxine α est le principal facteur de virulence de l'EN. Cependant, parce que beaucoup de ces expériences étaient basées sur les filtrats bruts de culture bactérienne,

il existe une possibilité qui demeure sans réponse que d'autres toxines étaient impliquées dans l'induction de l'EN. Des preuves conflictuelles ont également été mises en évidence; Par exemple, Gholamiandekhordi *et al.* (2006) n'ont pas pu trouver une relation entre la production in vitro d'alpha toxine et l'incidence de l'EN chez des isolats prélevés sur des oiseaux malades et en bonne santé. D'autres études ont montré plus d'incohérences telles que l'absence de leucostasie dans les tissus infectés, ce qui est une caractéristique normale de l'activité de la toxine alpha, un manque de corrélation entre les niveaux intestinaux de la toxine α et les scores lésionnel, ainsi que l'élaboration d'un Mutant *plc*- nul qui a conservé sa capacité à induire une EN in vivo (Keyburn *et al.*, 2006).

Le manque de preuves impliquant la toxine alpha comme étant la principale toxine capable de causer l'EN a conduit les chercheurs à étudier d'autres facteurs de virulence, selon les plus récentes études, une nouvelle toxine NetB qui est une toxine formant des pores a été découverte comme étant un élément important de la virulence des souches de *C. perfringens* causant la maladie, la toxine a été démontrée dans des souches isolées d'animaux atteints d'EN et est maintenant reconnu comme un nouveau facteur de virulence important chez ces souches (Coursodon *et al.*, 2010). Par contre, NetB ne représente pas la seule toxine responsable de l'induction d'EN, puisque des souches isolées à partir des cas cliniques de la maladie ont été identifiées comme ne possédant pas le gène *netB* (Martin *et al.*, 2009). La toxine a été découverte pour la première fois par Keyburn *et al.* 2006, suite à la création d'un mutant ne produisant pas la toxine α , elle comporte 30% et 38% d'homologie avec l'alpha-hémolysine de *Staphylococcus aureus* et la toxine bêta de *C. perfringens* respectivement. Responsable de la formation de pores d'environ 1.6 à 1.8 nm dans la membrane cellulaire menant à l'efflux de K^+ et à l'influx de Na^+ , de Ca^{2+} et de Cl^- conduisant à la lyse osmotique de la cellule (Keyburn *et al.*, 2010a). Tout récemment, il a été démontré que le gène *netB* était retrouvé sur un îlot de pathogénicité (NELoc-1), à son tour porté sur un gros plasmide, chez des souches virulentes de *C. perfringens*. Cependant, d'autres travaux ont démontré que les souches isolées des cas associés à l'EN ne portaient pas toutes le gène codant pour la toxine NetB, ni le plasmide portant l'îlot de pathogénicité 1 (NELoc-1) (Keyburn *et al.*, 2010b; Lepp *et al.*, 2013). Dans une autre étude, la présence du gène *netB* apparié avec *tpeL*, un gène codant pour la toxine TpeL récemment découverte, semblait augmenter la virulence

de *C. perfringens* sur des poussins de poulets de chair par rapport aux isolats avec seulement *netB*. (Coursodon *et al.*, 2010).

Il existe actuellement des données limitées indiquant l'importance mondiale de la toxine NetB. Une étude menée par Keyburn *et al.* (2010b) a révélé que 70% des isolats prélevés sur de nombreux cas d'EN en Australie, en Belgique, au Danemark et au Canada étaient positifs pour le gène *netB* et ont même exprimé la toxine NetB in vitro. Une étude en Suède a montré que 91% des isolats prélevés sur des cas de maladie étaient positifs pour NetB (Johansson *et al.*, 2010). Cependant, dans une autre étude menée à la Nouvelle-Angleterre, à New York et la Pennsylvanie, seulement 58,3% des isolats associés à l'EN étaient positifs pour NetB (Martin et Smyth, 2009). Cela indique que le NetB n'est pas un facteur de virulence essentiel pour de nombreuses souches, mais suite à l'échantillonnage qui est limité sur une zone géographique, cela nécessite plus de recherches pour déterminer l'importance de la toxine à l'échelle mondiale. Saita *et al.* (2009) n'ont signalé aucun cas de NetB dans 25 souches de *C. perfringens* de type A isolées de dindes malades, ce qui suggère que le NetB n'est pas un facteur de virulence important pour l'EN dans cette espèce.

6. Signes cliniques

Les signes cliniques associés à l'EN sont peu discriminants ce qui rend l'identification de la maladie ardue. Les oiseaux sont généralement atteints par la maladie dans les élevages de poulets de chair entre deux et six semaines d'âge (Opengart, 2008), mais la maladie peut aussi être observée chez des oiseaux âgés de plus de six mois. Des cas ont été rapportés chez des poules pondeuses de 3 à 6 mois élevées au sol, des poules pondeuses de remplacement élevées en cage de 12 à 16 semaines et chez des poules pondeuses en cage en phase de production (Opengart, 2008).

La forme aigue de la maladie se traduit par de l'abattement, la déshydratation des oiseaux, des plumes ébouriffées, une diarrhée liquide et brunâtre, ainsi qu'une diminution de la consommation alimentaire. Ces signes sont généralement de très courte durée et précèdent souvent la mort de l'oiseau (Opengart, 2008; Shojadoost *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2013). Dans la forme suraiguë, aucun signe clinique n'est observé et les oiseaux sont tout simplement retrouvés morts au sol. La mort des oiseaux peut survenir en 1 ou 2 heures et la mortalité totale du troupeau peut atteindre

50% (Timbermont *et al.*, 2011). Le problème majeur lié à l'EN est sa forme sub-clinique qui se caractérise par une mauvaise conversion alimentaire, il en résulte une diminution du gain de poids et/ou une perte de poids chez les poulets de chair, ainsi qu'une possible augmentation des condamnations à l'abattoir, surtout à cause d'une augmentation des cas d'hépatites associés à *C. perfringens* (Lovland et Kaldhusdal, 2001).

7. Lésions macroscopiques

Les changements caractéristiques observés liés à des cas d'EN lors de la nécropsie reposent sur la présence des lésions entériques nécrotiques et hémorragiques de la muqueuse intestinale (Brennan *et al.*, 2001). Dans la forme classique de l'EN, l'intestin présente une odeur nauséabonde avec des parois minces et friables et souvent distendus par du gaz, les lésions peuvent être réparties tout au long de l'intestin, les portions majoritairement atteintes sont le duodénum, jéjunum, iléon et à moindre degré les caeca (Opengart, 2008; Timbermont *et al.*, 2011). Un agglomérat composé de tissus intestinaux nécrosés et de débris cellulaires forme à la surface de la muqueuse une pseudomembrane dont la couleur varie du gris brun au jaune brun nommée membrane diphtérique qui est une lésion caractéristique des cas d'EN de terrain, mais elle n'est pas rapportée dans la littérature lors d'infection expérimentale. Alors que des lésions focales à multifocales de zones nécrotiques de taille variable, localisées à coalescentes, ont été décrites lors d'infection expérimentale (Keyburn *et al.*, 2013a; Keyburn *et al.*, 2013b). Dans la forme sub-clinique, on observe essentiellement une baisse des performances dans les élevages qui peut être associée à une hépatite ou une cholangiohépatite se traduisant par un foie qui devient plus gros, ferme et verdâtre avec apparition de foyers pâles multifocaux disséminés dans le parenchyme hépatique (Lovland et Kaldhusdal, 2001; Van Immerseel *et al.*, 2004).

8. Lésions microscopiques

L'examen microscopique des tissus prélevés à partir de cas de terrain chez des poulets atteints d'EN a révélé une nécrose extensive des villosités intestinales avec une grande quantité de fibrine et de débris cellulaires adhérents à la muqueuse nécrosée (Long *et al.*, 1974; Opengart, 2008; Cooper *et al.*, 2013). Les lésions se développent généralement au premier lieu au niveau de l'apex des villosités qui subissent une

nécrose, ensuite il y aura une progression de cette nécrose de l'apex vers les cryptes intestinales (Opengart, 2008). Dans les cas plus sévères, la dégénérescence cellulaire peut atteindre la sous-muqueuse ou même la *muscularis mucosa* (Cooper *et al.*, 2013). Des bâtonnets à Gram-positif peuvent être observés sur les villosités et dans les débris nécrotiques suite à une forte colonisation par le *C. perfringens*. Dans les lésions aiguës, les hétérophiles sont les principales cellules inflammatoires qui entourent les zones nécrotiques, alors que dans les lésions plus chroniques une infiltration par les mononucléaires est observé (Cooper *et al.*, 2013). Une ligne nette de démarcation se forme entre le tissu nécrosé et le tissu sain qui est due à l'accumulation des cellules mononucléaires à la limite extérieure de ce dernier (Long, 1973; Long *et al.*, 1974). Dans la lumière intestinale, les villosités nécrosées, les cellules épithéliales dégénérées ainsi que les cellules inflammatoires piégées dans la fibrine forme la membrane diphtérique caractéristique de la maladie, qui est observée macroscopiquement lors de la nécropsie (Olkowski *et al.*, 2006)

Lors d'atteinte du foie, une hyperplasie des canaux biliaires s'installe avec une fibrose et infiltration cellulaire. Des foyers multifocaux d'inflammation granulomateuse sont observés dans le foie (Opengart, 2008; Cooper *et al.*, 2013), présence d'exsudat fibrineux associé à des zones de nécrose de coagulation et des bâtonnets à Gram-positif seront aussi observés (Cooper, *et al.*, 2013).

9. Diagnostic

Un diagnostic de l'EN devrait être basé sur plusieurs critères, et il n'y a pas un seul test ou examen qui peut confirmer ce diagnostic (Cooper *et al.*, 2013). Lors de l'examen post-mortem, les lésions de nécrose focales, multifocales ou diffuses affectant l'intestin grêle et parfois le caecum sont très suggestifs de l'EN. Cependant, ces lésions ne sont pas pathognomoniques pour cette maladie, et un diagnostic final ne peut pas être basé sur observation seulement de ces dernières. L'histologie est également utile pour établir un diagnostic présomptif de l'EN, mais comme c'est le cas avec des lésions macroscopiques, il ne peut pas être utilisé pour établir un diagnostic final. Cependant, l'histologie est particulièrement utile pour exclure d'autres conditions telles que la coccidiose (Ficken *et al.*, 1997). L'isolement de *C. perfringens* de type A à partir du tractus intestinal peut également être utile pour établir un diagnostic de l'EN, bien que c'est rare où ce micro-organisme n'est pas

isolé de ce dernier. *C. perfringens* peut être isolé sur gélose TSC et doit être incubé en anaérobiose pendant 24 à 48 heures à 37 °C. Les colonies auront une apparence noire (Gharaibeh *et al.*, 2010). Ce micro-organisme peut également être isolé sur plusieurs autres milieux anaérobiques classiques, tel que le bouillon de Thioglycollate, la gélose au sang et d'autres. Cependant, parce que *C. perfringens* type A est présent dans presque tous les oiseaux sains, son isolement n'est pas diagnostique pour l'EN. En outre, la découverte de toxines autres que la toxine α qui peut produire l'EN, oblige à revoir la question de l'utilisation de la détection de *C. perfringens* type A seule pour le diagnostic de l'EN. Dans des recherches plus récentes, la détection du gène *netB* est importante car la toxine NetB reliée à ce gène peut induire l'EN sans que le gène *cpa* soit présent (Keyburn *et al.*, 2006; Keyburn *et al.*, 2008). Par contre, certaines souches de *C. perfringens* ne possédant pas le gène *netB* ont aussi la capacité d'induire des lésions d'EN (Cooper et Songer, 2010). Donc, la détection du gène *netB* dans les souches de *C. perfringens* isolées de cas d'EN n'est pas un diagnostic complètement fiable.

10. Diagnostic différentiel

La coccidiose est un facteur prédisposant connu pour l'EN et peut se produire avant ou simultanément avec la maladie. Aussi, il doit être différencié de l'EN. Typiquement, la coccidiose chez les poulets entraîne une présence de sang dans le tractus intestinal, ce qui est rarement observé dans les cas d'EN (Cooper *et al.*, 2013). Histologiquement, dans toutes les espèces aviaires, la présence d'oocystes à la pointe des villosités intestinales ou de grands schizontes dans la lamina propria indique la coccidiose, alors que de grands bâtonnets à Gram-positifs dans les lésions indiqueraient une infection clostridienne telle que l'EN ou l'entérite ulcéreuse (Williams, 2005).

L'entérite ulcéreuse est une autre maladie entérique clostridiale qui doit être diagnostiquée de manière différentielle par rapport à l'EN, la maladie est caractérisée par la formation d'ulcères au niveau de l'intestin grêle qui perforent souvent la paroi intestinale et produisent de la péritonite et des adhérences intestinales. L'isolement de *Clostridium colinum* présent dans l'intestin est un diagnostic d'entérite ulcéreuse au lieu de l'EN (Wages, 1997).

L'histomonose doit également être différenciée de l'EN. La maladie se traduit par des lésions hépatiques nécrotiques caractérisées par des centres déprimés et des bords bien définis, ainsi que des lésions au niveau caecales composés de muqueuses nécrosés, avec du sang et d'autres débris. L'observation des microorganismes vivants par microscopie à contraste de phase peut aider à diagnostiquer l'histomonose (McDougald, 2005).

11. Traitement et prophylaxie

11.1. Méthode conventionnelle

11.1.1. Antimicrobiens

Il y a plusieurs années, les antibiotiques ont été utilisés à faible doses dans l'alimentation des volailles pour la stimulation de leur croissance (Moore *et al.*, 1946). Ainsi, ils ont longtemps joué un rôle accessoire dans le contrôle de l'EN (Williams, 2005). Plusieurs classes d'antibiotiques efficaces contre les Gram-positifs ont été utilisées dans le traitement de l'EN. Parmi eux : les céphalosporines, les tétracyclines, le chloramphénicol, les macrolides, les sulfamides, les pénicillines, la vancomycine et le triméthoprim (Harley *et al.*, 2010). Les cas d'EN ont été traités par l'utilisation de la lincomycine, bacitracine, oxytétracycline, pénicilline et tylosine dans l'eau de boisson ou bien par la virginiamycine, avoparcine, nitrovine, lincomycine, bacitracine et la pénicilline dans l'alimentation (Ficken *et al.*, 1997).

La lincomycine à 20 g / tonne de nourriture réduit significativement la mortalité qui est due à l'EN (Truscott et Al-sheikhly, 1977). La virginiamycine à 5 - 40 g / tonne de nourriture est également efficace pour traiter l'EN (George *et al.*, 1982). La bacitracine est utilisée à 100 mg / gallon dans l'eau pour la prévention de l'EN et à 200 - 400 mg/gallon pour son traitement (Prescott *et al.*, 1978). La bacitracine de zinc ajoutée aux aliments réduit la mortalité par l'EN (Wicker *et al.*, 1977), et le disalicylate de méthylène de bacitracine dans les aliments, seuls ou en association avec la narasine, réduisent la mortalité ainsi que la gravité de la maladie chez les survivants. La bacitracine seule était un traitement plus efficace que la narasine seule, mais un effet synergétique a été observé lors de l'association des deux médicaments (Brennan *et al.*, 2003).

La pénicilline dans l'eau à 100 000 UI / L a empêché la mortalité induite expérimentalement par l'EN. L'utilisation de cet antimicrobien à 110 mg/L dans l'eau

a retardé et réduit la mortalité par l'EN, mais n'a pas complètement empêché la maladie (Long et Truscott, 1976). Le phosphate de tylosine à 100 ppm dans l'alimentation était également un traitement efficace, empêchant la mortalité et augmentait le poids corporel (Van Immerseel *et al.*, 2004).

11.1.2. Anticoccidiens ionophores

La coccidiose aviaire a été contrôlée depuis plus de cinquante ans par l'utilisation des anticoccidiens ionophores. Composés d'origine naturelle, issus de la fermentation de quelque espèces de microorganismes présents dans le sol et appartenant soit au genre *Streptomyces*, soit au genre *Actinomadura* (McDougald, 1991). Les ionophores détruisent le parasite en interférant avec le transport de cations monovalents et bivalents comme le sodium (Na^+), le potassium (K^+) et le calcium (Ca^{2+}) (Peek et Landman, 2011). Avec l'utilisation des ionophores, les oiseaux produisent une immunité contre les coccidies car celles-ci peuvent subsister en faible nombre dans l'intestin. Les ionophores possèdent aussi une légère capacité à inhiber la croissance des bactéries à Gram-positifs comme *C. perfringens* (Cooper et songer, 2009). Ils peuvent donc avoir un léger effet sur le contrôle de l'EN en agissant directement sur cette bactérie.

11.2. Méthodes alternatives

11.2.1. Acides organiques

Les acides organiques ont été utilisés pendant des décennies dans les aliments destinés aux animaux, pour protéger les aliments des dommages causés par les microorganismes et les champignons. Ces acides sont ajoutés aux aliments comme agents conservateurs et peuvent également être utilisés pour contrôler la contamination microbienne (Kum *et al.*, 2010). En fait, les acides organiques qui ont une activité antimicrobienne sont soit des acides monocarboxyliques simples tels que les acides formique, acétique, propionique et butyrique, ou sont des acides carboxyliques portant un groupe hydroxyle sur le carbone alpha tel que les acides lactique, malique et tartrique. Certains acides organiques carboxyliques à chaîne courte, tels que les acides sorbiques et fumariques contenant des doubles liaisons, ont également une activité antifongique (Dibner et Buttin, 2002). Plusieurs de ces acides organiques peuvent être produits en petites quantités en raison de l'activité de

fermentation du tractus gastro-intestinal (Dorsa, 1997) où la microflore anaérobie est prédominante (Dixon et Hamilton, 1981).

Les effets des acides organiques sur le poulet ont été bien documentés. Hassan *et al.* (2010) ont proposé que l'inclusion d'acides organiques dans les régimes alimentaires des poulets de chair augmente la croissance et le taux de conversion alimentaire. L'acidification avec différents acides organiques a permis de réduire la toxicité des bactéries pathogènes à travers le contrôle de la colonisation bactérienne de la paroi gastro-intestinale et l'inhibition des dommages induites aux cellules épithéliales (Langhout, 2000). De plus, des études ont rapporté que la supplémentation en acide organique peut améliorer la prolifération cellulaire et la taille des villosités gastro-intestinales (Adil *et al.*, 2010). D'autres activités d'acides organiques ont aussi été mises en évidence telles que l'augmentation des sécrétions pancréatiques, de l'activité de la phytase microbienne, et l'amélioration de l'activité enzymatique digestive (Dibner et Buttin, 2002).

11.2.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés volatils extraits des plantes par un processus de distillation à la vapeur. Ces substances sont reconnues pour l'odeur plaisante de leur essence, pour leur saveur, ou même pour leurs propriétés antiseptiques, ou de préservation, dû à leurs effets antimicrobiens (Amerah *et al.*, 2011), les huiles essentielles ont été utilisées comme des substances alternatives qui assureraient le rôle joué par les antibiotiques, en ce qui concerne le maintien de la santé digestive et des performances de croissance, ils représentent des composés dont l'utilisation n'entraîne pas la présence de résidus et ils sont perçus comme sécuritaires (Mueller *et al.*, 2012). Certains auteurs ont voulu évaluer l'influence de différents produits à base d'huiles essentielles sur les comptes intestinaux de *C. perfringens*, et leur efficacité sur l'amélioration des performances de croissance afin de les utiliser comme alternatives aux promoteurs de croissance sur l'EN. Si *et al.* (2009) ont d'abord vérifié l'effet inhibiteur de 66 huiles essentielles ou de leurs composés sur des cultures de *C. perfringens*. Sur les 66 composés testés, 33 ont montré un pouvoir inhibiteur de 80% et 9 se sont avérés capables d'inhiber 50% de la croissance bactérienne, lorsqu'ajoutés à des concentrations de 500 mg / ml à des cultures de *C. perfringens*. Certains composés sont même parvenus à faire diminuer les comptes

de *C. perfringens* de 2,5-log 10 lorsque mis en contact avec du contenu iléal de poulet. Dans un modèle d'infection expérimentale d'EN, Jerzsele *et al.* 2012 ont rapporté que l'utilisation d'un produit alternatif à base de gingembre et de carvacrol chez des oiseaux infectés avec *C. perfringens* était associée à une augmentation significative du gain de poids, celle-ci pouvant être expliquée par une augmentation de la longueur des villosités et de la profondeur des cryptes intestinales. Les scores lésionnels macroscopiques et histologiques étaient même statistiquement plus faibles dans le groupe recevant des huiles essentielles.

11.2.3. Probiotiques

Les probiotiques peuvent interagir avec l'hôte pour améliorer l'immunité et la morphologie intestinale ou stimuler le métabolisme, réduisant ainsi le risque de contamination par des agents pathogènes opportunistes. Il a été également montré que les bactéries probiotiques produisent des molécules possédant des activités antimicrobiennes, telles que les bactériocines, qui visent des agents pathogènes spécifiques, par inhibition de l'adhérence de ces agents ou l'inhibition de la production de toxines pathogènes (Pan et Yu, 2014). Un grand nombre d'études ont décrit l'isolement de Micro-organismes avec une activité anti-*C. perfringens*. La plupart de ces souches appartenaient aux genres *Bacillus* et *Lactobacillus* (Cao *et al.*, 2012; Jayaraman *et al.*, 2013).

11.2.4. Prébiotique

Les prébiotiques sont des additifs qui stimulent la flore commensale et améliorent les effets bénéfiques des probiotiques au sein de l'hôte, et sont principalement des oligosaccharides indigestes (Patel et Goyal, 2012). De nombreuses molécules ont été décrites, les mannane-oligosaccharides sont les principaux prébiotiques d'origine microbienne. Ce sont des composants de la cellule de levure et constituent le principal ingrédient actif de l'extrait de levure pour la lutte contre les maladies. Ils sont souvent utilisés comme additifs dans l'alimentation de poulets de chair où ils ont montré qu'ils améliorent la santé intestinale et la réponse immunitaire, et inhibent également la colonisation des agents pathogènes en réduisant leur adhérence (Fowler *et al.*, 2015). Abudabos et Yehia (2013) ont testé un additif commercial d'extrait de levure, Saf-Mannan, dans un essai sur terrain pour évaluer sa capacité à protéger les poulets de chair contre l'EN. Ils ont effectué une induction

expérimentale d'EN sur des oiseaux à 16 jours d'âge, après les avoir nourris avec 0,05% de Saf-Mannan Depuis leur éclosion. Les poussins qui ont reçu l'extrait de levure ont montré une meilleure santé intestinale (en fonction de la hauteur des villosités), et ont présenté une amélioration des performances (mesurée par le gain de poids corporel et le taux de conversion alimentaire), ce qui correspond à l'effet bénéfique connu de l'extrait de levure sur les performances de poulets de chair. En plus, les animaux traités avec le Saf-Mannan avaient une réduction de 5-log 10 le nombre de *C. perfringens* dans l'intestin grêle par rapport aux animaux non traités.

11.2.5. Produits d'exclusion compétitive

La notion de produits d'exclusion compétitive était à l'origine décrite par Nurmi et Rantalain en 1973, lors de l'incorporation de bactéries isolées d'un poulet adulte sain dans l'alimentation des jeunes poussins, qui a permis la prévention contre la colonisation par *Salmonella infantis* (Rantala et Nurmi, 1973). Les mécanismes d'action exacts des produits d'exclusion compétitive restent peu clairs. Cependant, il est maintenant bien connu que l'incorporation d'une flore "saine" au début de la vie accélère l'établissement de la flore intestinale et crée une compétition pour les nutriments dans l'intestin, empêchant ainsi la colonisation par des agents pathogènes (Schneitz, 2005). Les premiers rapports sur l'utilisation du contenu caecal des poulets sains pour prévenir l'EN chez les jeunes poussins datent du début des années 80. Barnes *et al.* (1980) ont rapporté qu'une incorporation de contenu caecal provenant de poulets sains à des poussins d'un jour, a permis après 3 jours, une réduction du nombre de *C. perfringens*, allant de 100 à 1000 fois. Depuis lors, plusieurs rapports ont été publiés, signalant une meilleure santé intestinale, une réduction du nombre de *C. perfringens* et une mortalité plus faible, après administration d'un produit d'exclusion compétitive (Hofacre *et al.*, 2003; McReynolds *et al.*, 2009).

11.2.6. Enzymes et formulation de la diète

La modification du régime alimentaire et l'addition d'enzymes ne sont pas capable de fournir une protection totale contre l'EN, mais peuvent réduire le risque due à l'EN en améliorant la digestion. Par exemple, les céréales alimentaires telles que l'orge, le seigle et le blé contiennent des quantités élevées d'arabinoxylanes ou de β -glucanes, de mannanes, de cellulose, de lignine et d'ingrédients qui ne peuvent être digérés par les volailles. Ces constituants non digestibles augmentent la viscosité du

contenu digestif et encouragent le développement de l'EN (Dahiya *et al.*, 2006; McDevitt *et al.*, 2006). En outre, les régimes de volaille à haute teneur en protéines, ou ceux riches en protéines animales comme la farine d'os ou la farine de poisson prédisposent les oiseaux à l'EN (Williams, 2005; Wu *et al.*, 2014). Ainsi, la réduction des hydrates de carbone et des protéines indigestes qui prédisposent les oiseaux à l'EN peut diminuer le risque d'apparition de la maladie dans les fermes avicoles.

Il a été démontré que l'inclusion d'enzymes exogènes dans les régimes à base de blé, d'orge, d'avoine ou de seigle peut réduire considérablement la viscosité du contenu digestif dans l'intestin grêle. Choct *et al.* (1999) ont rapporté que l'addition de xylanase aux régimes alimentaires à base de blé diminue la viscosité et la fermentation du contenu digestif, augmente la digestion des nutriments et accélère leur passage intestinal. Elle réduit aussi la quantité de nutriments disponible pour la microflore, qui, à son tour, peut réduire la population bactérienne dans l'intestin grêle. Sinlae et Choct (2000) ont également démontré que la supplémentation alimentaire en xylanase réduit le nombre de *C. perfringens*. Jackson *et al.* (2003) ont proposé que le bêta-mannanase réduit considérablement les scores lésionnels au niveau intestinal due à l'EN, induite expérimentalement par *C. perfringens* en utilisant *Eimeria spp* comme facteur prédisposant chez les poulets de chair. Cependant, la supplémentation de pentosanase dans un régime à base de blé n'a pas eu un effet bénéfique sur la sensibilité à l'EN chez les poulets de chair. Malgré les résultats contradictoires des études publiées sur l'effet des enzymes alimentaires sur diverses populations bactériennes, y compris *C. perfringens* dans l'intestin de poulet, la supplémentation des enzymes exogènes seules ne peut pas fournir une protection complète contre L'EN (Elwinger et Teglöf, 1991, Riddell et Kong, 1992).

11.2.7. Vaccination contre *C. perfringens*

Un grand nombre d'études ont testé l'efficacité de la vaccination des poulets de chair comme traitement prophylactique contre l'EN induite par *C. perfringens*. Ces dernières ont été largement revues par Mot *et al.* (2014). De nombreuses stratégies ont été utilisées pour vacciner les poulets de chair contre *C. perfringens* à savoir l'utilisation de bactéries vivantes ou de toxines inactivées. Les vaccins peuvent être administrés par pulvérisation des poussins lors de l'éclosion, par l'alimentation ou l'eau de boisson, ou même injecté in ovo (Sharma, 1999; Muir *et al.*, 2000; Mot *et al.*,

2014), ceux utilisant des souches non virulentes de *C. perfringens* se sont avérées inefficaces, Il a été démontré que les souches utilisées dans les vaccins doivent rester légèrement virulente. Thompson *et al.* (2006) ont montré que les souches qui ont subi une mutation au niveau du gène codant pour la toxine α ont conservé leur virulence (mais moins que le type sauvage), et ont pu protéger les poulets contre l'EN, alors qu'une souche non virulente de *C. perfringens* n'avait aucun effet immunitaire.

Plusieurs essais ont montré que les poulets pourraient aussi être protégés contre l'EN par injection de toxines inactives ou active de *C. perfringens* (Kulkarni *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2012), ou bien des protéines antigéniques (Jiang *et al.*, 2009). Mais l'étape la plus importante dans le développement des vaccins contre l'EN chez les oiseaux a eu lieu après la découverte de la toxine NetB (Keyburn *et al.*, 2008), cette dernière a fait l'objet d'une étude approfondie en matière de vaccination, avec des résultats convaincants (Fernandes da Costa *et al.*, 2013; Keyburn *et al.*, 2013a,b)

Chapitre 3.

Les modèles expérimentaux de l'EN

Les chercheurs ont étudié l'EN depuis plusieurs années. Pour ce faire, des essais basés sur des infections expérimentales pour induire la maladie ont été utilisés par des inoculations *per os* de bouillons de cultures de *C. perfringens* à des oiseaux vivants afin d'étudier différents aspects de cette maladie. Ainsi, la pathogénie, les différents facteurs de risques, les moyens de prévention et les traitements reliés à la maladie ont tous été étudiés à partir de ces modèles expérimentaux (Shojadoost *et al.*, 2012). Il n'existe pas de modèle d'infection unique et plusieurs facteurs sont utilisés pour induire l'EN. Pour être valide, un modèle d'infection expérimentale doit faire apparaître des signes cliniques et des lésions caractéristiques de la maladie parmi les groupes d'oiseaux qui ont été infectés, et doit être reproductible.

Parmi les points à prendre en considération pour réussir une reproduction expérimentale de la maladie.

1. Le facteur nutritionnel

1.1. Alimentation à base de polysaccharides non-amylacés

Plusieurs études ont montré que les aliments destinés aux animaux (orge, seigle, blé) contenant une quantité élevée de polysaccharide non-amylacés (PNA), tels que les β -glucanes ou les arabinoxylanes, augmentent la viscosité du contenu digestif et prédisposent les poulets à l'EN (McDevitt *et al.*, 2006; Shojadoost *et al.*, 2012). De plus, les PNA ont la particularité d'interagir avec les glycoprotéines de surface de l'épithélium intestinal augmentant ainsi la production de mucine (Kleesen *et al.*, 2003). Riddell et Kong 1992 ont rapporté dans une étude faite sur l'influence du régime alimentaire sur l'EN, que le taux de mortalité des groupes d'oiseaux recevant une alimentation à base de maïs était de 0-12%, alors que ceux recevant une alimentation riche en orge, seigle ou blé était de 26-35%. De plus, dans une autre étude des chercheurs ont constaté que le nombre de *C. perfringens* dans l'intestin de poulets de chair recevant une alimentation riche en maïs était de 1,2 à 1,5-log 10 UFC/g, plus bas que chez les oiseaux nourris avec 50% de seigle dans leurs aliments

(Craven, 2000). Cela a été expliqué par le fait que, puisque les PNA ne sont pas bien digérés, ils atteignent le tractus intestinal inférieur et modifient son environnement. Il a aussi été montré que la taille des particules constituant l'alimentation pouvait affecter le nombre de *C. perfringens* dans l'intestin, une alimentation présentée aux oiseaux sous forme de farine permet à *C. perfringens* de proliférer plus rapidement et à des nombres plus importants qu'une alimentation sous forme de granulé (Engberg *et al.*, 2002), et peut ainsi prédisposer les oiseaux à l'EN.

1.2. Alimentation riche en protéines animales (farine de poisson)

La présence de grandes quantités de protéines d'origine animale dans le régime alimentaire prédisposent la volaille à l'EN (William, 2005). Une forte concentration de protéines brutes et de certains acides aminés sont liée à une prolifération accrue de *C. perfringens* avec production de la toxine alpha (Titball *et al.*, 1999). La glycine est parmi les acides aminés qui stimulent la croissance et la production de la toxine alpha (Dahiya *et al.*, 2007). Le nombre de *C. perfringens* dans l'intestin a été trouvé plus élevé chez les oiseaux recevant une alimentation riche en protéines d'origine animale (40% de protéines brutes / aliments), par rapport à ceux qui ont reçu une alimentation riche en protéines d'origine végétale (Olkowski *et al.*, 2006). De plus, l'utilisation de grandes quantités de farine de poisson a été associée à la prolifération de *C. perfringens* et à l'apparition d'EN (Kocher, 2003).

Une reproduction expérimentale de l'EN par l'utilisation d'un régime alimentaire riche en protéines pendant une plus longue période de temps semble pouvoir induire la maladie de manière plus sévère, mais les détails du moment n'ont pas été déterminés. La ration à haute teneur en protéines devrait être présente au moment de l'inoculation de *C. perfringens* (Shojadoost *et al.*, 2012).

2. Rôle des coccidies

Les coccidies sont considéré comme un facteur prédisposant majeur dans le développement de l'EN, et cela suite aux dommages causés au niveau de l'épithélium intestinal, ce qui permet à *C. perfringens* de se répliquer rapidement et produire de la toxine (Van Immerseel *et al.*, 2009), probablement parce que la fuite des protéines, qui sont d'origine cytoplasmique dans la lumière intestinale durant l'infection par *Eimeria*, fournit un substrat nutritif riche favorable à la prolifération de *C. perfringens*.

et à la production de toxines (Van der Sluis, 2000). L'administration d'une forte dose de vaccin vivant non atténué contre la coccidiose induisant des lésions intestinales prédisposant à l'EN est un moyen largement utilisé dans les modèles d'EN (Uzal *et al.*, 2015). Des modèles utilisant 10 à 24 fois la dose vaccinale recommandée ont été utilisés en synergie avec l'inoculation de *C. perfringens* (Lee *et al.*, 2011; Shojadoost *et al.*, 2012). De plus, l'administration des coccidies doit être faite au maximum quatre ou cinq jours avant l'infection avec *C. perfringens* (Shojadoost *et al.*, 2012) pour synchroniser les dommages intestinaux induits par les coccidies avec la colonisation par *C. perfringens* (Uzal *et al.*, 2015).

3. Facteurs immunodépresseurs

Les poulets immunodéprimés sont plus susceptibles de développer une EN, c'est pourquoi, certains chercheurs ont utilisé des méthodes pour induire une immunosuppression. Ces méthodes utilisent principalement le vaccin contre la maladie de la bursite infectieuse (McReynolds *et al.*, 2004; Timbermont *et al.*, 2009). Son utilisation avant l'inoculation de *C. perfringens* a entraîné une augmentation significative des lésions d'EN. Cela a été réalisé en administrant une dose habituelle du vaccin de la bursite infectieuse avec une pathogénicité moyenne (classe intermédiaire) (McReynolds *et al.*, 2004), ou 10 fois la dose du vaccin avec une pathogénicité relativement plus élevée (intermédiaire plus) (Nikpiran *et al.*, 2008).

Des conditions stressantes peuvent diminuer l'immunité et prédisposer à EN (McDevit *et al.*, 2006). L'augmentation de la densité des animaux, en tant que mesure «stressante», combinée au vaccin contre la bursite infectieuse, a été utilisée dans un modèle expérimental de l'EN (Nikpiran *et al.*, 2008), mais le facteur stress n'a pas été évalué indépendamment du vaccin.

4. Critères bactériologiques

4.1. Caractéristiques des souches de *C. perfringens* impliquées dans la reproduction de la maladie

En effet, il est tout d'abord important de choisir des souches capables d'induire l'EN. Ainsi, les toxinotypes A et C doivent être sélectionnés car les autres toxinotypes n'induisent pas l'EN chez la volaille. De plus, le choix de souches produisant la toxine NetB permet de reproduire l'EN avec une bonne reproductibilité

(Keyburn *et al.*, 2008; Smyth et Martin, 2010; Uzal *et al.*, 2015). Il a par contre été rapporté que certaines souches ne produisant pas cette toxine sont également aptes à causer des lésions macroscopiques et microscopiques avec la même sévérité que les souches produisant le NetB (Cooper et Songer, 2010). Il est aussi à noter que ce ne sont pas toutes les souches de *C. perfringens* isolée de cas cliniques qui sont capables d'induire l'EN dans les modèles expérimentaux (Lee *et al.*, 2011). Dans un modèle expérimental sur des poulets évaluant la virulence de 10 isolats de *C. perfringens* provenant de plusieurs sources (bétail, poulets sains, humains, porcs et sol), Cooper *et al.* (2010) ont constaté que seul l'isolat positif pour le gène *netB* isolé d'un cas d'EN était capable de provoquer la maladie. La gravité de la maladie peut varier en fonction de la présence d'autres déterminants de la virulence, la toxine accessoire la plus impliquée est le TpeL. Des études ont montré que les souches de *C. perfringens* qui sont positives pour le gène *netB* et le gène *tpeL* provoquent la maladie de manière plus sévère par rapport aux souches négatives pour le gène *tpeL* (Coursodon *et al.*, 2012).

Il est donc essentiel de tester plusieurs souches pour trouver celles permettant de créer des lésions intestinales d'EN dans un modèle *in vivo*. De plus, en raison du risque de perte de plasmides de virulence, les chercheurs essayant de reproduire l'EN devraient constamment maintenir une approche "paranoïaque" pour confirmer tout au long de leur travail (en utilisant la PCR) que la souche expérimentale n'a pas perdu le gène *netB* (Shojadoost *et al.*, 2012).

4.2. Préparation de la culture de *C. perfringens*

4.2.1. Type de milieu de culture

Plusieurs différents milieux de culture anaérobique et différentes périodes d'incubation ont été utilisés pour reproduire l'EN. Le Bouillon Thioglycolate (avec dextrose) est le milieu de culture le plus couramment utilisé pour la reproduction expérimentale de la maladie (McReynolds *et al.*, 2004; Olkwski *et al.*, 2006). L'ajout de peptone et d'amidon à ce milieu augmente le niveau de production de la toxine alpha (Al-sheikhly et truscott, 1977b), mais comme mentionné précédemment c'est plutôt le NetB qui est le plus important que la toxine alpha. D'autres ont utilisé le milieu viande cuite ou le bouillon infusion cœur-cerveau (Dahiya *et al.*, 2007), mais le milieu viande cuite coûte cher et le bouillon infusion cœur-cerveau n'a pas d'agents réducteurs, cela nécessite son incubation en anaérobiose.

4.2.2. Temps d'incubation

Les cultures plus jeune de 15 h sur bouillon Thyoglycolate produisent la maladie de manière plus sévère que celles de 24 h (Thomson *et al.*, 2005), Probablement en raison de la production accrue de toxines après 15h d'incubation. Par exemple, une culture de 15h a augmenté les scores lésionnels de plus de 50% par rapport à une culture de 24 h (Thompson *et al.*, 2005). Il est également probable que des cultures plus anciennes, en phase stationnaire produisent des protéases qui dégradent le NetB et d'autres toxines. Cependant, pour les chercheurs qui doivent inoculer les oiseaux deux fois par jour avec la culture de *C. perfringens*, il peut être difficile de préparer une culture de 15 h pour l'inoculation de l'après-midi car ils doivent commencer l'incubation sur bouillon Thyoglycolate de leur souche à minuit. Pour ceux qui veulent produire une maladie moins sévère, l'inoculation doit être effectué l'après-midi avec une culture de 24 h (Shojadoost *et al.*, 2012).

4.2.3. Quantité de bactéries

La quantité de *C. perfringens* utilisée pour l'inoculation est importante pour réussir une reproduction expérimentale de la maladie. La culture à inoculer doit contenir de 10^7 à 10^9 UFC / ml (McReynolds *et al.*, 2004; Dahyia *et al.*, 2007). Une culture sur bouillon Thyoglycolate incubée à 37 ° C pendant 15 heures, préparée à partir d'une inoculation par une culture de *C. perfringens* faite sur le milieu viande cuite à raison de 3% (v / v) contiendra plus de 10^8 UFC/ml (Shojadoost *et al.*, 2012).

Chapitre 4.

Probiotiques

1. Généralités

La notion de probiotique est apparue au début du XX^{ème} siècle suite aux travaux d'Elie Metchnikoff (professeur à l'institut Pasteur de Paris, lauréat du Prix Nobel de médecine en 1908), Qui a suggéré que la bonne santé et la longévité des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés riche en bactéries surtout *Lactobacillus*, qui joue un rôle important dans la régulation de la microflore intestinale en diminuant les activités toxiques microbiennes responsable de désordres intestinaux (Metchnikoff, 1907). Le terme probiotique (du grec pro «pour» et biotikos « en faveur de la vie ») introduit pour la toute première fois en 1965 par Daniel M. lilly et Rosalie H. Stilwel pour décrire les facteurs de croissance produits par des micro-organismes (Lilly et Stillwell, 1965). En 1991, Fuller a proposé une nouvelle définition au probiotique comme étant un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte positivement la santé de l'animal en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (Fuller, 1991). De nombreux auteurs proposent par la suite leurs propres définitions. En 2001, le groupe de travail mixte formé par l'organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation et l'organisation Mondiale pour la Santé (Rapport FAO/WHO, 2001) qualifie les probiotiques comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice sur la santé de l'hôte en améliorant les propriétés de sa flore intestinale ». (World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2001).

Au cours des années 1960 et 1970, les probiotiques ont été très peu impliqués lorsqu'ils ont été redécouverts pour la nutrition des mammifères principalement humains et animaux. Les premiers produits probiotiques efficaces pour la nutrition animale qui ont satisfait aux exigences des additifs alimentaires n'ont pas émergé sur le marché européen jusqu'au milieu des années 1980 (Patterson et Burkholder, 2003). Au cours d'un siècle, les Européens de l'Est et les Asiatiques ont utilisé des probiotiques contenant invariablement des bactéries lactiques et des Bifidobactéries comme remède naturel pour prévenir et traiter les infections des voies urinaires, intestinales et cutanées chez les humains et les animaux comme yaourt et boissons.

Les résultats de nombreuses études in vitro et in vivo dans des essais cliniques effectués sur des animaux ont prouvé le potentiel de ces probiotiques à prévenir de nombreuses maladies ainsi que les perturbations du microbiote intestinal qui augmentent la susceptibilité à l'infection (Rolfe, 2000).

2. Utilisation des probiotiques en aviculture

Dans les pratiques modernes de production des volailles, il existe de nombreux facteurs qui peuvent accroître le stress (changements ou déséquilibres alimentaires, transport, traitements et densités élevées) (Pinchasov et Noy, 1993), ce qui affecte la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries pathogènes en raison de l'affaiblissement du système immunitaire, menaçant la santé des oiseaux et la sécurité alimentaire. *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* et *C. perfringens* sont les principales bactéries présentes comme cause d'infection des poulets de chair et des poules reproductrices augmentant ainsi le risque de contamination à travers la chaîne alimentaire, ce qui entraîne un état néfaste à la fois pour la volaille et l'homme (Humphry, 2006).

Dans la production avicole, l'application des probiotiques est strictement associée à la notion d'exclusion compétitive. La capacité des souches probiotiques à contrôler la croissance des agents pathogènes est considérée comme importante dans la prévention de la maladie. Les cultures bactériennes lactiques commerciales ont été largement utilisées pour leur capacité à réduire l'infection par *Salmonella* dans la production de poulet et de dinde dans de nombreux pays (Higgins *et al.*, 2010). Dans une étude effectuée sur 296 souches de bactéries lactiques prélevées à partir de l'intestin de 50 poussins, 77 des souches ont réussi à diminuer la croissance de *Salmonella enteritidis* et *E. coli* (Garriga *et al.*, 1998). En outre, les cultures probiotiques ont modifié la composition microbienne et les activités enzymatiques du microbiote caecal, engendrant un effet probiotique significatif (Gaggia *et al.*, 2010).

Outre le contrôle des agents pathogènes alimentaires dans l'intestin de volaille, certaines cultures probiotiques, principalement *Lactobacillus spp.*, peuvent également augmenter les performances de production; Chez les éleveurs de volailles, les objectifs (tels que l'augmentation du taux de croissance, l'amélioration de la conversion alimentaire et la qualité de la viande) sont sans aucun doute d'une importance primordiale. Dans une étude sur les dindes et les poulets, les chercheurs

ont permis de constater qu'une bonne administration d'un mélange de probiotiques augmente les performances, réduit les coûts de production ainsi que les dépôts de graisse abdominale (Torres-Rodriguez *et al.*, 2007). Timmerman *et al.* (2006) ont rapporté que les principaux facteurs qui influent sur l'efficacité des préparations probiotiques dépendent de la manière et du moment de l'administration. Leur inclusion dans l'alimentation des animaux a entraîné une augmentation plus élevée du gain quotidien moyen par rapport à l'eau de boisson. En outre, la supplémentation des probiotiques au début de la vie de l'hôte est d'une grande importance pour ce dernier, car les bactéries probiotiques peuvent moduler l'expression des gènes de l'épithélium intestinal pour créer un habitat favorable pour eux-mêmes.

D'autres études ont été menées sur l'effet des probiotiques sur la production des oeufs. Davis et Anderson (2002) ont constaté que l'utilisation d'une culture mixte de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium thermophilus* et *Enterococcus faecium* peut améliorer la taille des œufs et réduire le coût des aliments chez les poules pondeuses. De plus, *Bifidobacterium thermophilus* et *Enterococcus faecium* ont amélioré la production et la qualité des œufs (Kurtoglu *et al.*, 2004). Une alimentation prolongée avec des probiotiques basés sur *Enterococcus faecium* a augmenté l'intensité de la ponte et l'efficacité de la conversion alimentaire (Panda *et al.*, 2008)

3. Principaux micro-organismes utilisés comme probiotiques chez les volailles

Généralement, les souches bactériennes non pathogènes vivantes appartenant au genre *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* ou *Enterococcus* et les levures de type *Saccharomyces* sont utilisées chez les volailles. Les souches bactériennes productrices d'acide lactique, qui ont la spécificité d'adhérer à l'épithélium intestinal, et *Aspergillus oryzae*, qui confère un impact bénéfique sur les performances de la volaille sont fréquemment utilisés dans cette industrie. Les espèces *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été utilisées plus chez les humains. Étant donné que les probiotiques peuvent également inclure des champignons et des levures, en plus des bactéries, l'utilisation du terme DFM a été suggérée (Dhama *et al.*, 2011). Les probiotiques les plus couramment utilisés contiennent un ou un mélange de microbes inoffensifs. Les microbes généralement utilisés pour développer les promoteurs de croissance probiotiques sont *Lactobacillus acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. bulgaricus*,

L. casei, *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. animalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus cristatus*, *S. thermophilus*; *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Escherichia spp.*, *Lactococcus spp.*, *Torulopsis spp.*, *Aspergillus oryzae* et *spiruline hawaïenne* (algues bleu-vert) (Patterson et Burkholder, 2003; Czerucka *et al.*, 2007; Dhama et Singh, 2010; Hajati et Rezaei, 2010). Les probiotiques les plus fréquemment utilisés dans l'industrie des volailles sont les probiotiques à base de *Lactobacillus* et levure, suite à leur résistance aux températures de granulation et au stockage dans différentes conditions environnementales.

3.1. Caractéristiques de *Pediococcus acidilactici*

Les *Pediococcus* sont des bactéries lactiques non sporulées à Gram positif. Les souches probiotiques de cette espèce bactérienne sont principalement utilisées en production aviaire. Les *Pediococcus spp.* sont bien connus pour leur capacité à survivre dans des conditions très acides et en présence de forte concentration en sels biliaires (Erkkilä et Petäjä, 2000). La plupart des souches de *Pediococcus acidilactici* (*P. acidilactici*) produisent une bactériocine, nommée pédiocine PA-1 (Chikindas *et al.*, 1993), qui agit sur plusieurs types de bactéries lactiques et sur certains pathogènes comme *C. perfringens* (Allaart *et al.*, 2013). Une autre caractéristique intéressante est la forte production d'acide lactique. La grande concentration d'acide lactique produite par ces bactéries diminuerait le pH de la lumière intestinale ce qui aurait pour conséquence de venir moduler le microbiote intestinal, se traduisant ainsi par des effets positifs sur l'équilibre et le rôle de la flore intestinale (Jin *et al.*, 2000).

P. acidilactici renforce l'écosystème microbien des volailles, contribue à la défense immunitaire et protège les poulets contre les conséquences de stress tels que la vaccination, les changements de températures, et améliore même la conversion alimentaire, le gain de poids et l'indice de consommation (Vittorio *et al.*, 2005).

3.2. Caractéristiques de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Sacharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) est utilisée depuis longtemps dans la panification et la fabrication de boissons alcoolisées, et plus récemment pour la production de bioéthanol ou biocarburant. Mais elle est aussi utilisée comme régulateur de la biocénose intestinale chez l'homme et comme additif alimentaire pour l'amélioration des performances zootechniques des animaux d'élevage.

S. cerevisiae est une cellule eucaryote définie comme un champignon unicellulaire appartenant à la classe des ascomycètes. La levure se reproduit de manière asexuée par bourgeonnement. En conditions défavorables, elle forme des spores haploïdes qui peuvent fusionner pour donner des colonies de spores diploïdes. Elle se développe en milieu anaérobie et aérobie mais nécessite une source de carbone, d'azote, de vitamines et des sels minéraux. La croissance de *S. cerevisiae* se fait grâce à une réaction de fermentation en milieu anaérobie, et par la voie respiratoire en milieu aérobie. La respiration est plus efficace pour la production de l'énergie que la fermentation. Les produits de la fermentation sont l'éthanol et le dioxyde de carbone.

La température optimale de croissance se situe entre 20 et 25 °C. Quant au pH optimum, divers intervalles de croissance optimale sont proposés. Rose (1987) repris par Marden (2007) donne un pH optimum compris entre 4,5 et 5. Pour Rampal (1996) le pH optimum de croissance des levures se situe entre 4,5 et 6,4. Cependant ces différences pourraient être dues à la différence entre les souches. Du point de vue chimique, une cellule de levure est composée d'environ 75 % d'eau et 25 % de matières sèches et constitue un aliment presque complet.

Les levures vivantes sont divisés en 2 groupes, les souches pures sans milieu de culture et les souches associés à leur milieu de culture (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997). Les souches pures sont revivifiables et respectent un taux élevé de cellules vivantes exprimé en UFC/g. Elles sont soumises à des conditions de fabrication spéciales et sont notamment représentés par la souche NCYC Sc 47, commercialisée par la société Lesaffre Feed Additives sous la marque déposée de BIOSAF® et la souche CNCM I-1077 commercialisée par la société Lallemand sous le nom de LEVUCCELL®. Contrairement aux souches pures, d'autres souches (ex : CBS 493.94,

commercialisée par la société Alltech sous le nom de YEA-SACC[®]) sont cultivées et séchées avec leur milieu de croissance, dans le but de maintenir leur capacité fermentaire (Lyons *et al.*, 1993). Ce dernier produit conserve des métabolites issus de sa production et permet ainsi de réduire de façon considérable le coût de production.

La levure probiotique (*S. cerevisiae*) disparaît rapidement du tube digestif soit par excrétion ou par digestion. Pour assurer donc la présence permanente de la levure dans le tube digestif, elle devra être administrée régulièrement et doit être résistante à la digestion.

4. Mode d'action des probiotiques

La diversité des souches de probiotiques ainsi que le nombre considérable de situations cliniques dans lesquelles leur efficacité a été montrée suggère qu'il existe non pas un mais plusieurs mécanismes d'actions impliqués. Ces derniers sont encore difficiles à expliquer et ont fait le sujet de nombreuses études notamment au niveau intestinal. Les probiotiques agissent sur l'écosystème intestinal en stimulant les mécanismes immunitaires muqueux et en stimulant les mécanismes non immunitaires par opposition et compétition avec les micro-organismes pathogènes (Pageot et Primault, 2016).

4.1. Effets immunologiques

Les probiotiques présentent des effets immunologiques du fait de leur capacité à activer des macrophages locaux afin d'amplifier la présentation des antigènes aux lymphocytes B et d'augmenter le taux d'immunoglobulines sécrétoires A (IgA). Ils sont capables de diminuer la réponse des anticorps face aux antigènes présents dans l'alimentation par augmentation de la concentration de TGF- β . Ils ont également une action anti-inflammatoire par stimulation de la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'InterLeukine-10 (Steidler *et al.*, 2000; Rautava *et al.*, 2002; Amrouche, 2005).

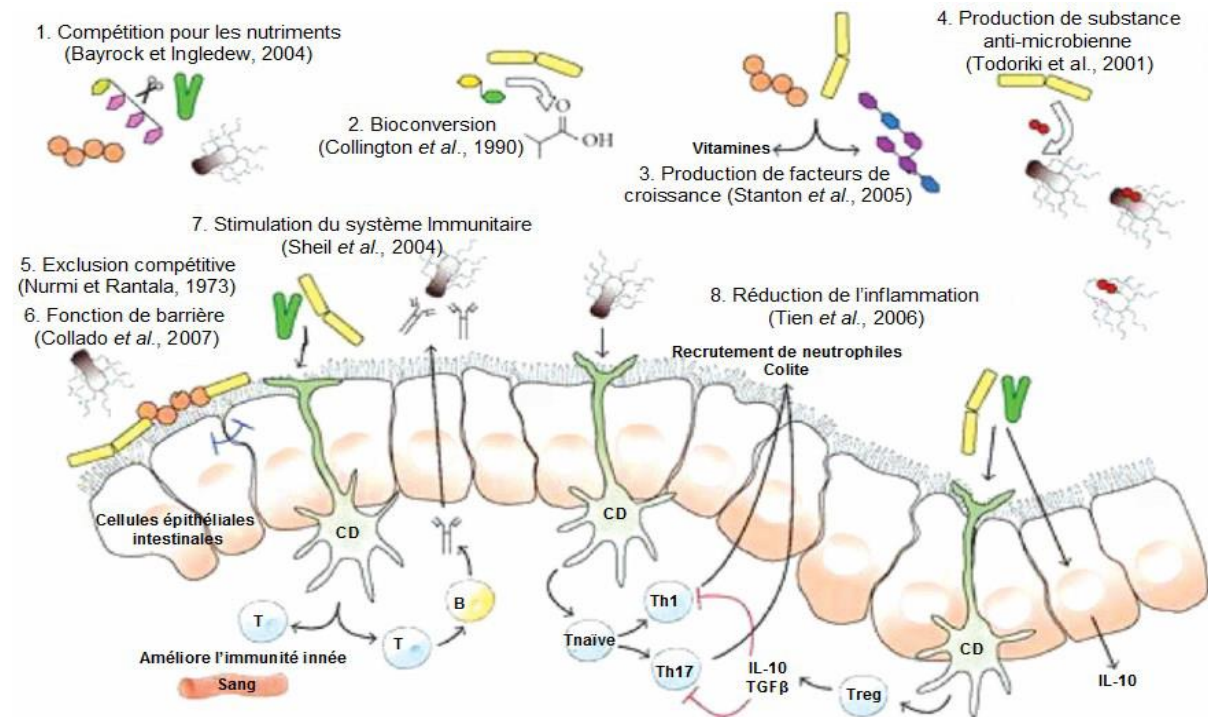


Figure 1. Schéma illustrant les mécanismes potentiels et connus par lesquels les bactéries probiotiques influencent le microbiote et la santé intestinale en général. Correspondance des abréviations : T, lymphocyte T; B, lymphocyte B; CD, cellule dendritique. Adapté de O'Toole et Cooney (2008); Wealleans et Litten-Brown (2010).

4.2. Effets non immunologiques

Les probiotiques ont également une action intestinale non immunologique puisqu'ils sont capables d'améliorer la digestion de certains sucres comme le lactose en apportant des quantités supplémentaires d'enzymes digestives comme les bêta-galactosidases qui hydrolysent le lactose (Marteau *et al.*, 1990).

Ils inhibent également les pathogènes intestinaux, et ce grâce à de nombreux mécanismes :

- En entrant en compétition avec les pathogènes intestinaux au niveau de leur adhésion aux cellules de l'intestin.
- En ayant une consommation des mêmes nutriments que ceux utilisés par ces pathogènes.
- En produisant des bactériocines
- En modifiant les toxines dérivées de ces pathogènes.

- En modifiant le pH local créant ainsi un environnement défavorable aux entéropathogènes.

Les probiotiques permettent d'améliorer la fonction de la barrière intestinale en stimulant la production de mucus par l'épithélium intestinal, ils permettent aussi l'élimination des radicaux superoxydes, ou radicaux libres, dont les effets nocifs ont depuis longtemps été démontrés (Gagon, 2007; Guarner *et al.*, 2011).

MATERIELS ET METHODES

Expérimentation 1 : Détection et caractérisation de *C. perfringens* isolé à partir de poulet de chair présentant des signes d'EN.

L'objectif de cette étude est de détecter la présence de *C. perfringens* agent causal de l'EN dans différents élevages de poulets de chair situés au niveau de la région de Tiaret et de caractériser les souches isolées grâce à l'utilisation de la technique PCR pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB*.

1. Collecte des échantillons :

Au total, 180 échantillons de contenu intestinal ont été prélevés de façon aseptique chez des poulets de chair âgés de 2 à 8 semaines, présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par l'EN et provenant de 70 élevages (2 à 3 prélèvements par élevage d'un effectif moyen de 2500 poulets de chair), localisés à différentes régions au niveau de la wilaya de Tiaret. Les prélèvements ont été effectués sur une période de 12 mois (août 2015 – juillet 2016). Tous les échantillons ont été rapidement transférés dans une glacière au laboratoire « Hygiène et Pathologie Animale » de l'université de Tiaret pour l'examen bactériologique.

2. Examen bactériologique :

2.1. Isolement du *C. perfringens* :

Les contenus intestinaux ont été ensemencés dans des tubes contenant du milieu viande cuite (Oxoid, UK) et incubés en anaérobiose à 37 °C pendant 24 heures pour enrichissement (**Figure 2**). Par la suite, la culture a été ensemencée sur gélose TSC (Oxoid, UK) et incubée en anaérobiose à 37 °C pendant 24 - 48 heures pour isolement du *C. perfringens* (Harmon, 1984). Les colonies noires typiques, supposées être *C. perfringens* ont été repiquées et ensemencées sur la gélose au sang frais (gélose nutritive + 5% de sang de mouton) (Biokar, France) et la gélose au jaune d'œuf (gélose nutritive + émulsion de jaune d'œuf) (Biokar, France) et incubée en anaérobiose à 37 °C pendant 24 - 48 heures (Cruickshank *et al.*, 1975). Les colonies plates, irrégulières et présentant une double hémolyse

(hémolyse complète au contact de la colonie et un halo trouble de l'hémolyse incomplète), ont été repiquées et inoculées dans du bouillon au Thioglycolate (Oxoid, UK), puis conservées à 4 °C pour l'identification.



A: La jarre d'anaérobiose contenant les milieux d'enrichissement viande cuite.
B: Sachet utilisé pour l'obtention d'une atmosphère anaérobique.

Figure 2. Matériels utilisés pour générer une atmosphère anaérobique.

2.2. Identification du *C. perfringens* :

Les colonies suspectées d'être *C. perfringens* ont été identifiées par les caractères morphologiques et biochimiques (**Tableau 3**) tel recommandés par Koneman *et al.* (1992) et Macfaddin (2000).

Tableau 3. Identification biochimique de *C. perfringens* (Koneman *et al.*, 1992; Macfaddin, 2000).

Tests	Résultats
Catalase	-
Oxydase	-
Glucose	+
Sucrose	+
Lactose	+
Maltose	+
Indole	-
Urease	-
Liquéfaction de la gélatine	+
Activité de lécithinase	+

3. Détermination des souches toxigènes de *C. perfringens* :

3.1. Test de létalité sur souris :

Après une incubation en anaérobiose des souches isolées de *C. perfringens* sur milieu viande cuite pendant 24 h à 37 °C, les cultures ont été centrifugées à 3 000 rpm pendant 15 min et les surnageants des cultures clairs sans présence de cellules ont été récupérés. Un volume de 0,3 ml de chaque surnageant a été inoculé en intraveineuse dans la veine de la queue de chaque souris (25 à 40 g), ensuite les souris injectées ont été observées pendant une période de trois jours pour la détection de symptômes nerveux ou la mort (Mariano *et al.*, 2007). Une souris a été injectée avec une culture de bouillon sans bactéries comme témoin.

3.2. Test de la réaction de Nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique :

Ce test a été effectué selon la méthode de Smith et Holdeman (1968). Il a été réalisé en étalant le sérum antitoxine de *C. perfringens* type A (National Institute for Biological and Standard Control, UK) sur la moitié d'une boîte de pétri contenant la gélose jaune d'œuf, ensuite cette dernière a été laissée afin de sécher dans l'incubateur pendant une demi-heure. Les cultures ont ensuite été ensemencées sous forme de stries à travers la boîte de pétri, en commençant par la partie qui ne contient pas l'antitoxine et se terminant sur le côté contenant l'antitoxine. Les cultures ont été incubées en anaérobiose pendant 24 h à 37 °C.

Toutes les souches toxigènes isolées ont été stockées dans du milieu Thioglycolate avec 30% de glycérol à -20 °C pour le génotypage des toxines.

4. Génotypage moléculaire des souches toxigènes de *C. perfringens* :

4.1. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait des souches toxigènes de *C. perfringens* en utilisant le kit de purification d'ADN (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, USA) comme recommandé par les instructions du fabricant.

- Procédure :

1. Transférer à la pipette 20 µl de Protéase QIAGEN (QP) dans un tube de lyse (LT).
2. Ajouter 200 µl d'échantillon dans le tube de lyse (LT).

3. Ajouter 200 µl de tampon de lyse (AL) dans le tube de lyse (LT), fermer le capuchon et mélanger au moyen du vortex pendant 15 s.

4. Incuber pendant 10 min ($\pm$ 1 min) à 56 °C ($\pm$ 1 °C).

5. Centrifuger pendant 5 s ou plus le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon.

6. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) dans le tube de lyse (LT), fermer le capuchon et bien mélanger pendant 15 s ou plus au moyen du vortex.

7. Centrifuger pendant 5 s ou plus le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon.

8. Déposer avec précaution la totalité du lysat de l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

9. Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à environ 8000 rpm pendant 1 min. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

10. Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) sans mouiller le bord de la colonne. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

11. Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à environ 8000 rpm pendant 1 min. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

12. Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) sans mouiller le bord de la colonne. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

13. Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à vitesse maximale (environ 14 000 rpm) pendant 1 min. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

14. Centrifuger pendant 3 min à vitesse maximale pour sécher la membrane complètement. L'absence de centrifugation de séchage peut entraîner une inhibition de l'analyse en aval.

15. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) et mettre le tube de lavage (WT) contenant le filtrat au rebut. Ouvrir le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et déposer au centre de la membrane 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE). Fermer le capuchon et incubé à température ambiante (15 à 25°C) pendant 1 min. Centrifuger pendant 1 min à environ 8 000 rpm afin d'éluer l'ADN.

4.2. La PCR multiplex pour la détection des toxines alpha, beta, epsilon et iota

Les amorces oligonucleotidiques spécifiques utilisées pour la détection des toxines alpha (α), beta (β), epsilon (ε) et iota (i) (Yoo *et al.*, 1996) sont illustrées dans le **Tableau 4**. La réaction de PCR a été réalisée dans un cycleur thermique (TRIO thermal cycler, Biometric, Germany) sur un volume de réaction total de 50 µl contenant : 8 µl d'extrait d'ADN, 25 µl EmeraldAmp GT PCR master mix (TAKARA, USA, **Annexe 1**), 2 µl de chaque paire d'amorces spécifiques pour les toxines alpha, beta, epsilon et iota (20 pmol µl⁻¹), 9 µl d'eau stérile redistillée. L'amplification pour la détection des toxines des gènes toxiques a été obtenue par une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min suivie par 35 cycles. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 94 °C pendant 30 s, une étape d'hybridation à 55 °C pendant 45 s, et une étape d'élongation à 72 °C pendant 45 s et pour finir une étape d'élongation de 10 min à 72 °C.

4.3. La PCR uniplex pour la détection de la toxine NetB

Les amorces oligonucleotidiques spécifiques utilisées pour la détection de la toxine NetB (Keyburn *et al.*, 2008) sont illustrées dans le **Tableau 4**. La PCR a été réalisée sur un volume de réaction totale de 25 µl contenant : 6 µl d'extrait d'ADN, 12,5 µl EmeraldAmp GT PCR master mix (TAKARA, USA), 2 µl de la paire d'amorces spécifiques pour la toxine NetB (20 pmol µl⁻¹), et la réaction a été complétée par 4,5 µl d'eau stérile redistillée. L'amplification pour la détection du gène toxique de la toxine a été obtenue par 35 cycles suivant une dénaturation initiale de 5 min à 94 °C. Chaque cycle comprend une dénaturation à 94 °C pendant 30 s, hybridation à 58 °C pendant 45 s, élongation à 72 °C pendant 45 s et pour finir une élongation de 10 min à 72 C°.

Tableau 4. Les séquences des amorces oligonucleotidiques utilisées dans cette étude.

Gènes	Amorces	Séquences	Taille du produit (pb)
<i>Cpa</i>	F	GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG	402
(α toxin)	R	CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	
<i>Cpb</i>	F	ACTATACAGACAGATCATTCAACC	236
(β toxin)	R	TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC	
<i>Etx</i>	F	ACTGCAACTACTACTCATACTGTG	541
(ϵ toxin)	R	CTGGTGCCTTAATAGAAAGACTCC	
<i>iA</i>	F	GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC	317
(ι toxin)	R	GGTATATCCTCCACGCATATAGTC	
<i>netB</i>	F	GCTGGTGCTGGAATAAATGC	560
(NetB toxin)	R	TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	

Par la suite, 30 μ l du produit d'amplification pour les gènes (α , β , ϵ et ι) et 20 μ l de produit d'amplification pour le gène *netB* ont été soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% suivi d'une coloration au bromure d'éthidium. Des fragments d'ADN standard (marqueur de poids moléculaire d'ADN « Gel Pilot100-bp; QIAGEN, USA » contenant 6 bandes d'une taille de 100-600 pb) ont été utilisés comme marqueurs de poids moléculaires pour indiquer la taille des produits d'amplification. Les bandes amplifiées ont été visualisées et photographiées par un système de documentation sur gel (Alpha Innotech, Allemagne), et les données ont été analysées par le biais d'un logiciel informatiques (Automatic Image Capture Software, ProteinSimple formerly Cell Biosciences, USA).

Les échantillons d'ADN positifs pour alpha, beta, epsilon, iota et la toxine NetB ont été obtenus par le laboratoire de référence pour le contrôle vétérinaire de la qualité sur la production avicole (Animal Health Research Institute of Cairo, Egypt). L'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif.

Expérimentation 2: Evaluation *in vivo* de l'effet de *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae* sur l'EN.

L'objectif de cet essai est d'étudier l'intérêt de l'utilisation des probiotiques, *Pediococcus acidilactici* et *Saccharomyces cerevisiae*, comme moyens de prévention contre l'EN dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* chez les poulets de chair soumis à un facteur prédisposant (coccidies). Plus précisément, l'impact de la supplémentation alimentaire en ces deux probiotiques a été évalué sur les performances zootechniques, les paramètres cliniques et lésionnels ainsi que la morphométrie des intestins et de la bourse de Fabricius.

1. Lieu, durée et période de l'étude

Notre essai a été mené dans l'animalerie du laboratoire d'hygiène et pathologie animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Tiaret. Il s'est déroulé sur une période de 29 jours : soit du 01 avril 2017 au 29 avril 2017.

2. Animaux

180 poussins d'un jour (sexe mélangés) de souche Cobb500, provenant du même couvoir ont été pesés, triés et identifiés. Par la suite, 150 sujets ont été sélectionnés sur la base du poids (en excluant les sujets trop chétifs ou trop lourds) et répartis en cinq groupes (n=30) de poids moyen homogène ($41,09 \pm 0,35$ g). Chaque groupe est alors divisé de manière aléatoire en 6 lots de 5 sujets, puis chaque lot est placé dans une cage : soit 5 poulets par cage et 6 cages par groupe.

Au cours des premières 48 heures, les sujets morts sont pesés et remplacés par des sujets de même poids.

3. Traitements

La distribution des groupes pour cette expérimentation est présentée dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Distribution des groupes expérimentaux

Groupes	Traitement	Vaccin anticoccidien HIPRACOX [®] (10 fois la dose)	<i>C. perfringens</i> Type A (10 ⁸ UFC/ml)	<i>P. acidilactici</i> 1x10 ⁹ UFC/kg d'aliment	<i>S. cerevisiae</i> 1x10 ⁹ UFC/kg d'aliment
T	Témoin négatif	Non	Non	Non	Non
Cp	Témoin inoculé / <i>C.perfringens</i>	Non	J18, J19 & J20	Non	Non
CpC	Témoin Inoculé / <i>C.perfringens</i> + Coccidies.	A J15	J18, J19 & J20	Non	Non
CpCB	Groupe Inoculé / <i>C.perfringens</i> + Coccidies. + Supplémenté en BACTOCELL [®]	A J15	J18, J19 & J20	De J0 à J28	Non
CpCL	Groupe Inoculé / <i>C.perfringens</i> + Coccidies. + Supplémenté en LEVUCCELL [®] SB	A J15	J18, J19 & J20	Non	De J0 à J28

4. Déroulement de l'essai

A la mise en place, les poussins d'un jour ont été pesés, triés et répartis en 05 groupes de poids moyen homogène. Après identification, ils ont été élevés dans des cages et ont reçu, ad libitum, un aliment standard sans additifs (Groupes T, Cp et CpC) ou supplémenté en probiotiques, à base de *Pediococcus acidilactici* (Groupe CpCB; BACTOCELL[®] à la dose de 1x10⁹ UFC/kg d'aliment) ou de *Saccharomyces cerevisiae* (Groupe CpCL; LEVUCCELL[®]SB à la dose de 1x10⁹ UFC/kg d'aliment)

jusqu'à la fin de l'expérience. Les doses de probiotiques utilisées sont celles recommandées par le fabriquant.

A l'âge de 15 jours, les groupes CpC, CpCB et CpCL ont reçu le vaccin anticoccidien HIPRACOX[®] (HIPRA, S. A., Espagne, **Annexe 4**) vaccin vivant contenant dans une dose les nombres suivants d'oocystes sporulés, dérivés de cinq lignées précoces atténuées de coccidies : *Eimeria acervulina* (300-390), *Eimeria maxima* (200-260), *Eimeria mitis* (300-390), *Eimeria praecox* (300-390) et *Eimeria tenella* (250-325). Administré par voie orale (10 fois la dose).

Du 18^{ème} jour au 20^{ème} jour, les groupes Cp, CpC, CpCB et CpCL ont reçu la culture bactérienne de *C. perfringens* par voie orale à la dose de 3 ml (10^8 UFC/ml), une fois par jour par voie orale.

5. Conditions d'élevage

5.1. Animalerie

L'animalerie où s'effectue l'essai possède une surface de 32 m², incluant 30 cages divisées en cinq rangées de 6 cages séparées par des petits couloirs. Chaque cage a une superficie de 0,4 m², dispose d'un abreuvoir automatique et d'une mangeoire linéaire de 40 cm (**Figure 3**). La ventilation est dynamique, assurée par un extracteur. Le chauffage de l'animalerie se fait par des radiants à base d'électricité. La température est maintenue à 33°C à l'arrivée des poussins, puis réduite progressivement de 3°C chaque semaine jusqu'à la fin de l'essai. L'éclairage est assuré par 2 néons.

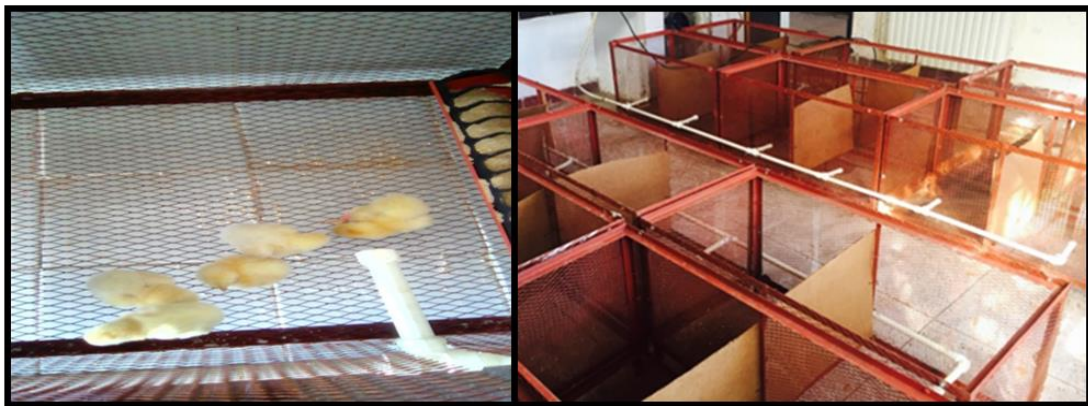


Figure 3. Animalerie utilisée pour l'expérimentation.

5.2. Aliments

5.2.1. Aliments de base

Les poulets ont reçu deux aliments de base adaptés à l'âge, sous forme de farine et fabriqués par la Sarl SOFABEL (Tiaret), supplémentés ou non en probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*, selon les groupes expérimentaux): un aliment « démarrage » distribué entre J0 et J15, un aliment « croissance » distribué de J16 à J28. La composition et les caractéristiques de chaque aliment sont présentées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Composition et caractéristiques des aliments de base utilisés durant l'essai.

	Aliment démarrage	Aliment croissance
<i>Matières premières (%)</i>		
Maïs	60.4	60
Tourteau de soja	30	33
Son de blé	5	2.5
Phosphate bicalcique	1,60	2
Bicarbonate	1,00	1.00
Huile végétale	1,00	0,50
CMV	1,00	1,00

CMV : sans anticoccidien

5.2.2. Modalités de la supplémentation en probiotique

Deux probiotiques ont été utilisés dans cet essai :

Pediococcus acidilactici : est une souche de bactérie lactique spécifique aux Monogastriques MA 185M (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris) commercialisée sous le nom de BACTOCELL® (Lallemand Nutrition Animale, France, **Annexe 2**). Il s'agit d'un concentré de ferment lactique développé spécifiquement pour la nutrition et la santé des monogastriques contenant

1×10^{10} UFC/g de *Pediococcus acidilactici*. La dose préconisée par le fabricant est de 1×10^9 UFC/kg d'aliment en démarrage, en croissance et en finition, soit des quantités de 100 g de probiotique/tonne d'aliment (100 ppm).

Saccharomyces cerevisiae : est une souche de levure spécifique aux monogastriques CNM I-1077 (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris) commercialisée sous le nom de LEVUCCELL®SB (Lallemand Nutrition Animale, France, **Annexe 3**). Il s'agit d'un concentré de levure sèche active développé spécifiquement pour la nutrition et la santé des monogastriques contenant 2×10^{10} UFC/g de levures *Saccharomyces cerevisiae*. La dose préconisée par le fabricant est de 1×10^9 UFC/kg d'aliment en démarrage, en croissance et en finition, soit des quantités de 100g de probiotique/tonne d'aliment (100 ppm).

L'incorporation des probiotiques pour cet essai a été effectuée par un mélange de ces derniers avec des quantités de 10 kg d'aliment de base, correspondant à chaque période d'élevage, et avec la dose préconisée par le fabricant (100 g/tonne d'aliment).

L'eau de boisson est distribuée à volonté avec un système d'abreuvement automatique. De ce fait, la consommation d'eau est un paramètre non exploitable pour cet essai.

5.3. Nettoyage et désinfection de l'animalerie

Le lavage et la désinfection de l'animalerie se font comme suit

- Lavage complet de l'animalerie avec un jet d'eau à haute pression.
- Arrêt de la ventilation et désinfection par pulvérisation de Biocid®-30 dans tout l'espace de la salle avec un appareil dédié. Le produit désinfectant est laissé pendant 24 heures pour une action optimale.
- Après 24 à 48 heures, démontage du matériel d'élevage et transport dans une autre salle.
- Nettoyage et désinfection des murs et du sol avec un appareil à haute pression.
- Nettoyage et stérilisation du matériel d'élevage.

6. Protocol expérimental

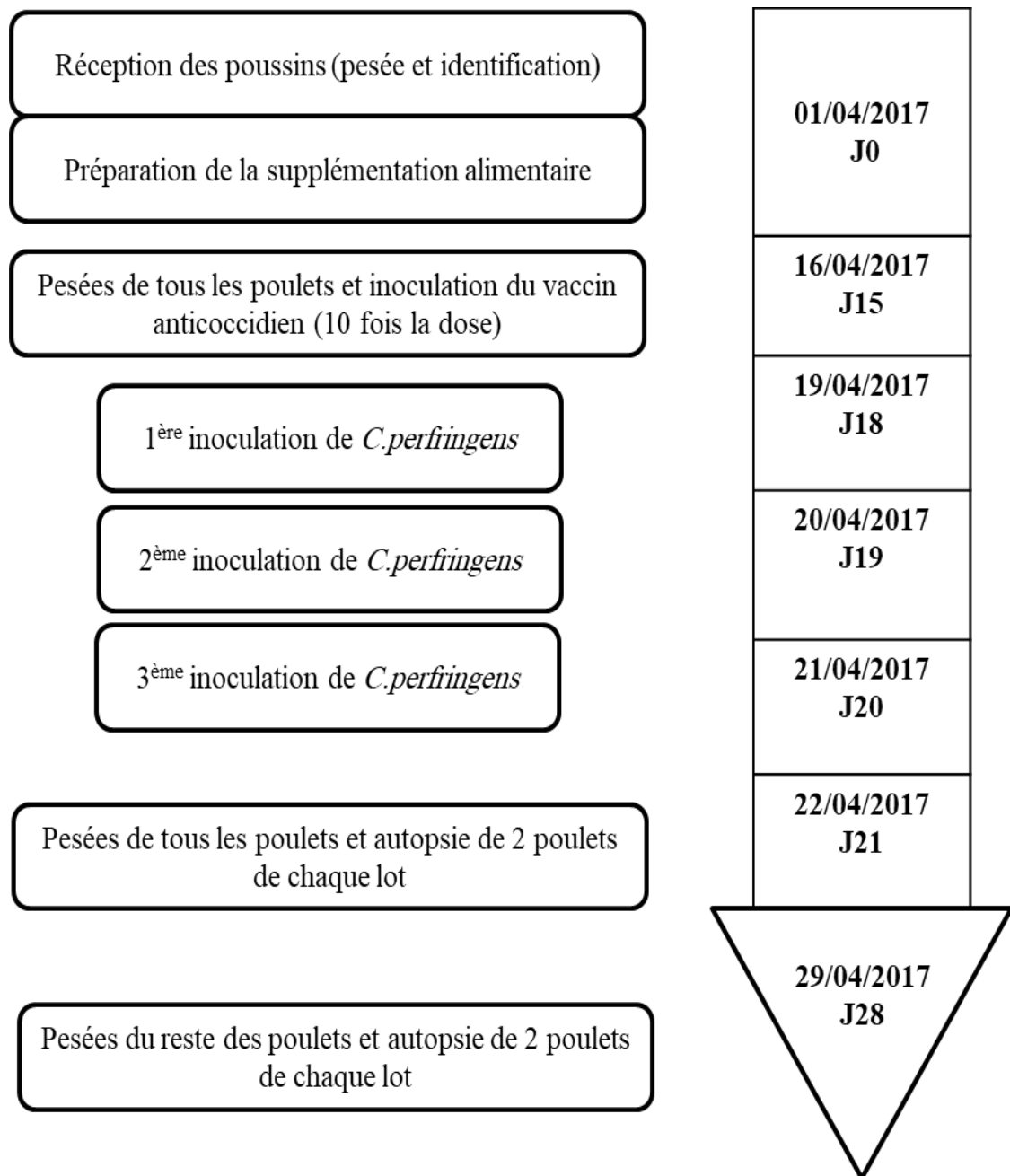


Figure 4. Protocol expérimental.

7. Préparation et inoculation du vaccin anticoccidien

Selon les modèles expérimentaux établis par d'autres chercheurs (Shojadoost *et al.*, 2012), il a été observé que l'utilisation d'un vaccin anticoccidien à 10 fois la dose recommandée est capable de créer un environnement favorable au niveau de l'intestin pour le développement de l'EN. Dans notre essai, nous avons utilisé le vaccin anticoccidien (**Figure 5**) HIPRACOX® (HIPRA, S. A., Espagne, **Annexe 4**) de la manière suivante :

Une ampoule contenant 1000 doses a été diluée dans 100 ml d'eau physiologique stérile, l'inoculation a été réalisée *per os*, à l'aide d'une pipette, avec un volume de 1 ml de la suspension pour chaque sujet, qui correspond à 10 fois la dose recommandée.



Figure 5. Vaccin anticoccidien utilisé

8. Préparation et inoculation de *C. perfringens*

La souche de référence de *C. perfringens* de type A a été fournis par Dr. Alaa Abdel-Fattah Mohamed directeur adjoint à l'institut de recherche des sérums et vaccins vétérinaires, le Caire, Egypte. Utilisée dans la préparation du vaccin local anti *C. perfringens*. Isolée à partir de cas d'EN du terrain chez les poulets.

8.1. Technique de préparation de l'inoculum de *C. perfringens*

8.1.1. Pré-culture

Les souches de *C. perfringens* sont conservées sous forme lyophilisée (**Figure 6**), et stockées à + 4°C au laboratoire d'hygiène et pathologie animale.

- Deux souches ont été ensemencées individuellement dans 10 ml de milieu viande cuite. Incubation des tubes à 37°C en anaérobiose pendant 24 heures.
- L'anaérobiose a été réalisée dans des jarres avec l'utilisation du sachet d'anaérobiose (AnaeroGentm).



Figure 6. La souche standard de *C. perfringens* sous forme lyophilisée.

8.1.2. Culture

- Les tubes de milieu viande cuite incubés ont été récupérés et ensemencés individuellement dans deux flacons contenant 200 ml de bouillon Thioglycolate pour chaque souche.
- L'incubation des deux flacons à 37°C en anaérobiose pendant 24 heures.

8.1.3 Inoculum

- Après incubation des deux flacons, un volume de 10 ml de chaque flacon a été récupéré et conservé à +4°C pour la réalisation du dénombrement bactérien.
- Un mélange des deux bouillons incubés dans un seul flacon a été effectué pour l'obtention de la suspension finale à inoculer.

8.1.4 Dénombrement de l'inoculum

- Le milieu de culture utilisé pour le dénombrement de *C. perfringens* est la gélose TSC.

- Une série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}) a été réalisée dans de l'eau peptonée à partir des deux tubes conservés à $+4^{\circ}\text{C}$, contenant 10 ml de l'inoculum de chaque souche.
- Ensemencement des boîtes de pétri à partir des tubes contenant les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} pour chaque souche (**Figure 7**).
- Incubation des boîtes de pétri en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures.
- Lecture et comptage des colonies.

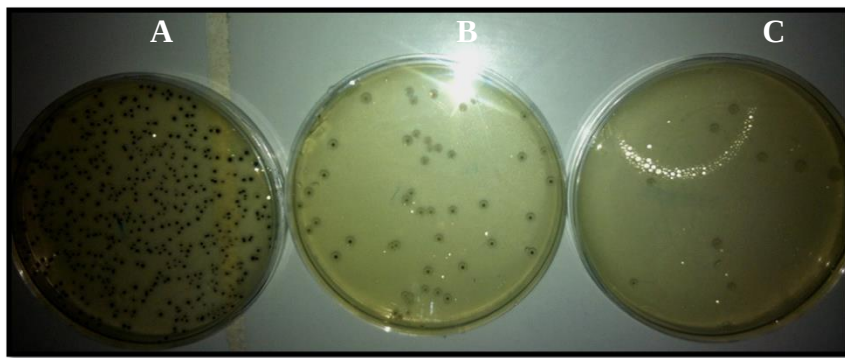


Figure 7. Dénombrement de *C.perfringens* sur gélose TSC (A : 10^{-4} ; B : 10^{-5} ; C : 10^{-6}).

8.2. Technique d'inoculation

- Deux personnes sont nécessaires pour réaliser cette opération.
- Tenir le poulet de façon à ce que le cou soit tendu afin de pouvoir passer une pipette du bec jusqu'au jabot.
- Une main maintient les pattes, et l'autre entrouvre le bec et étire le cou.
- Maintenir le poulet de façon assez ferme pour éviter qu'il ne se débatte et ne pas le blesser lors de l'inoculation.
- Prendre la suspension préparée, l'agiter doucement et prélever le volume à inoculer avec un pipetteur.
- Insérer la pipette dans le bec et descendre dans l'œsophage jusqu'au niveau du jabot sans forcer.
- Si ça coince, retirer la pipette et recommencer
- Laisser couler le contenu de la pipette.



Figure 8. Inoculation des poulets par la culture de *C. perfringens*.

9. Mesures réalisées

9.1. Mesure des performances zootechniques

9.1.1. Ingéré alimentaire

L'ingéré alimentaire est calculé à J15 et J28. La quantité d'aliment ingérée est déterminée à partir des quantités d'aliments distribuées et des refus pesés selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'aliment ingéré (g)} = \text{Quantité distribuée (g)} - \text{Refus (g)}$$

9.1.2. Poids vif

En vue d'apprécier l'évolution du poids vif, une pesée individuelle de tous les poulets est effectuée à J0, J15 et J28, par la suite le poids moyen de chaque groupe est calculé.

9.1.3. Gain de poids

Le gain de poids de chaque poulet est estimé par différence entre le poids vif final et initial de la période considérée (J0-J15, J15-J28, J0-J28).

9.1.4. Indice de consommation

L'indice de consommation (IC) est le rapport entre la quantité d'aliment consommée et le gain de poids réalisé, pour une période donnée. Il est calculé selon la formule suivante :

$$IC = \frac{\text{Quantité d'aliment ingérée par groupe}}{\text{Gain de poids total pour chaque groupe}}$$

10. Paramètres cliniques et lésionnels

10.1. Notation de la morbidité

La morbidité est notée quotidiennement de J15 à J28, selon le barème présenté dans le **Tableau 7**. Après être entré dans l'animalerie, l'observateur se tient immobile dans la salle jusqu'à ce que les oiseaux reprennent un comportement non influencé par sa présence.

Tableau 7. Barème de la notation de la morbidité selon Mouna 2012.

0	Attitude normale des animaux
1	Plumes ébouriffées (surtout celles du cou)
2	Début de frilosité et de prostration
3	Frilosité et prostration marquées, animaux apathiques
4	Position en boule des animaux, ailes tombantes, station debout pénible, yeux fermé

10.2. Taux de mortalité

Un suivi matin et soir est effectué durant tout l'essai afin de noter et récupérer les sujets morts. Le taux de mortalité est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\text{Taux de mortalité (\%)} = \frac{\text{Le nombre de poulets morts par groupe} \times 100}{\text{Effectif de départ dans chaque groupe}}$$

10.3. Notation des lésions d'EN

Les notations des lésions sont réalisées à l'âge de J21 et de J28, sur 2 poulets par lot (choix aléatoire), autopsiés après euthanasie. Les poulets sont euthanasiés par exsanguination par section des veines jugulaires, des artères carotides et de la colonne vertébrale. L'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) est prélevé, étalé puis ouvert longitudinalement dans sa totalité pour la notation des lésions. Cette dernière se fait selon le barème décrit par Dahyia *et al.* (2005) et présenté dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Notation des lésions d'EN selon Dahyia *et al.* (2005)

0	apparence normale de l'intestin
1	intestin à paroi mince et friable avec des petites pétéchies (> 5).
2	lésions nécrotiques focales.
3	tâches de nécroses (1 à 2 cm de long).
4	nécrose diffuse typique des cas de terrain.

11. Mesures de la morphométrie intestinale

Le poids et la longueur des différentes portions de l'intestin prélevées à partir des 12 poulets sacrifiés sont mesurés à J21 et J28 (**Figure 9**).

Pour ce faire, l'intestin est prélevé dans sa totalité, de sa jonction avec le gésier jusqu'au colon et étiré. Les deux caeca sont détachés de la jonction iléo-caecale. Les 3 portions (duodénum, jéjunum, iléon) sont alors juxtaposées et mesurées.



Figure 9. Mesure morphométrique intestinale.

12. Mesure de la morphométrie de la bourse de Fabricius

A partir des 12 poulets sacrifiés à J21 et J28, la bourse de Fabricius est prélevée soigneusement afin d'éviter le risque d'écrasement. Le poids est déterminé à l'aide d'une balance pour laboratoire, et un pied à coulisse digital est utilisé pour mesurer son diamètre (**Figure 10**).



Figure 10. Mesure du diamètre de la bourse de Fabricius.

13. Analyse statistique

Les différents résultats sont décrits par la moyenne et l'erreur standard (SE, calculée à partir de la déviation standard SD selon la formule $SE = SD/n^{0,5}$; n étant le nombre de répétitions).

L'homogénéité de la variance entre traitements est vérifiée par le test de Bartlett. Dans les cas où ce test est significatif ($p < 0,05$), les moyennes des groupes sont comparées par le test non paramétrique de Mann-Whitney. Lorsque le test de Bartlett s'avère non significatif ($p > 0,05$), les résultats sont soumis à une analyse de variance à un facteur (ANOVA 1) afin de déterminer l'effet du traitement sur les paramètres considérés. Le seuil de signification choisi est d'au moins 5%.

Toutes ces analyses sont effectuées à l'aide du programme StatView (Abacus Concepts, 1996, Inc., Berkeley, CA94704-1014, USA).

RESULTATS

Expérimentation 1 :

1. Les observations de nécropsie

Tous les 180 sujets de poulets de chair, à partir desquels le contenu intestinal a été récolté, ont montré des lésions macroscopiques évoquant une atteinte par l'EN (**Figure 11**). Les lésions ont été observées au milieu de l'intestin grêle, allant d'une paroi friable et distendues par des gaz jusqu'à la présence d'une membrane diphtérique sur la muqueuse intestinale d'une couleur jaune à bronze, avec ou sans foyer hémorragique.

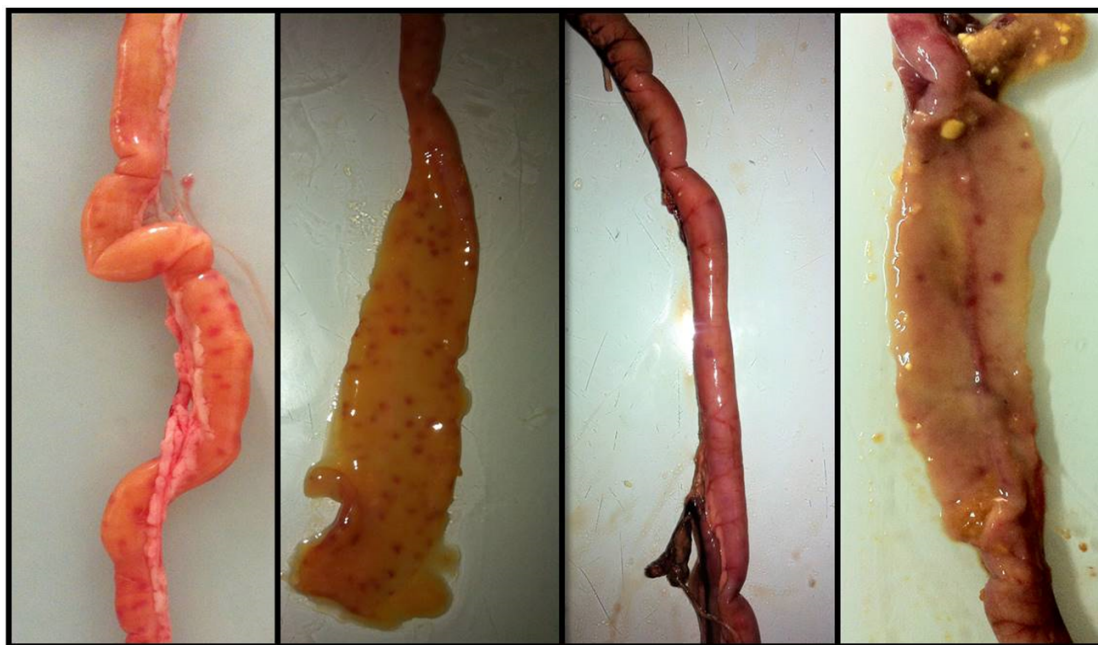


Figure 11. Parties d'intestins présentant des lésions évoquant une atteinte par l'EN.

2. Examen bactériologique et biochimique

Sur les 180 échantillons intestinaux examinés, 62 isolats de *C. perfringens* (34,44%) ont été détectés (**Figure 12**). Les isolats ont produit des colonies entourées d'un halo noir typiques de 1 à 2 mm sur milieu gélose TSC (**Figure 13**). Ils ont également produit des colonies lisses, rondes et brillantes entourées par une double zone d'hémolyse sur milieu gélose au sang de mouton (**Figure 13**).

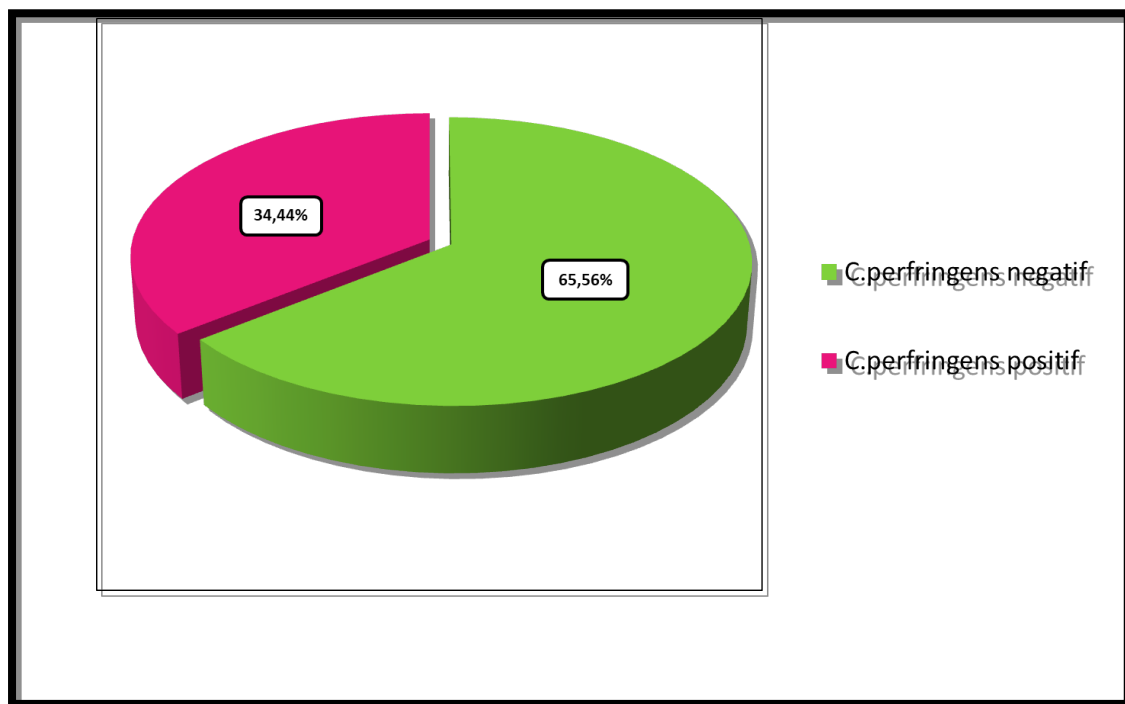


Figure 12. Taux de détection de *C. perfringens*.



Figure 13. Caractéristiques des colonies de *C. perfringens* sur gélose TSC et gélose au sang.

L'identification des isolats de *C. perfringens* a été basée sur les caractères morphologiques et biochimiques. La coloration de Gram a révélé la présence de bactéries de couleur violet en forme de bâtonnet large indiquant des Gram-positifs (**Figure 14**), la caractérisation biochimique a révélé que tous les isolats étaient positifs pour l'activité de la lécithinase sur milieu gélose au jaune d'œuf (**Figure 15**), la fermentation du sucre (glucose, sucrose, lactose, maltose), la liquéfaction de la gélatine, tandis que la production d'indole, urease, catalase et oxydase étaient négatifs.

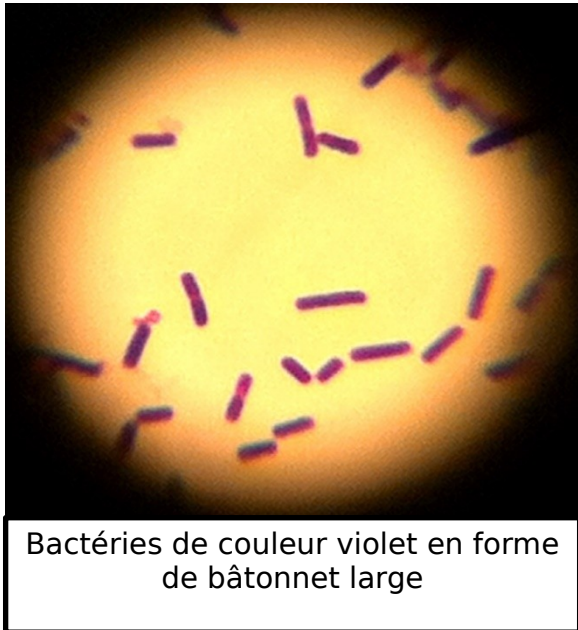


Figure 14. Photographie au microscope de *C. perfringens* Gr x 1000.

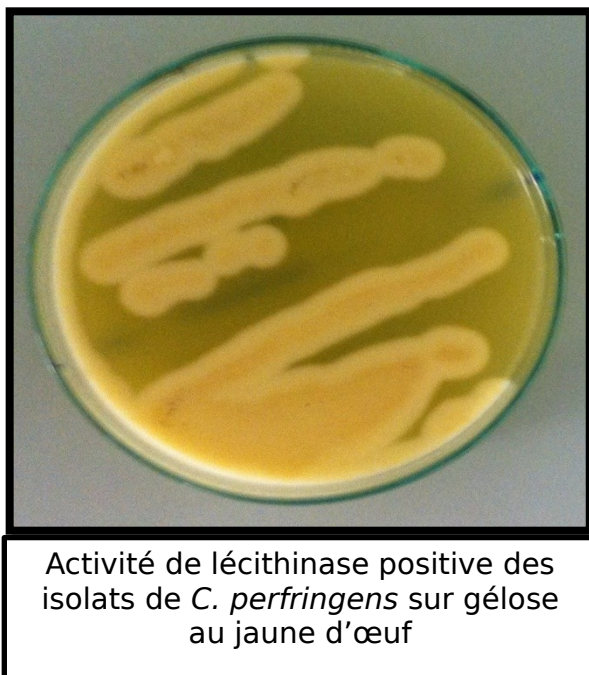


Figure 15. Réaction de lécithinase.

3. Activité toxigénique de *C. perfringens*

Sur les 62 souches de *C. perfringens* isolées, 52 souches étaient toxigènes (83.87%) (**Figure 16**), comme indiqué par la mort des souris inoculées dans le test de létalité sur souris, et par une réaction positive du test de Nagler exprimés par l'apparition d'une zone d'opacité entourant les colonies toxigéniques de *C. perfringens* sur la moitié de la boîte de pétri sans antitoxine alors qu'aucun changement n'a été observé sur l'autre moitié contenant l'antitoxine (**Figure 17**). Les 10 isolats restants de *C. perfringens* (16,13%) n'étaient pas toxigènes.

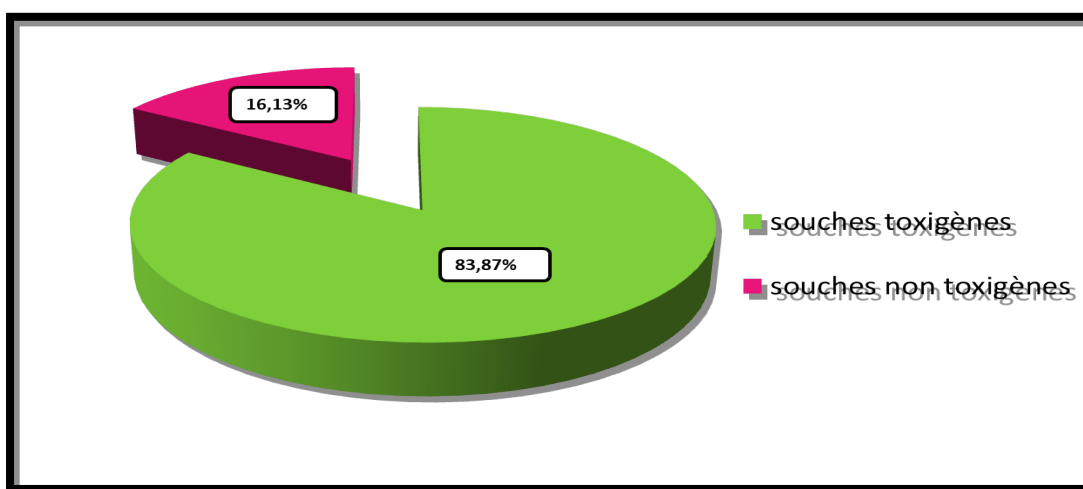


Figure 16. Taux des souches toxigènes de *C. perfringens*.

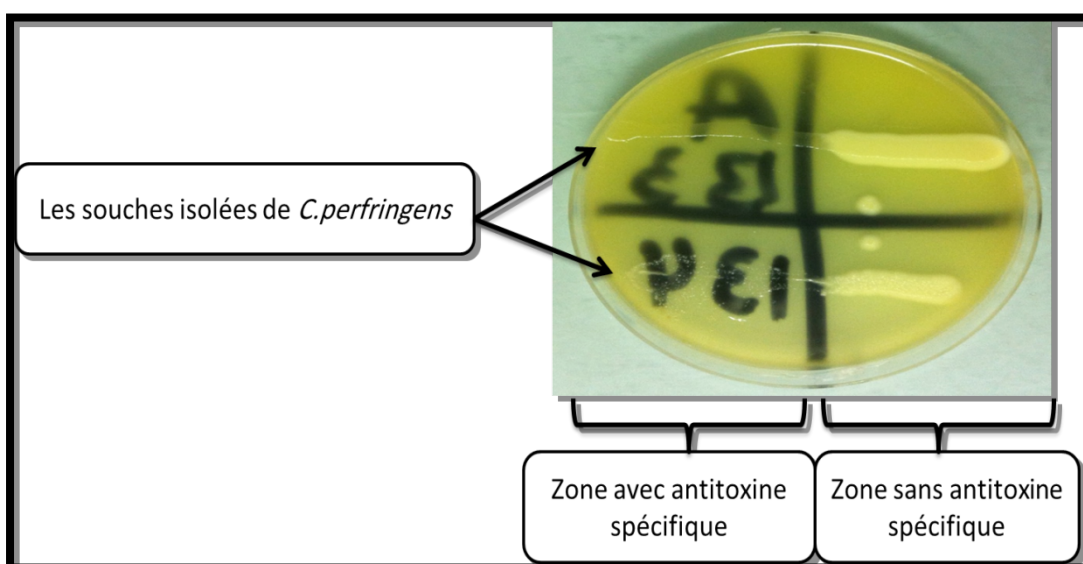
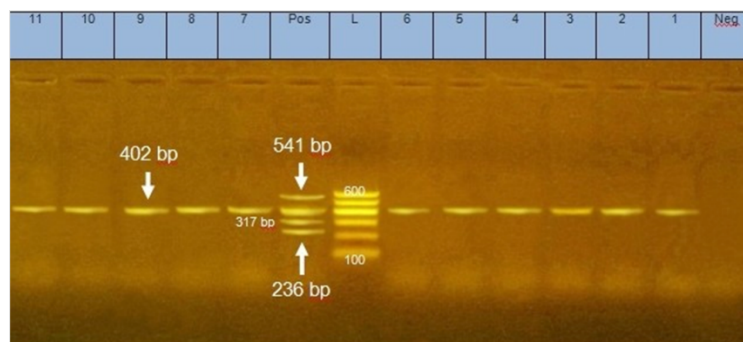


Figure 17. Réaction de Nagler.

4. La caractérisation moléculaire des souches toxigènes de *C. perfringens*

4.1. Multiplex PCR pour le génotypage des souches toxigènes de *C. perfringens*

Le génotypage des 52 souches toxigènes a révélé que toutes les souches portaient le gène *cpa* (402 pb), codant pour la toxine alpha (**Figure 18**), et aucune des souches ne possédait les gènes *cpb* (236 pb), *etx* (541 pb) et *iA* (317 pb) codant pour les toxines bêta, épsilon et iota, respectivement. Cela indique que toutes les souches toxigènes étaient *C. perfringens* type A 100% (52/52).

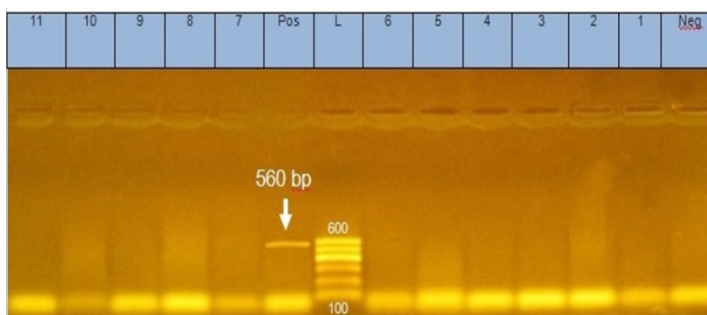


Pos : contrôle positif ; Neg : contrôle négatif ; L : échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *C. perfringens* positifs pour le gène *cpa*.

Figure 18. Multiplex PCR pour le typage de *C. perfringens*.

4.2 Uniplex PCR pour la détection du gène *netB*

Une sélection de 22 souches toxigènes confirmées comme étant *C. perfringens* de type A ont été analysées par PCR uniplex pour détecter la présence du gène *netB* (560 pb). Aucune des souches n'a été trouvée positive pour ce gène codant pour la toxine NetB (**Figure 19**).



Pos : contrôle positif ; Neg : contrôle négatif ; L : échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *C. perfringens* négatifs pour le gène *netB*.

Figure 19. Uniplex PCR pour la détection du gène *netB*.

Expérimentation 2 :

Dans cet essai, nous évaluons, dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* chez les poulets de chair soumis à un facteur prédisposant (coccidies), l'effet de la supplémentation alimentaire en probiotiques *Pediococcus acidilactici* (bactérie lactique) et *Saccharomyces cerevisiae* (levure probiotique) sur les performances zootechniques, paramètres cliniques et lésionnels et la morphométrie des intestins et de la bourse de Fabricius.

1. Effet des probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* sur les performances de croissance

1.1. Effet sur le poids vif et le gain de poids du poulet

Les valeurs moyennes de poids vif et de gain de poids mesurés de J0 à J28, chez les poulets de chair supplémentés ou non en *P. acidilactici* ou *S. cerevisiae*, dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis un facteur prédisposant (coccidies) sont reportées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Poids vif et gain de poids des poulets mesurés durant l'essai.

Paramètres	n=	T	Cp	CpC	CpCB	CpCL	SEM	p=
Poids vif (g)								
J0	30	41,07	41,00	41,50	40,80	41,10	0,35	0,67
J15	30	267,83 ^a	267,20 ^a	266,83 ^a	290,20 ^b	312,83 ^c	7,20	<0,0001
J28	18	843,78	819,83	784,50	844,56	847,11	21,48	0,21
Gain de poids (g)								
J0 – J15	30	226,77 ^a	226,20 ^a	225,33 ^a	249,40 ^b	271,73 ^c	7,25	<0,0001
J15 – J28	18	576,67	550,39	537,89	552,89	541,56	22,12	0,86
J0 – J28	18	802,33	779,07	742,56	803,50	806,17	21,49	0,26

T : poulets témoins non inoculés et non supplémentés en probiotiques. Cp : poulets inoculés par *C. perfringens* et non supplémentés en probiotiques. CpC : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et non supplémentés en probiotiques. CpCB : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Pediococcus acidilactici*. CpCL : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. SEM : Erreur standard moyen.

Au démarrage (J0), les poussins ont des poids homogènes : $41,09 \pm 0,35$ g en moyenne. A J15, le poids des poussins supplémentés en probiotique *P. acidilactici* ou *S. cerevisiae* est meilleur que celui des sujets nourris avec l'aliment de base : +9% et + 17%, respectivement ($p < 0,0001$). Même constatation pour les gains de poids entre J0 et J15, l'augmentation est significative ($p < 0,0001$) entre les groupes supplémentés en probiotiques par rapport aux groupes non supplémentés : +10 et +20% en

moyenne, respectivement pour les groupes CpCB et CpCL comparés aux groupes T, Cp et CpC.

A J28 les écarts de poids vif et des gains de poids enregistrés entre les différents groupes ne sont pas statistiquement différents : variations non significatives ($p=0,21$).

1.2. Effet sur l'ingéré alimentaire

Les quantités d'aliments consommées durant l'essai, chez les poulets de chair supplémentés ou non en *P. acidilactici* ou *S. cerevisiae*, dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis un facteur prédisposant (coccidies) sont présentées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10. Ingéré alimentaire des poulets mesuré durant l'essai.

Paramètres	n=	T	Cp	CpC	CpCB	CpCL	SEM	p=
Ingéré (g)								
J0 – J15	30	371,77 ^a	393,18 ^c	383,70 ^{bc}	376,00 ^{ab}	387,43 ^{bc}	3,85	0,01
J15 – J28	18	1002,11 ^a	1038,09 ^b	1035,11 ^b	1022,55 ^b	991,44 ^a	5,53	<0,0001
J0 – J28	18	1373,88 ^a	1431,28 ^d	1418,81 ^{cd}	1398,55 ^{bc}	1378,88 ^{ab}	7,98	<0,0001

T : poulets témoins non inoculés et non supplémentés en probiotiques. Cp : poulets inoculés par *C. perfringens* et non supplémentés en probiotiques. CpC : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et non supplémentés en probiotiques. CpCB : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Pediococcus acidilactici*. CpCL : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. SEM : Erreur standard moyen.

A la phase initiale de l'essai (J0 - J15), l'ingéré alimentaire du groupe Cp (infecté clostridies, non supplémenté) et CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté) est significativement plus élevé que celui du groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté) : +5% en moyenne ($p<0,05$). De même, la consommation alimentaire du groupe supplémenté en levure probiotique (CpCL) est supérieure à celle du groupe témoin (+4%, $p<0,05$) mais reste non significativement différente de celle des groupes Cp et CpC. En revanche, le groupe supplémenté en *P. acidilactici* (CpCB) présente un ingéré plus faible que celui du groupe Cp (-4%, $p<0,05$) mais comparable aux valeurs enregistrées dans les trois autres groupes (T, CpC et CpCL).

A la phase (J15 - J28), nous constatons qu'il y'a une différence significative ($p<0,0001$) entre le groupe T par rapport aux groupes Cp et CpC, avec un ingéré

alimentaire plus faible pour le groupe T de 4% et 3% par rapport aux groupes Cp et CpC respectivement.

En ce qui concerne les groupes infectés et supplémentés en probiotiques, il n'y a pas de différence significative entre l'ingéré alimentaire du groupe CpCB (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *P. acidilactici*) et celui du groupe CpC. Alors que, la quantité d'aliment ingéré est significativement plus faible ($p < 0,0001$) chez le groupe CpCL (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *S. cerevisiae*) d'environ 43,71 g par rapport au groupe CpC soit une baisse de 4%.

Finalement, en comparant les deux probiotiques utilisés, la différence est significative ($p < 0,0001$) avec une réduction de la consommation alimentaire d'environ 31,11 g soit une baisse de 3% pour le groupe CpCL par rapport au groupe CpCB.

Si nous considérons la période globale de l'essai (J0 à J28), nous constatons une augmentation significative ($p < 0,0001$) de l'ingéré alimentaire de 4% pour le groupe Cp (infecté clostridies, non supplémenté) et +3% pour le groupe CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté) par rapport au groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté). Alors que l'addition de la levure probiotique (*S. cerevisiae*) réduit significativement ($p < 0,0001$) la consommation de l'aliment d'environ 39,93 g soit une baisse de 3% par rapport au groupe CpC. La différence n'est pas significative en comparant le groupe CpCL (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *S. cerevisiae*) au groupe T.

En ce qui concerne la supplémentation en bactérie probiotique (*P. acidilactici*), nous remarquons une réduction significative ($p < 0,0001$) de la quantité d'aliment consommée d'environ 20,26 g soit une baisse de 1% par rapport au groupe CpC.

Finalement, en comparant les deux probiotiques utilisés, nous constatons une différence non significative entre les deux groupes (CpCB/CpCL).

1.3. Effet sur l'indice de consommation du poulet

Les indices de consommation relevés durant l'essai, chez les poulets de chair supplémentés ou non en *P. acidilactici* ou *S. cerevisiae*, dans un modèle d'infection

expérimentale par *C. perfringens* soumis un facteur prédisposant (coccidies) sont présentés dans le **Tableau 11**.

Tableau 11. Indice de consommation des poulets mesuré durant l'essai.

Paramètres	n=	T	Cp	CpC	CpCB	CpCL	SEM	p=
IC (g/g)								
J0 – J15	30	1,68 ^{bc}	1,81 ^c	1,79 ^c	1,52 ^{ab}	1,46 ^a	0,06	<0,0001
J15 – J28	18	1,77	1,94	2,32	1,90	1,89	0,16	0,40
J0 – J28	18	1,72 ^a	1,86 ^{bc}	1,97 ^c	1,77 ^{ab}	1,73 ^{ab}	0,06	0,03

T : poulets témoins non inoculés et non supplémentés en probiotiques. Cp : poulets inoculés par *C. perfringens* et non supplémentés en probiotiques. CpC : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et non supplémentés en probiotiques. CpCB : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Pediococcus acidilactici*. CpCL : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. SEM : Erreur standard moyen.

Ainsi, il apparaît qu'en période de J0 à J15, l'apport en probiotiques a diminué de manière significative ($p < 0,0001$) l'indice de consommation : -15% et -18% en moyenne, respectivement pour les groupes CpCB (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *P. acidilactici*) et CpCL (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *S. cerevisiae*) comparés aux groupes Cp (infecté clostridies, non supplémenté) et CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté). Par contre, nous constatons une différence non significative entre les groupes infectés non supplémentés en probiotiques et le groupe CpCB comparés au groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté). Alors que, le groupe CpCL présente une diminution significative (-13%, $p < 0,0001$) de l'indice de consommation comparé au groupe T. Enfin, en comparant les deux probiotiques utilisés, nous remarquons une baisse de 4% pour le groupe CpCL, statistiquement non significative.

Par contre, durant la phase J15 à J28, les indices de consommation enregistrés entre les différents groupes ne sont pas statistiquement différents : variation non significatives ($p = 0,40$).

En considérant toute la période de l'essai, nous remarquons une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'indice de consommation des groupes Cp et CpC: +8 % et +15 %, respectivement comparés au groupe T. Alors que, une diminution significative ($p < 0,05$) de l'indice de consommation des groupes infectés et supplémentés en probiotiques a été enregistrée : -12% et -10% pour les groupes CpCL et CpCB, respectivement comparés au groupe CpC. Par contre, les groupes infectés et

supplémentés en probiotiques reste non significativement différent par rapport aux groupes Cp et T.

Finalement, en comparant les deux probiotiques utilisés, nous remarquons une baisse de 2% de l'indice de consommation du groupe CpCL, statistiquement non significative.

2. Effet des probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* sur les paramètres cliniques et lésionnels

2.1. Effet sur la morbidité et la mortalité

Il n'y a pas eu de morbidité au cours de cette expérimentation. De même, aucune mortalité n'a été enregistrée durant toute la période de cet essai.

2.2. Effet sur les scores lésionnels

Les scores lésionnels enregistrés durant l'essai, chez les différents groupes expérimentaux sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12. Scores lésionnels mesurés chez les poulets à l'âge de 21 et 28 jours (n=12).

Paramètres	T	Cp	CpC	CpCB	CpCL	SEM	p=
Score lésionnel							
J21	0,17 ^a	0,83 ^b	1,42 ^b	0,33 ^a	0,33 ^a	0,14	<0,0001
J28	0,17 ^a	1 ^b	1,25 ^b	0,42 ^a	0,42 ^a	0,13	<0,0001

T : poulets témoins non inoculés et non supplémentés en probiotiques. Cp : poulets inoculés par *C. perfringens* et non supplémentés en probiotiques. CpC : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et non supplémentés en probiotiques. CpCB : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Pediococcus acidilactici*. CpCL : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. SEM : Erreur standard moyen.

Selon les valeurs enregistrées à J21, on constate une différence significative ($p<0,0001$) entre les groupes infectés et non supplémentés et le groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté), avec une augmentation des scores lésionnels qui tend à être 7 et 4 fois plus grand pour les groupes CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté) et Cp (infecté clostridies, non supplémenté), respectivement par rapport au groupe T. De même, nous remarquons une augmentation significative ($p<0,0001$) du score lésionnel des groupes infectés et non supplémentés par rapport aux groupes

infectés et supplémentés en probiotiques : +60% et +77%, respectivement pour les groupes Cp et CpC comparés aux groupes CpCB (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *P. acidilactici*) et CpCL (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *S. cerevisiae*).

Même constatation pour les scores lésionnels observés à J28, l'apport en probiotiques (*P. acidilactici* et *S. cerevisiae*) a diminué de manière significative (<0,0001) les scores lésionnels avec $0,42 \pm 0,51$ pour les groupes CpCB et CpCL, soit une baisse de 58% et 67% par rapport au groupe Cp et CpC respectivement.

Finalement, aucune différence significative n'a été enregistrée, pour les scores lésionnels entre les groupes T, CpCB et CpCL à J21 et J28.

3. Effet des probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* sur la morphométrie intestinale

Les mesures morphométriques intestinales enregistrées durant l'essai, chez les poulets de chair supplémentés ou non en *P. acidilactici* ou *S. cerevisiae*, dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis un facteur prédisposant (coccidies) sont reportées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. Mesures morphométriques de l'intestin à J21 et J28 (n=12).

Paramètres	T	Cp	CpC	CpCB	CpCL	SEM	p=
Mesures à j21							
Poids vif (g)	540,92	540,58	527,83	555,58	589,42	18,44	0,25
Longueur intestin (cm)	134,38	141,96	137,54	142,42	140,75	3,62	0,52
Longueur Duodénum (%)	16,34	15,27	15,42	15,42	15,65	0,45	0,50
Longueur Jéjunum (%)	56,14	55,98	56,80	56,48	56,77	0,72	0,73
Longueur Iléon (%)	27,52	28,75	27,78	28,10	27,58	1,05	0,33

Résultats

Poids Intestin (g/cm)	0,31	0,35	0,33	0,32	0,34	0,01	0,32
PRI (g/100g PV)	7,67	9,31	8,96	8,38	8,03	0,51	0,18
Mesures à j28							
Poids vif (g)	864,17 ^b	830,50 ^{ab}	795,50 ^a	885,83 ^b	863,83 ^b	19,88	0,03
Longueur intestin (cm)	146,75 ^{ab}	146,42 ^{ab}	142,00 ^a	152,50 ^{bc}	156,67 ^c	3,04	0,02
Longueur Duodénum (%)	16,15	16,96	16,40	16,14	15,89	0,35	0,28
Longueur Jéjunum (%)	57,02	56,95	57,40	57,80	57,03	0,54	0,78
Longueur Iléon (%)	26,83	26,09	26,20	26,06	27,08	0,80	0,85
Poids Intestin (g/cm)	0,34	0,38	0,38	0,40	0,38	0,01	0,14
PRI (g/100g PV)	5,83	6,80	6,84	6,80	6,87	0,29	0,07

T: poulets témoins non inoculés et non supplémentés en probiotiques. Cp: poulets inoculés par *C. perfringens* et non supplémentés en probiotiques. CpC : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et non supplémentés en probiotiques. CpCB : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Pediococcus acidilactici*. CpCL : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. SEM : Erreur standard moyen. PV: Poids vif. PRI : Poids relatif intestin.

Les mesures morphométriques intestinale enregistrées à J21 nous indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre les différents groupes, que ce soit pour la longueur ou bien le poids de l'intestin, même constatation pour les pourcentages des différentes portions de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon).

Selon les valeurs enregistrées à J28 pour la longueur intestinale, il n'y a aucune différence significative entre les groupes T (témoin, non infecté, non supplémenté), Cp (infecté clostridies, non supplémenté) et CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté). Par contre, le groupe CpCL (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *S. cerevisiae*) présente une augmentation significative ($p < 0,05$) de la longueur intestinale de +10% par rapport au groupe CpC et +7% par rapport aux groupes Cp et T. Alors que, la longueur intestinale du groupe CpCB (infecté coccidies et clostridies, supplémenté en *P. acidilactici*) est supérieure à celle du groupe CpC (+7%, $p < 0,05$) mais reste non significativement différente de celle des groupes CP et T. En comparant les deux probiotiques utilisés, nous constatons une différence non significative.

En ce qui concerne les pourcentages des portions de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon), aucune différence significative n'a été enregistrée.

Enfin, il n'y a pas eu de différence significative à J28 pour le poids de l'intestin ainsi que son poids relatif.

4. Effet des probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* sur la morphométrie de la bourse de Fabricius

Les mesures morphométriques de la bourse de Fabricius enregistrées durant l'essai, chez les poulets de chair supplémentés ou non en *P. acidolactici* ou *S. cerevisiae*, dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis un facteur prédisposant (coccidies) sont présentées dans le **Tableau 14**.

Tableau 14. Mesures morphométriques de la bourse de Fabricius à j21 et j28 (n=12).

Paramètres	T	Cp	CpC	CpCB	CpCL	SEM	p=
Mesures à j21							
Poids vif (g)	540,92	540,58	527,83	555,58	589,42	18,44	0,25
Diamètre BF (mm)	11,96	10,97	12,20	11,93	12,03	0,37	0,18
Diametre BF (mm/100g PV)	2,22	2,06	2,39	2,18	2,05	0,11	0,17
Poids BF (g)	0,90	1,04	1,13	0,98	1,10	0,08	0,27
PRBF (g/100g PV)	0,17	0,20	0,22	0,18	0,19	0,02	0,20
Mesures à j28							
Poids vif (g)	864,17 ^b	830,50 ^{ab}	795,50 ^a	885,83 ^b	863,83 ^b	19,88	0,03
Diamètre BF (mm)	14,20	14,81	14,21	14,27	13,99	0,37	0,63
Diamètre BF (mm/100g PV)	1,64 ^a	1,79 ^b	1,80 ^b	1,62 ^a	1,62 ^a	0,05	0,01
Poids BF (g)	1,87	1,70	1,69	1,70	1,70	0,13	0,86
PRBF (g/100g PV)	0,22	0,20	0,21	0,19	0,19	0,01	0,66

T: poulets témoins non inoculés et non supplémentés en probiotiques. Cp: poulets inoculés par *C. perfringens* et non supplémentés en probiotiques. CpC : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et non supplémentés en probiotiques. CpCB : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Pediococcus acidilactici*. CpCL : poulets inoculés par *C. perfringens* et le vaccin anticoccidien et supplémentés avec le probiotique *Saccharomyces cerevisiae*. SEM : Erreur standard moyen. PV : Poids vif. BF: Bourse de Fabricius. PRBF: Poids relatif bourse de Fabricius.

Selon les mesures morphométriques enregistrées à J21, aucune différence significative n'a été observée pour le poids et le diamètre de la bourse de Fabricius, ainsi que son poids relatif.

En revanche, à J28, le groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté) présente une diminution significative ($p < 0,05$) du diamètre de la bourse de Fabricius rapporté au poids vif de -9% en moyenne, comparé aux groupes Cp (infecté clostridies, non supplémenté) et CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté). De même, le diamètre relatif de la bourse de Fabricius des groupes infectés et supplémentés en probiotiques est significativement ($p < 0,05$) inférieure à celui des groupes Cp (infecté clostridies, non supplémenté) et CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté) : -9% et -10% respectivement, mais reste non significativement différent de celui du groupe T. En ce qui concerne les probiotiques utilisés, il n'y a pas eu de différence significative.

Finalement, aucune différence significative n'a été enregistrée à J28 entre les groupes pour le poids et le diamètre de la bourse de Fabricius ainsi que son poids relatif.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Expérimentation 1

Détection de *C. perfringens*

La présence de *C. perfringens* dans les élevages avicoles a été rapportée dans la plupart des régions du monde. Cette bactérie est considérée comme l'une des causes les plus fréquentes des infections gastro-intestinales et d'entérite nécrotique chez la volaille (Van Immerseel *et al.*, 2004; McDevitt *et al.*, 2006). Cependant, à notre connaissance, aucune étude sur la détection et la caractérisation moléculaire de *C. perfringens* induisant l'EN chez les poulets de chair n'a été réalisée en Algérie.

Dans la présente étude, une investigation a été menée afin de détecter la présence de *C. perfringens* dans différents élevages de poulets de chair situés dans la région de Tiaret. *C. perfringens* a été isolé à partir de 62 échantillons sur 180 analysés avec un taux de 34,44 %. Ces résultats indiquent que les lésions intestinales observées sur le terrain ne sont pas toutes dues à une infection à *C. perfringens*. D'autres pathogènes peuvent être incriminés dans l'étiologie de ces lésions. On pense également que la faible proportion d'isolement déterminée dans notre étude peut être expliquée par le fait que, en Algérie et particulièrement dans la région de Tiaret, l'utilisation incontrôlée des antibiotiques à titre préventif et curatif sans pour autant avoir déterminé la sensibilité à ces derniers, peut conduire à une destruction et un dysfonctionnement de la population bactérienne dans le tractus intestinal. Plusieurs études ont rapporté différents taux d'isolement; Bjerrum *et al.* (2006) ont mentionné que *C. perfringens* a été isolé avec un taux de 30%. Cependant, Manfreda *et al.* (2006) ont détecté *C. perfringens* dans 87 échantillons à partir de 149 analysés (58,40%). De plus, le groupe de Svobodova *et al.* (2007) ont isolé *C. perfringens* avec un taux de 18,39%, Schocken- iturrino *et al.* (2013) ont analysé 560 contenus intestinaux et ont démontré que *C. perfringens* était trouvé dans 94 échantillons avec un taux de 16,78%. Tandis que le taux d'isolement le plus bas a été rapporté par Kalender et Ertas (2005), qui ont constaté que seulement 5% des contenus intestinaux étaient positives pour *C. perfringens*.

Contrairement à nos résultats, Tschirdewahn *et al.* (1991); Miwa *et al.* (1997) et Craven *et al.* (2001) ont pu isoler *C. perfringens* avec une prévalence de 75 à 95%. Ces variations constatées peuvent être expliquées par les différentes méthodologies utilisées pour l'isolement, la sélection des échantillons (le nombre et la nature des échantillons) et la gestion des élevages de volaille (utilisation ou non d'antibiotiques en tant que promoteurs de croissance dans les aliments).

C. perfringens est considéré comme étant un organisme commensal de l'intestin (Petit *et al.*, 1997). Pour cette raison, il faut différencier entre les souches toxigènes de celles qui sont non toxigènes. Nos résultats ont révélé que sur les 62 souches de *C. perfringens* isolées, 52 souches (83,87%) étaient toxigènes et 10 souches non toxigènes prouvés par le test de létalité sur souris et le test de la réaction de Nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique. Les résultats obtenus sont en partie en accord à ceux démontrés par El Jakee *et al.* (2013) qui ont enregistré une incidence des souches toxigènes de *C. perfringens* de 69,8%, tandis que, ceux non toxigènes était 30,2%. Le taux élevé des souches toxigènes de *C. perfringens* enregistré dans notre étude confirme le rôle de cette bactérie dans l'apparition de la maladie en raison de la forte production de toxines responsable de la destruction de la muqueuse intestinale.

La caractérisation moléculaire des souches toxigènes de *C. perfringens*

C. perfringens est associée à sa capacité à sécréter des toxines majeures et mineures qui jouent un rôle important dans la pathogénie et l'induction de la maladie. Le typage moléculaire de *C. perfringens* par la PCR multiplex est une méthode rapide et efficace. Dans notre étude le typage de 52 souches toxigènes de *C. perfringens* par la PCR multiplex a révélé que toutes les souches étaient *C. perfringens* type A. Ceci est en accord avec les études précédentes menées par Keyburn *et al.* (2006), Crespo *et al.* (2007), Svobodova *et al.* (2007), Drigo *et al.* (2008) et Trinh *et al.* (2010). Tandis que, *C. perfringens* type C et D n'ont pas pu être isolés à partir des poulets de chair qui ont démontré l'EN, ceci est en désaccord avec les résultats de Shane *et al.* (1984) et Heier *et al.* (2001), qui ont isolé *C. perfringens* type D et type C à partir de poulets chair souffrant de la maladie.

Plusieurs études récentes ont démontrées l'implication d'autres toxines dans l'induction de l'EN. La plus intéressante d'entre elles est la toxine NetB, une toxine capable de causer des lésions typiques d'EN dans des modèles expérimentaux (Keyburn *et al.*, 2008). Depuis la découverte de ce nouveau facteur de virulence, la présence du gène *netB* dans les souches de *C. perfringens* a été étudiée dans différentes régions du monde. Selon notre étude, sur une sélection de 22 souches toxigènes de *C. perfringens* type A analysées par PCR uniplex, aucune des souches étaient positives pour la toxine NetB. Ces résultats sont similaires aux résultats des travaux de Datta *et al.* (2014) qui ont enquêté sur la présence du gène *netB* dans 26 souches de *C. perfringens* type A et ont démontré qu'aucune des souches n'étaient positives pour ce gène. Les mêmes résultats ont été rapportés par Thomas *et al.* (2014) qui ont enregistré que les souches de *C. perfringens* testées pour la présence du gène *netB* étaient négatives. A l'inverse, plusieurs études ont démontrées la présence du gène *netB* parmi une grande variété de souches de *C. perfringens*. Johansson *et al.* (2010) ont étudié la prévalence du gène *netB* et ont rapporté que plus de 90 % des souches isolées à partir d'organes présentant des lésions spécifiques d'EN portaient le gène *netB*. De plus, la présence de ce gène a été étudiée sur 36 souches de *C. perfringens* provenant d'élevages infectés et a été détecté sur 19 souches avec un taux de 52.8% par Tolooe *et al.* (2011). L'absence de ce gène dans notre étude peut être expliquée par le nombre insuffisant d'échantillons analysés, l'origine des échantillons selon l'expression de la maladie, ou bien l'inexistence de ce gène dans notre région.

En conclusion, les résultats de l'expérimentation 1 ont démontré que *C. perfringens* agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que le type A était l'étiologie la plus prédominante de l'EN. Par conséquent, une attention considérable devrait être accordée dans la prévention de cette maladie, car *C. perfringens* type A est considéré comme l'une des causes les plus importantes des toxi-infections d'origine alimentaire chez l'humain.

Toutes les souches toxigènes de *C. perfringens* type A sélectionnés ont été négatifs pour le gène *netB*. Cette constatation représente le premier rapport sur la détection du gène *netB* dans les souches algériennes de *C. perfringens*.

Expérimentation 2

Depuis l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'alimentation des volailles, de nombreuses études ont été publiées décrivant des stratégies alternatives pour prévenir différentes maladies. Un accent particulier a été mis sur la prévention de l'EN chez les volailles causée par *C. perfringens* par l'utilisation de microbes ou de produits dérivés de microbes (Caly *et al.*, 2015). Dans notre étude, l'objectif était d'évaluer, dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis à un facteur prédisposant (coccidies), l'intérêt de la complémentation alimentaire en probiotique en tant qu'alternative à l'utilisation des antibiotiques. Notre évaluation s'est basée, plus précisément, sur l'impact de l'addition de *Pediococcus acidilactici* ou de *Saccharomyces cerevisiae* sur les performances de croissance, les paramètres cliniques et lésionnels ainsi que la morphométrie intestinale et celle de la bourse de Fabricius.

Le model expérimental décrit dans ce présent travail a été basé sur les recommandations de Shojadoost *et al.* (2012), qui ont rapporté qu'une reproduction expérimentale de l'EN, afin de tester différents moyens de prévention contre cette maladie, peut être réalisée par l'utilisation d'un vaccin anticoccidien vivant atténué 10 fois la dose recommandée (correspondant à 17000-23000 oocystes), comme facteur prédisposant, associé à des inoculations par *C. perfringens* (10^7 - 10^9 UFC/ml), et que l'administration de ce facteur prédisposant doit être faite au maximum 4-5 jours avant les inoculations de la bactérie, de sorte que les dommages induits par les coccidies coïncident avec les inoculations de *C. perfringens*.

Dans la présente étude, nos résultats ont révélé une amélioration significative du gain de poids et de l'indice de consommations des poulets qui ont reçu une alimentation supplémentée en probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*), et cela avant l'inoculation du *C. perfringens* et du vaccin anticoccidien (à J15), confirmant ainsi les résultats d'études antérieures montrant que les probiotiques ont un rôle potentiel dans l'amélioration des performances de croissance (Onifade *et al.*, 1999; Santin *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Après infection par une overdose (17550 oocystes/sujet) du vaccin anticoccidien (à J15) et inoculation de *C. perfringens* pendant 3 jours, une

augmentation significative de l'indice de consommation a été enregistrée pour le groupe infecté par *C. perfringens* et non supplémenté en probiotiques par rapport au groupe témoin non infecté et non supplémenté. Cet effet négatif de l'infection par *C. perfringens* pourrait être lié aux dommages causés à la muqueuse intestinale susceptibles d'affecter l'absorption des aliments et donc leurs utilisations, se traduisant ainsi par une baisse des performances de croissance (Dahiya *et al.*, 2007). Notons que le groupe CpC (inoculé avec des coccidies et des clostridies, non supplémenté en probiotique) a présenté des valeurs d'indice de consommation significativement supérieures par rapport au groupe Cp (inoculé par les clostridies, non supplémenté en probiotique). Ceci suggère que l'utilisation du vaccin anticoccidien avec une dose de 17550 oocystes comme facteur prédisposant est capable d'amplifier l'effet négatif d'une infection par *C. perfringens*. Ces résultats sont en accord avec les résultats des travaux de Abudabos et Yehia (2013); Abudabos et Alyemni (2013) et Eeckhaut *et al.* (2016) qui ont utilisé le vaccin anticoccidien (Paracox[®]-8) 10 fois la dose (23000 oocystes) associé à une infection par *C. perfringens* pour reproduire une EN, afin de tester différents traitements contre cette maladie.

En comparant les groupes infectés et supplémentés en probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*) avec le groupe CpC, aucune différence significative n'a été enregistrée pour le gain de poids. Par contre, nous avons constaté une diminution significative de l'indice de consommation, liée à la légère baisse de l'ingéré alimentaire puisque la croissance est très peu modifiée. Ceci traduit une meilleure efficacité de transformation de l'aliment correspondant à une meilleure utilisation digestive sûrement en rapport avec l'action de ces probiotiques. D'autres études ont rapporté les mêmes résultats. Hofacre *et al.* (2003) ont examiné l'effet du Mannane-oligosaccharide dérivé de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans un modèle expérimentale d'EN, et ont rapporté qu'il n'y avait pas de différence significative pour le gain de poids. Cependant, une amélioration significative a été constatée pour la conversion alimentaire. Abudabos et Yehia (2013) ont pu conclure dans une expérience réalisée sur des poulets de chair pendant 30 jours que l'utilisation d'un extrait de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans un modèle d'infection expérimentale par *C. perfringens* soumis à un facteur prédisposant (coccidies), peut améliorer de manière significative l'indice de consommation des poulets. De plus,

M'Sadeq *et al.* (2015) ont rapporté que l'utilisation de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans l'alimentation des poulets de chair soumis à une EN expérimentale, peut améliorer les performances de croissance.

L'effet bénéfique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* peut être expliqué par le fait qu'elle réduit d'une façon indirecte les réactions de stress des oiseaux en augmentant l'absorption des vitamines, la synthèse des enzymes et le métabolisme des protéines, permettant ainsi une meilleure digestion et absorption des nutriments qui se traduit par une amélioration des performances de croissance. Elle améliore aussi par un mécanisme indirect l'efficacité de la réponse immunitaire des oiseaux, en augmentant la réponse antigénique au niveau de la muqueuse intestinale permettant ainsi une meilleure protection contre les agents pathogènes (Zhang *et al.*, 2005).

Les mêmes résultats ont été constatés pour les bactéries lactiques probiotiques. Plusieurs études ont rapporté un effet positif de leur utilisation sur les performances de croissance. Une amélioration significative du gain de poids et de l'indice de consommation a été enregistrée au cours d'une étude sur l'effet de la supplémentation alimentaire en *Bacillus subtilis* sur des poulets de chair soumis à une EN expérimentale par Tactacan *et al.* (2013). De plus, Zhou *et al.* (2016) ont évalué l'effet de *Bacillus licheniformis* sur les performances de croissance de poulets de chair soumis à une infection expérimentale par *C. perfringens*, et ont rapporté que son utilisation peut améliorer de manière significative le gain de poids et l'indice de consommation malgré l'infection par *C. perfringens*, expliquant ainsi que ces effets sont principalement attribués au fait que *Bacillus licheniformis* peut améliorer la digestion des éléments nutritifs et leurs utilisations par les poulets de chair, en produisant plusieurs enzymes, telles que la lipase, la protéase et l'amylase.

L'effet bénéfique observé dans notre étude suite à la supplémentation alimentaire par *Pedococcus acidilactici* des poulets de chair sur les performances de croissance, peut être expliqué par le fait qu'elle peut créer un environnement favorable en produisant de l'acide lactique (abaissant le pH) et en permettant seulement la croissance de *Pedococcus acidilactici*, entraînant des conditions défavorables pour la croissance des agents pathogènes par phénomène d'exclusion compétitive (Satheesh *et al.*, 2012), se traduisant par une meilleure santé intestinale, améliorant ainsi l'absorption et l'utilisation des nutriments.

Il est intéressant de noter que dans nos conditions d'élevage, les probiotiques (*Pedococcus acidilactici* et *Sacharomyces cerevisiae*) ont permis une amélioration significative de la conversion alimentaire des poulets de chair, soumis à une infection expérimentale par l'utilisation d'une overdose du vaccin anticoccidien associée à des inoculations de *C. perfringens*, et cette amélioration a permis à ces poulets de chair, d'atteindre des performances de croissance comparables à celle du groupe témoin (non infecté et non supplémenté).

Selon les résultats enregistrés pour le score lésionnel, l'utilisation du vaccin anticoccidien 10 fois la dose associée à une infection par *C. perfringens* a provoqué une augmentation du score lésionnel par rapport au groupe infecté *C. perfringens* qui lui-même a présenté un score plus élevé de manière significative par rapport au groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté), suggérant ainsi que l'utilisation d'une overdose du vaccin anticoccidien associée à une infection par *C. perfringens* peut accentuer la gravité des lésions due à *C. perfringens* au niveau intestinale, ce qui explique l'augmentation observée de l'indice de consommation précédemment discuter pour le groupe CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté) qui a enregistré la valeur la plus élevée. Cependant, nous avons constaté que le score 2 était le plus élevé lors de la notation des lésions, nous conduisons ainsi à suggérer qu'il y a eu une installation d'une entérite nécrotique sub-clinique, confirmer par une conversion alimentaire médiocre du groupe CpC. Ces résultats sont en accord avec plusieurs chercheurs qui ont utilisé le vaccin anticoccidien 10 fois la dose associé à *C. perfringens* pour reproduire expérimentalement une EN (Abudabos et Yehia, 2013; Abudabos et Alyemni, 2013; Eeckhaut *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

Cependant, nos résultats montrent une diminution significative du score lésionnel des groupes infectés et supplémentés en probiotiques (*Pedococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*) par rapport au groupe CpC. Cela suggère qu'il y a eu peut être un effet protecteur de ces probiotiques contre les lésions induites par les inoculations. Ces résultats sont similaires aux résultats des travaux de M'Sadeq *et al.* (2015) qui ont rapporté que la supplémentation alimentaire en paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est efficace dans la réduction des lésions induites par une infection expérimentale à *C. perfringens*. De même, Xue *et al.* (2017) ont pu conclure dans une étude sur les effets de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*, que la complémentation alimentaire par cette dernière peut offrir une

protection contre une entérite nécrotique sub-clinique induite expérimentalement chez les poulets de chair. Par contre, d'autres études ont enregistré un effet négatif de la supplémentation de *Saccharomyces cerevisiae* et ces dérivés sur l'amélioration des lésions dues à une infection à *C. perfringens* (Hofacre *et al.*, 2003; Ao *et al.*, 2012). Ces variations constatées peuvent être expliquées par la nature de l'effet protecteur de la levure qui est indirecte en le comparant par exemple aux antibiotiques qui agissent directement sur les agents pathogènes en les détruisant (Bactéricides) ou en inhibant leurs développements (Bactériostatiques). Alors que la levure probiotique peut agir en renforçant l'immunité et en améliorant le développement de la microflore intestinale, réduisant ainsi les effets néfastes des agents pathogènes, ce qui explique des réponses différentes d'un hôte à l'autre.

En ce qui concerne la bactérie lactique probiotique (*Pediococcus acidilactici*), plusieurs travaux ont rapporté un effet bénéfique de l'utilisation des bactéries lactiques probiotiques dans la protection contre l'installation des lésions engendrées par une infection à *C. perfringens*. Tactacan *et al.* (2013) ont enregistré un effet protecteur de la supplémentation des spores de *Bacillus subtilis* (QST 713) contre l'apparition des lésions d'EN. Une amélioration de la santé et de l'intégrité intestinale a été constatée par Jayaraman *et al.* (2013) suite à l'utilisation d'une supplémentation alimentaire en *Bacillus subtilis* (PB6) chez des poulets de chair soumis à un modèle expérimentale d'EN. De plus, Knap *et al.* (2013) ont pu conclure qu'une complémentation alimentaire en spores de *Bacillus licheniformis* comme probiotique peut améliorer le score lésionnel d'une EN induite expérimentalement chez des poulets de chair.

L'action bénéfique des bactéries lactiques probiotiques est attribuée à leur capacité à produire de l'acide lactique, rendant le milieu intestinal défavorable pour le développement des agents pathogènes, diminuant ainsi leur impact négatif sur la santé intestinale. Ainsi qu' à leur effet sur les toxines dérivées des agents pathogènes, tel que la sécrétion des protéases qui agissent sur la toxine alpha produite par *C. perfringens* (Titball *et al.*, 1999), ou la production des bactériocines qui sont actives contre différentes souches de *Clostridium*, réduisant ainsi leurs proliférations (Teo et Tan, 2005).

L'étude de la morphométrie intestinale dans notre essai a révélé une augmentation de la longueur de l'intestin des groupes infectés et supplémentés en probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*) par rapport aux groupes infectés et non supplémentés, représentée par des valeurs statistiquement non significative à J21 ($p=0,52$) et significative à j28 ($p<0,05$). Cette augmentation a pour conséquence l'accroissement de la surface d'absorption intestinale qui se traduit par une meilleure utilisation des nutriments, confirmant ainsi l'amélioration de la conversion alimentaire des groupes infectés et supplémentés en probiotiques observée précédemment. Plusieurs recherches ont été réalisées sur l'effet des probiotiques sur la morphométrie intestinale dans un modèle d'infection expérimentale d'EN, mais en se basant principalement sur les mesures des villosités intestinales. Ainsi, ces études ont rapporté une nette amélioration des dimensions des villosités (Ao *et al.*, 2012; Abudabos et Yehia, 2013; Jayaraman *et al.*, 2013; M'Sadeq *et al.*, 2015), suggérant que l'augmentation de la taille et du volume des villosités intestinales peuvent induire un accroissement de l'efficacité de transformation alimentaire, se traduisant par une meilleure valorisation digestive de l'aliment.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que l'addition des probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*) a réduit légèrement et de manière significative le diamètre de la bourse de Fabricius rapporté au poids vif, alors qu'aucune différence significative n'a été enregistrée pour le poids et le diamètre de la bourse de Fabricius ainsi que son poids relatif. On suggère que l'augmentation de la taille de la bourse de Fabricius surtout pour le groupe CpC (infecté coccidies et clostridies, non supplémenté) qui a présenté la valeur la plus élevée par rapport aux autres groupes, est peut être due à une réponse immunitaire élevée vis à vis de l'inoculation des coccidies associée à une infection par *C. perfringens*. Ces résultats sont partiellement en accord avec Van den berg *et al.* (2000) qui ont rapporté qu'une infection par le virus de la bursite infectieuse provoque une hypertrophie de la bourse de Fabricius qui dure pendant trois à quatre jours, alors qu'à partir du cinquième jour, la bourse retrouve une taille normale et s'atrophie dès le huitième jour. Ceci peut expliquer l'augmentation de la taille de la bourse observée dans notre étude suite à l'infection, Par contre l'atrophie qui suit l'hypertrophie suite à l'infection par le virus de la bursite infectieuse, peut être due au tropisme direct du virus sur la bourse, contrairement à notre étude où l'infection était localisée au niveau intestinale. Nous

pensons que si l'hypertrophie de la bourse est induite indirectement par une réaction immunitaire au niveau intestinale, cela peut expliquer la persistance de cette hypertrophie tant que les lésions intestinales durent. Par contre, nous avons constaté une taille plus réduite de la bourse de Fabricius pour les groupes infectés et supplémentés en probiotiques, dont les valeurs étaient proches de celles du groupe T (témoin, non infecté, non supplémenté), cela nous amène à penser que les probiotiques ont peut-être pu protéger ou atténuer l'effet de l'infection au niveau intestinale, qui s'est traduite par une réaction immunitaire plus faible, et par conséquent une taille plus réduite de la bourse de Fabricius. Des travaux ultérieurs devraient préciser les mécanismes impliqués.

En conclusion, les résultats de l'expérimentation 2 montrent, d'une part, que l'utilisation d'un vaccin anticoccidien 10 fois la dose associé à des inoculations par *C. perfringens* a permis une reproduction expérimentale d'une entérite nécrotique subclinique : Les effets indésirables de l'infection ont entraîné une conversion alimentaire médiocre, une augmentation du score lésionnel (≤ 2) et une diminution de la longueur totale de l'intestin.

D'autre part, pour atténuer les effets négatifs d'une entérite nécrotique subclinique chez les poulets de chair, la supplémentation alimentaire en probiotiques (*Pediococcus acidilactici* ou *Saccharomyces cerevisiae*) s'avère bénéfique vu l'amélioration significative de la conversion alimentaire et la nette réduction du score lésionnel dans ces conditions.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus et les observations faites pendant cette étude ont permis de répondre à certaines interrogations, mais ont aussi contribué à soulever d'autres questionnements.

Dans un premier temps, très peu d'informations relatives à la prévalence des souches de *C. perfringens* dans les élevages de poulets de chair en Algérie sont actuellement disponibles, alors que *C. perfringens* est considéré parmi les espèces bactériennes les plus souvent incriminées comme cause de toxi-infections alimentaires chez les humains (Fisher *et al.*, 2005). Nos résultats ont permis de mettre en évidence le *C. perfringens* type A dans les élevages de poulets de chair en niveau de la région de Tiaret avec une absence du gène *netB* sur les souches sélectionnées, il serait intéressant de mener d'autres investigations sur un plus grand nombre d'échantillons, et sur d'autres régions au niveau de l'Algérie.

Selon les résultats de l'expérimentation 2, l'usage des probiotiques (*P. acidilactici* et *S. cerevisiae*) comme complément alimentaire chez les poulets de chair peuvent atténuer les effets négatifs d'une entérite nécrotique sub-clinique. Il semble être nécessaire de poursuivre les études sur les mécanismes d'action de ces additifs impliqués dans la protection contre cette maladie.

Des études ultérieures devraient en outre essayer de préciser l'impact de ces suppléments sur l'état immunitaire des poulets, par une analyse des paramètres sanguins. D'autres études histopathologiques devraient mieux préciser le rôle protecteur de ces probiotiques contre les effets néfastes des toxines secrétées par le *C. perfringens* sur l'intégrité de la muqueuse intestinale.

Enfin, il semble être nécessaire de prolonger la période de supplémentation jusqu'à 49 jours (cycle complet d'élevage), afin de bien étudier l'impact de ces probiotiques sur les performances de croissance des poulets de chair soumis à une EN expérimentale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abudabos, A. M., Yehia, H. M. 2013. Effect of dietary mannan oligosaccharide from *Saccharomyces cerevisiae* on live performance of broilers under *Clostridium perfringens* challenge. Ital. J. Anim. Sci. 12 (2) e38. doi: 10.4081/ijas.2013.e38
- Abudabos, A. M., Alyemni, A.H., 2013. Effects of the Essential Oil Blend CRINA® Poultry in Feed on Broiler Performance and Gut Microbiology. Ital. J. Anim. Sci. 12(4) 4, e83.doi: 10.4081/ijas.2013.e83
- Adil, S., Banday, T., Bhat, G.A., Mir, M.S., Rehman, M., 2010. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. Vet. Med. Int. 479-485. doi: 10.4061/2010/479485
- Allaart, J.G., Van Asten, A. J., Grone A. 2013. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 36(5): 449-64. doi: 10.1016/j.cimid.2013.05.001
- Alloui, N., Bennoune, O., 2013. Poultry production in Algeria: Current situation and future prospects. World. Poult. Sci. J. 69(3): 601-612. doi: 10.1017/S0043933913000615
- Alsheikhly, F., Truscott, R.B., 1977a. Interaction of *Clostridium Perfringens* and Its Toxins in Production of Necrotic Enteritis of Chickens. Avian. Dis. 21, 256-263.
- Alsheikhly, F., Truscott, R.B., 1977b. Pathology of Necrotic Enteritis of Chickens Following Infusion of Broth Cultures of *Clostridium perfringens* Into duodenum. Avian. Dis. 21, 230-240.
- Amerah, A.M., Péron, A., Zaefarian, F., Ravindran, V., 2011. Influence of whole wheat inclusion and a blend of essential oils on the performance, nutrient utilisation, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. Br. Poult. Sci. 52(1), 124-132. doi: 10.1080/00071668.2010.548791
- Amrouche, T., 2005. Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : Analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université de Laval.
- Ao, Z., Kocher, A., Choct, M., 2012. Effects of dietary additives and early feeding on performance, gut development and immune status of broiler chickens

challenged with *Clostridium perfringens*. Asian-australas. J. Anim. Sci. 25, 541-551. doi:10.5713/ajas.2011.11378

Arbuckle, J. B. R., 1972. The attachment of *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. J. Pathol. 106.

B

Barbara, A.J., Trinh, H.T., Glock, R.D., Glenn Songer, J., 2008. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. Vet. Microbiol. 126, 377-382. doi: 10. 10 16/j.vetmic.2007.07.019

Barnes, E. M., Impey, C. S., Cooper, D. M., 1980. Manipulation of the crop, and intestinal flora of the newly hatched chick. Am. J. Clin. Nutr. 33, 2426–2433.

Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol. 100 (1-2), 11-16. doi: 10.1016/S0378-1135(03)00126-3

Belaid, D., 2015. Elevage Avicole En Algérie. In: collection dossiers agronomiques. Edition 2015. pp 1-66.

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. Poult. Sci. 85, 1151-1164.

Brennan, J., Moore, G., Poe, S.E., Zimmermann, A., Vessie, G., Barnum, D.A., Wilson, J., 2001. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. Poult. Sci. 80, 1451-1454.

Brennan, J., Skinner, J., Barnum, D. A., Wilson, J., 2003. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with na²rasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. Poult. Sci. 82, 360-363.

C

Caly, D.L., D’Inca, R., Auclair, E., Drider, D., 2015. Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist’s Perspective. Front. Microbiol. 6, 1336. doi:10.3389/fmicb.2015.01336.

Cao, L., Yang, X. J., Li, Z. J., Sun, F. F., Wu, X. H., Yao, J. H. 2012. Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.20291. Poult. Sci. 91, 3065–3071. doi: 10. 33 82/ps.2012-02548

- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 159-161. doi: 10.1093/ jac/ dkg 313
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Hunter, D.B., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Jiang, Y.F., 2008. Multilocussequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J. Clin. Microbiol.* 46(12), 3957-3964. doi: 10.1128/JCM.01548-08
- Chikindas, M. L., Garcia-Garcera, M. J., Driessen, A. J. M., Ledeboer, A. M., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Abee T., Konings, W. N., Venema, G., 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3577-3584.
- Choct, M., Hughes, R.J., Bedford, M.R., 1999. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *Br. Poult. Sci.* 40, 419-422. doi: 10.1080/00071669987548
- Cooper, K.K., Songer, J.G., 2009. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe.* 15, 55-60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.01.006
- Cooper, K.K., Songer, J.G. 2010. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 142, 323-328. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.065
- Cooper, K.K., Songer, J.G., Uzal, F.A., 2013. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 314-327. doi: 10.1177/1040638713483468
- Cooper, K.K., Theoret, J.R., Stewart, A., Trinh, H.T., Glock, R.D., Songer, J.G., 2010. Virulence for chickens of *Clostridium perfringens* isolated from poultry and other sources. *Anaerobe.* 16 (3), 289–292. doi : 10.1016 /j.anaerobe. 2010. 02.006
- Coursodon, C.F., Glock, R.D., Moore, K.L., Cooper, K.K., Songer, J.G., 2012. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe.* 18, 117–121.
- Coursodon, C.F., Trinh, H.T., Mallozzi, M., Vedantam, G., Glock, R.D., Songer, J.G., 2010. *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. *Anaerobe.* 16(6), 614-617. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.09.006

- Craven, S.E., 2000. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet stressed and unstressed broiler chickens. Poult. Sci. 79, 843–849.
- Craven, S.E., Stern, N.J., Bailey, J.S., Cox, N.A., 2001. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian. Dis. 45, 887-896.
- Craven, S. E., Cox, N. A., Bailey, J. S., Cosby. D. E., 2003. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. Avian. Dis. 47, 707-711.
- Crespo, R., Fisher, D.J., Shivaprasad, H.L., Fernandez – Miyakawa, M.E., Uzal, F.A., 2007. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 329-333. doi:10.1177/107710900701900321
- Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marimo, B.R., Swain, R.H., 1975. In: Medical Microbiology 12th ed. Vol. II, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., 2007. Review article: yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharmacol. Ther. 26(6), 767-768. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x

D

- Dahiya, J.P., Hoehler, D., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., 2007. Dietary encapsulated glycine influences *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* growth in the gastrointestinal tract of broiler chickens. J. Nutr. 137, 1408–1414.
- Dahiya, J.P., Hoehler, D., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., 2005. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and lactobacilli populations in broiler chickens. Poult. Sci. 84 (12), 1875–1885.
- Dahiya, J.P., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. Anim. Feed. Sci. Technol. 129(1-2), 60-88. doi: 10.1016/j.anifoodsci.2005.12.003
- Datta, S., Rakha, N.K., Narang, G., Arora, D., Mahajan, N.K., 2014. Prevalence of α , β and Netb toxin producing strains of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in Haryana. Haryana. Vet. 53, 39-42.
- Davis, G.S., Anderson, K.E., 2002. The effects of feeding the direct-fed microbial, primalac, on growth parameters and egg production in single comb white leghorn hens. Poult. Sci. 81(6), 755-759.

- De Cesare, A., Borilova, G., Svobodova, I., Bondioli, V., Manfreda, G., 2009. *Clostridium perfringens* occurrence and ribotypes in healthy broilers reared in different European countries. Poult. Sci. 88(9), 1850-1857. doi: 10.3382/ps.2009-00131.
- Dhama, K., Singh, S. D., 2010. Probiotics improving poultry health and production: an overview. Poult. Punch. 26 (3), 41.
- Dhama, K., Verma, V., Sawant, P. M., Tiwari, R., Vaid, R. K., Chauhan, R.S., 2011. Applications of Probiotics in Poultry: Enhancing Immunity and Beneficial Effects on Production Performances and Health - A Review. J. Immunol. Immunopathol. 13(1), 1-19.
- Dhillon, A. S, Roy, P., Lauerman, L., Schaberg, D., Weber, S., Bandli, D., Wier, F., 2004. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. Avian. Dis. 48, 675-80.
- Dibner, J.J., Buttin, P., 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. J. Appl. Poult. Res. 11, 453-463.
- Dixon, R.C., Hamilton, P.A.T.B., 1981. Effect of feed ingredients on the antifungal activity of propionic acid. Poult. Sci. 60, 2407-2411.
- Djouini, M., 2006. Prévalence de l'entérite nécrotique chez le poulet de chair dans la région de Tébessa. Thèse magistère. Département vétérinaire d'El Khroub. Faculté des sciences. Université Mentouri de Constantine, Algérie. 137 pages.
- Dorsa, W.J., 1997. New and established carcass decontamination procedures commonly used in the beef-processing industry. J. Food. Prot. 60, 1146-1151.
- Drigo, I., Agnoletti, F., Bacchin, C., Bettini, F., Cocchi, M., Ferro, T., Marcon, B., Bano, L., 2008. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. Ital. J. anim. Sci., (7), 397-400. doi: 10.4081/ijas.2008.397
- Durand-Chaucheyras, F., Fonty G., Bertin, G., 1997. L'utilisation de levures vivantes, additif microbiens chez le ruminant : Effets sur la microflore et les fermentations ruminales, effets zootechniques. Bulletin des G.T.V. no.5B. 576, 35-52.

E

- Eeckhaut, V., Wang, J., Van Parys, A., Haesebrouck, F., Joossens, M., Falony, G., Raes, J., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2016. The Probiotic *Butyrivibrio* *pullicaeorum* Reduces Feed Conversion and Protects from Potentially Harmful Intestinal Microorganisms and Necrotic Enteritis in Broilers. Front. Microbiol. 7, 1416. doi: 10.3389/fmicb.2016.01416

- El-Jakee, J., Nagwa, S.A., Mona, A.E., Azza, S.M.A., Riham, H. H., Shawky, N.M Shawky, H.M., 2013. Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from poultry. Global. Vet. 11 (1), 88-94.
- Elwinger, K., Teglöf, B., 1991. Performance of broiler chickens as influenced by a dietary enzyme complex with and without antibiotic supplementation. Arch. Gefluegelk. 55 (2), 69-73.
- Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., 2002. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. Brit. Poult. Sci. 43, 569–579. doi: 10.1080 /0 0071 66 022000004480
- Enstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen., Baverud, A., Gunnarsson A ., 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. Vet. Microbiol. 94, 225-235.
- Erkkilä, S., Petäjä. E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat. Science. 55 (3), 297-300.

F

- Fernandes da Costa, S. P., Mot, D., Bokori-Brown, M., Savva, C. G., Basak, A. K., Van Immerseel, F., 2013. Protection against avian necrotic enteritis after immunization with NetB genetic or formaldehyde toxoids. Vaccine 31,4003–4008. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.063
- Fernandez-Miyakawa, M.E., Marcellino, R., Uzal, F.A., 2007. *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 184-186. doi: 10.1177/104063870701900208
- Fisher, D.J., Miyamoto, K., Harrison, B., Akimoto, S., Sarker, M.R., McClane, B.A., 2005. Association of beta 2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastro - intestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Vet. Microbiol. 56, 747-762. doi: 10.1111/j.1365-2958. 200 5.04573.x
- Ficken, MD., Wages, D., 1997. Necrotic enteritis. In: Diseases of poultry 10th ed. Iowa State University Press, London. pp. 261–264.
- Fowler, J., Kakani, R., Haq, A., Byrd, J. A., Bailey, C. A., 2015. Growth promoting effects of prebiotic yeast cell wall products in starter broilers under an immunestress and *Clostridium perfringens* challenge. J. Appl. Poult. Res. 24, 66–72. doi: 10.3382/japr/pfv010
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. Gut. 32(4), 439-442.

G

- Gagon, M., 2007. Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale : Analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins. Thèse Doctorat. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université de Laval., 155 pages.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int. J. Food. Microbiol. 141(Suppl. 1), S15–S28. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M., Hugas, M., 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. J. Appl. Microbiol. 84(1), 125-132.
- Gaucher, M-L., 2016. Étude de l'impact de deux traitements, dont un sans antibiotiques, sur la santé digestive et les populations de *Clostridium perfringens* dans des élevages de poulets de chair. Thèse Doctorat. Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Canada. 285 pages.
- George, B. A., Quarles, C. L., Fagerberg, D. J., 1982. Virginiamycin effects on controlling necrotic enteritis infection in chickens. Poult. Sci. 61, 447-450.
- Gharaibeh, S., Al Rifai, R., Al-Majali, A., 2010. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. Anaerobe. 16, 586–589.
- Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., 2006. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. Vet. Microbiol. 113, 143-152. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.023
- Guarner, F., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., 2011 World Gastroenterology Organisation : Practice Guidelines Probiotics and Prebiotics.

H

- Hajati, H., Rezaei, M., 2010. The application of probiotics in poultry production. Inter. J. Poult. Sci., 9, 298-304.
- Harley, J.P., Klein, D.A., Prescott, L.M., Sherwood, L.M., Willey, J.M. Woolverton, C.J., 2010. La chimiothérapie antimicrobienne. In : Microbiologie 3^{ème} ed. de Boeck edition. Paris.

- Harmon, S., 1984. *Clostridium perfringens*: enumeration and identification. In: FDA Bacteriological Analytical Manual. Association of Official Analytical Chemists., Arlington, VA. pp 1701-1710.
- Hassan, H.M.A., Mohamed, M.A., Youssef, A.W., Hassan, E.R., Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance and intestinal microflora of broilers. Asian-Australasian. J. Anim. Sci. 23, 1348-1353. doi: 10.5713/ajas.2010.10085
- Heier, B.T., Lovland, A., Soleim, K.B., Kaldhusdal, M., Jarp, J., 2001. A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* Alpha toxin in Norwegian broiler flocks. Avian. Dis, 45, 724-732, doi: 10.2307/1592919
- Helmboldt, C.F., Bryant, E.S., 1971. Pathology of Necrotic Enteritis in Domestic Fowl. Avian Dis. 15(4), 775-780. doi: 10.2307/1588866
- Hermans, P.G., Morgan, K.L., 2007. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. Avian. Pathol. 36, 43-51.
- Hofacre, C. L., Beacorn, T., Collett, S., Mathis, G., 2003. Using competitive exclusion, mannan oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. J. Appl. Poult. Res. 12, 60–64. doi: 10.1093/japr/12.1.60
- Higgins, J.P., Higgins, S.E., Wolfenden, A.D., Henderson, S.N., Torres-Rodriguez, A., 2010. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on Salmonella Enteritidis in neonatal broilers. Poult. Sci. 89(2), 243-247. doi: 10.3382/ps.2009-00436
- Hume, M.E. 2011. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. Poult. Sci. 90(11), 2663-2669. doi: 10.3382/ps.2010-01030
- Humphrey, T., 2006. Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. Br. Poult. Sci. 47(4), 379-391. doi: 10.1080/00071660600829084

J

- Jackson, M.E., Anderson, D.M., Hsiao, H.Y., Mathis, G.F., Fodge, D.W., 2003. Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. Avian. Dis. 47, 759-763. doi: 10.1637/7024
- Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Hong, Y. H., 2012. Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide ISA71VG adjuvant increases protection against

- experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. *Vaccine* 30, 5401–5406. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.007
- Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., Chirakkal, H., 2013. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 92, 370–374. doi: 10.3382/ps.2012-02528
- Jerzsele, A., Szeker, K., Csizinszky, R., Gere, E., Jakab, C., Mallo, J. J., 2012. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poult. Sci.* 91(4), 837-843. doi: 10.3382/ps.2011-01853
- Jiang, Y., Kulkarni, R. R., Parreira, V. R., Prescott, J. F. 2009. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens* - induced necrotic enteritis using purified recombinant immunogenic proteins. *Avian. Dis.* 53, 409 – 415. doi: 10.1637/8656-021109-Reg.1
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S., 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 79, 886–891.
- Johansson, A., Aspan, A., Kaldhusdal, M., Engstrom, B.E., 2010. Genetic diversity and prevalence of *netB* in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 144(1-2), 87-92. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.017
- Johnson, S., Gerding, D.N., 1997. Enterotoxemic infections. In: *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. Academic Press, London, San Diego, CA. pp. 117-140.
- Jukes, T.H., Hill, D.C. Branion, H.D., 1956. Effect of feeding antibiotics on the intestinal tract of the chick. *Poult. Sci.* 35, 716-723.

K

- Kaldhusdal, M., Skjerve, E., 1996. Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Prev. Vet. Med.* 28, 1-16.
- Kalender, H., Erta, H.B. 2005. Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 847-851.

- Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J., Rood, J.I., 2010a. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* (Basel). 2, 1913-1927. doi: 10.3390/toxins2071913
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS. Pathog.* 4(2), e26.
- Keyburn, A.L., Portela, R.W., Ford, M.E., Bannam, T.L., Yan, X.X., Rood, J.I., 2013a. Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Vet. Res.* 44, 108. doi: 10.1186/1297-9716-44-108
- Keyburn, A.L., Portela, R.W., Sproat, K., Ford, M.E., Bannam, T.L., Yan, X., 2013b. Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Vet. Res.* 44, 54. doi: 10.1186/1297-9716-44-54
- Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson MM, Awad MM, Rood JI, Moore RJ., 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74, 6496-6500. doi: 10.1128/IAI.00806-06
- Keyburn, A.L., Yan, X.X., Bannam, T.L., Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., 2010b. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet. Res.* 41(2), 21. doi: 10.1051/vetres/2009069
- Kirouani, L., 2015. Structure et organisation de la filière avicole en Algérie. Cas de la wilaya Bejaia. *El-Bahith Review.* 15/2015. 187-199.
- Kleesen, B., Hartmann, L., Blaut, M., 2003. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *Brit. J. Nutr.* 89, 597–606.
- Knap, I., Lund, B., Kehlet, A.B., Hofacre, C., Mathis, G., 2013. *Bacillus licheniformis* prevents necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian. Dis.* 54(2), 931-925. doi: 10.1637/9106-101509-ResNote.1
- Kocher, A., 2003. Nutritional manipulation of necrotic enteritis outbreak in broilers. *Rec. Adv. in Ani Nutri. in Australia.* 14, 111-116.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., 1992. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.

- Kulkarni, R. R., Parreira, V. R., Sharif, S., Prescott, J. F. 2007. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. Clin. Vaccine. Immunol. 14, 1070–1077. doi: 10.1128/CVI.00162-07
- Kum, S., Eren, U., Onol, A.G., Sandikci, M., 2010. Effects of dietary organic acid supplementation on the intestinal mucosa in broilers. Rev. Med. Vet.10, 463-468.
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., 2004. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. Food. Addit. Contam. 21(9), 817-823. doi: 10.1080/02652030310001639530

L

- Langhout, P., 2000. New additives for broiler chickens. World. Poult. 16, 22-27.
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jeong, W., Jeoung, H.Y., An, D.J., 2011. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. Poult. Sci. 90, 1381-1390. doi: 10.3382/ps.2010-01319
- Lepp, D., Gong, J., Songer, J.G., Boerlin, P., Parreira, V.R., Prescott, J.F., 2013. Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. J. bacteriol. 195(6), 1152-1166. doi: 10.1128/JB.01032-12
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V.R., Marri.,R., Rosey, E.L., Gong, J., 2010. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. PLoSOne. 5(5), e10795. doi: 10.1371/journal.pone.0010795
- Lilly, D. M., Stillwell, R. H., 1965. "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." Sci. 147(3659), 747-748.
- Lindstrom, M., Heikinheimo, A., Lahti, P., Korkeala, H., 2011. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. Food microbiol. 28(2), 192-198. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.020
- Long, J.R., 1973. Necrotic Enteritis in Broiler Chickens .1. Review of Literature and Prevalence of Disease in Ontario. Can. J. Comp. Med. 37(3), 302-308.
- Long, J. R., Petit, J. R., Barnum, D. A., 1974. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. Can. J. Comp. Med. 38, 467-74.
- Long, J. R., Truscott, R. B., 1976. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Reproduction of the disease. Can. J. Comp. Med. 40, 53-59.

- Lovland, A., Kaldhusdal, M., 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. Avian. Pathol. 30, 73-81. doi: 10.1080/03079450020023230
- Lovland, A., Kaldhusdal, M., Redhead, K., Skjerve, E., Lillehaug, A. 2004. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. Avian. Pathol. 33(1), 83-92.
- Lyons T. P., Jacques, K. A., Dawson, K. A., 1993. Miscellaneous products from yeast. In: The Yeasts Vol. 5. Academic Press, New York. pp 293-324.

M

- MARD., 2012. Le renouveau agricole et rural en marche : revue et perspective. (Bir Mourad Rais Algiers, official printing press).
- M'Sadeq, S.A., Wu, S.B., Choct, M., Forder, R., Swick, R.A., 2015. Use of yeast cell wall extract as a tool to reduce the impact of necrotic enteritis in broilers. Poult. Sci. 94, 898-905. doi: 10.3382/ps/pev035
- Macfaddin, J.F., 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria 3rd ed., Lippincott Williams & wilkins, Philadelphia.
- McReynolds, L., Byrd, J.A., Anderson, R.C., Moore, R.W., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Poole, T.L., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., 2004. Evaluation of Immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. Poult. Sci. 83, 1948–1952.
- McReynolds, J., Waneck, C., Byrd, J., Genovese, K., Duke, S., Nisbet, D. 2009. Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phyto-genetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. Poult. Sci. 88, 2075–2080. doi: 10.3382/ps.2009-00106.
- Manfreda, G., bondioli, V., De Cesare, A., Franchini, A., 2006. Quantitative evaluation of *Clostridium perfringens* in Italian broilers. Poult. Sci. 62 (Suppl.), 91-92.
- Marden, J.P., 2007. Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant: Approch thermodynamique chez la vache laitière, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.F., Rambaud, J.C. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose : An in vivo study in lactase-deficient humans. Br. J. Nutr. 64 (1), 71-9.

- Martin, T.G., Smyth, J.A., 2009. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet. Microbiol.* 136(1-2), 202-205. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.026
- McDevitt, R.M., Brooker, J.D., Acamovic, T., Sparks, N.H.C., 2006. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *Worlds. Poult. Sci. J.* 62, 221-247.
- McDougald, L.R., 2005. Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. *Avian. Dis.* 49, 462–476.
- Metchnikoff, E., 1907. *The prolongation of life.* GP Putnam's Sons. New York & London.
- Miyamoto, K., Yumine, N., Mimura, K., Nagahama, M., Li, J., McClane, B.A., 2011. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS One.* 6(5):e20376.
- Miwa, N., Nishina T., Kubo, S., Honda, H., 1997. Most probably numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 557-560.
- Moore, P.R., Evenson, A., 1946. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biol Chem.* 165(2):437-441.
- Morris, W.E., Fernandez-Miyakawa, M.E. 2009. Toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Argent. Microbiol.* 41, 251-260.
- Mouna, A., 2012. Aptitude des anticoccidiens ionophores à inhiber l'entérite nécrotique chez le poulet dans les conditions d'un modèle expérimentale. Thèse magistère. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach, Algérie. 87 pages.
- Mot, D., Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2014. Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian. Pathol.* 43, 290-300. doi: 10.1080/03079457.2014.939942
- Mueller, K., Blum, N.M., Kluge, H., Mueller, A.S., 2012. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic and antioxidant enzymes in broiler chickens. *Br. J. nutr.* 108(4), 588-602. doi: 10.1017/S0007114511005873
- Muir, W. I., Bryden, W. L., Husband, A. J. 2000. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 325–342. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00081-6

Murrell, T. G. C., Egerton, J. R., Rampling, A., Samels, J., Walker, P. D., 1966. The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrome in man in New Guinea. J. Hyg. Camb. 64(3), 375-396.

N

Nairn, M.E., Bamford, V.W., 1967. Necrotic enteritis of broiler chickens in Western Australia. Aust. Vet. J. 43, 49-54.

Nauerby, B., Pedersen, K., Madsen, M., 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. Vet. Microbiol. 94(3), 257-66.

Niilo, L., 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. Can. Vet. J. 21(5), 141-148.

Nowell, V. J., Poppe, C., Parreira, V. R., Jiang, Y. F., Reid-Smith, R., Prescott, J. F. 2010. *Clostridium perfringens* in retail chicken. Anaerobe. 16, 314-315. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.11.004

O

Olkowski, A. A., Wojnarowicz, C., Chirino-Trejo, M., Drew, M. D., 2006. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. Res. Vet. Sci. 81, 99-108.

Onifade, A. A., Odunsi, A. A., Babatunde, G. M., Olorede, B. R., Muma. E., 1999. Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low-protein and high-fiber diets fed to broiler chicken. Arch. Anim. Nutr. 52:29–39.

Opengart, K., 2008. Necrotic enteritis. In Diseases of Poultry 12th ed. Iowa: Blackwell Publishing, pp. 872-879.

O'Toole, P. W., Cooney, J. C., 2008. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2008, ID 175285, 9. doi : 10.1155/2008/175285

P

Pageot, M., Primault, F., 2016. Le point sur les probiotiques en parodontologie et odontologie conservatrice en 2015. Thèse de fin étude. Faculté d'odontologie, Université de rennes 1, France. 147 pages.

- Pan, D., Yu, Z., 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut. Microb.* 5, 108–119. doi: 10.4161/gmic.26945
- Panda, A.K., Rama Rao, S.S., Raju, M.V.L.N., Sharma, S.S., 2008. Effect of probiotic (*Lactobacillus sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders. *J. Sci. Food. Agri.* 88(1), 43-47. doi: 10.1002/jsfa.2921
- Parent, E., 2015. Caractérisation et évaluation de la virulence de souches cliniques de *Clostridium perfringens* chez le poulet à griller élevé sans antibiotique. Thèse magistère. Département de sciences cliniques. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal, Canada. 102 pages.
- Parish, W.E., 1961. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *J. Comparative. Pathol.* 71, 377.
- Parreira, V.R., Costa, M., Eikmeyer, F., Blom, J., Prescott, J.F., 2012. Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoSOne.* 7(11), e49753. doi: 10.1371/journal.pone.0049753
- Patel, S., Goyal, A., 2012. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech.* 2, 115–125. doi: 10.1007/s13205-012 0044-x
- Patterson, J.A., Burkholder, K.M., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82(4), 627-631.
- Peek, H.W., Landman, W.J., 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 31, 143-161. doi: 10. 10 80/ 01652176.2011.605247
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends. Microbiol.* 3, 104-110.
- Pinchasov, Y., Noy, Y., 1993. Comparison of post- hatch holding time and subsequent early performance of broiler chicks and Turkey poults. *Br. Poult. Sci.* 34(1), 111-120. doi: 10.1080/00071669308417567
- Prescott, J. F., Sivendra R., Barnum D. A., 1978. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. *Can. Vet. J.* 19,181-183.

Q

- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R., 1994. *Clostridium* species. In *Clinical veterinary microbiology*. Mosby, Edinburgh, Scotland. pp. 191-208.

R

- Rantala, M., Nurmi, E. 1973. Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. Br. Poult. Sci. 14, 627–630. doi: 10.1080/00071667308416073
- Rautava, S., Isolauri, E., 2002. The development of gut immune responses and gut microbiota : effects of probiotics in prevention and treatment of allergic disease. Curr. Issues. Intest. Microbiol, 2002.
- Riddell, C., Kong, X.M., 1992. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. Avian. Dis. 36, 499-503.
- Rolfe, R.D., 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastro intestinal health. J. Nutr. 130(2 S Suppl), 396S-402S.
- Rose, A.H., 1987. Yeast culture, a microorganism for all species: A theoretical look at its mode of action. In: Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, Kentucky, U.S.A. pp. 113-118.

S

- Saita, M., Bano, L., Gallazzi, D.D., 2009. Pathogenicity markers of *Clostridium* spp. In commercial turkeys. Ital. J. Anim. Sci. 8:781-784.
- Santin, E., A. Maiorka, M., Macari, M., Grecco, J. C., Sanchez, T. M., Okada, A., Myasaka, M., 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall J. Appl. Poult. Res. 10:236–244.
- Satheesh, Y., Reddy, K.K., Gupta, P.S.P., Mallikarjuna, P.V.R., Reddy, Y.R. Kumar, M.K., 2012. Effect of feeding *Pediococcus acidilactici* on performance of broiler chicken and microstructures of intestinal villus. Indian. J. Poult. Sci. 47(3), 357-362.
- Schocken-Iturrino, R.P., Vittori, J., Beraldo-Massoli, M.C., Delphino, T.P.C. Damasceno, P.R., 2009. *Clostridium perfringens* search in water and ration used in the raising of broiler in sheds of São Paulo State – Brazil. Ciênc. Rural. 40, 1. doi: 10.1590/S0103-84782010000100033

- Schocken-Iturrino, R.P., Vittori, J., Massoli, M.C.B., Meirelles, Gama, L.F.S.A., 2013. Presence of *Clostridium perfringens* in broiler from chicken farms in Ribeirão Preto-sp. ARS. Vet. 29, 37-41. doi: 10.15361/2175-0106.2013v29n1p37-41
- Schneitz, C. 2005. Competitive exclusion in poultry — 30 years of research. Food. Contr. 16, 657–667. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.06.002
- Shane, S.M., Koetting, D.G., Harrington, K.S., 1984. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. Avian. Dis. 28(4):1120-1124.
- Sharma, J. M. 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. Adv. Vet. Med. 41, 481–494. doi: 10.1016/S0065-3519(99)80036-6
- Shojadoost, B., Vince, A.R., Prescott, J.F., 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. Vet. Res. 43,74. doi: 10.1186/1297-9716-43-74.43.
- Si, W., Ni, X., Gong, J., Yu, H., Tsao, R., Han, Y., 2009. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. J. Appl. Microbiol. 2009, 106(1), 213-20. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03994
- Sinlae, M., Choct, M., 2000. Xylanase supplementation affects the caecal microflora of broilers. In: Proceeding of the Australian poultry science symposium, vol. 12, Sydney. pp 209.
- Smyth, J.A., Martin, T.G., 2010. Disease producing capability of netB positive isolates of *Clostridium perfringens* recovered from normal chickens and a cow, and netB positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. Vet. Microbiol. 146, 76-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.022
- Smith, H.W., 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. J. Pathol. Bacteriol. 90, 495-513.
- Smith, L.D., Holdeman, L.V., 1968. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. 1st ed, Charles C-Thomas Publisher, USA. pp 201-205.
- Songer, J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 1996, 9(2), 216-234.
- Songer, J.G., 1997. Clostridial diseases of animals. In The clostridia: molecular biology and pathogenesis. Academic Press, London, San Diego, CA. pp. 153-182.
- Songer, J.G., Meer, R.R. 1996. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. Anaerobe. 2,197-203.

- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W., 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Sci.* 289 (5483), 1352-1355.
- Svobodova, I., Steinhauserova, I., Nebola, M., 2007. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in the Czech Republic. *Acta. Vet. Brno.* 76, S25-S30. doi: 10.2754/avb200776S8S025

T

- Tactacan, G. B., Schmidt, J. K., Mülle, M. J., Jimenez, D. R., 2013. A *Bacillus subtilis* (QST 713) spore-based probiotic for necrotic enteritis control in broiler chickens, *J. Appl. Poult. Res.* 22 (4), 825–831, doi.org/10.3382/japr.2013-00730
- Teo, A. Y., Tan, H., 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4185–4190.
- Tolooe, A., Shojadoost, B., Peighambar, S.M., Tamaddon, Y., 2011. Prevalence of *netB* gene among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased chicks. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 106-110. doi: 10.3923/javaa.2011.106.110
- Torres-Rodriguez, A., Donoghue, A.M., Donoghue, D.J., Barton J.T., Tellez, G., Hargis, B.M., 2007. Performance and condemnation rate analysis of commercial turkey flocks treated with a *Lactobacillus* spp.-based probiotic. *Poult. Sci.*, 86, 444-446.
- Thomas, P., Arun, T. R., Arthik, K. K., Berin, P. V., Kumar, M. A., Usharani, M. P., Gupta, S. K., Dhama, K., Viswas, K. N., 2014. Molecular characterization and toxinotyping of a *Clostridium perfringens* isolate from a case of necrotic enteritis in Indian kadaknath fowl. *Asian. J. Anim. Vet. Adv.* 9, 385-394. doi: 10.3923/ajava.2014.385.394
- Thompson, D.R., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Prescott, J.F., 2005. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 113, 25–34. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.015
- Timbermont, L., De Smet, L., Van Nieuwerburgh, F., Parreira, V.R., Van Driessche, K., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Prescott, J.F., Deforce, D., Devreese, B., Van Immerseel, F., 2014. Perfrin, a novel bacteriocin associated with *netB* positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Vet. Res.* 45, 40. doi: 10.1186/1297-9716-45-40

- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian. Pathol.* 40, 341-347. doi: 10.1080/03079457.2011.590967
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Gholamiandehkordi, A.R., Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2009. Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp. Immun. Microbial. Infect. Dis.* 32, 503-512.
- Timmerman, H.M., Veldman, A., van den Elsen, E., Rombouts, F.M., Beynen, A.C. 2006. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poult. Sci.* 85, 1383–1388.
- Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K., 1999. The *Clostridium perfringens* alpha toxin. *Anaerobe.* 5, 51–64. doi: 10.1006/anae.1999.0191
- Trinh, H.T., Mallozzi, M., Vedantam, G., Songer, J.G., 2010. *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. *Anaerobe.* 16, 614-617. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.09.006
- Truscott, R. B., Al-Sheikhly, F. 1977. Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. *Am J Vet Res* 38:857-61.
- Tschirdewahn, B., Notermans, S., Wernars, K., Untermann, F., 1991. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int. J. Food. Microbiol.* 14, 175-178.

U

- Uzal, F.A., Freedman, J. C., Shrestha, A., Theoret, R., Garcia, J., Awad M.M., Adam, S.V., Moore, R.J., Rood, J., McClane, B., 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future. Microbiol.* 9, 361-377.
- Uzal, F.A., McClane, B.A., Cheung, J.K., Theoret, J., Garcia, J.P., Moore, R.J., 2015. Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. *Vet. Microbiol.* 179 (1-2), 23-33 doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.013

V

- Van den Berg, T.P., Eterradossi, N., Toquin, D., Meulemans, G., 2000. La bursite infectieuse (maladie de Gumboro). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 19 (2), 509-526.

- Van der Sluis, W., 2000 . Clostridial enteritis is an often underestimated problem. World. Poult. 16, 42-43.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R, 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. Avian. Pathol. 33, 537-549.
- Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., Titball, R.W., 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. Trends. Microbiol. 17, 32-36.
- Vittorio, S. A., Mauro, F., Carla, B., Giovanna, D. D., Giovanni, S., Horses. E., 2005. Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* dans la ration de poulets de chair sur les performances zootechniques et la microflore intestinale. Pages 208–211 in Proc. 6th Poultry Research Days, St. Malo, France.

W

- Wages DP: 1997, Ulcerative enteritis (quail disease). In: Diseases of poultry 11th ed. Iowa State University Press, London. pp. 776–781.
- Wang, H., Ni, X., Qing, X., Zeng, D., Luo, M., Liu, L., Li, G., Pan, K., Jing, B., 2017. Live Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 Promotes Growth Performance and Lowers Fat Deposition by Improving Lipid Metabolism, Intestinal Development, and Gut Microflora in Broilers. Front. Microbiol. 8, 1073. doi:10.3389/fmicb.2017.01073
- Wealleans, A. L., Litten-Brown, J. C., 2010. The potential of probiotics as in-feed growth enhancers for swine. Food Science and Technology Bulletin: Funct. Foods. 7, 65-75.
- Welch, W. H., Flexner, S., 1896. Observations concerning *Bacillus aerogenes capsulatus*. J. Exp. Med. 1, 4505-4510.
- Wells, C.L., Wilkins, T.D., 1996. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In Medical Microbiology 4th ed. Galveston (TX).
- Wicker, D. L., Iscrigg, W. N., Trammell, J. H., 1977. The control and prevention of necrotic enteritis in broilers with zinc bacitracin. Poult. Sci. 56, 1229-1231.
- Williams, R.B., 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. Avian. Pathol. 34(3), 159-80. doi: 10.1080/03079450500112195
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of Probiotics in food including powder milk

with live lactic acid bacteria. Probiotics in food : Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Cordoba Argentina, oct. 2001.

- Wu, S.B., Stanley, D., Rodgers, N., Swick, R.A., Moore, R.J., 2014. Two necrotic enteritis predisposing factors, dietary fishmeal and *Eimeria* infection, induce large changes in the caecal microbiota of broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 169, 188-97. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.007

X

- Xue, G-D., Wu, S-B., Choct, M., Swick, R. A., 2017. Effects of yeast cell wall on growth performance, immune responses and intestinal short chain fatty acid concentrations of broiler in an experimental necrotic enteritis model. *Anim. Nutr.* doi: 10.1016/j.aninu.2017.08.002

Y

- Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y., Park, Y.H., 1996. Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. *J. Med. Microbiol.* 35 (1), 228-232.

Z

- Zhang, A.W., Lee, B.D., Lee, S.K., Lee, K.W., An, G.H., Song, K.B., Lee, C.H., 2005. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Sci.* 84:1015-1021.
- Zeissler, J., Rassfeld-Sternberg, L., 1949. Enteritis necroticans due to *Clostridium welchii* type F. *Brit. Med. J.* 1(4597), 267–269.
- Zhou, M., Zeng, D., Ni, X., Tu, T., Yin, Z., Pan, K., Jing B., 2016. Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Lipids. Health. Dis.* 15(1), 1–10. doi:10.1186 /s12944-016-0219-2

Annexe 1: Fiche technique EmeraldAmp GT PCR master mix

EmeraldAmp® GT PCR Master Mix

Code No. RR310Q

Size : 1 ml
(for 40 PCR reactions)Shipping at - 80 °C
Store at - 20 °C

Components (for 160 reactions, 50 µl each) :

EmeraldAmp GT PCR Master Mix

(2X Premix)

1 ml

dH₂O

1 ml

Lot No.

Conc. :

Volume :

Description :

EmeraldAmp GT PCR Master Mix is a 2X premix composed of a DNA polymerase, optimized reaction buffer, dNTPs, and a density reagent. The premix also contains a vivid green dye that will separate into blue and yellow dye fronts when run on an agarose gel. The premix simplifies PCR assembly; simply add primers, template, and water and start the reaction. After PCR, the reaction mixture can be applied directly to a gel for analysis.

Shipping : dry ice (-80°C)**Storage :** -20 °C (or 4 °C for 3 months)

If the premix will be used frequently, store at 4°C; repeated freezing and thawing will decrease activity. Mix the premix gently and briefly centrifuge before use.

Applications :

DNA amplification by PCR

Colony PCR

PCR screening

PCR Test :

Premix performance was confirmed by robust amplification of a 3.9 kb fragment from the human IGF2R gene.

General PCR Mixture (Total 50 µl) :

EmeraldAmp GT PCR Master Mix (2X Premix)	25 µl
Template	< 500 ng
Forward Primer	0.2 µM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 µM (final conc.)
dH ₂ O (Sterile distilled water)	up to 50 µl

Suggested PCR Conditions :**3 Step (up to 6 kb)**

98°C	10 sec.	} 30 cycles
60°C *	30 sec.	
72°C	1 min./kb	

2 Step (over 6 kb)

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	1 min./kb	

* For optimal results, primers should have a T_m >60°C. The following formula is commonly used for estimating the T_m of the primers.

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{NA} + \text{NT}) + 4(\text{NG} + \text{NC}) - 5$$

N : the number of adenine (A), thymidine (T), guanine (G), or cytosine (C) bases in the primer

(Note) Denaturation conditions vary depending on the thermal cycler and tubes used for PCR. Denaturation for 5 - 10 sec. at 98°C or 20 - 30 sec. at 94°C is recommended.

PCR product :

PCR products generated with EmeraldAmp GT PCR Master Mix have a single A at the 3'-termini, and PCR products can be directly cloned into a T-vector. It is also possible to clone products into blunt-end vectors after blunting and phosphorylation of the ends.

Dye marker migration :

When 5 µl of the reaction mixture is used for electrophoresis on a 1% Agarose L03 (Cat. #5003) gel, the blue dye front migrates near 3 - 5 kb and the yellow dye front is below 50 bp.

EmeraldAmp is a registered trademark of TAKARA BIO INC.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

v2013120a

Annexe 2: Fiche technique du probiotique *Pediacoccus acidilactici***BACTOCELL®****BACTÉRIE LACTIQUE MONOGASTRIQUES**

BACTOCELL® est un concentré de ferment lactique développé spécifiquement pour la nutrition et la santé des monogastriques.

La souche de ferment lactique (*Pediacoccus acidilactici* MA18/5M) a été sélectionnée pour ses propriétés spécifiques:

- Production massive et exclusive d'acide lactique L+,
- Régulation des écosystèmes microbiens,
- Réduction des microorganismes indésirables,
- Robustesse et stabilité.

GARANTIES

SOUCHE DE BACTÉRIE LACTIQUE :

- Espèce *Pediacoccus acidilactici* enregistrée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, Paris) sous le numéro MA 18/5 M. (Autorisation Européenne : 9 pour porcelet et E1712 pour porcs engrais et poulet de chair)

	BACTOCELL®
CONCENTRATION MA 18/5M (ufc*/g)	1.0×10^{10}
CONSERVATION**	12 mois

*unité formant colonie. ** conservé en emballage fermé, stocké dans un endroit frais et sec.

DOSES D'UTILISATION (dans l'aliment)

	BACTOCELL®	
	g/tonne	ufc*/kg
• PORC		
• PORCELET JUSQU'À 35KG	100 g	1×10^9
• PORC À L'ENGRAIS	100 g	1×10^9
• VOLAILLE		
• POULET DE CHAIR (démarrage/croissance/finition)	de 100 g à 1000 g	de 1×10^9 à 1×10^{10}
• PONDEUSE***	100 g	1×10^9
• DINDE***	100 g	1×10^9
• AUTRES VOLAILLES***	100 g	1×10^9
• AQUACULTURE		
• SALMONIDE & POISSON MARIN***	100 g	1×10^9
• CREVETTE***	de 500 g à 1000 g	de 5×10^9 à 1×10^{10}

***Autorisé dans de nombreux pays (USA...) mais pas sous la législation additif européen

MÉTHODES D'ANALYSE

Comptage de cellules vivantes par dilution décimale dans milieu M.R.S. agar incubées à 37°C.

Normes NF V 08-010 et NF V 08-100. Identification génétique : électrophorèse en champ pulsé.

SÉCURITÉ D'EMPLOI

De part ses composants, BACTOCELL® est sans toxicité. Il ne laisse aucun résidu et ne nécessite aucune période de retrait.

PRÉSENTATION

Caisse outre de 20 kg avec sachet aluminisé.

Bactocell® est aussi disponible en : • carton de 5kg contenant 10 boîtes PE de 500 g.
• carton de 25kg contenant 5 sachets aluminisés de 5 kg.



www.lallemand.com
animal@lallemand.com

LALLEMAND SAS
19, rue des Briquetiers - BP 59
31702 Blagnac Cedex - FRANCE
Tel: +33(0) 5-62-74-55-55
Fax: +33(0) 5-62-74-55-00

BCTSL17L24006
CP BCT - 4347-40
CP BCT1000000 - 4347-10
CP BCT1000000 - 4347-10

Annexe 3: Fiche technique du probiotique *Saccharomyces cerevisiae*

Fiche de spécification

LEVUCELL®SB

LEVURE SPÉCIFIQUE MONOGASTRIQUE

LEVUCELL®SB est un concentré de levure active développé spécifiquement pour la nutrition et la santé des monogastriques.

La souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1079) a été sélectionnée pour ses propriétés spécifiques :

- **Interaction microbienne : diminue la concentration de microorganismes pathogènes,**
- **Renforcement de l'équilibre de la flore intestinale,**
- **Stimulation des défenses de l'animal.**

GARANTIES**SOUCHE DE LEVURE :**

- **Espèce :** *Saccharomyces cerevisiae* type *boulardii* enregistrée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris) sous le numéro I-1079. Autorisation Européenne E1703 pour truies (gestation et lactation) et porcelets.

	LEVUCELL SB20	LEVUCELL SB10 ME
CONCENTRATION CNCM 1079 (ufc/g)	2.0x10 ¹⁰	1.0x10 ¹⁰
CONSERVATION**	16 mois	12 mois

* unité formant colonie. ** conservé en emballage fermé, stocké dans un endroit frais et sec.

DOSES D'UTILISATION (dans l'aliment)

Doses légales européennes	LEVUCELL SB20	LEVUCELL SB10 ME
	g/tonne	g/tonne
PORCELETS JUSQU'À 35 KG	de 100 à 300g	de 200 à 600g
TRUIES (gestation & lactation)	de 50 à 300g	de 100 à 600g

MÉTHODES D'ANALYSES

Dénombrement de colonies sur milieu gélosé (méthode sur demande). Identification génétique : PCR (Polymerase Chain Reaction).

SÉCURITÉ D'EMPLOI

De part ses composants, LEVUCELL®SB est sans toxicité. Il ne laisse aucun résidu et ne nécessite aucune période de retrait.

PRÉSENTATION

Pour le Levucell SB 20 and SB10ME : Caisse outre de 20 kg avec sachet aluminisé respectivement sous vide et sous atmosphère contrôlée.

Le Levucell SB20 est aussi disponible en carton de 10 kg contenant 20 sachets aluminium sous vide de 500 g.

LALLEMAND

www.lallemand.com
animal@lallemand.com

LALLEMAND SAS
19, rue des Briquetiers - BP 59
31702 Blagnac Cedex - FRANCE
Tel: +(33) 5-62-74-55-55
Fax: +(33) 5-62-74-55-00

LSB/SL/PR/2206
CP 2023-10-10
CP 2023-10-10 : 100-10
CP 2023-10-10 : 100-10

Nutrition Animale

Annexe 4: Fiche technique du vaccin anticoccidien utilisé dans l'expérimentation 2

HIPRACOX®**Suspension buvable et agent colorant pour pulvérisation****NOM ET ADRESSE DU TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ ET DU TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE FABRICATION RESPONSABLE DE LA LIBÉRATION DES LOTS, SI DIFFÉRENT:**

LABORATORIOS HIPRA, S.A.
Avda. la Selva, 135
17170 AMER (Girona) ESPAGNE

LISTE DES SUBSTANCES ACTIVES:

Composition par dose (0,007 ml) d'aérosol HIPRACOX:

Substance(s) active(s):

- Une dose de vaccin de 0,007 ml contient les nombres suivants d'ocystes sporulés dérivés de cinq lignées précoces atténuées de coccidies:

<i>Eimeria acervulina</i> , souche 003	300-390 (*)
<i>Eimeria maxima</i> , souche 013	200-260 (*)
<i>Eimeria mitis</i> , souche 006	300-390 (*)
<i>Eimeria praecox</i> , souche 007	300-390 (*)
<i>Eimeria tenella</i> , souche 004	250-325 (*)

(*) Selon les procédures in-vitro utilisées par le fabricant pendant le mélange et à la libération.

Agent colorant UNIFLOCK 0,02 ml/dose.

Suspension buvable trouble légèrement brunâtre à blanche.

INDICATIONS:

Chez les poulets de chair:

- Immunisation active afin de réduire la colonisation intestinale, les lésions intestinales et les signes cliniques de coccidiose causés par *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* et *E. tenella*.

L'immunité commence 14 jours après la vaccination et la durée de la protection se maintient pendant au moins 28 jours.

CONTRE-INDICATIONS:

Aucune.

EFFETS INDESIRABLES:

Après la vaccination, aucun effet indésirable n'a été observé.

Si vous constatez des effets indésirables graves ou d'autres effets ne figurant pas sur cette notice, veuillez en informer votre vétérinaire.

L'utilisation de ce type de vaccins peut occasionnellement donner lieu à une réduction passagère du gain de poids quotidien sans conséquences sur les performances finales.

ESPECES CIBLES:

Poulets de chair.

POSOLOGIE POUR CHAQUE ESPECE, VOIE(S) ET MODE D'ADMINISTRATION:

Orale par pulvérisation.

Poulet: 0,007 ml vaccin/oiseau + 0,02 ml UNIFLOCK (agent colorant)/oiseau, âgé d'1 jour.

Il faut un récipient adéquat et propre ayant une capacité suffisamment grande (287 ml pour 1000 doses ou 1435 ml pour 5000 doses).

Ajouter de l'eau propre à température ambiante (260 ml pour 1000 doses ou 1300 ml pour 5000 doses).

Agiter le flacon d'UNIFLOCK (agent colorant). Verser dans de l'eau et remuer doucement jusqu'à homogénéisation complète.

Agiter le flacon d'HIPRACOX. Remplir le vaporisateur avec le mélange tout en maintenant son homogénéité.

Remplir le réservoir à vaccin du système de vaporisation avec la suspension préparée.

Vaporiser 28 ml du mélange sur 100 poussins. La pression du vaporisateur doit être égale à 3 bars. Le diamètre des gouttelettes pulvérisées doit être égal ou supérieur à 100 µm.

CONSEILS POUR UNE ADMINISTRATION CORRECTE:

Les poulets doivent être strictement élevés au sol sur litière.

La litière devra être retirée et l'équipement et le matériel nettoyés entre les cycles de production afin de réduire le champ d'infection.

Après la vaccination, maintenir les poussins dans les box à poussins pendant au moins 1 heure.

Ensuite, placer les poussins sur la litière et poursuivre les pratiques habituelles d'administration.

N'utiliser qu'UNIFLOCK (agent colorant).

TEMPS D'ATTENTE:

Zéro jour.

CONDITIONS PARTICULIÈRES DE CONSERVATION:

HIPRACOX: À conserver et transporter réfrigéré entre 2 °C et 8 °C. Conserver à l'abri de la lumière. Ne pas congeler.

UNIFLOCK (agent colorant): À conserver à une température ne dépassant pas 25 °C. Ne pas congeler. Ne pas utiliser après la date de péremption figurant sur l'étiquette.

Durée de conservation après première ouverture du conditionnement primaire: Utiliser le vaccin immédiatement après ouverture et jeter le vaccin non utilisé.

Durée de conservation après dilution ou reconstitution conforme aux instructions: 10 heures.

Tenir hors de la portée et de la vue des enfants.

MISE(S) EN GARDE PARTICULIÈRE(S):

Ne pas vacciner les oiseaux en mauvaise santé ou stressés.

Ne pas utiliser chez les oiseaux destinés à la ponte, œuf de consommation ou à la reproduction.

Ne pas mélanger avec d'autres médicaments vétérinaires à l'exception du solvant ou d'autre composant fourni pour être utilisé avec ce produit.

Aucun médicament anticoccidien ou aucun autre agent ayant une activité anticoccidienne ne doit être administré via la nourriture ou l'eau pendant au moins 3 semaines après la vaccination des poussins. Cela pourrait gêner la réplication adéquate des ocystes du vaccin et par conséquent, le développement d'une immunité solide. En outre, l'étendue de la protection produite par ré-infections ocystiques serait également limitée.

Se laver les mains et désinfecter l'équipement après utilisation.

Nettoyer la zone affectée avec de l'eau et du savon dans un cas de renversement accidentel du produit sur la peau. En cas d'ingestion accidentelle du produit, demander immédiatement conseil auprès du médecin et lui montrer la notice ou l'étiquette du médicament.

Le vaccin ne protégera que les poulets et pas d'autres espèces contre la coccidiose et il n'est efficace que contre les espèces d'*Eimeria* indiquées.

Aucune information n'est disponible concernant l'innocuité et l'efficacité de ce vaccin lorsqu'il est utilisé avec un autre médicament vétérinaire. Par conséquent, la décision d'utiliser ce vaccin avant ou après un autre médicament vétérinaire doit être prise au cas par cas.

PRECAUTIONS PARTICULIÈRES POUR L'ÉLIMINATION DES MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES NON UTILISÉS OU DES DÉCHETS DÉRIVÉS DE CES MÉDICAMENTS, LE CAS ÉCHÉANT:

HIPRACOX: Éliminer les déchets par ébullition, incinération ou immersion dans un désinfectant approprié approuvé par les autorités compétentes.

UNIFLOCK (agent colorant): Les conditionnements vides et tout reliquat de produit doivent être éliminés suivant les pratiques en vigueur régies par la réglementation sur les déchets.

DATE DE LA DERNIÈRE NOTICE APPROUVÉE: 09/07/2012

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES:

Afin de stimuler l'immunité active contre la coccidiose causée par *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* et *Eimeria tenella*.

Présentation de vente:**HIPRACOX**

Boîte en carton contenant un flacon de 1000 doses.

Boîte en carton contenant un flacon de 5000 doses.

Boîte en carton contenant 10 flacons de 1000 doses.

Boîte en carton contenant 10 flacons de 5000 doses.

Boîte en carton contenant 5 flacons de 5000 doses.

Boîte en carton contenant 6 flacons de 5000 doses.

Conditionnement UNIFLOCK (agent colorant)

Boîte en carton contenant un flacon de 1000 doses.

Boîte en carton contenant un flacon de 5000 doses.

Boîte en carton contenant 10 flacons de 1000 doses.

Boîte en carton contenant 10 flacons de 5000 doses.

Boîte en carton contenant 5 flacons de 5000 doses.

Boîte en carton contenant 6 flacons de 5000 doses.

Toutes les présentations HIPRACOX ou UNIFLOCK (agent colorant) peuvent ne pas être commercialisées.

TENIR HORS DE LA PORTEE ET DE LA VUE DES ENFANTS.

A USAGE VÉTÉRINAIRE.

A NE DELIVRER QUE SUR ORDONNANCE VÉTÉRINAIRE.

EXPLOITANT: HIPRA FRANCE

7 rue Roland Garros, Batiment H

44700 - Orvault - FRANCE

Tél. - 02 51 80 77 91 Fax - 02 51 80 82 20

e-mail: france@hipra.com

CATÉGORIE:

Accessible aux groupements agréés pour la production avicole, volailles et oiseaux.



LABORATORIOS HIPRA, S.A. Avda. la Selva, 135 - 17170 Amer (Girona) Spain

Tel. (34) 972 43 06 60. Fax (34) 972 43 06 61. hipra@hipra.com

702058-02.0

09-15