

Méthodologies pour choisir et caractériser des extraits de plantes et évaluer leurs activités biologiques sur l'immunité des poulets

Angélique TRAVEL¹, Rodrigo GUABIRABA², Olivia TAVARES³, Denis BELLENOT⁴, Benjamin LEMAIRE⁴, Hanh DUFAT⁵, Christine FILLIAT⁶, Jean-Yves FERRE⁷, Fabien SKIBA⁸, Margot LAMARQUE⁸, Marion PERTUSA¹, Laurence A. GUILLOTEAU⁹

¹ITAVI, l'Orfrasière, 37380, Nouzilly, France

²INRAE, Université de Tours, ISP, 37380, Nouzilly, France

³ITAB, 75595, Paris, France

⁴ITEIPMAI, Melay, 49120, Chemillé-en-Anjou, France

⁵PNAS, CITCOM-UMR CNRS 8038/Université de Paris-Faculté de Santé, Pharmacie, 75006, Paris, France

⁶Cabinet Vétérinaire Vétopole 26, 26300, Châteauneuf-Sur-Isère, France

⁷SNGTV, Labovet Conseil Réseau cristal, 85505, Les Herbiers, France

⁸Nutricia, route de Saint Sever, 40280, Haut-Mauco, France

⁹INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, Nouzilly, France

Courriel : Laurence.Guilloteau@inrae.fr

■ Les propriétés des plantes intéressent de plus en plus les entreprises de la nutrition animale pour soutenir les fonctions immunitaires des volailles dans un objectif de gestion intégrée de la santé. Cela nécessite de disposer de méthodologies et d'outils complémentaires, adaptés et fiables, qui restent encore limités dans la littérature scientifique, pour évaluer la qualité et la valeur ajoutée fonctionnelle des extraits de plantes pour la santé des poulets. Cet article présente une démarche applicable à tous types d'extraits végétaux.

Introduction

Les plantes sont utilisées depuis très longtemps dans toutes les cultures, notamment pour leurs vertus dites médicinales et constituant la base de la phytothérapie. Chez les volailles, les extraits de plantes introduits dans l'alimentation sont utilisés essentiellement pour améliorer leurs performances zootechniques et la qualité des produits (viande, œufs).

L'alimentation animale est très encadrée réglementairement (règlements R178/2002¹, R183/2005², R767/2009³ et R1831/2003⁴ et Directive 2002/32⁵). Les plantes et produits à base de plantes peuvent entrer dans l'alimentation des animaux en tant que matières premières (listées dans le catalogue du règlement R1017/2017⁶) ou additifs, et sont incorporés dans des aliments composés. Chaque additif utilisé en alimentation animale est évalué sur la base d'un

dossier montrant son efficacité et son innocuité selon des conditions particulières (décris dans le R429/2008⁷) et est autorisé dans une catégorie ou un groupe fonctionnel selon un règlement spécifique, par exemple certains extraits de plantes sont autorisés en substances aromatiques. En revanche, tout aliment pour animaux ayant une allégation de prévention, traitement ou guérison d'une maladie passe dans la catégorie médicamente vétérinaire. Ce statut

1 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R0178&qid=1653378088721&from=FR>

2 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0183&qid=1653378857301&from=FR>

3 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0767&qid=1653379258452&from=FR>

4 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&qid=1653379331683&from=FR>

5 https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aca28b8c-bf9d-444f-b470-268f71df28fb.0007.02/DOC_1&format=PDF

6 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1017&from=CS>

7 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0429&qid=1653379477065&from=FR>

nécessite une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) délivrée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV), leur utilisation répond à une prescription vétérinaire. Les produits de nutrition fonctionnelle⁸ relèvent de l'alimentation animale, les produits visant à réduire les risques sanitaires et/ou métaboliques peuvent également relever de ce cadre. Les plantes médicinales sont répertoriées dans la Pharmacopée⁹ (certaines sont libérées du monopole pharmaceutique et sont donc utilisables en alimentation humaine et animale ; d'autres n'en sont pas libérées et leur utilisation n'est donc pas recommandée mais fait l'objet d'étude complémentaire – GBP AFCA-CIAL 2020¹⁰). Dans ce cadre, les produits à base de plantes intéressent de plus en plus les chercheurs et professionnels pour leurs propriétés sur le bien-être et le maintien des animaux en bonne santé comme en témoigne le recensement des alternatives aux antibiotiques conduit par l'Anses (Anses, 2018). Cet essor s'inscrit dans un contexte mondial de réduction des risques d'antibiorésistance liée en partie à l'utilisation massive des antibiotiques en élevage (Anses, 2020) et de l'interdiction de leur usage préventif depuis 2006 en Europe. Une des voies, notamment soutenue par la création d'un axe dédié dans le plan Ecoantibio¹¹ est le « développement d'alternatives permettant d'éviter les recours aux antibiotiques » et de méthodes pour en évaluer le réel bénéfice. à ce titre, différentes approches alternatives thérapeutiques antimicrobiennes ont été mises en perspectives (Ducrot *et al.*, 2017). Dans le cadre de la nutrition animale, l'usage des préparations de plantes se positionne dans une démarche de gestion intégrée de

la santé des animaux. Dans ce même numéro, Fortun-Lamothe *et al.* (2022) rappellent que « les principes de la gestion intégrée de la santé animale a pour finalité *i)* de favoriser la construction de la santé des animaux afin qu'ils aient une trajectoire de vie harmonieuse et soient en état de bien-être et *ii)* de limiter l'apparition des maladies pour pouvoir diminuer l'utilisation des intrants ». Il est rappelé également que « la santé animale est à la fois un état d'homéostasie qui permet la réalisation optimale des fonctions biologiques, et un processus de maintien ou de restauration de cette homéostasie face aux évolutions du milieu de vie ». Ceci est d'autant plus vrai pendant la période de démarrage, au cours de laquelle les poussins sont très sollicités dans leurs capacités d'adaptation face aux changements d'environnement (physique, microbien, social) alors qu'ils sont en pleine construction de leur immunité et donc de leur santé présente et future. Les poulets sont ensuite exposés au cours de l'élevage à des périodes de transition alimentaire et des variations environnementales telles que des changements thermiques qui peuvent affecter leurs santé et performances (Goel, 2021). Le soutien des fonctions immunitaires, notamment par l'apport d'extraits de plantes, est un moyen de renforcer les capacités d'adaptation des poulets pendant ces périodes. Encore faut-il que le contrôle de qualité et la valeur ajoutée fonctionnelle des extraits de plantes pour la santé des poulets soient validés. Cela nécessite de disposer sur le terrain de méthodologies et d'outils complémentaires, adaptés et fiables qui restent encore limités dans la littérature scientifique. En élevage, face à une offre de préparations qui explose, comment faire le bon choix ?

Dans le présent article, nous avons fait le choix de nous intéresser aux extraits de plantes (hors huiles essentielles) pouvant renforcer l'immunité des poulets, notamment l'immunité innée qui est le moyen de défense majeur chez le poussin. Cet article présente les différentes étapes et outils/méthodes associés, d'une démarche élaborée dans le cadre du projet Casdar RT MEXAVI¹²,

pour identifier les extraits de plantes, les caractériser et évaluer leurs activités biologiques sur l'immunité des poulets en situation d'élevage.

1. Comment choisir des extraits de plantes d'intérêt pour renforcer l'immunité des volailles ?

Des chercheurs et praticiens en phytochimie et zootechnie ont conçu et mis en application une méthodologie d'aide à la sélection d'extraits de plantes potentiellement intéressants, *a priori*, pour renforcer l'immunité des volailles. Le groupe de travail s'est inspiré de la méthodologie utilisée dans la Saisine 2013-SA-0122 relative à l'état des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage (Anses, 2018). Une première étape consiste à sélectionner les plantes mentionnées dans la bibliographie comme ayant la capacité de moduler l'immunité des volailles. Une seconde étape consiste à utiliser pour chaque publication des grilles d'analyse construites pour permettre 2 niveaux d'évaluation : la fiabilité de la source bibliographique et les effets biologiques de l'extrait de plante étudié au regard des objectifs visés (stimulation de l'immunité) (figure 1A).

■ 1.1. Étape 1. Sélection d'extraits de plantes d'intérêt à partir de données bibliographiques : constitution du corpus bibliographique

La phase de recherche bibliographique a nécessité de définir les moteurs de recherche, les dates de publication et les mots clefs les plus pertinents. La phase suivante a permis de raffiner la liste des publications grâce à une analyse textuelle des résultats de la phase de recherche, une analyse d'occurrence et une analyse des connaissances pharmacologiques.

a. Choix des bases de données

Le recueil de publications scientifiques a été établi en utilisant les moteurs de recherche des Bases De Données (BDD) qui indexent largement les revues tra-

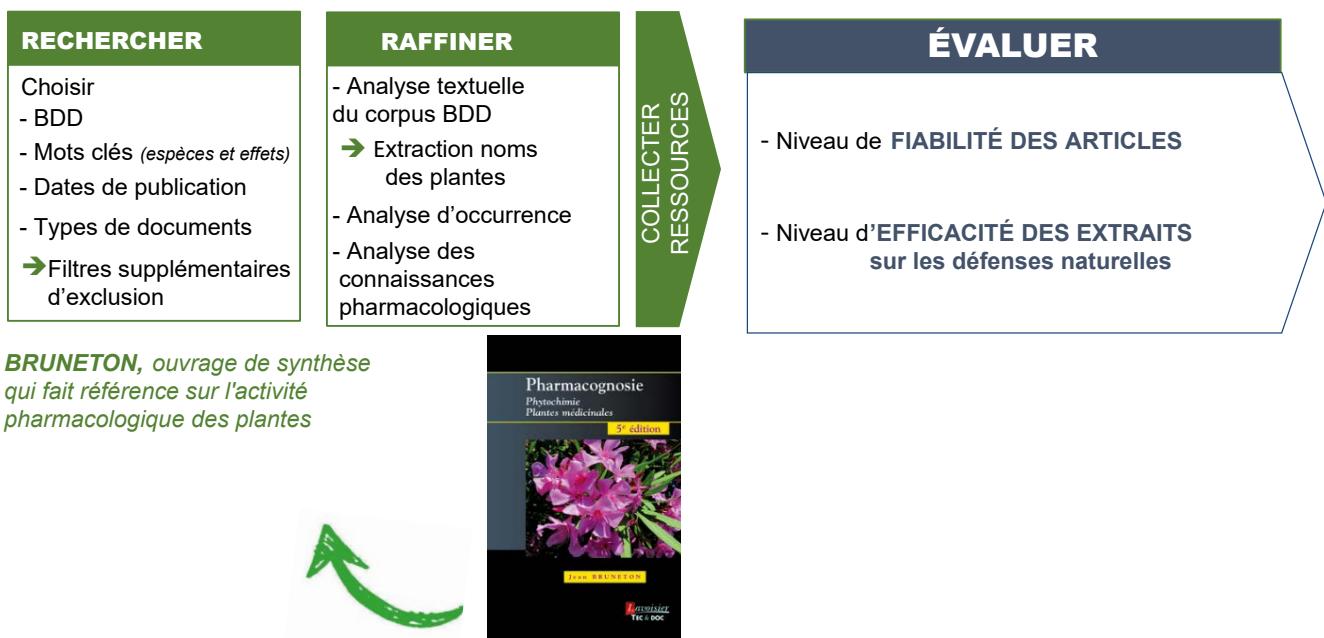
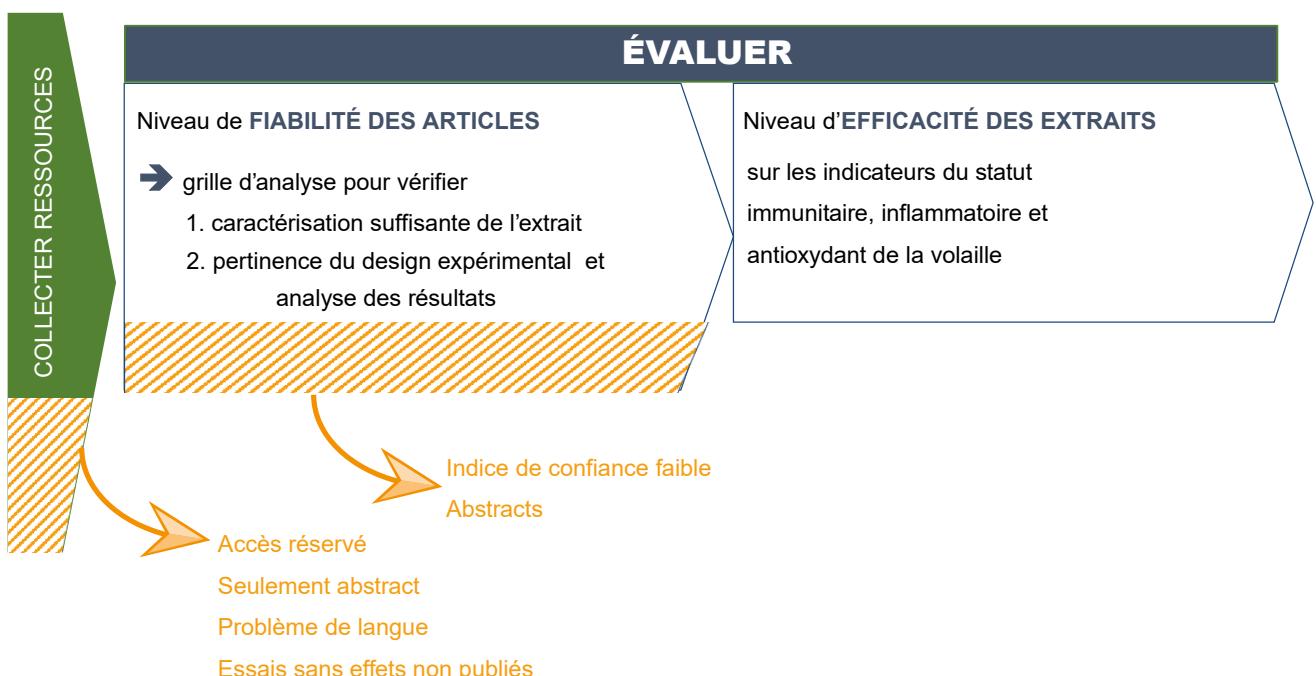
8 Il s'agit de produits à action spécifique qui participent au maintien ou au soutien des fonctions physiologiques.

9 Il s'agit d'un ouvrage réglementaire qui définit les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) voire leur contenant, mais également les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle.

10 Guide de bonnes pratiques pour l'utilisation des plantes et produits à base de plantes en alimentation animale <https://www.afca-cial.org/telechargements.php> <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021>

11 <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021>.

12 CasDar RT MEXAVI (n° 1612 – 2017/2020).

Figure 1. Schéma général de la démarche de sélection des extraits de plante.**A****B**

tant de phytochimie (Horticultural scientific database, SciFinder®) et les revues traitant de zootechnie (Web of Science®, CabDirect®, PubMed®). La recherche a été effectuée dans ces bases complémentaires, spécialisées¹³ et polyvalentes,

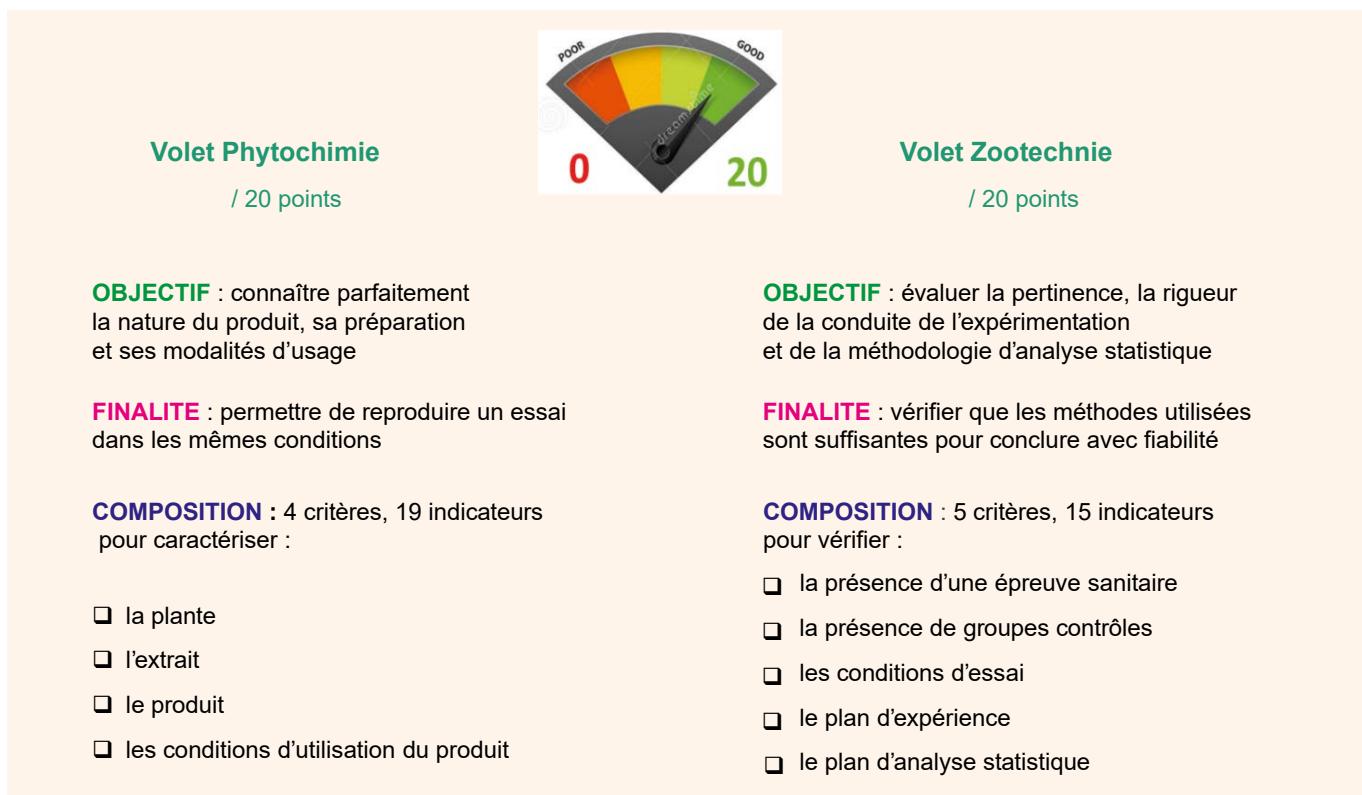
afin de compiler les résultats et obtenir un corpus bibliographique le plus complet possible.

b. Choix des mots clefs et filtres d'exclusion

Les mots clefs doivent être en anglais et doivent définir ou être fortement liés au concept à rechercher, pour permettre de faire ressortir les publications les plus pertinentes. Pour le projet

MEXAVI, les trois champs thématiques étaient : 1. les VOLAILLES et particulièrement le poulet de chair (poultry, broilers, chicks/chickens, fowls, hen), 2. les EXTRAITS DE PLANTES (plant extracts, phylogenics, plants, herbs, herbal products, medicinal plants), 3. le RENFORCEMENT DES DÉFENSES NATURELLES focalisée sur les notions d'immunité : (immunostimulants, immunostimulation, immune system,

13 Le service documentation de l'iteipmai met son savoir-faire au service des professionnels pour la veille techniques, scientifiques et/ou réglementaires et pour la recherche et la fourniture d'articles.

Encadré 1. Présentation des volets « Phytochimie » et « Zootechnie » de la grille de fiabilité.

immune response, vaccines, vaccination). Ces termes ont ensuite été associés pour construire des équations de recherche spécifiques à chaque BDD. Des filtres d'exclusion ont permis d'éliminer les études *in vitro* (effet recherché *in vivo*), celles réalisées avec des huiles essentielles (hors champs du projet) ou encore les articles publiés avant 2005.

c. Sélection des plantes d'intérêt

Lorsque la recherche génère une liste importante de références, l'utilisation d'un logiciel d'analyse textuelle adapté au traitement des publications scientifiques (VosViewer, IRaMuTeQ) ou des fonctions avancées du logiciel Excel, permet d'extraire les noms des plantes apparus dans notre corpus bibliographique. Les noms communs des plantes sont souvent imprécis et sont susceptibles de désigner des plantes différentes, la dénomination botanique, plus précise, a été privilégiée pour l'analyse. Les propriétés connues et attendues (immuno-stimulantes) des plantes identifiées ont été vérifiées dans un ouvrage de synthèse sur les connais-

sances pharmacologiques des plantes (Bruneton, 2016). Pour finir, les plantes à occurrences faibles (< 5 publications/plante) et non cultivables en France métropolitaine (approvisionnement difficile) ont été retirées.

■ 1.2. Étape 2. Évaluation du niveau de fiabilité de chaque publication

L'étape suivante vise à évaluer la qualité scientifique de chaque ressource avec un volet « phytochimie » et un volet « zootechnie ». Une grille de fiabilité a été élaborée et permet de vérifier que 1) l'extrait étudié est correctement caractérisé (nature, préparation, modalité d'usage) et 2) le dispositif expérimental est pertinent et les résultats analysés avec des méthodes statistiques adaptées pour conclure sur l'effet de l'extrait de plante testé (figure 1B). Dans la section « Materials and Methods » de chaque publication, des critères d'intérêt sont relevés et les indicateurs sont notés selon une échelle de score, définie par le groupe d'experts en phytochimie et en zootechnie (encadré 1). Après cette notation, un Indice de Confiance (IC)

est attribué à chaque publication selon trois niveaux : IC élevé, modéré ou faible. L'IC prend en compte la somme des notes de chaque volet ainsi que leur dispersion pour définir des bornes pour chaque seuil de confiance. Les IC des « Abstracts » sont systématiquement faibles, ils ne sont pas suffisants pour caractériser l'extrait de plante et de juger de la fiabilité de la méthodologie mise en œuvre, ils n'ont donc pas été considérés dans l'étape 3. Le volet « zootechnie » est spécifique du couple « poulet – stimulation des défenses naturelles », mais il est possible de l'adapter si on souhaite travailler sur un autre couple « espèce – fonction ciblée ».

Cette grille de fiabilité constitue un guide pertinent pour vérifier les conditions nécessaires et suffisantes à l'étude d'extraits de plante chez une espèce animale et pour une fonction définie. Les indicateurs ont été choisis et sont décrits pour être simples à apprécier par des non spécialistes¹⁴.

14 Voir la notice de la grille de fiabilité de l'outil Check'Mex – <https://www.iteipmai.fr/71-nos-projets/266-mexavi>

■ 1.3. Étape 3. Sélection des extraits de plantes sur leurs effets biologiques

Pour la dernière étape, une grille d'évaluation a été mise au point. Elle vise à compiler les résultats de publications identifiées comme les plus fiables (IC élevé à modéré), afin de classer les extraits de plantes selon leurs effets stimulants des défenses naturelles et zootechniques. Cette étape permet d'avoir une vision globale des extraits de plantes d'intérêt par une analyse de la récurrence des effets et une analyse des conditions dans lesquelles les effets les plus intéressants ont été obtenus. Pour réaliser cette évaluation, dans chaque publication, les conditions d'essais (espèce, environnement, stimulation), les caractéristiques et modalités d'usage des extraits de plantes (composition, dose, âge, durée et modalité d'administration) de chaque lot/traitement expérimental sont relevées et sont mises au regard des résultats obtenus pour chaque indicateur d'intérêt. Des graphiques générés automatiquement à partir de la BDD, permettent de visualiser rapidement le nombre de publications qui mentionnent des effets positifs ou négatifs selon l'indicateur considéré. Ils permettent également de visualiser selon l'extrait, l'espèce animale et l'indicateur considéré, les doses, durées et âge d'administration qui permettent d'obtenir des résultats intéressants.

L'ensemble de ces étapes et grilles d'analyse ont été rassemblées en un outil d'aide à la décision nommé CHECK'MEX. Cet outil est téléchargeable gratuitement sur le site de

l'iteipmai (institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et industrielles) (<https://www.iteipmai.fr/71-nos-projets/266-mexavi>) au format Excel pour rendre son utilisation accessible à tous et permettre de générer automatiquement les calculs des scores, les indices de confiance et les graphiques. Tous les types de ressources peuvent passer au crible de la grille de lecture, de l'article scientifique aux fiches techniques d'additifs commerciaux en passant par les dires d'experts. Il est destiné aux acteurs de la recherche et du développement pour faciliter la sélection d'extraits de plantes d'intérêt pour renforcer l'immunité des volailles. C'est un outil générique et pérenne qui peut être adapté à d'autres couples « espèce animale – fonction cible », ce qui nécessiterait une révision des grilles de fiabilité et d'évaluation.

■ 1.4. Mise à l'épreuve de la démarche de sélection et d'évaluation des extraits de plantes à visée immunitaire chez le poulet

Le résultat des étapes de recherche, sélection et collecte bibliographique est résumé dans le tableau 1.

L'étape de recherche bibliographie a permis d'identifier 917 publications qui concernaient 48 plantes. L'intégration des connaissances pharmacologiques, des occurrences et des possibilités de culture sur le territoire français a raffiné la liste à 8 plantes. Le corpus de 244 références bibliographiques a été réduit à 159 réellement

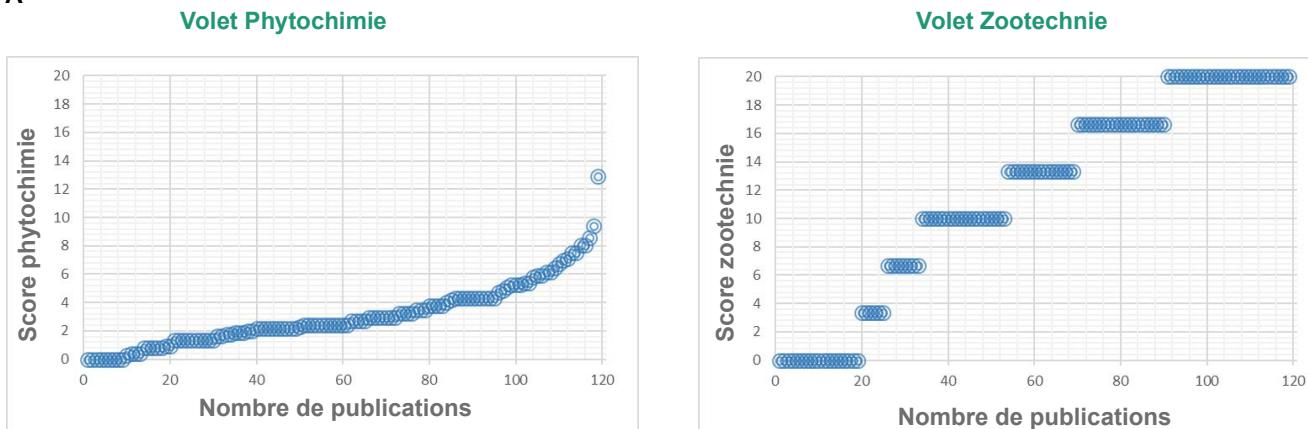
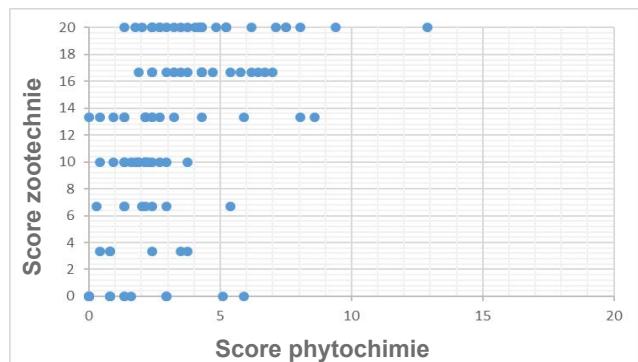
utilisables, principalement par l'accès restreint de certains articles, des articles en langues étrangères non maîtrisées (chinois...). Il y avait entre 10 et 40 articles utilisables par plante. L'analyse de la fiabilité des 159 publications a montré une très forte hétérogénéité de résultats entre les volets. Pour le volet « phytochimie », les scores s'étaient de 0 à 13/20 et de 0 à 20/20 pour le volet « zootechnie » (figure 2A). Il n'existe pas de corrélation entre les scores des volets « phytochimie » et « zootechnie » (figure 2B). Ces scores très variables entre les publications montrent bien la difficulté d'évaluation des études utilisant des extraits végétaux (manque de reproductibilité et discordances de résultats). La plupart des publications sont publiées dans des revues spécialisées pour les animaux d'élevage et conduites par des zootechniciens, ce qui explique que le volet « zootechnie » soit le mieux précisé (score supérieur). En revanche, le volet « phytochimie » est parfois inexistant des publications, où même le nom botanique ou le type d'extrait utilisé peuvent ne pas apparaître.

Malgré le peu d'informations disponibles sur les extraits de plantes utilisés, l'analyse des effets positifs sur l'immunité des volailles a mis en évidence quatre plantes intéressantes : l'astragale, l'échinacée, le ginseng et la nigelle. La nigelle n'a pas été retenue pour la suite du projet, de par le risque de toxicité connue (Zaoui *et al.*, 2002) et du coût élevé de l'extrait. A contrario, la mélisse a été ajoutée. Elle n'a pas été sélectionnée lors de la recherche bibliographique sans doute par les mots clefs choisis

Tableau 1. Résultats de la mise à l'épreuve de la méthode pour l'identification de plantes à visée immunitaire chez le poulet.

Phase de recherche	Phase de sélection			Collecte
	Corpus bibliographique	Analyse textuelle	Connaissances pharmacologiques	
Corpus bibliographique	Analyse textuelle	Connaissances pharmacologiques	Occurrence et possibilité de culture	Collecte des articles
917 références d'articles, de chapitres d'ouvrage, de communication dans des colloques, de brevets	48 plantes	12 plantes	244 publications pour 8 plantes	159 publications pour 8 plantes : ail, astragale, échinacée, ginseng, nigelle, ortie, réglisse, whitania

Figure 2. Répartition des scores sur le volet « Phytochimie » et sur le volet « Zootechnie » des articles étudiés (A), représentation pour chaque article, du score « Phytochimie » en fonction du score « Zootechnie » (B).

A**B**

pour le champ thématique relatif à l'immunité. Cependant connue pour ses effets antioxydant et anti-inflammatoire impliqués dans l'immunité innée (Dhama *et al.*, 2014 ; Miraj *et al.*, 2017), elle a été ajoutée à la liste des extraits de plantes retenus d'autant plus qu'elle est répandue en France et facilement cultivable. Lors de l'étape de recherche bibliographique, il est très important de définir les mots clefs recouvrant le plus le champ thématique. Dans notre étude, l'intégration des mots clefs « antioxidant », « oxidative stress » and « inflammation » auraient été pertinents pour mieux définir l'immunité innée. Ainsi l'astragale, l'échinacée, la mélisse et le ginseng ont été sélectionnés pour la suite du projet et particulièrement la mélisse (*Melissa officinalis*) et le ginseng (*Panax ginseng*) étudiés dans toutes les étapes de caractérisation et d'évaluation des activités biologiques chez le poulet (encadré 2).

2. Caractérisation et traçabilité des extraits de plantes

■ 2.1. Comment sont définis les extraits de plantes ?

Quelques normes donnent des définitions des différents types d'extraits, définitions basées le plus souvent selon leur état physique (Extraits de drogues végétales 04/2019:0765 de la Pharmacopée européenne¹⁵; norme ISO 9235:2013¹⁶). Le document de l'AFCA-CIAL¹⁷ (AFCA-CIAL, 2020) ajoute un

certain nombre de définitions et de précisions. Cependant, si certaines de ces définitions incluent des indications sur le mode de préparation (teinture, décoction, concrète...) ce n'est pas le cas général. En effet, selon le solvant utilisé, la composition de l'extrait pour une plante donnée pourra être différente. À cette variabilité, il faut ajouter les variations dues à la nature du matériel végétal, celles liées à la variété, à des effets saisonniers ou aux pratiques culturelles. Il faut encore ajouter l'impact de la méthode de dosage utilisée. En effet, selon la méthode utilisée, un même extrait peut afficher des teneurs en marqueurs différentes. Ces considérations sur les variations possibles de teneurs sur un même extrait soulignent la nécessité d'utiliser lors des dosages des méthodes standardisées. Rappelons que l'emploi de solvants lors de la fabrication d'un extrait peut rendre nécessaire la recherche des traces résiduelles de ce solvant mais

15 Pharmacopée européenne Ed. 10.4. https://www.edqm.eu/fr/Pharmacopée_Européenne_10e_Edition

16 Matières premières aromatiques naturelles-Vocabulaire. <https://www.iso.org/fr/standard/51017.html>

17 Association des Fabricants de Compléments et fournisseurs d'Additifs et ingrédients fonctionnels pour l'Alimentation Animale.

Encadré 2. *Melissa officinalis* et *Panax ginseng*, des plantes d'intérêt pour la santé des volailles.

La mélisse, (*Melissa officinalis L.*) de la famille des Lamiacées est réputée pour sa teneur en acide rosmarinique¹⁸. Facile à cultiver, elle produit aussi une huile essentielle riche en aldéhydes monoterpéniques : néral, géranial, citronellal. On utilise les feuilles ou les parties aériennes. Elle est réputée pour ses nombreuses propriétés antioxydante, antispasmodique, carminative, diaphorétique, immunostimulante, etc.



Le ginseng (*Panax ginseng Meyer*)¹⁹ de la famille des Araliaceae bénéficie d'une très ancienne réputation de produit miracle ; « Panax », signifie d'ailleurs « panacée » c'est à dire de remède universel. Les composés réputés actifs sont des hétérosides triterpéniques (Ginsenosides). C'est la racine qui est utilisée. La réputation du ginseng est d'être une plante « adaptogène » c'est à dire qu'elle augmenterait de manière non spécifique la résistance du corps au stress externe. Selon l'agence européenne du médicament, la racine ou des extraits peuvent être utilisés pour lutter contre la fatigue ou les états de faiblesse.

Référence générale : Bruneton, 2016

¹Nadeen M., et al., 2014. Applied Sciences, 9, 3139. doi.org/10.3390/app9153139

²EMA/HMPC/321233/2012 ; Community herbal monograph on Panax ginseng C.A.Meyer, radix

aussi des éventuelles impuretés qu'il pourrait renfermer. Le séchage des extraits peut aussi nécessiter l'emploi d'adjutants technologiques tels que la maltodextrine ou des poudres minérales. Ces auxiliaires peuvent aussi être utilisés pour ajuster par dilution le titre de l'extrait en marqueur.

■ 2.2. Comment caractériser un extrait de plante ?

La caractérisation des extraits végétaux répond à deux objectifs principaux : *i)* Connaître au mieux le plus grand nombre possible de composants, dans toute leur diversité chimique et de gamme de concentration, ce qui nécessite de les identifier et les quantifier ; *ii)* Définir parmi les composants de l'extrait, des marqueurs (responsables ou pas, de tout ou partie de l'activité supposée de l'extrait) permettant le suivi tout au long de la chaîne de fabrication de l'extrait jusqu'au produit final qui sera consommé par l'animal.

Le premier objectif répond d'abord aux exigences réglementaires de plus

en plus importantes (REACH¹⁸ ; EFSA¹⁹) qui imposent la caractérisation la plus exhaustive possible des ingrédients utilisés en alimentation animale. Il répond aussi à des exigences de qualité par le suivi des recommandations de l'AFCA-CIAL (AFCA-CIAL, 2020). Il doit permettre aussi de comparer deux produits en apparence semblables (même appellation, mêmes caractéristiques générales) mais dont certains éléments sont suffisamment différents pour que l'on puisse raisonnablement supposer des activités différentes.

Le second objectif répond lui aussi à des exigences réglementaires (conformité à une norme ou *a minima* à un étiquetage) mais aussi à la nécessité de suivre l'incorporation de l'extrait tout au long de la chaîne de fabrication de l'aliment destiné à l'expérimentation ou la commercialisation. Le suivi de ces marqueurs pourra éventuellement se poursuivre chez l'animal (études

pharmacocinétiques) et dans les produits destinés à la consommation humaine (viande, lait, œufs...). La ou les substances supposées être responsables de l'activité de l'extrait ne sont pas toujours connues avec certitude. Il est recommandé de suivre les indications des monographies de la Pharmacopée européenne qui précisent notamment la notion de marqueurs (Pharmacopée européenne, chapitre 04/2019:0765).

Concernant le choix des méthodes d'analyse de la composition des extraits végétaux, il est nécessaire d'utiliser les méthodes normalisées quand elles existent, au moins pour qualifier les matières premières. La Pharmacopée européenne et l'ISO en propose : on peut distinguer des méthodes « globales » qui permettent d'évaluer la teneur en une famille de composés (les polyphénols, les tanins...) mais sans distinguer chacune des molécules et des méthodes « spécifiques » (méthodes chromatographiques type CLHP/UV) qui permettent de doser séparément différentes molécules identifiées. Seules ces méthodes spécifiques

18 Service national d'assistance réglementaire REACH : <https://reach-info.ineris.fr>

19 Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) : <https://www.efsa.europa.eu/fr>

sont utilisables pour suivre une molécule qualifiée de marqueur tout au long du processus de fabrication des aliments supplémentés avec des extraits végétaux. Par exemple, l'Acide Rosmarinique (AR) est considéré être un marqueur de la mélisse et ses extraits par la Pharmacopée européenne. Il n'existe pas de méthode spécifique pour doser toutes les molécules présentes dans les extraits végétaux. La maltodextrine est un exemple typique de substance pour laquelle il n'existe pas de méthode de dosage officielle alors qu'elle peut représenter jusqu'à 60 % d'un extrait sec.

■ 2.3. Traçabilité des extraits de plantes dans l'aliment

Pour s'assurer de la qualité des extraits végétaux eux-mêmes ou intégrés dans des aliments, il est important de disposer de marqueurs et de références. L'utilisation des profils chromatographiques de référence combinée à la quantification des composés pharmacologiquement actifs des extraits de plantes recommandés par la Pharmacopée sont utiles quand ces molécules sont présentes dans une gamme de 0,1 à 10 mg/g d'extrait. Par exemple, la proportion d'AR retrouvée entre 1 et 2 % (10 – 20 mg/g d'extrait) dans des extraits de mélisse (**tableau 2**)

est en accord avec celle attendue, la teneur pouvant varier de 0,5 à 8 % (Arceusz et Wesolowski, 2013), et elle est restée stable pendant 9 mois de stockage (Travel *et al.*, 2021). Cette proportion est inférieure aux 5 % d'AR déclarés par le fournisseur parce que la méthode utilisée est probablement une méthode spectrophotométrique qui détecte l'ensemble des composés orthodiphénols présents et pas seulement l'AR comme le fait une méthode chromatographique. Les analyses réalisées avec ces méthodes sur les aliments de poulets de chair supplémentés avec 1 % d'extrait de mélisse montrent que l'on peut retrouver 60 à 80 % d'AR dans l'aliment, ce taux restant stable au moins 3 mois après stockage (Travel *et al.*, 2021). On peut supposer qu'il y ait des interactions entre les principes actifs et les composants de la matrice qui perturbent la détection des principes actifs. Par exemple, les protéines comme les protéines de soja de l'aliment peuvent former des complexes avec les orthodiphénols incluant l'AR qui ne sont plus détectables lors de l'analyse (Krekora *et al.*, 2020). La sensibilité de ces méthodes d'analyses ne permet pas de détecter des quantités inférieures au ppm. Le développement de méthodes analytiques pour atteindre la gamme de ppm nécessiterait des étapes de

purification et de concentration. Le choix des marqueurs et des méthodes pour les détecter devraient évoluer dans le futur en utilisant de nouvelles technologies pour mieux caractériser la qualité d'extraits de plantes et leur traçabilité au cours du processus de production d'aliments (Wei *et al.*, 2020 ; Klein-Junior *et al.*, 2021).

3. Évaluation des activités biologiques des extraits de plantes sur l'immunité innée des volailles

L'immunité innée est la réponse immunitaire prédominante chez le poussin. En réponse à des facteurs de stress biotiques ou abiotiques l'organisme produit rapidement des substances impliquées dans l'inflammation et le stress oxydant telles que les cytokines et chimiokines, médiateurs lipidiques, substances réactives à l'oxygène et à l'azote (EROs/ERNs) (**figure 3A**).

Le stress oxydant est l'expression d'un déséquilibre du statut d'oxydo-réduction cellulaire, entre les activités oxydantes et réductrices ou antioxydantes intracellulaires. Il s'agit d'un processus physiologique impliqué dans le maintien de l'intégrité cellulaire et dans de nombreuses fonctions comme l'inflammation et l'immunité. Naturellement le stress oxydant et l'inflammation sont régulés, cependant ces réactions peuvent persister et devenir chroniques, maintenir une inflammation à bas bruit ayant des effets délétères sur les cellules, les tissus et leurs fonctions (Cardoso Dal Pont *et al.*, 2020). Pour équilibrer le statut redox, l'organisme dispose d'un système complexe d'antioxydants endogènes qui inclut des enzymes (glutathion peroxidase, catalase, superoxyde dismutase, thioredoxin réductase...), protéines et des piégeurs de radicaux libres comme l'acide urique. Ce système endogène est complété par des molécules antioxydantes exogènes présentes dans l'alimentation et les compléments alimentaires (vitamine E, vitamine C, polyphénols, caroténoïdes) (**figure 3B**).

Tableau 2. Proportion d'acide rosmarinique dans des extraits de mélisse (MEL) stockés ou non et dans l'aliment pour poulets supplémenté à différentes températures (d'après Travel *et al.*, 2021).

Préparation	Acide Rosmarinique ^a	
	% MS ^b	ppm
Extrait MEL (T0)	1,44	14 400
Extrait MEL T0+4 mois ^c	1,37	13 700
Extrait MEL T0+9 mois ^c	1,38	13 800
Farine d'aliment	0,015	149
Aliment granulé à 70 °C ^d	0,010	101
Aliment granulé à 85 °C ^d	0,009	92

^a Quantification par HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography with diode array detection).

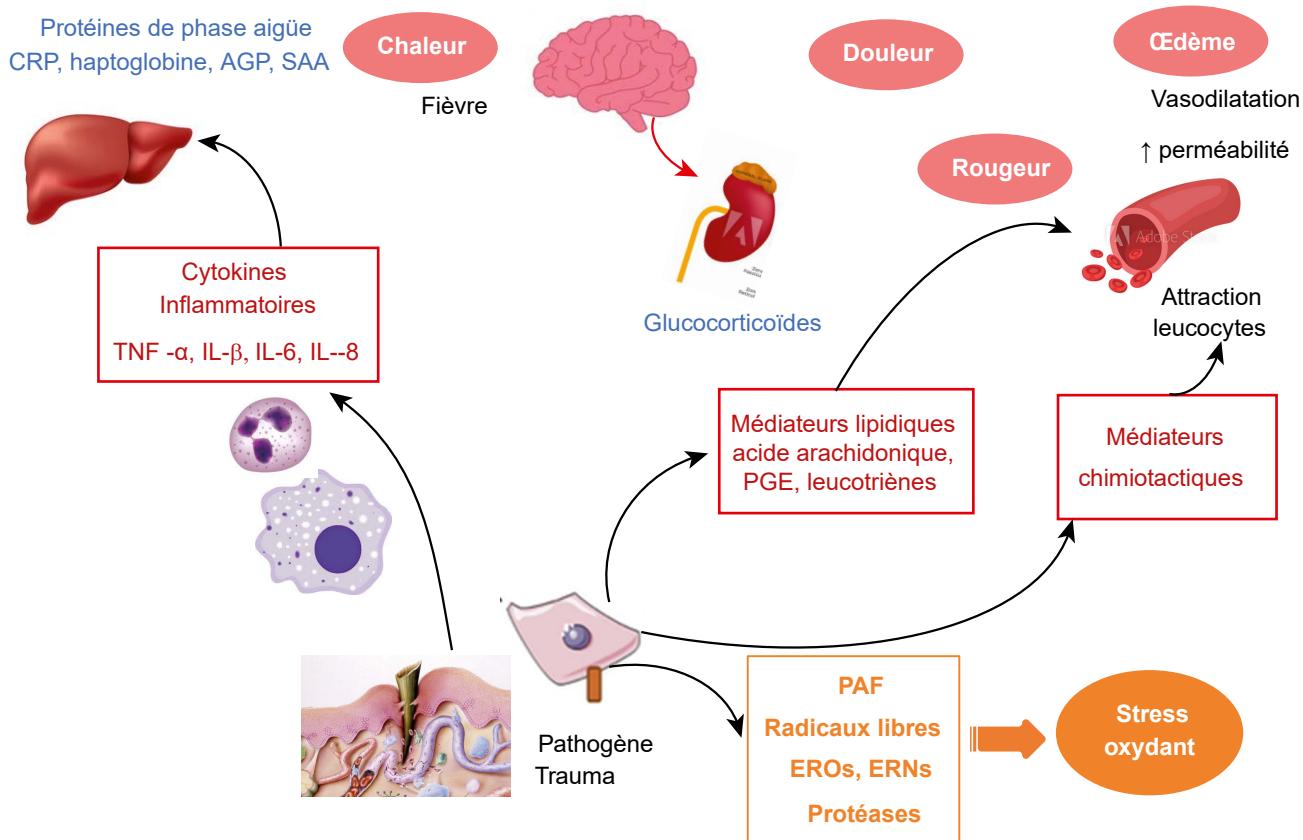
^b MS = matière sèche.

^c Extraits conservés à température ambiante pour mimer les conditions réelles.

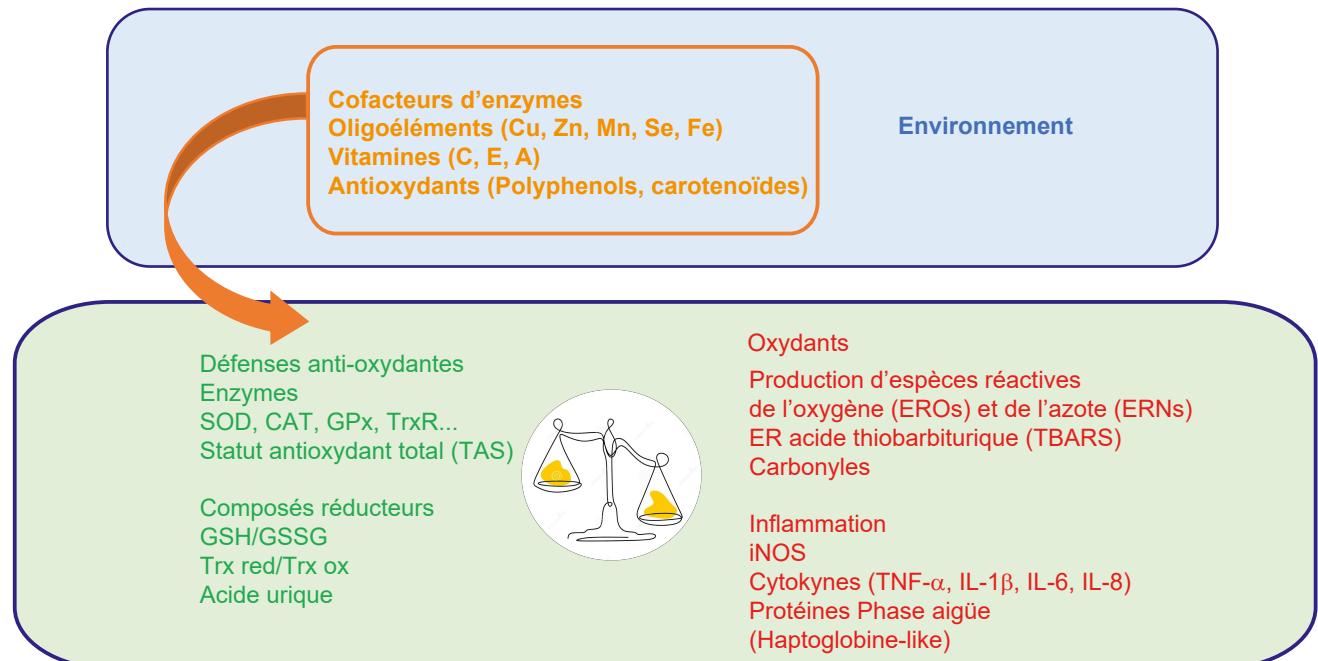
^d Température de granulé à la sortie du conditionneur (appliquée quelques secondes).

Figure 3. Réponse inflammatoire, ses différents acteurs et médiateurs (A) et les différents acteurs et régulateurs de la balance d'oxydo-réduction (B).

A



B



Pour évaluer les activités biologiques d'extraits de plantes, nous présentons dans cette section des outils et

méthodes pour évaluer leurs capacités à stimuler l'immunité innée des volailles dans des modèles cellulaires ou des

modèles d'inflammation et de stress oxydant développés *ex vivo* sur cellules de poulet.

■ 3.1. Tests de cytotoxicité et d'activités biologiques *in vitro* sur lignées cellulaires aviaires

Les extraits de plantes sont composés de nombreuses molécules bioactives pouvant avoir des effets à la fois bénéfiques et néfastes chez les eucaryotes multicellulaires. Évaluer leurs effets dans des modèles biologiques simples comme la culture de lignées cellulaires est préférable d'un point de vue éthique et peut orienter les prochaines étapes vers des expérimentations utilisant des animaux vivants. Chez les volailles, la disponibilité de lignées cellulaires bien caractérisées, y compris des lignées ayant intégré des gènes rapporteurs de gènes d'intérêt, permet aux chercheurs du domaine de franchir cette première étape éthique et moins coûteuse, avant d'évaluer les effets biologiques chez le poulet.

Pour évaluer les effets des extraits de plantes à la fois sur le métabolisme et l'immunité, plusieurs tests cellulaires et biochimiques sont disponibles et bien maîtrisés. Nous avons fait le choix de montrer des résultats reposant sur l'analyse de l'innocuité et de l'effet immunostimulant des extraits de ginseng et de mélisse dans des lignées cellulaires d'hépatocyte et de macrophage de poulet. La lignée cellulaire de macrophages HD11 (Beug *et al.*, 1979) est largement utilisée en biologie cellulaire aviaire pour évaluer les mécanismes de la réponse immunitaire innée (Peroval *et al.*, 2013). La lignée cellulaire hépatocytaire LMH (Kawaguchi *et al.*, 1987) est également très utilisée pour des études portant sur le métabolisme au cours des dernières décennies (Kolluri *et al.*, 1999 ; Qiao *et al.*, 2020). Pour évaluer l'innocuité et les effets des extraits de plantes sur les lignées cellulaires, le sel de tétrazolium, ou MTT, est largement utilisé par les biologistes cellulaires depuis les années 1980 pour dénombrer et mesurer l'activité métabolique des cellules viables en culture (Mosmann, 1983). Simple dans sa réalisation, cette méthode comprend l'utilisation de deux réactifs ajoutés en plaque de culture sans étape de lavage et une lecture de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre. Des

approches alternatives avec une plus grande sensibilité de détection (*e.g.* MTS, Alamar Blue), avec la capacité d'enregistrer des données à plusieurs reprises en temps réel et de tester plus efficacement les cellules en culture 3D (*e.g.* CellTiter-Glo® 3D – Cell Viability Assay) a conduit à une diminution de l'utilisation du MTT, bien qu'il reste l'une des méthodes d'évaluation de la viabilité cellulaire les plus utilisées en biologie cellulaire.

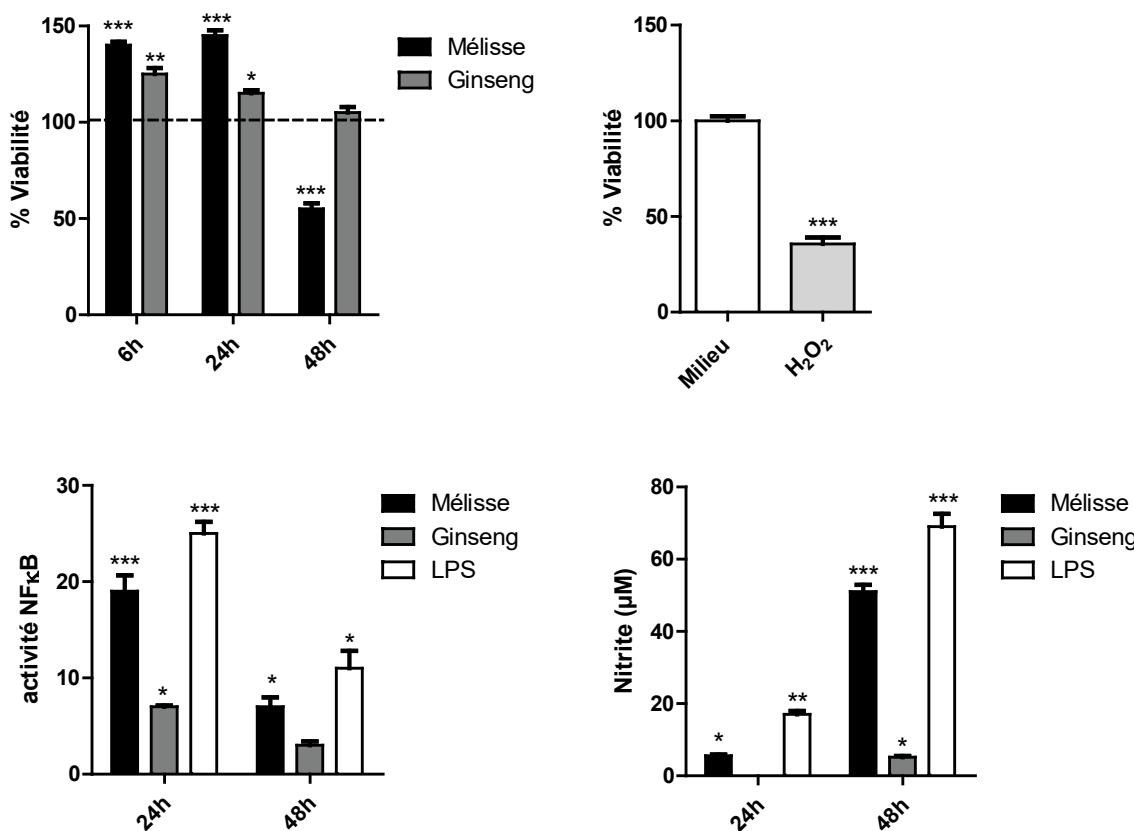
En pratique, pour évaluer l'innocuité des extraits de ginseng et de mélisse, différentes concentrations (100 µg/mL à 10 ng/mL) diluées dans du milieu de culture ont été testées. Les cellules HD11 et LMH ont été distribuées à 5 x 10⁴ cellules/puits dans une plaque de culture à 96 puits et exposées à chacune des différentes concentrations de chaque extrait ou incubées en milieu de culture seul (groupe témoin). À 6 h, 24 h et 48 h après l'incubation, l'activité métabolique cellulaire a été déterminée à l'aide du MTT (Travel *et al.*, 2021). À titre d'illustration, nous présentons les résultats pour la lignée de macrophages HD11 avec lesquels nous avons également étudié d'autres paramètres ultérieurement. Les concentrations les plus élevées de mélisse et de ginseng (100 µg/mL) ont entraîné une augmentation du métabolisme cellulaire dès 6 heures (figure 4A). Une cinétique similaire a été observée après 24 heures d'incubation. À 48 heures d'incubation, l'activité métabolique a fortement diminué (56 %) dans les cellules au contact de l'extrait de mélisse, suggérant un effet cytotoxique potentiel pour une concentration de 100 µg/mL de cet extrait (> 50 % de perte du métabolisme cellulaire²⁰). L'extrait de ginseng ne présente lui aucun effet cytotoxique à ce même temps d'incubation pour la même concentration. À titre de comparaison, le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂ (1 mM), un contrôle positif dans ce type de test, induit une grande cytotoxicité > 60 % dans les cellules HD11, mettant ainsi en évidence la sensibilité du test (figure 4B).

Pour évaluer l'activité pro/antioxydante et pro/anti-inflammatoire des extraits de plantes, des modèles d'inflammation et de stress oxydant sont développés sur cellules *in vitro* (Mengome *et al.*, 2014 ; Islam *et al.*, 2018). Chez le poulet, ces modèles sont plus souvent réalisés *in vivo* (Liu *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2017 ; El-Senousey *et al.*, 2018 ; Lv *et al.*, 2018). Pour réduire le recours à l'expérimentation animale, le développement de méthodologies alternatives sont encouragées (principe des 3R, Russell et Burch, 1959 ; Richmond, 2000). Les lignées cellulaires ayant intégré un gène reporteur de l'expression de gènes d'intérêt sont un puissant outil pour le criblage de molécules bioactives *in vitro*. Le facteur nucléaire kappa B (NFkB) est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans de nombreux processus immunitaires, comme l'inflammation. Le suivi de l'expression de ce facteur de transcription permet une meilleure compréhension des phénomènes d'immunostimulation engendrés par différentes molécules. L'activation des voies de signalisation liées à NFkB par les extraits de ginseng et de mélisse a été évaluée avec la lignée cellulaire macrophagique HD11-NFkB luciférase, ayant intégré le gène de la luciférase en amont du gène NFkB (Garrido *et al.*, 2018 ; Travel *et al.*, 2021), un outil unique dans la communauté de l'immunologie aviaire.

Un potentiel effet immunomodulateur a été observé pour l'extrait de mélisse (100 µg/mL), notamment après 6 h d'incubation, où l'activation du facteur de transcription NFkB est 19 fois plus élevée par rapport au témoin négatif (milieu seul) (figure 4C). Le lipopolysaccharide (LPS) d'origine bactérienne, communément utilisé pour induire une inflammation expérimentale *in vivo* ou *in vitro* sur cellules (témoin positif, à 1 µg/mL) a induit une augmentation de 25 fois de l'activation de NFkB par rapport au témoin négatif. Les effets de l'extrait de ginseng sont discrets par rapport à l'extrait de mélisse et n'excèdent jamais 5 fois plus par rapport au témoin négatif. Ces données suggèrent que l'extrait de mélisse mobiliserait de façon très efficace le facteur de transcription NFkB lors de la réponse des macrophages chez le poulet.

²⁰ Évaluation biologique des dispositifs médicaux – partie 5 : essais concernant la cytotoxicité *in vitro*. <http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>

Figure 4. Effets des extraits de ginseng et de mélisse sur l'activité métabolique et la réponse immunitaire dans une lignée de macrophages aviaires.



Activité métabolique des cellules exposées à chaque extrait de plante à différents temps. Les cellules uniquement en milieu de culture définissent le témoin à 100 % de viabilité ($m \pm SEM, n = 5$) (A), Activité métabolique suite à l'exposition des cellules à H_2O_2 (1 mM) pendant 24 h ($m \pm SEM, n = 5$) (B), Activité NFkB des cellules exposées à chaque extrait de plantes ou de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) à différents temps (activité relative à celle de cellules en milieu de culture seul, normalisée à une valeur de 1) ($m \pm SEM, n = 5$) (C), Production de nitrite par les cellules exposées à chaque extrait de plante ou de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) à différents temps ($m \pm SEM, n = 5$) (D). *P < 0,05, **P < 0,01 et ***P < 0,001 par rapport aux témoins négatifs (milieu de culture seul) dans chaque expérience.

Les macrophages sont l'une des premières cellules effectrices réactives en situation de stress oxydant ou en présence d'agents pathogènes *via* la production de divers médiateurs pro-inflammatoires dont le monoxyde d'azote (en anglais NO), un radical libre de courte durée (Moncada *et al.*, 1991). L'une des méthodes les plus anciennes et les plus simples pour mesurer la production du NO est la méthode de Griess, qui est basée sur la réaction de l'ion nitrite produit par l'auto-oxydation du NO, qui est facilement quantifié par spectroscopie. En pratique, la production de nitrite est mesurée dans le milieu de culture à partir de 24 h d'incubation des macrophages HD11 avec les extraits de plantes. À la concentration la plus élevée (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), l'extrait de mélisse induit une augmentation de 10 fois de la production de NO entre 24 et 48 h d'incubation (5 et 50 μM respectivement) (figure 4D). En comparai-

son, le LPS induit une production de NO de l'ordre de 16 μM à 24 h. Celle-ci a ensuite été multipliée par un facteur 4 à 48 heures (69 μM). L'extrait de ginseng n'induit pas ou peu la production du NO par les macrophages HD11.

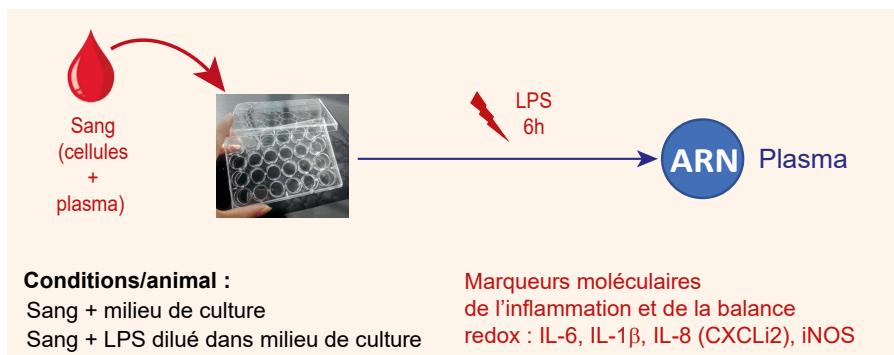
En résumé, l'extrait de ginseng présente une innocuité plus stable aux différentes concentrations testées sur la lignée de macrophages aviaires en comparaison à l'extrait de mélisse. Il induit peu ou pas d'effet immunostimulant sur les macrophages H11 alors que l'extrait de mélisse révèle une activité immunostimulante à prendre en considération. Cette méthodologie simple et rentable peut donc être réalisée en première intention pour évaluer l'innocuité et la bio-activité d'extraits de plantes dans des cellules eucaryotes de l'espèce animale d'intérêt avant d'envisager des tests *in vivo*, conformément au REACH et au principe des 3Rs (Richmond,

2000). Toutes les méthodes utilisées ici sont accessibles et peuvent être facilement mises en œuvre dans des laboratoires vétérinaires ayant une expertise en biologie cellulaire et en biochimie.

■ 3.2. Tests d'activités biologiques *ex vivo* sur cellules sanguines de poulet

La prochaine étape a consisté à développer une méthode pour mettre en évidence les potentielles propriétés antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de plantes chez le poulet. Le LPS est communément utilisé pour induire une inflammation expérimentale *in vivo* ou *in vitro* sur cellules. Dans cette étude (Travel *et al.*, 2021), nous avons développé une méthode *ex vivo* pour induire une réaction inflammatoire et un stress oxydant à partir de cellules sanguines de poulet incubées avec du LPS (encadré 3).

Encadré 3. Modèle ex vivo d'inflammation et de stress oxydant sur cellules sanguines de poulet (d'après Travel et al., 2021).

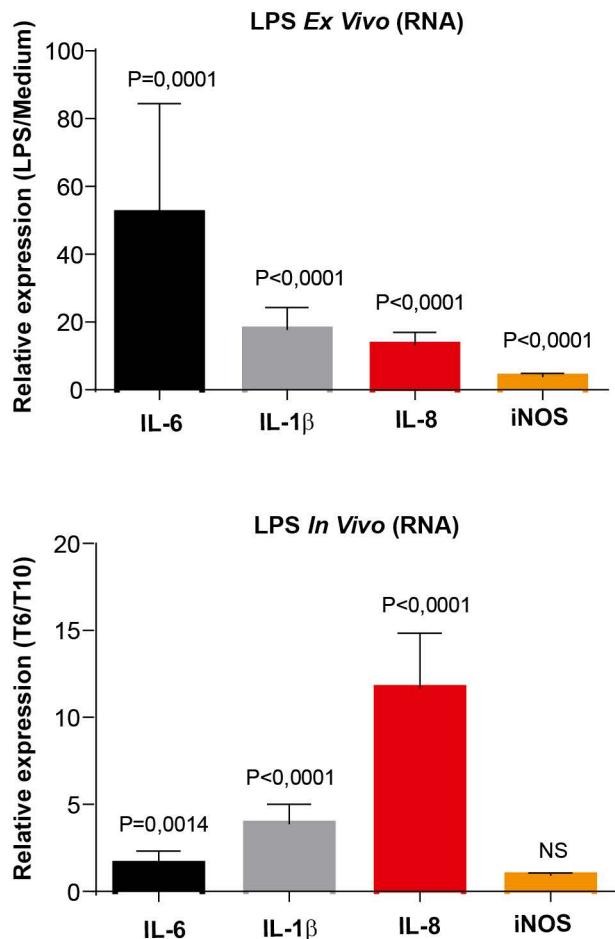


Nous avons comparé cette méthode avec une méthode réalisée par une injection de LPS chez le poulet (Kaiser et al., 2012). L'incubation des cellules sanguines totales fraîchement prélevées avec le LPS (10 µg/mL) pendant 6 h induit une forte augmentation de l'expression des ARNm des gènes de

cytokines pro-inflammatoires, principalement l'IL-6 et à un degré moindre l'IL-1 β , IL-8, et l'enzyme iNOS impliquée dans la synthèse du NO (figure 5). Ces résultats sont en accord avec des études réalisées précédemment sur des lignées de macrophages qui sont les acteurs principaux de ces réponses

(Qi et al., 2017 ; Islam et al., 2018). *In vivo*, l'injection du LPS (100 µg/kg) par voie sous-cutanée induit une augmentation de l'expression des gènes de l'IL-8 principalement, de l'IL-1 β et l'IL-6 à un degré moindre mais pas de l'iNOS (figure 5). Ces résultats sont complémentaires de ceux publiés sur cellules de rate de poulet (Kaiser et al., 2012). L'amplification de l'expression des gènes étudiés était remarquablement plus élevée dans la méthode *ex vivo* qu'*in vivo* (jusqu'à 25 fois plus). De ces deux méthodes, l'approche *ex vivo* réalisée sur cellules sanguines de poulet permet de reproduire une réaction inflammatoire et un stress oxydant mesurable par l'analyse de biomarqueurs moléculaires de ces réactions cellulaires. Elle a l'avantage d'utiliser le sang de poulet directement sans purification cellulaire et d'éviter l'injection de LPS chez les animaux. Cependant, elle ne permet pas

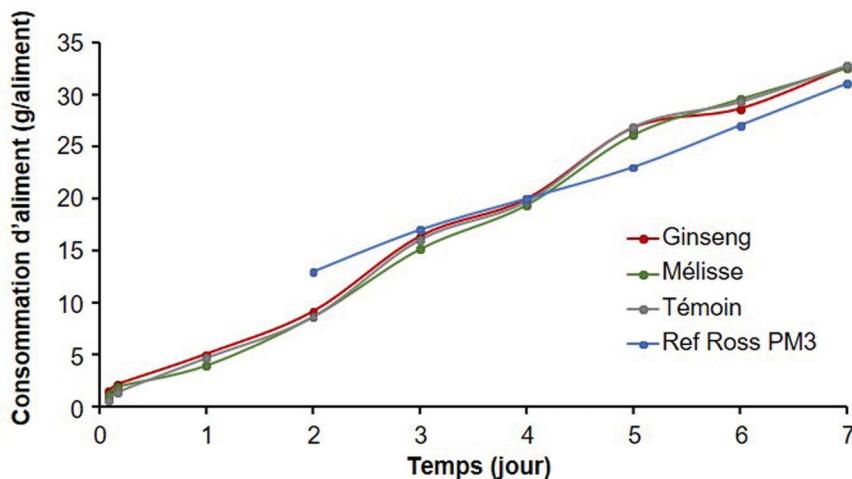
Figure 5. Modèle ex vivo et in vivo d'inflammation et de stress oxydant chez le poulet et biomarqueurs (d'après Travel et al., 2021).



Analyses		Ex vivo	In vivo
Expression des gènes	IL-1 β	↑↑	↑
	IL-6	↑↑↑	→
	IL-8(L2)	↑↑	↑
	iNOS	↑↑	→
Métabolites	Glucose	→	↑
	Triglycérides	→	↓↓
	Acide urique	→	→
Balance redox	TAS	→	→
	SOD	→	→
	Gpx	→	↓
	GSH/GSSG	→	↓↓
	TBARS	→	→
Inflammation	Haptoglobine	→	→

Expression relative des gènes des cellules sanguines de poulet après stimulation pendant 6 h avec du LPS (*ex vivo*) ou prélevées 6 h après injection de LPS au poulet (*in vivo*) ($m \pm SEM$, $n = 12$). Expression de différents biomarqueurs du métabolisme, de la balance d'oxydo-réduction et de l'inflammation dans le plasma des cellules sanguines dans les modèles *ex vivo* et *in vivo* (réponse grise = stable, réponse en rouge : augmentée ou diminuée).

Figure 6. Consommation alimentaire d'aliments supplémentés en extraits de plantes par des poussins (d'après Pampouille, 2020).



(n = 4 x 6 parquets = 24 poussins/traitement). Ginseng = aliment + ginseng ; Mélisse = aliment + mélisse ; Témoin = aliment non supplémenté ; ref Ross PM3 = courbe de référence de consommation alimentaire de poulets Ross PM3. Aucune différence significative de consommation d'aliment n'est observée entre les différents aliments supplémentés quel que soit le temps considéré ($P > 0,5$).

de reproduire toutes les interactions cellulaires complexes qui ont lieu *in vivo* lors d'une injection de LPS comme les modifications des métabolites sanguins (glucose et triglycérides) et de la balance redox glutathion (GSH/GSSG, activité enzymatique Gpx) (figure 5). Ces deux méthodes apportent des indicateurs complémentaires d'inflammation et de stress oxydant qui peuvent être utilisés pour évaluer les effets biologiques de la consommation d'extraits de plantes chez le poulet. Pour rester dans la démarche d'éviter le recours à une méthode invasive chez l'animal, la méthode *ex vivo* a été choisie pour évaluer les effets biologiques de la consommation des extraits de plante chez le poulet.

■ 3.3. Évaluer les effets biologiques *in vivo* chez le poulet

Pour évaluer les effets biologiques de la consommation d'extraits de plante chez le poulet, il est nécessaire de tester en préambule l'acceptabilité des aliments complémentés avec les extraits de plante pour les animaux. La question du taux d'incorporation de l'extrait de plante est essentielle à régler et doit se baser soit sur des travaux déjà publiés, soit sur un effet-dose à réaliser chez l'animal. Par exemple, compte tenu des

informations disponibles dans la bibliographie pour les extraits d'échinacée, de mélisse et de ginseng, un taux d'incorporation de 2 % a été retenu pour réaliser un test d'acceptabilité chez le poussin pendant la première semaine de démarrage, ce taux a été volontairement choisi plus élevé que celui décrit pour ces extraits. L'analyse de la consommation alimentaire de poussins vis-à-vis d'aliments incorporant ces extraits a été testée en comparaison avec un aliment témoin sans ajout d'extrait. Nous n'avons pas observé de différence de consommation alimentaire entre les groupes pendant la première semaine de vie des poussins (figure 6) ni sur la croissance des animaux. Nous avons pu définir qu'un minimum de 6 parquets avec 4 poussins/parquet permettait de mettre en évidence une différence de $4 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ de consommation d'aliment. Ce protocole est une base pour tester l'acceptabilité d'un nouvel aliment supplémenté avec un extrait de plante et peut être aménagé selon les besoins.

La méthode d'induction d'inflammation et de stress oxydant *ex vivo* a ensuite été appliquée sur le sang des poulets qui ont consommé un aliment supplémenté avec un extrait de ginseng ou de mélisse jusqu'à l'âge d'abattage (J34). Les taux d'incorporation

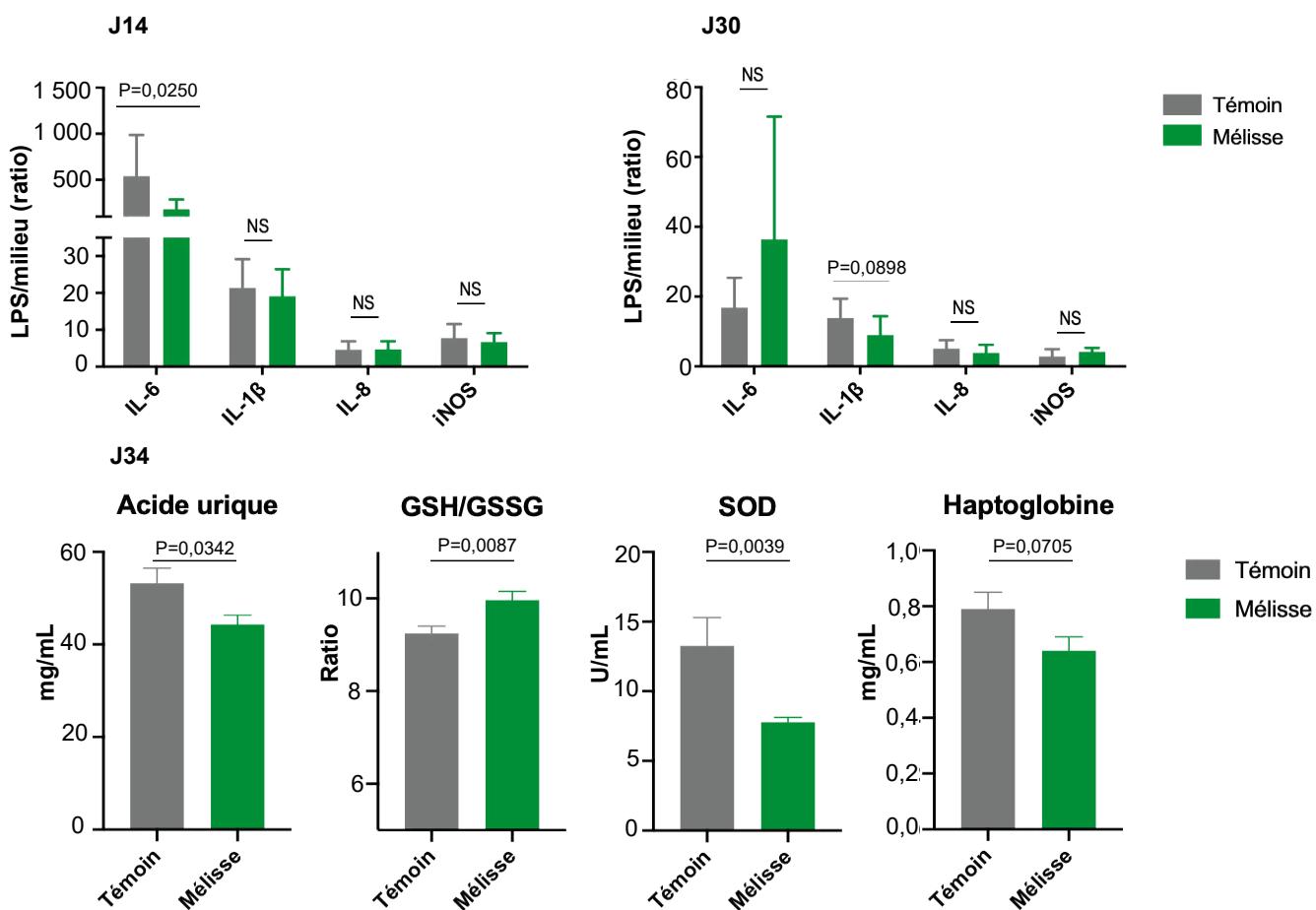
des extraits de plantes trouvés dans la bibliographie sont parfois très variables selon les études. Par exemple le taux pouvait varier de 0,005 % à 3 % pour le ginseng (Kim *et al.*, 2014 ; Zhai *et al.*, 2014), et de 0,2 à 2 % pour la mélisse (Marcinčáková *et al.*, 2011 ; Petrovic *et al.*, 2012 ; Kasapidou *et al.*, 2014). Pour nos essais, nous avons choisi un taux de 0,05 % pour le ginseng et de 1 % pour la mélisse et analysé leurs effets chez le poulet de chair à 2 âges, J14 et J30.

Nous avons pu observer que les cellules sanguines de poulets ayant consommé un aliment supplémenté avec un extrait de mélisse exprimaient une réponse inflammatoire inférieure (IL-6 à J14, IL-1 β à J30) à celle des poulets témoins en réponse à une exposition à du LPS (figure 7A). Nous avons observé des effets directs de la consommation d'extraits de mélisse sur d'autres biomarqueurs complémentaires analysables dans le sang comme l'acide urique, le ratio GSH/GSSG, l'activité SOD et la protéine de phase aigüe haptoglobine like, montrant respectivement une activité antioxydante et anti-inflammatoire jusqu'à l'âge d'abattage des poulets (J34) (figure 7B).

Un autre exemple réalisé avec un aliment supplémenté avec un extrait de ginseng montre que la réponse inflammatoire à une exposition au LPS est différente selon le temps d'analyse (diminution de l'IL-1 β à J14 et tendance à augmenter l'IL-8 à J30) chez les poulets ayant consommé cet aliment en comparaison avec les poulets témoins. Des effets directs sont également observés sur la concentration en acide urique, l'activité Gpx et l'haptoglobine like après consommation d'un aliment supplémenté avec un extrait de ginseng (figure 8A et 8B).

Même si la méthode *ex vivo* ne permet pas de reproduire les interactions cellulaires complexes qui ont lieu *in vivo*, elle peut être privilégiée en première intention pour évaluer les effets biologiques d'un extrait de plante en utilisant une sélection de biomarqueurs de l'inflammation et du stress oxydant et de pouvoir choisir de continuer l'évaluation de l'extrait en situation d'élevage.

Figure 7. Évaluation des effets biologiques d'un aliment supplémenté en extrait de mélisse sur les marqueurs d'inflammation et de stress oxydant (d'après Travel et al., 2021).



L'expression des gènes est analysée par RT-PCR sur les ARN des cellules sanguines exposées ou pas à du LPS (modèle *ex vivo*) ($m \pm SEM, n = 12$) (A). Marqueurs analysés dans le plasma des poulets à l'aide de kits commerciaux ($m \pm SEM, n = 12$) (B).

4. Évaluation des activités biologiques des extraits de plantes en situation d'élevage

La dernière étape de la méthodologie a consisté à évaluer en conditions d'élevage plus proches du terrain (grands groupes d'animaux) les effets des extraits végétaux sur une base plus large d'indicateurs incluant ceux de l'immunité étudiés précédemment et également des indicateurs de santé, de bien-être et de performances des animaux.

■ 4.1. Étape 1 : recréer expérimentalement des conditions de pré et post-éclosion peu favorables

Les périodes pré- et post-éclosion sont essentielles pour la santé des poussins et leur démarrage. Les stress vécus pendant

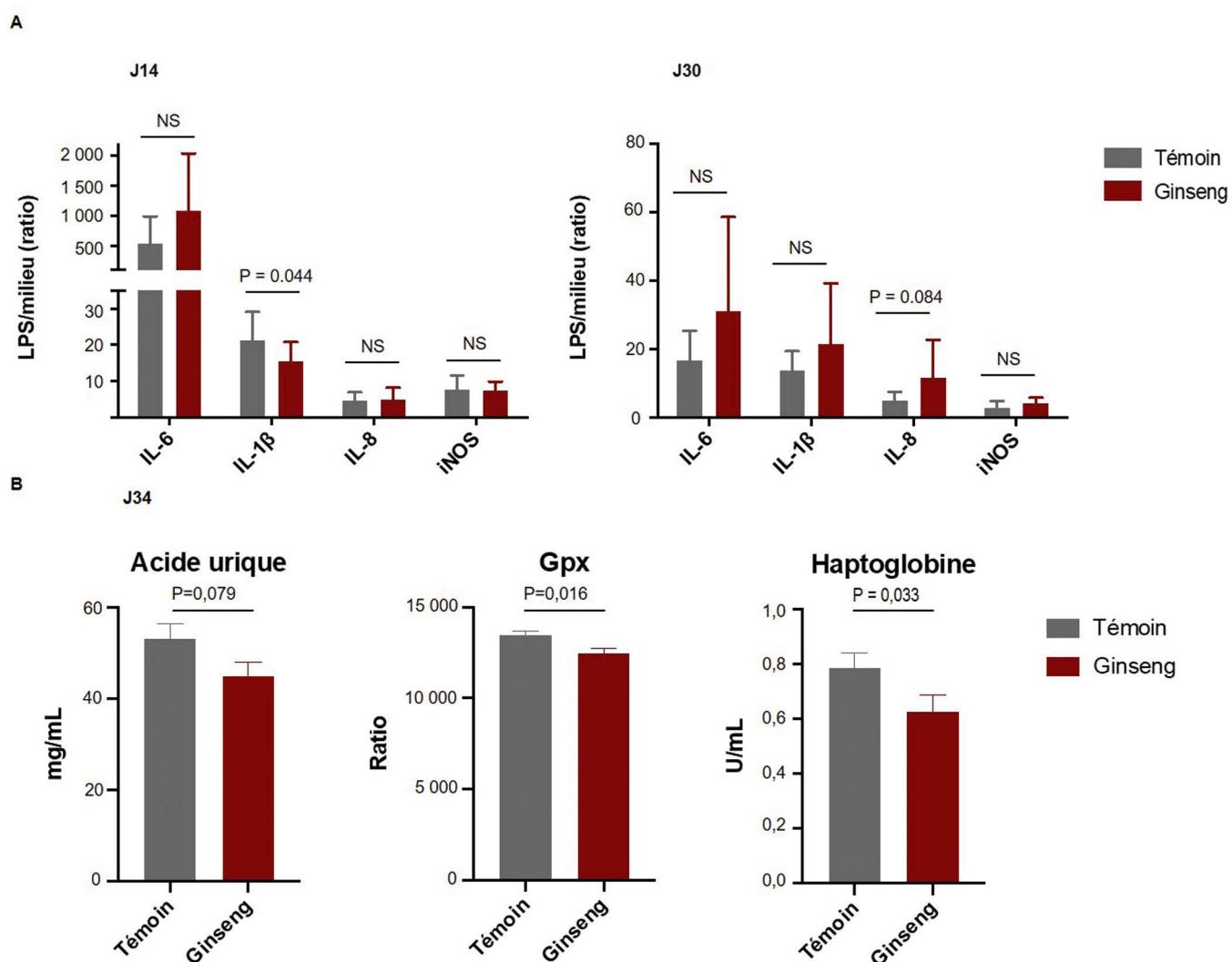
ces périodes, leur durée et leur nature peuvent avoir des impacts très importants et surtout durables sur les animaux (Ericsson et al., 2016). En élevage, les pratiques, les conditions environnementales, les contraintes logistiques et organisationnelles des élevages de reproducteurs et des couvoirs, peuvent induire des situations involontairement défavorables pour l'œuf, l'embryon et les poussins et donc entraîner des réactions de stress. Dans la période postnatale, ces situations défavorables reproduites expérimentalement peuvent provoquer des changements immédiats mais aussi durables (jusqu'à 34 jours d'âge) sur le métabolisme des poulets et sur leurs performances (Guilloteau et al., 2019 ; Foury et al., 2020). Dans le temps, le transcriptome sanguin des mâles est plus affecté que celui des femelles par le vécu postnatal des poussins, et cible l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant, la croissance et

le métabolisme énergétique et osseux (Foury et al., 2020). Cependant, la mise en évidence des effets de ces conditions périnatales défavorables sur la santé et le bien-être des poulets en situation d'élevage demeure peu fréquente sur le plan expérimental. Une des difficultés est de reproduire la dimension et l'écosystème présent en élevage (taille des bâtiments, taille des groupes d'animaux, la pression sanitaire, la densité...). Pour évaluer expérimentalement le potentiel sur l'immunité des poulets mais également l'effet plus global des extraits de plantes, il est nécessaire de recréer des conditions qui se rapprochent le plus des conditions d'élevage.

Plusieurs facteurs connus peuvent y participer :

i) **La durée de stockage des œufs à couver**, quand elle est supérieure à 7 j, peut impacter la viabilité embryonnaire,

Figure 8. Évaluation des effets biologiques d'un aliment supplémenté en extract de ginseng sur les marqueurs d'inflammation et de stress oxydant.



L'expression des gènes est analysée par RT-PCR sur les ARN des cellules sanguines exposées ou pas à du LPS (modèle *ex vivo*) ($m \pm SEM$, $n = 12$) (A). Marqueurs analysés dans le plasma des poulets ($m \pm SEM$, $n = 12$) (B).

mais également la capacité de réponse au stress oxydant et la croissance des poussins (Elibol et Brake, 2008 ; Alsobayel et Al-Miman, 2010 ; Pertusa *et al.*, 2017). Une longue durée de stockage des œufs augmente également la fenêtre d'éclosion et allonge le délai d'accès à la première prise d'aliment et d'eau sur le site d'élevage (Boyner *et al.*, 2021).

ii) La gestion des poussins au couvoir (sexage, tri, vaccination), et leur transport (chargement/déchargement, durée et température de transport) sont sources de stress et ajoutent un délai supplémentaire pour l'accès à l'aliment et à l'eau. Ce jeûne peut durer jusqu'à 72 h après la sortie de l'éclosoir (Willemsen *et al.*, 2010 ; Van de Ven *et al.*, 2013). Les

poulets de chair standards actuels ont un début de croissance très précoce, leur sac vitellin peut ne pas fournir les nutriments nécessaires pendant 72 heures (Tesseraud *et al.*, 2003).

iii) Un retard d'alimentation de 24 h a des effets négatifs sur le développement du tractus gastro-intestinal (capacité de digestion d'aliment exogène riches en carbohydrates) (Ravindran, 2003 ; Lamot *et al.*, 2014), sur l'utilisation du sac vitellin (oxydation des réserves énergétiques) (Noy et Sklan, 2001) ce qui implique des répercussions sur la croissance de l'animal (Noy et Sklan, 1999 ; Sklan *et al.*, 2000). L'accès tardif à l'alimentation et à l'eau a également des effets négatifs sur l'activation du système immunitaire (Bar Shira *et al.*,

2004) induisant des risques de développement de maladies et voire la mort de l'animal (Boyner *et al.*, 2021).

iv) La vitamine E est une molécule antioxydante exogène apportée par l'alimentation des volailles. Elle aide au maintien du statut redox (figure 3) car elle est utilisée par l'organisme lors d'un stress oxydant pour lui permettre de revenir à l'état d'équilibre. Au démarrage, les volailles ont des besoins importants en vitamines et acides aminés essentiels qui ne sont en général pas suffisamment couverts par l'aliment (Pertusa *et al.*, 2017), des supplémentations peuvent être apportées en élevage.

Notre démarche pour évaluer l'intérêt global des extraits végétaux a été

de cumuler ces modalités défavorables fréquemment rencontrées en élevage (18 j de stockage des œufs, alimentation retardée de 24 h, dose minimale de vitamine E dans l'aliment) pour maximiser les effets sur les indicateurs de stress oxydant et d'inflammation. Un effectif de 1 440 poussins mâles de souche Ross PM3 ont été mis en place à J0 à la station expérimentale de Nutricia (Benquet, France). Trois groupes expérimentaux ont été constitués : le lot « Témoin » (sans extrait de plante), le lot « Mélisse » incluant 1 % de mélisse dans tous les aliments distribués de J0 à J34 et le lot « Ginseng » incluant 0,05 % de ginseng dans tous les aliments distribués de J0 à J34 (Travel et al., 2021) (tableau 3). Les doses d'incorporation des extraits ont été choisies à partir d'études montrant des effets sur les performances et/ou les marqueurs de santé (Astani et al., 2014 ; Kasapidou et al., 2014 ; Yu et al., 2015).

■ 4.2. Étape 2 : Réaliser une évaluation multicritère pour une vision globale des effets des extraits de plantes

Pour répondre aux utilisateurs, l'évaluation de l'intérêt des extraits de plante dans l'alimentation des volailles peut s'étendre au-delà des biomarqueurs de l'immunité en utilisant une approche plus globale des impacts. La **méthode d'évaluation multicritère** repose sur la collecte de plusieurs indicateurs de référence, mesurables, collectés tout au long de la période d'élevage et à l'abattoir afin d'objectiver les conséquences économique, sanitaire et sur le bien-être

des extraits sur les animaux (Lairez et al., 2017). Les indicateurs suivis sont listés dans le tableau 4 et les résultats obtenus pour les extraits de mélisse et de ginseng synthétisés dans le tableau 4 (data supplémentaires).

a. Les effets de la mélisse

Le poids vif et le Gain Moyen Quotidien (GMQ) ont été augmentés pendant la phase de croissance, grâce à une amélioration de l'efficacité alimentaire des animaux consommant un aliment supplémenté avec un extrait de mélisse. Ces résultats renforcent les observations de Kasapidou et al. (2014) et Poorghasemi et al. (2017) sur l'impact positif sur la croissance de l'incorporation de 1 % de mélisse dans la ration des volailles.

La supplémentation avec l'extrait de mélisse n'a pas modifié le comportement des poulets, quel que soit le moment de l'observation. Bien que les pododermatites observées soient modérées, le score global proportionnel à l'intensité des lésions a augmenté significativement avec l'âge et en présence de l'extrait de mélisse dans l'aliment, à J11, 21 et 31. La mélisse est connue pour agir sur les enzymes digestives (Bilen et al., 2020) et avoir des propriétés antispasmodiques et diurétiques, pouvant impacter la vitesse de transit et la constance des fientes (Miraj et al., 2017).

Une étude de l'effet dose ou du moment de distribution serait à conduire pour limiter les effets négatifs.

Le taux de mortalité et l'état global de santé des animaux n'ont pas été modi-

fés par la supplémentation avec l'extrait de mélisse. Le nombre de filets atteints de défauts musculaires (« white striping » et « wooden breast ») avait tendance à être plus faible pour le lot supplémenté. L'effet bénéfique de la mélisse sur le statut antioxydant, non mesuré dans notre étude, a déjà été montré sur la qualité de la viande au travers l'oxydation plus faible des lipides (Kasapidou et al., 2014). Le ratio hétérophile/lymphocyte (marqueur de l'immunité) était équivalent entre nos groupes. L'analyse des autres marqueurs sanguins (métabolisme, balance redox et inflammation) a montré que seul le statut antioxydant total (TAS) exprimant l'activité antioxydante globale du sang était augmenté à J30 pour les animaux recevant la mélisse. L'alimentation retardée est connue pour avoir des effets négatifs sur les performances, avec des modifications immédiates et à moyen terme sur la balance redox (Guilloteau et al., 2019 ; Foury et al. 2020). Dans ce contexte, l'effet bénéfique de la consommation d'un extrait de mélisse sur la balance redox a été confirmé par l'augmentation du statut antioxydant totale du sang plus marquée à la fin de la période d'élevage (J30).

b. Les effets du ginseng

En phase de croissance, l'efficacité alimentaire des poulets consommant l'extrait de ginseng est meilleure mais sans effet significatif sur le poids vif des animaux.

Quel que soit le moment de l'observation, la supplémentation de ginseng n'a pas modifié le comportement

Tableau 3. Description des conditions de pré et post-éclosion peu favorables mise en œuvre, des modalités d'élevage et d'alimentation permettant d'évaluer les effets des extraits de mélisse et de ginseng.

Groupes expérimentaux	Lot Mélisse	Lot Ginseng	Lot Témoin
Extraits de plante	Mélisse (1 %)	Ginseng (0,05 %)	Sans
Conditions pré et post éclosion	18 j de pré-stockage des œufs avant incubation 24 h d'attente des poussins à 20 °C avant mise en élevage 20 UI vitamine E /kg d'aliment Litière paille Densité d'élevage 39 kg/m ²		
Nombre d'animaux/lot	360	360	360
Nombre de parquets/lot	9	9	9
Nombre d'animaux/parquet	40	40	40

Tableau 4. Liste et modalités de mesure des indicateurs technico-économiques, sanitaires et de bien-être.

Objectifs	Critères	Indicateurs	Âge du contrôle	Effectif/lot	Référence méthode
Technico-économique	Poids de carcasse rémunéré	Poids vif	J1, J11, J21 et 31	Tous	/
		Saisie	J31	1/lot	
		Rendement carcasse	J32	1/lot	
	Valorisation alimentaire	Consommation d'aliment	J11, J21 et 31	Tous	/
		Indice de consommation			
Sanitaire	Mortalité	Mortalité	Quotidienne	Tous	/
	Propreté, blessure et maladies	Animaux sales, blessés, boiteux ou immobiles, état des pattes, propreté du cloaque, gêne respiratoire	J11, J21 et 31	Tous	/
	Défauts musculaires	Wooden breast, white striping et muscle « spaghetti »	J32	100 filets/lot	Bourin (2017)
	Formule sanguine	Numération hétérophiles, lymphocytes, hétérophiles/lymphocytes, monocytes, éosinophiles dans le sang	J30	18 poulets/lot	Gross et Siegel (1983)
	Métabolisme	Dosage glucose, acide urique, triglycérides dans le sang	J14 et J30	18 poulets/lot	Travel et al. (2021)
	Marqueur de l'inflammation	Dosage haptoglobine dans le sang			
	Marqueurs de la balance redox	Dosage de statut anti-oxydant total (TAS), de peroxydation des lipides (TBARS), de la superoxyde dismutase (SOD) dans le sang			
Bien-être	Comportement du groupe	Interaction entre individus, picage, répartition	J15, J23 et J28	Tous	Bignon et al. (2017)
	Adaptation aux exigences comportementales de l'espèce	Exploration de l'environnement, étirements et battements des ailes			
	Marqueurs de lésions	Score de pododermatites	J11, J21 et 31	90 poulets/lot	Michel et al. (2012)

des poulets. Comme pour la mélisse, le score global de pododermatites augmentait significativement avec l'âge et en présence de ginseng dans l'aliment jusqu'à J21. Les différences n'étaient plus visibles en fin d'élevage.

Le taux de mortalité et l'état global de santé (incluant les défauts musculaires) des animaux n'ont pas été modifiés par la supplémentation en ginseng. Les

marqueurs sanguins du métabolisme, du stress oxydant, de la balance rédox n'ont pas été modifiés. En revanche, l'haptoglobine, marqueur de l'inflammation était présente en quantité plus réduite à J14, dans le sang des poulets consommant du ginseng. Ces résultats confirment l'effet anti-inflammatoire du ginseng, déjà montré sur les poulets (Bong et al., 2011 ; Lee et Lau, 2011). De nombreux auteurs ont également décrit

des effets bénéfiques du ginseng sur l'immunité adaptative (Zhai et al., 2011 ; 2014 ; Li et al., 2012 ; Kallon et Abdullahi, 2015 ; Abdullahi et al., 2016 ;).

■ 4.3. Analyse multicritère

Pour illustrer l'impact des extraits végétaux sur chacun des objectifs économique, sanitaire et bien-être, une représentation graphique sous forme de radar

Tableau 5. Évaluation de la distribution d'un aliment supplémenté en extrait de mélisse ou de ginseng sur les indicateurs technico-économiques, sanitaires et de bien-être (d'après Travel et al., 2021).

Objectifs	Critères	Âge	Unité	Témoin	Mélisse (1 %)	P ^a	Témoin	Ginseng (0,05 %)	P ^a
Technico-économique	Poids vif	J11	g	294	290	NS	294	294	NS
		J21		767	780	0,0445	767	773	NS
		J31		1847	1837	NS	1847	1851	NS
	Gain Moyen Quotidien	J1-11	g/jour	23	23	NS	23	23	NS
		J12-21		47	49	0,0077	47	48	NS
		J21-31		108	106	NS	108	108	NS
	Indice de Consommation	J1-11		1,130	1,142	NS	1,130	1,138	NS
		J12-21		1,601	1,542	0,001	1,601	1,570	0,001
		J22-31		1,437	1,450	NS	1,437	1,445	NS
	Rendement	J32	%	75,20	75,90	NS	75,20	75,20	NS
Sanitaire	Mortalité	J1-15	%	0,83	0,83	NS	0,83	0,28	NS
		J1-31		2,22	3,06	NS	2,22	2,22	NS
	« White striping »	J32	%	44	38	0,0708	44	44	NS
	« Wooden breast »			18	9	0,0517	18	15	NS
	Muscle spaghetti			6	5	NS	6	11	NS
	Hétérophiles	J31	Nb de cellules	53,63	48,63	NS	53,63	47,63	NS
	Lymphocytes			46,13	51,38	NS	46,13	52,38	NS
	Hétéro/Lympho			1,26	1,04	NS	1,26	1,03	NS
	Haptoglobine	J14	mg/mL	1,30	1,29	NS	1,30	1,14	0,019
		J31		2,12	1,98	NS	2,12	1,96	NS
	TAS	J14	mmol/L	1,32	1,39	NS	1,32	1,27	NS
		J31		1,22	1,36	0,0651	1,22	1,28	NS
Bien-être	Interaction	J15	Nb comportements/min	0,33	0,78	NS	0,33	0,56	NS
	Picage			0,11	0,33	NS	0,11	0,11	NS
	Exploration			2,44	2,33	NS	2,44	3,11	NS
	Étirements			4,11	3,78	NS	4,11	3,33	NS
	Interaction	J28	Nb comportements/min	0,11	0,22	NS	0,11	0,22	NS
	Picage			0,00	0,11	NS	0,00	0,11	NS
	Exploration			0,56	0,22	NS	0,56	0,78	NS
	Étirements			4,00	3,78	NS	4,00	2,89	NS
	Pododermatites	J11	Moyenne de scores	1,23	1,5	< 0,0001	1,23	1,54	0,0056
		J21		1,67	2,15	< 0,0001	1,67	2,38	< 0,0001
		J31		2,08	2,38	< 0,0001	2,08	2,14	NS

^a P : Niveau de significativité du traitement mélisse ou ginseng. Les effets significatifs sont en caractères gras.

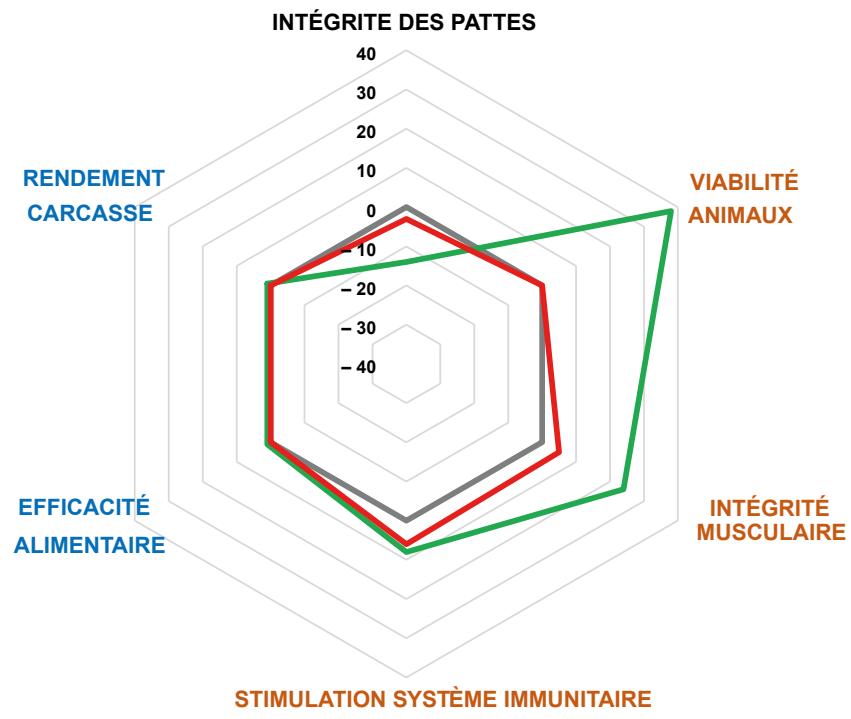
multicritère a été réalisée (figure 9). Pour chaque objectif, la valeur en fin d'élevage, 2 à 3 indicateurs d'intérêt et/ou sensibles à l'incorporation d'extrait ont été sélectionnés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amélioration ou de dégradation des indicateurs par rapport aux résultats du groupe témoin. Cette représentation montre clairement, qu'à résultats technico-économiques équivalents en fin d'élevage, l'incorporation de mélisse ou de ginseng, améliore les défenses immunitaires des poulets, et la mélisse aurait tendance à réduire l'apparition de troubles musculaires. Il faut toutefois être vigilant à l'impact sur l'apparition de pododermatites, plus marquée avec la mélisse.

Le modèle expérimental mis en œuvre dans cette dernière étape a été essentiel pour réaliser, en conditions proche du terrain, une évaluation plus globale de l'intérêt des extraits de plante pour les volailles, tels que la santé, le bien-être et les performances et ne pas se contenter uniquement des propriétés connues des extraits étudiés. C'est donc une étape indispensable qui permet de mettre en évidence d'éventuelles effets négatifs et/ou d'ajuster les modalités d'administration (dose, durée). Cette évaluation a été réalisée dans un cadre expérimental, l'étape finale est d'adapter la méthode pour réaliser des évaluations en élevage. Elle consisterait à suivre au moins 3 mises en place successives d'animaux dans 2 bâtiments identiques et contemporains en alternant le bâtiment témoin et essai à chaque mise en place. Ces suivis doivent être réalisés chez plusieurs éleveurs qui diffèrent en termes de structures d'élevage et de pratiques afin de vérifier la récurrence des effets.

Conclusion

Les différentes étapes décrites, indépendantes mais complémentaires, ont permis d'élaborer et de valider une méthodologie globale, pertinente et robuste pour sélectionner, évaluer la qualité et les effets des extraits de plantes sur l'immunité des poulets en limitant autant que possible l'expérimentation sur les animaux. La caractérisation des extraits par des méthodes de référence est un préalable nécessaire pour connaître la qualité du produit et ajuster

Figure 9. Radar multicritères représentant l'ensemble des paramètres d'élevage et d'abattoir mesurés.



Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amélioration ou de dégradation des indicateurs technico-économiques (bleue), sanitaires (marron) et de bien-être (gris), par rapport aux résultats du groupe témoin.

les taux d'incorporation. Les méthodes *in vitro* et *ex vivo* sont à privilégier, mais elles ne remplaceront pas les essais *in vivo* qui permettent une évaluation multicritère tenant compte des interactions fonctionnelles. Cette démarche est applicable à tous types d'extraits de plantes et elle peut être adaptée pour d'autres espèces animales ou d'autres effets biologiques. Cette boîte à outils méthodologiques est désormais disponible pour les firmes services, fabricants d'aliments, vétérinaires et organisations de production et ainsi guider leur choix.

Le projet a confirmé que des extraits de plantes, correctement sélectionnés, ont un réel impact bénéfique sur les animaux au niveau cellulaire et immunitaire. Leurs effets ne sont pas neutres, même à faible dose. Ce travail montre également qu'il est nécessaire de réviser les méthodes et protocoles pour évaluer les effets des plantes. Il est nécessaire de connaître les éventuelles supplémentations des aliments distribués et d'en discuter avec ses conseillers avant d'ajouter des extraits de plante ou huiles essentielles *via l'eau de boisson*, il peut exister des interactions avec la matrice alimentaire, des

interactions avec d'autres traitements, une inappétence ou encore une toxicité par doses cumulées. L'usage de plus en plus fréquent des préparations à base de plantes ou d'huiles essentielles pour gérer la santé des animaux d'élevage, a conduit l'Anses à s'autosaisir, en janvier 2022, afin de proposer une méthode d'évaluation adaptée aux médicaments vétérinaires à base de plantes. Leur usage doit bien sûr être raisonnable, réservé à des cas d'usage spécifique comme les antibiotiques, les deux types d'approches à visée de la santé étant complémentaires. Il pourrait en être de même pour les extraits de plantes qui font partie des additifs alimentaires.

La construction de cette méthode globale est le fruit d'un partenariat inter-filière et interdisciplinaire, riche d'enseignement et nécessaire pour intégrer tous les pans de la question de l'incorporation des extraits de plantes dans l'aliment des volailles dans un objectif de renforcement de l'immunité. L'organisation d'un colloque dédié²¹ a

21 Pour visionner les interventions du colloque <https://www.itavi.asso.fr/content/colloque-mexavi>

permis d'ouvrir le dialogue entre chercheurs, producteurs d'extraits, firmes services, fabricants d'aliments, vétérinaires et organisations de production. Le nouveau guide d'aide à la classification réglementaire des produits à base de plantes et la démarche MEXAVI y ont été présentés et discutés avec les utilisateurs pour envisager les mises en œuvre directes et les pistes à poursuivre.

Contribution des auteurs

Laurence Guilloteau et Angélique Travel ont coordonné la réflexion globale et rédigé le manuscrit. Rodrigo

Guabiraba, Denis Bellenot, Hanh Dufat, Margot Lamarque et Marion Pertusa ont contribué à la rédaction et aux illustrations. Tous les auteurs ont relu et approuvé la version finale du manuscrit.

Remerciements

Ce travail a été conduit dans le cadre du projet Cas Dar RT MEXAVI (n° 1612 – 2017/2020) et réalisé dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD). Il a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Agriculture et de l'interprofession poulets de chair (CIPC). Nous remercions le person-

nel de l'Unité d'expérimentation aviaire (PEAT, INRAE, 2018, 37380 Nouzilly, France ; <https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12>) et de l'installation expérimentale avicole (NUTRICIA, Haut Mauco, France) pour la conduite des essais poulets et pour leur aide. Nous remercions également Pharmanager Ingredients (Angers, France) pour avoir fourni les extraits de plantes et les techniciens de l'iteipmai (Melay Chemillé-en-Anjou, France) pour avoir effectué les analyses sur les extraits de plante et les aliments. Nous remercions Géraldine Chanu (AFCA-CIAL) pour son expertise sur le statut réglementaire des plantes et produits à base de plantes.

Références

- Abdullahi A.Y., Kallon S., Yu X., Zhang Y., Li G., 2016. Vaccination with astragalus and ginseng polysaccharides improves immune response of chickens against H5N1 avian influenza virus. *BioMed Res. Int.*, ID 1510264, 8p. <https://doi.org/10.1155/2016/1510264>
- AFCA-CIAL, 2020. Guide des bonnes pratiques pour l'utilisation des plantes et produits à base de plantes en alimentation animale. Octobre 2020. <https://www.afca-cial.org/telechargements.php>
- Alsobayel A.A., Al-Miman S.S., 2010. Effect of pre-incubation storage of hatching eggs on subsequent post-hatch growth performance and carcass quality of broilers. *Int. J. Poult. Sci.*, 9, 436–439. <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.436.439>
- Anses, 2018. AVIS et RAPPORT relatif à l'état des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage. Saisine n° 2013-SA-0122, Saisines liées n° 2011-SA-0071 et 2012-SA-0067. France, février 2018, rapport, 208p.
- Anses, 2020. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2019, Anses-ANMV, France, novembre 2020, rapport, 97pp.
- Arceusz A., Wesolowski M., 2013. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 83, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.020>
- Astani A., Heidary N., Schnitzler P., 2014. Attachment and penetration of acyclovirus-resistant herpes simplex virus are inhibited by *Melissa officinalis* extract: *Melissa officinalis* inhibits herpes simplex virus. *Phytother. Res.*, 28, 1547–1552. <https://doi.org/10.1002/ptr.5166>
- Bar Shira E., Sklan D., Friedman A., 2004. Impaired immune response in broiler hatching hindgut following delayed access to feed. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 105, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.011>
- Beug H., von Kirchbach A., Döderlein G., Conscience J.F., Graf T., 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 18, 375–390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90057-6)
- Bignon L., Mika, A., Mindus C., Litt J., Souchet C., Bonnaud V., Picchiottino C., Warin L., Dennery G., Brame C., Guesdon V., Bouvarel I., 2017. A shared and practical tool for welfare assessment in poultry and rabbit: EBENE. Xth Eur. Symp. Poultr. Welfare. Ploufragan, France. https://chrome-extension://efaidnbmnnibp-cajpcclcdedfmkaj/https://pure.au.dk/ws/files/118856397/978_90_8686_862_9.pdf
- Bilen S., Altift A.T.S., Özdemir K.Y., Salem M.O.A., Terzi E., Güney K., 2020. Effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) extract on growth performance, digestive and antioxidant enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 46, 471–481. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00737-z>
- Bong M.H., Ji S.Y., Park J.C., Moon H.K., Lee S.C., Lee J.H., Hong J.K., 2011. Effect of Feeding Plum and Red Ginseng Marcon Vital Reaction in Broiler Stress. *Korean J. Poult. Sci.*, 38, 213–223. <https://doi.org/10.5536/kjps.2011.38.3.213>
- Bourin, 2017. Les défauts de carcasse du poulet de chair : Référentiel visuel d'identification. Leaflet, 5 pages. <https://www.itavi.asso.fr/content/les-defauts-de-carcasse-du-poulet-de-chair>
- Boynar M., Ivarsson E., Andersson Franko M., Rezaei M., Wall H., 2021. Effect of hatching time on time to first feed intake, organ development, enzymatic activity and growth in broiler chicks hatched on-farm. *Animal*, 15, 100083. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100083>
- Bruneton J., 2016. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Tec & Doc, Lavoisier Paris, France.
- Cardoso Dal Pont G., Farnell M., Farnell Y., Kogut M.H., 2020. Dietary Factors as Triggers of Low-Grade Chronic Intestinal Inflammation in Poultry. *Microorganisms*, 8, 139. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010139>
- Dhama K., Tiwari R., Khan R., Chakraborti S., Gopi M., Karthik K., Saminathan M., Desingu P., Lakshmi T.S.,
2014. Growth Promoters and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles and Beneficial Applications: The Trends and Advances: A Review. *Int. J. Pharmacol.*, 10, 129–159.
- Ducrot C., Fric D., Lalmanach A.C., Monnet V., Sanders P., Schouler C., 2017. Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage. *INRAE Prod. Anim.*, 30, 77–88. <https://doi.org/10.20870/productions-animaux.2017.30.1.2234>
- Elibol O., Brake J., 2008. Effect of Egg Weight and Position Relative to Incubator Fan on Broiler Hatchability and Chick Quality. *Poult. Sci.*, 87, 1913–1918. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00014>
- El-Senousey H.K., Chen B., Wang J.Y., Atta A.M., Mohamed F.R., Nie Q.H., 2018. Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. *Poult. Sci.*, 97, 30–38. <https://doi.org/10.3382/ps/pex298>
- Ericsson M., Henriksen R., Bélteky J., Sundman A.S., Shionoya K., Jensen P., 2016. Long-Term and Transgenerational Effects of Stress Experienced during Different Life Phases in Chickens (*Gallus gallus*). *PLoS ONE*, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153879>
- Fortun-Lamothe L., Collin A., Combes S., Ferchaud S., Germain K., Guilloteau L., Gunia M., LeFloc'h N., Manoli C., Montagne L., Savietto D., 2022. Principes, cadre d'analyse et leviers d'action à l'échelle de l'élevage pour une gestion intégrée de la santé chez les animaux monogastriques. In : Numéro spécial, Rationaliser l'usage des médicaments en élevage. Baéza É., Bareille N., Ducrot C. (Éds). *INRAE Prod. Anim.*, 35, 307–326. <https://doi.org/10.20870/productions-animaux.2022.35.4.7225>
- Foury A., Collin A., Helbling J.C., Leterrier C., Moisan M.P., Guilloteau L.A., 2020. Spontaneous intake of essential oils after a negative postnatal experience has long-term effects on blood transcriptome in chickens. *Sci. Rep.*, 10:20702. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77732-5>

- Garrido D., Alber A., Kut E., Chanteloup N.K., Lion A., Trottereau A., Dupont J., Tedin K., Kaspers B., Vervelde L., Trapp S., Schouler C., Guabiraba R., 2018. The role of type I interferons (IFNs) in the regulation of chicken macrophage inflammatory response to bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.*, 86, 156-170. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.025>
- Goel A., 2021. Heat stress management in poultry. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 105, 1136-1145. <https://doi.org/10.1111/jpn.13496>
- Guilloteau L.A., Collin A., Koch A., Leterrier C., 2019. Spontaneous Intake and Long-Term Effects of Essential Oils After a Negative Postnatal Experience in Chicks. *Front Vet. Sci.*, 6, 72. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00072>
- Gross W.B., Siegel H.S., 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.*, 27, 972-979. <https://doi.org/10.2307/1590198>
- Islam S.U., Lee J.H., Shehzad A., Ahn E.-M., Lee Y.M., Lee Y.S., 2018. Decursinol Angelate Inhibits LPS-Induced Macrophage Polarization through Modulation of the NF κ B and MAPK Signaling Pathways. *Molecules*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23081880>.
- Kaiser M.G., Block S.S., Ciraci C., Fang W., Sifri M., Lamont S.J., 2012. Effects of dietary vitamin E type and level on lipopolysaccharide-induced cytokine mRNA expression in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 91, 1893-1898. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02116>
- Kallon S., Abdullahi A.Y., 2015. Immunity against avian influenza virus panax ginseng polysaccharide (GPS) can improve immunity against H9N2 avian influenza virus in chickens. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, 5, 715-722.
- Kasapidou E., Giannenas I., Mitlianga P., Sinapis E., Bouloumpasi E., Petrotos K., Manouras A., Kyriazakis I., 2014. Effect of *Melissa officinalis* supplementation on growth performance and meat quality characteristics in organically produced broilers. *Br. Poult. Sci.*, 55, 774-784. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.974140>
- Kawaguchi T., Nomura K., Hirayama Y., Kitagawa T., 1987. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res.*, 47, 4460-4464.
- Kim Y.J., Lee G.D., Choi I.H., 2014. Effects of dietary supplementation of red ginseng marc and α -tocopherol on the growth performance and meat quality of broiler chicken. *J. Sci. Food Agric.*, 94, 1816-1821. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6497>
- Klein-Junior L.C., de Souza M.R., Viaene J., Bresolin T.M.B., de Gasper A.L., Henriques A.T., Heyden Y.V., 2021. Quality Control of Herbal Medicines: From Traditional Techniques to State-of-the-art Approaches. *Planta Med.*, 87, 964-988. <https://doi.org/10.1055/a-1529-8339>
- Kolluri S., Elbirt K.K., Bonkovsky H.L., 1999 Heme biosynthesis in a chicken hepatoma cell line (LMH): comparison with primary chick embryo liver cells (CELC). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1472, 658-667. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(99\)00159-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(99)00159-2)
- Krekora M., Szymanska-Charget M., Niewiadomski, Z., Miś A., Agnieszka N., 2020. Effect of cinnamic acid and its derivatives on structure of gluten proteins – A study on model dough with application of FT-Raman spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 107, 105935. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105935>
- Lairez J., Feschet P., Botreau R., Bockstaller C., Fortun-Lamothe L., Bouvarel I., Aubin J., 2017. L'évaluation multicritère des systèmes d'élevage pour accompagner leurs évolutions : démarches, enjeux et questions soulevées. *INRA Prod. Anim.*, 30, 255-268. <https://doi.org/10.20870/productions-animautes.2017.30.3.2254>
- Lamot D.M., Van de Linde I.B., Molenaar R., Van der Pol C.W., Wijtten P.J.A., Kemp B., Van den Brand H., 2014. Effects of moment of hatch and feed access on chicken development. *Poult. Sci.*, 93, 2604-2614. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04123>
- Lee D.C., Lau A.S., 2011. Effects of Panax ginseng on Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Inflammation: A Mini-Review. *Molecules*, 16, 2802-2816. <https://doi.org/10.3390/molecules16042802>
- Li Y., Yan X., Hu S.H.F., 2012. Ginseng Stem-Leaf Saponins and Oil Adjuvant Synergistically Promote the Immune Responses to Newcastle Disease in Chickens. *J. Anim. Vet. Adv.*, 11, 2423-2428. <https://doi.org/10.3923/java.2012.2423.2428>
- Liu L., Shen J., Zhao C., Wang X., Yao J., Gong Y., Yang X., 2015. Dietary Astragalus polysaccharide alleviated immunological stress in broilers exposed to lipo-polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.*, 72, 624-632. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.057>
- Lv Z.P., Peng Y.Z., Zhang B.B., Fan H., Liu D., Guo Y.M., 2018. Glucose and lipid metabolism disorders in the chickens with dexamethasone-induced oxidative stress. *J Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 102, e706-e717. <https://doi.org/10.1111/jpn.12823>
- Marcinčáková D., Čertík M., Marcinčák S., Popelka P., Šimková J., Klempová T., Petrovič V., Tučková M., Bača M., 2011. Effect of dietary supplementation of *Melissa officinalis* and combination of *Achillea millefolium* and *Crataegus oxyacantha* on broiler growth performance, fatty acid composition and lipid oxidation of chicken meat. *Ital. J. Anim. Sci.*, 10, 4. <https://doi.org/10.4081/ijas.2011.e43>
- Mengome L.E., Voyer A., Akue J.P., Lerouge P., 2014. In vitro proliferation and production of cytokine and IgG by human PBMCs stimulated with polysaccharide extract from plants endemic to Gabon. *Molecules*, 19, 18543-18557. <https://doi.org/10.3390/molecules191118543>
- Michel V., Prampart E., Mirabito L., Allain V., Arnould C., Huonnic D., Le Bouquin S., 2012. Histologically-validated footpad dermatitis scoring system for use in chicken processing plants. *Br. Poult. Sci.*, 53, 275-281. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.695336>
- Miraj S., Rafieian-Kopaei null, Kiani S., 2017. *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 22, 385-394. <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>
- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Noy Y., Sklan D., 1999. Energy utilization in newly hatched chicks. *Poult. Sci.*, 78, 1750-1756. <https://doi.org/10.1093/ps/78.12.1750>
- Noy Y., Sklan D., 2001. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. *Poult. Sci.*, 80, 1490-1495. <https://doi.org/10.1093/ps/80.10.1490>
- Pampouille E., 2020. La mangeoire électronique Bird-e : un outil pour évaluer l'impact d'un extrait de plante sur le comportement alimentaire. Colloque MEXAVI : Intérêt des plantes chez les volailles : comment passer de la croyance à la science ?, 22 octobre 2020, Nouzilly, France. <https://www.youtube.com/watch?v=01hf9T6B0JA&t=483s>
- Peroval M.Y., Boyd A.C., Young J.R., Smith A.L., 2013. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One*, 8, e51243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051243>
- Pertusa M., Skiba F., Godfrain B., Guilloteau L., Cailleau Audouin E., Chartrin P., Travé A., Quentin M., 2017. Comparaison de l'effet de différents additifs alimentaires en production de poulets label rouge. *Journées Rech. Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*, Tours, France, 12.
- Petrovic V., Marcincak S., Popelka P., Simkova J., Martonova M., Buleca J., Marcincakova D., Tuckova M., Molnar L., Kovac G., 2012. The effect of supplementation of clove and agrimony or clove and lemon balm on growth performance, antioxidant status and selected indices of lipid profile of broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 96, 970-977. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01207>
- Poorghasemi M., Seidavi A., Mohammadi M., Simões J., Laudadio V., Tufarelli V., 2017. Effect of Dietary Inclusion of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.) Extract on Performance, Gut Microflora, Blood Parameters, Immunity and Carcass Traits of Broilers. *J. Poult. Sci.*, 54, 263-270. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170001>
- Qi T., Li H., Li S., 2017. Indirubin improves antioxidant and anti-inflammatory functions in lipopolysaccharide-challenged mice. *Oncotarget*, 8, 36658-36663. <https://doi.org/10.18633/oncotarget.17560>
- Qiao Y., Wang Z., Han Z., Shao Y., Ma Y., Liang Y., Chen Z., Wu H., Cui L., Zhang Y., Liu S., Li H., 2020. Global exploration of the metabolic requirements of gallid alphaherpesvirus 1. *PLoS Pathog.*, 16, e1008815. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008815>
- Ravindran V., 2003. Development of digestive function in neonatal poultry: physiological limitations and potential. *Proc. Australian Poult. Sci. Symp.*, Sydney, Australia, 1-7.
- Richmond J., 2000. The 3Rs-Past, present and future. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 27, 84-92.
- Russell W.M.S., Burch R.L., 1959. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead: Universities Federation for Animal Welfare. Russell W.M.S., Burch R.L. (Eds), London, UK, Methuen, 238 pp.
- Sklan D., Noy Y., Hoyzman A., Rozenboim L., 2000. Decreasing weight loss in the hatchery by feeding chicks and poulets in hatching trays. *J. Appl. Poult. Res.*, 9, 142-148. <https://doi.org/10.1093/japr/9.2.142>

- Tesseraud S., Pym R.A., Le Bihan-Duval E., Duclos M.J., 2003. Response of broilers selected on carcass quality to dietary protein supply: live performance, muscle development, and circulating insulin-like growth factors (IGF-I and -II). *Poult. Sci.*, 82, 1011-1016. <https://doi.org/10.1093/ps/82.6.1011>
- Travel A., Petit A., Barat P., Collin A., Bourrier-Clairat C., Pertusa M., Skiba F., Crochet S., Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Guillory V., Bellenot D., Guabiraba R., Guilloteau L.A., 2021. Methodologies to Assess the Bioactivity of an Herbal Extract on Immunity, Health, Welfare and Production Performance in the Chicken: The Case of *Melissa officinalis* L. Extract. *Front Vet Sci.*, 8, 759456. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.759456>
- Van de Ven L.J.F., Van Wagenberg A.V., Decuyper E., Kemp B., Van den Brand H., 2013. Perinatal broiler physiology between hatching and chick collection in 2 hatching systems. *Poult. Sci.*, 92, 1050-1061. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02534>
- Wei X.C., Cao B., Luo C.H., Huang H.Z., Tan P., Xu X.R., Yang M., Zhang Y., Han L., Zhang D.K., 2020. Recent advances of novel technologies for quality consistency assessment of natural herbal medicines and preparations. *Chin. Med.*, 15, 56. <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00335-9>
- Willemsen H., Debonne M., Swennen Q., Everaert N., Careghi C., Han H., Bruggeman V., Tona K., Decuyper E., 2010. Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. *World's Poult. Sci. J.*, 66, 177-188. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000243>
- Wu Q.J., Wang Y.Q., Qi Y.X., 2017. Influence of procyanidin supplementation on the immune responses of broilers challenged with lipopolysaccharide. *Anim. Sci. J.*, 88, 983-990. <https://doi.org/10.1111/asj.12729>
- Yu J., Chen Y., Zhai L., Zhang L., Xu Y., Wang S., Hu S., 2015. Antioxidative effect of ginseng stem-leaf saponins on oxidative stress induced by cyclophosphamide in chickens. *Poult. Sci.*, 94, 1955-1959. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01433>
- Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., Hassar M., 2002. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*, 9, 69-74. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00084>
- Zhai L., Li Y., Wang W., Hu S., 2011. Enhancement of humoral immune responses to inactivated Newcastle disease and avian influenza vaccines by oral administration of ginseng stem-leaf saponins in chickens. *Poult. Sci.*, 90, 1955-1959. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01433>
- Zhai L., Wang Y., Yu J., Hu S., 2014. Enhanced immune responses of chickens to oral vaccination against infectious bursal disease by ginseng stem-leaf saponins. *Poult. Sci.*, 93, 2473-2481. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04056>

Résumé

Le potentiel des plantes connues pour leurs vertus médicinales suscite un grand intérêt dans un contexte mondial de réduction des risques d'antibiorésistance. Dans le cadre de la nutrition animale, l'usage des extraits de plantes se positionne dans une démarche de gestion intégrée de la santé des animaux dans le but de favoriser la construction de leur immunité et de limiter l'apparition des maladies. Le soutien des fonctions immunitaires par l'apport d'extraits de plantes est un moyen de renforcer les capacités d'adaptation des poulets, notamment chez le poussin. Pour mettre en œuvre leur usage, cela nécessite de disposer de méthodologies complémentaires, adaptées et fiables pour s'assurer de la qualité et de la valeur ajoutée fonctionnelle des extraits pour la santé des poulets. Les étapes décrites, indépendantes et complémentaires, ont permis d'élaborer et de valider une méthodologie globale, pertinente et robuste pour sélectionner, caractériser et évaluer la qualité et les effets des extraits de plantes sur l'immunité des poulets en situation d'élevage. Des grilles d'analyse ont été rassemblées en un outil d'aide à la décision (CHECK'MEX). Les extraits de plantes sélectionnés comme la mélisse et le ginseng ont été testés pour évaluer leurs capacités à stimuler l'immunité innée des volailles dans des modèles cellulaires ou des modèles d'inflammation et de stress oxydant développés *ex vivo* sur cellules de poulet. Les extraits ont ensuite été évalués chez le poulet dans des conditions expérimentales proches du terrain permettant de valider leurs effets et de réaliser une analyse multicritère incluant des indicateurs de santé, de bien-être et de zootechnie. Cette démarche est applicable à tous types d'extraits de plantes et elle peut être adaptée pour d'autres espèces animales ou d'autres effets biologiques.

Abstract

Methodologies for selecting and characterizing plant extracts and evaluating their biological activities on the immunity of chickens.

The potential of plants known for their medicinal virtues is of great interest in a global context of reducing the risks of antibiotic resistance. In the context of animal nutrition, the use of plant extracts is part of an integrated management approach to animal health, with the aim of promoting immunity and limiting the onset of disease. The support of immune functions by the contribution of plant extracts is a way to reinforce the adaptation capacities of chickens, especially in the chick. To implement their use, this requires adapted and reliable complementary methodologies to ensure the quality and the functional added value of the extracts for the health of the chickens. The described steps, independent and complementary, allowed to elaborate and validate a global, relevant and robust methodology to select, characterize and evaluate the quality and the effects of plant extracts on the immunity of chickens in rearing situations. Analytical grids were gathered in a decision support tool (CHECK'MEX). Selected plant extracts such as lemon balm and ginseng were tested for their ability to stimulate innate immunity in poultry in cell models or in *ex vivo* models of inflammation and oxidative stress in chicken cells. The extracts were then evaluated in chickens under experimental conditions close to the field to validate their effects and to perform a multicriteria analysis including health, welfare and zootechnical indicators. This approach is applicable to all types of plant extracts and can be adapted for other animal species or other biological effects.

TRAVEL A., GUABIRABA R., TAVARES O., BELLENOT D., LEMAIRE B., DUFAT H., FILLIAT C., FERRE J-Y., SKIBA F., LAMARQUE M., PERTUSA M., GUILLOTEAU L.A., 2022. Méthodologies pour choisir et caractériser des extraits de plantes et évaluer leurs activités biologiques sur l'immunité des poulets. In : Numéro spécial, Rationaliser l'usage des médicaments en élevage. Baéza É., Bareille N., Ducrot C. (Eds). INRAE Prod. Anim., 35, 367-390.

<https://doi.org/10.20870/productions-animaux.2022.35.4.7337>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>

La citation comme l'utilisation de tout ou partie du contenu de cet article doit obligatoirement mentionner les auteurs, l'année de publication, le titre, le nom de la revue, le volume, les pages et le DOI en respectant les informations figurant ci-dessus.