

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Constantine 1

Institut des Sciences Vétérinaires



جامعة قسنطينة 1

معهد العلوم البيطرية



## Thèse

Présentée en vue de l'obtention du

**Doctorat en Sciences Vétérinaires**

**Option : Pathologie aviaire**

# Coccidiose du poulet : Etude pharmacologique et immunologique

Présentée Par : **DJEMAI Samir**

### Membres du jury :

<b>Président</b>	BENCHEIKH ELFEGOUN Mohammed Chérif	Professeur	Université de Constantine
<b>Examineur</b>	BENAKHLA Ahmed	Professeur	Université d'El-Tarf
<b>Examineur</b>	AISSI Meriem	Professeur	École Nationale Supérieure Vétérinaire- Alger
<b>Examineur</b>	ALLOUI Nadir	Professeur	Université de Batna
<b>Directeur de thèse</b>	MEKROUD Abdeslam	Professeur	Université de Constantine

**Année universitaire : 2016 / 2017**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالَ رَسُولَ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ: «اللَّهُمَّ انْفَعْنِي بِمَا عَلَّمْتَنِي، وَعَلِّمْنِي مَا يَنْفَعُنِي، وَأَزِدْنِي عِلْمًا تَنْفَعُنِي بِهِ». [السلسلة الصحيحة-حديث رقم 3151-الألباني].

Le Prophète- Que la prière d'Allah et Son salut soient sur lui- disait : « Ô Allah ! Fais-moi profiter de ce que Tu m'as appris, Apprends-moi ce qui m'apporte bénéfice et Accorde-moi une science par laquelle Tu Vas me faire profiter ». [Silsila Sahiha n°3151-Cheikh Al-Albani].

Prophet Muhammad-Peace be upon him- said : « Oh Allah ! Make useful for me what you have taught me, (and) teach me knowledge that will be useful to me and grant me such knowledge that will benefit me ». [Silsila Sahiha n°3151-Cheikh Al-Albani].

## Remerciements

**A Monsieur le Professeur Mohamed Chérif BENCHEIKH ELFEGOUN, de l'Institut des Sciences Vétérinaires-Université Mentouri de Constantine,**

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Hommages respectueux.

**A Monsieur le Professeur Abdeslam MEKROUD, de l'Institut des Sciences Vétérinaires-Université Mentouri de Constantine,**

Pour avoir accepté d'être le directeur de thèse, pour l'attention qu'il a portée à la réalisation de ce travail, pour ses grandes idées et ses si précieux conseils, pour le temps qu'il a consacré à la correction et l'orientation de ce travail.  
Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

**A Monsieur le Professeur Ahmed BENAKHLA, de l'Université d'El-Tarf,**

Qui a accepté de participer à notre jury de thèse.  
Sincères remerciements.

**A Madame le Professeur Meriem AISSI, de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,**

Qui a accepté d'être membre de notre jury de thèse.  
Veuillez trouver ici l'hommage de notre profond respect et nos sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Nadir ALLOUI, de l'Université de Batna,**

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse.  
Nos respects les plus sincères.

**A Monsieur le Professeur El Hacene BERERHI , Directeur de l'Institut des Sciences Vétérinaires-Université Mentouri de Constantine,**

Pour m'avoir toujours soutenu dans ma tâche pédagogique, pour son aide si précieuse et sans faille, ce qui m'a permis d'effectuer des stages au Royaume-Uni.  
Témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Geoff HIDE, de l'Université de Salford-Manchester UK,**

Pour sa patience, sa disponibilité et tout le temps accordé pour la réalisation de l'identification moléculaire des coccidies de poulet présentes dans nos prélèvements et ce, dans le but de performer ce travail.  
Très sincère reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Mark JENKINS, de l'Animal Parasitic Diseases Laboratory of Agricultural Research Service-USDA,**

Pour sa collaboration dans la réalisation du premier volet de ce travail, pour ses idées si précieuses dans la compréhension de l'atténuation des *Eimeria* spp par les agents physiques.  
Très sincères remerciements.

**A Mesdames les Docteurs Fafa et BELGHIAT, du Laboratoire d'Hygiène-Jijel,**

Pour leur assistance dans la réalisation et la lecture des coupes histologiques effectuées dans le premier volet de l'étude.

Hommage de mon profond respect.

**A Messieurs Brahim DJEMAI et Mohammed DJEMAI,**

Pour leur assistance inestimable dans la rédaction de cette thèse et des articles y afférents.

Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

**A Madame le Docteur Manal MEHIBEL et Monsieur le Docteur Samih MEHIBEL,**

Pour leur aide inappréciable et le soutien qu'ils m'ont toujours donné.

Je remercie chaleureusement tous les **membres du laboratoire « P.A.D.E.S.C.A »** : *Dr Amir Agabou, Dr Aimer Fayçal, Dr Mohammed Chérif Abdeldjalil, Dr Baghoul Saber, Dr Chebira Bacem, Dr Beroual Katiba* et bien d'autres.

## Acknowledgment

I would like to thank my committee chair, **Professor. Mohamed Chérif BENCHEIKH ELFEGOUN**, from the Institute of Veterinary Sciences- Constantine University, who has given us the great honor for accepting our thesis jury presidency.

A special thanks goes to my supervisor, **Professor. Abdeslam MEKROUD**, from the Institute of Veterinary Sciences- University of Constantine, for his big support and advice throughout these five years.

I would also like to thank the other members of the jury :

- **Professor. Ahmed BENAKHLA**, from the University of ElTarf-Algeria.
- **Professor Meriem AISSI**, from « Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire » of Algiers-Algeria.
- **Professor Nadir ALLOUI**, from the University of Batna- Algeria.

All my sincere feeling of gratitude to Professor. **El Hacene BERERHI**, Director of the Institute of Veterinary Sciences- University of Constantine, for having always supported me in my teaching task, for his precious and flawless help that enables to carried out the training course in the **University of Salford-UK**.

My special gratitude goes to Professor. **Geoff HIDE**, from the University of Salford-UK, for his patience, his availability and all his time granted to realize the molecular identification of the coccidia of chicken present in our samples , in order to perform this work.

I would like to thank **Professor. Mark JENKINS**, from the Animal Parasitic Diseases Laboratory of Agricultural Research Service-USDA, for his collaboration in the realization of the first part of this work.

Thanks also to **Dr. Fafa and Dr. BELGHIAT**, from the « Laboratoire d'Hygiène-Jijel-Algeria », for their help in carrying out the histological sections made in the first study.

I warmly thank **Mr. Brahim DJEMAI** and **Mr. Mohammed DJEMAI**, for their invaluable assistance in writing this thesis and corresponding scientific paper.

I want to also express my warmest thanks to **Dr Manal MEHIBEL**, from the University of Manchester-UK, and the Veterinary Doctor **Samih MEHIBEL**, for their invaluable help and support they have always given me.

I thank all the members of the laboratory « P.A.D.E.S.C.A »: **Dr Amir Agabou, Dr Aimer Fayçal, Dr Mohammed Chérif Abdeldjalil, Dr Baghoul Saber, Dr Chebira Bacem, Dr Beroual Katiba**.

## Je dédie ce travail

A mes très chères parents ... **Maman**, femme vigoureuse des plus puissantes, symbole d'abnégation et de dévouement, ... **Papa**, homme de sagesse des plus nobles, emblème de raison et de clairvoyance... pour leur soutien et leur assistance, pour l'exigence qu'ils ont eu envers moi, pour m'avoir toujours incité à donner le meilleur de moi-même, ... que ce travail soit la preuve de l'éducation juste qu'ils m'ont offerte ... espérant qu'ils soient fiers de moi, je leur adresse tous mes sentiments d'amour et de reconnaissance... Puisse Allah, le Tout-Puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon épouse **Sihem**, symbole de douceur et d'affection ... pour ses sacrifices, son soutien moral, sa gentillesse, son profond attachement et sa patience sans égal ... qu'elle trouve ici mon témoignage d'amour sincère et de respect ... Qu'Allah unisse nos chemins jusqu'à terme de nos vies.

A ma puce **Yamina** (Fatima) et mon brave **Ibrahim** qui ont agrémenté, agrémentent et agrémenteront, inchallah, toujours ma vie... pour être là, tout simplement ; sans vous, louange à Allah, la vie n'aurait aucune saveur.

A mon frère aîné **Mohammed**, mon ange gardien et mon compagnon dans les moments les plus durs de la vie... A son épouse **Zohra** et à leurs petites filles ; la charmante **Maram** et l'adorable **Chahla** (Chichi) ... Qu'ils trouvent ici mes meilleurs vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A **Naouel**, ma sœur unique, bijou et perle de notre famille ... et à son fils le vaillant **Mouatez** (Zizou)... Qu'Allah vous accorde une longue vie pleine de succès et de quiétude.

A mon frère cadet Daoud, personne généreuse des meilleures, serviable des plus complaisants... A son épouse **Soumia**... Qu'ils daignent accepter mes sentiments d'affection et de considération.

A mes amis intimes et mes fidèles compagnons **Sami** et **Toufik**... pour leur soutien et leur aide sans faille pendant toute ces longues années ... Tous mes sentiments de gratitude et de reconnaissance.

A mes oncles et tantes ... **Hamou, Moussa, Nacer, Mohammed, Mokhtar, Seddik, Rachid (Abbad), Rachid (Hammada), Mahfoud, Zoubida, Rachida, Saliha, Khadidja, Wahiba, Souad**... et à tous les membres de leurs familles... je vous aime tous.

A mon beau-père **Ammar** et mon beau-frère **Boualem**, ainsi que toute leur famille... Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments respectueux.

A tous mes cousins et cousines... **Nabil, Adel, Amine, Mouloud, Aissa, Taher, Yahya, Bilel, Abdou, Houcine, Nadjwa, Zoulikha, Ferial, Fadia, Habiba, Katima, Widad, Lydia, Warda**, et bien d'autres ... Je souhaite à tous une très bonne continuité dans la vie.

A ma défunte cousine **Laila**... Qu'Allah Lui Accorde Sa Miséricorde et l'Accueille en Son vaste paradis.

A mes amis d'enfance **Samih, Mounir, Lyes, Khaled, Laid, Karim, Latif, Riad, Rabeih, Omar, Antar, Ahmed, Atman, Fares, Raouf, Samir, Bader, Boualem, Bachir** et bien d'autres... pour leur amitié si précieuse et tous les bons moments passés et à venir.

# Sommaire

	<b>Page</b>
Remerciements	II
Dédicace	V
Sommaire	VII
Liste des tableaux	X
Liste des figures et des photos	XI
Liste des abréviations	XII
<b>Introduction</b>	1
<b>Première partie</b>	4
Synthèse bibliographique	
<b>Chapitre 1</b>	4
Données générales sur les coccidioses aviaires	
1. IMPORTANCE	5
2. EPIDEMIOLOGIE	6
3. ETUDE DU PARASITE	7
3.1. Taxonomie des espèces <i>Eimeria</i> spp du poulet	7
3.2. Cycle évolutif	10
3.3. Structure des germes infectieux des Apicomplexa	13
3.3.1. Au microscope photonique	14
3.3.2. Au microscope électronique	14
3.3.2.1. Membrane d'enveloppe	14
3.3.2.2. Micropore	15
3.3.2.3. Microtubules sous pelliculaire	15
3.3.2.4. Conoïde	15
3.3.2.5. Anneaux polaires	15
3.3.2.6. Corps dense antérieurs	16
3.3.2.7. Mitochondrie	16
3.3.2.8. Appareil de Golgi	16
3.3.2.9. Noyau	16
3.3.2.10. Autres organites	16
3.4. Métabolisme	17
4. DIAGNOSE DES ESPECES D' <i>Eimeria</i> spp DU POULET	18
5. SPECIFICITES ENVERS L'HOTE ET LE SITE TISSULAIRE	22
5.1. Spécificité vis-à-vis de l'hôte	22
5.2. Spécificité tissulaire et cellulaire	22
6. PATHOGENIE	24
7. SIGNES CLINIQUES DES COCCIDIOSES DU POULET	25
8. LESIONS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES	26
9. ETUDE IMMUNOLOGIQUE	27
9.1. Rôle de l'immunité humorale	28
9.2. Réponse immunitaire cellulaire	28
9.2.1. Réponse cellulaire systémique	29
9.2.2. Immunité cellulaire dans la muqueuse	30
10. CHIOMIOTHERAPIE ET RESISTANCE	30
11. VACCINATION	32
12. RESTAURATION DE LA SENSIBILITE	34
<b>Deuxième partie</b>	37
Etude expérimentale	
<b>Chapitre 2</b>	38
Evaluation de la sensibilité d'un pool d'isolats	

	<b>Page</b>
1. MATERIEL ET METHODES	39
1.1. Description du schéma expérimental	39
1.2. Molécules anticoccidiennes testées	40
1.3. Conception de l'élevage expérimental	40
1.4. Identification des lots	41
1.5. Description de l'inoculum	42
1.5.1. Origines des isolats	42
1.5.2. Sporulation et stockage des oocystes	42
1.5.3. Identification des espèces d' <i>Eimeria</i> spp dans l'inoculum	43
1.5.4. Rendement oocystal	44
1.5.5. Dose oocystale par sujet	44
1.6. Schéma expérimental	45
1.6.1. Médication	45
1.6.2. Inoculation	45
1.6.3. Paramètres retenus	46
1.6.3.1. Paramètres zootechniques	47
1.6.3.2. Paramètres lésionnels et parasitologiques	47
1.6.3.4. Analyse statistique	52
2. RESULTATS ET DISCUSSION	52
2.1. Paramètres zootechniques	52
2.2. Espèces d' <i>Eimeria</i> spp présentes dans l'inoculum étudié	55
2.3. Paramètres lésionnels et parasitologiques	56
2.4. Profils de la sensibilité anticoccidienne	63
2.4.1. Profil établi par McDougald	63
2.4.2. Profil établi par Chapman	63
<b>Chapitre 3</b>	<b>69</b>
Immunisation des poulets élevés au sol par deux vaccins	
1. MATERIELS ET METHODES	71
1.1. Conception des élevages expérimentaux	71
1.2. Vaccins anticoccidiens ( <i>E. tenella</i> ) élaborés et testés dans l'étude	72
1.3. Identification des élevages et des lots	72
1.4. Description des vaccins et des inocula	73
1.4.1. Origine des isolats	73
1.4.2. Sporulation et stockage d'oocystes	74
1.4.3. Identification de l'espèce <i>E. tenella</i> dans les isolats	74
1.4.4. Rendement oocystal	75
1.4.5. Doses oocystales vaccinales et infectantes	75
1.5. Paramètres d'évaluation des vaccins élaborés	76
1.5.1. Poids moyen et gain de poids	76
1.5.2. Indice de consommation	77
1.5.3. Excrétion oocystale	77
1.5.4. Score fécal caecal	77
1.5.5. Score lésionnel	77
1.5.6. Taux de Mortalité	80
1.6. Analyse statistique	82
2. RESULTATS ET DISCUSSION	82
2.1. Paramètres zootechniques	82
2.1.1. Expérimentation 1 (M)	82
2.1.1.1. Gain de poids et poids moyen	82

	<b>Page</b>
2.1.1.2. Indice de consommation	83
2.1.2. Expérimentation 2 (A)	83
2.1.2.1. Gain de poids et poids moyen	83
2.1.2.2. Indice de consommation	83
2.2. Paramètres lésionnel, parasitologique et clinique	85
2.2.1. Expérimentation 1 (M)	86
2.2.1.1. Après immunisation	86
2.2.1.2. Après inoculation	87
2.2.2. Expérimentation 2 (A)	90
2.2.2.1. Après immunisation	90
2.2.2.2. Après inoculation	91
3. DISCUSSION GENERALE	93
<b>Chapitre 4</b>	<b>97</b>
Techniques utilisées dans l'étude	
1. METHODE DE FLOTTATION	97
2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES OOCYTES	98
3. TECHNIQUE DE McMaster MODIFIEE	99
4. PREPARATION DES DOSES OOCYSTALES PURIFIEES	100
4.1. Doses oocystales relativement grandes	101
4.2. Doses oocystales faibles	101
5. PURIFICATION DES OOCYSTES D' <i>E. tenella</i>	101
6. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	102
6.1. Préparation des coupes histologiques	102
6.1.1. Fixation	103
6.1.2. Déshydratation	103
6.1.3. Eclaircissement	103
6.1.4. Imprégnation	104
6.1.5. Inclusion (enrobage)	104
6.1.6. Microtomie	104
6.1.7. Etalement	104
6.2. Coloration Hématoxyline-Eosine et montage des lames	107
6.2.1. Déparaffinage et réhydratation	105
6.2.2. Coloration	105
6.2.3. Montage manuel des lames	105
6.3. Observation microscopique	106
7. IDENTIFICATION DES ESPECES D' <i>Eimeria</i> spp	106
7.1. Diagnose morphologique	106
7.2. Identification par la technique ITS1-PCR	108
7.2.1. Extraction de l'ADN génomique du parasite	109
7.2.2. Lecture de densité optique (DO) de l'ADN	110
7.2.3. Préparation de la réaction de PCR (PCR master mix)	111
7.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	112
7.2.4.1. Préparation du gel d'agarose 2%	112
7.2.4.2. Préparation et dépôt des échantillons	113
8. ELABORATION DES VACCINS TESTES	115
8.1. Vaccin inactivé (mort) par les radiations micro-ondes	115
8.2. Vaccin vivant atténué par les rayons Ultraviolets C	116
<b>Conclusion</b>	<b>117</b>
<b>Recommandations et perspectives</b>	<b>119</b>
<b>Résumé</b>	<b>121</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>124</b>
<b>Annexe</b>	<b>143</b>

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Chapitre 1</b>	
Tableau 1. Caractéristiques des 9 espèces des coccidies du poulet	21
<b>Chapitre 2</b>	
Tableau 1. Molécules anticoccidiennes utilisées	40
Tableau 2. Produits anticoccidiens testés	40
Tableau 3. Composition de l'aliment utilisé dans l'étude	41
Tableau 4. Lots identifiés dans l'étude	41
Tableau 5. Origines des isolats	42
Tableau 6. Récapitulatif des résultats des paramètres zootechniques	52
Tableau 7. Scores lésionnels retenus	56
Tableau 8. Récapitulation des résultats de score lésionnel, de nombre oocystal moyen, de taux de mortalité	57
Tableau 9. Profil de la sensibilité anticoccidienne (McDougald et al., 1986)	63
Tableau 10. Profil de la sensibilité anticoccidienne (Chapman, 1989b)	63
<b>Chapitre 3</b>	
Tableau 1. Conception des élevages expérimentaux	71
Tableau 2. Composition de l'aliment utilisé	72
Tableau 3. Vaccins anticoccidiens ( <i>E. tenella</i> ) élaborés et testés	72
Tableau 4. Identification des élevages et des lots	73
Tableau 5. Récapitulatif des caractéristiques des élevages d'origine des isolats	73
Tableau 6. Rendement oocystal	75
Tableau 7. Doses vaccinales et d'inoculations	76
Tableau 8. Réalisation des scores lésionnels dans les deux expérimentations	78
Tableau 9. Poids moyen, gain de poids et indice de consommation	82
Tableau 10. Paramètres cliniques et lésionnels	85
Tableau 11. Score fécal caecal réalisé avant l'inoculation	85
Tableau 12. Score fécal caecal après inoculation	85
<b>Chapitre 4</b>	
Tableau 1. Récapitulatif des caractères oocystaux évalués	107
Tableau 2. Composants chimiques du tampon de lyse	110
Tableau 3. Concentration en acides nucléiques	111
Tableau 4. Programmes d'amplification selon l'espèce d' <i>Eimeria</i> spp du poulet	112
Tableau 5. Séquences d'ADN et températures d'hybridations des amorces ITS1	112

## Liste des figures et des photos

	<b>Page</b>
<b>Chapitre 1</b>	
Figure 1. Cycle évolutif d' <i>Eimeria tenella</i>	13
Figure 2. Diagramme de l'ultrastructure de l'espèce <i>Eimeria ninakohlyakimovae</i>	17
Figure 3. Programme anticoccidien annuel proposé	36
<b>Chapitre 2</b>	
Figure 1. Détermination, par la technique ITS1-PCR, des espèces présentes dans l'inoculum utilisé dans l'étude	44
Figure 2. Schéma expérimental	46
<b>Chapitre 2</b>	
Photo 1. Observation histopathologique : Lot N° 1 (Dic)	59
Photo 2. Observation histopathologique : Lot N° 2 (Las)	60
Photo 3. Observation histopathologique : Lot N° 3 (Mon)	60
Photo 4. Observation histopathologique : Lot N° 4 (Nar)	61
Photo 5. Observation histopathologique : Lot N° 5 (Sal)	61
Photo 6. Observation histopathologique : Lot N° 6 (INT)	62
<b>Chapitre 3</b>	
Figure 1. Détermination, par la technique ITS1-PCR, des espèces présentes dans les inocula utilisés dans l'étude	80
Figure 2. Schéma de l'expérimentation 1 (M)	81
Figure 3. Schéma de l'expérimentation 2 (A)	81
<b>Chapitre 4</b>	
Figure 1. Schéma d'un oocyste sporulé d' <i>Eimeria</i>	106
Figure 2. Détermination, par la technique ITS1-PCR, de l'espèce <i>E. maxima</i> dans un prélèvement de fientes de poulet de chair-Jijel, Algérie	115

## Liste des abréviations

Å	Angström
ACI	Index Anticoccidien
ADN	Acide désoxyribonucléique (Deoxyribonucleic acid)
ADNr	ADN ribosomal
ANOVA	Analysis of variance (Analyse de variance)
ARN (RNA)	Acide ribonucléique (Ribonucleic acid)
ARNr	ARN ribosomal
ARNr 16S (ou 16S rRNA)	Le Constituant ARN de la petite sous-unité ribosomale du 30S des procaryotes
ARNr 18S (ou 18S rRNA)	ARN ribosomique constituant la petite sous-unité 40S des ribosomes d'eucaryotes
AST	Anticoccidial Sensitivity Test
bp	Base pairs (paire de bases)
C	Cytosine
<i>C</i>	<i>Conoïde</i>
°C	Degré Celsius
CD	Classe de différenciation (Cluster of détermination ou cluster de différenciation)
CD4+	Cluster de différenciation 4, est une glycoprotéine exprimée à la surface des lymphocytes TCD4+, des cellules régulatrices T, des monocytes, des macrophages et de certaines cellules dendritiques
CD8+	Cluster de différenciation 8, est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules cytotoxique, qui est attirée vers des portions de la molécule CMH de classe I
CheY-SO7'	Recombinant refractile protein synthesized from <i>E. tenella</i>
cm	Centimètre
cm <sup>2</sup>	Centimètre carré
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Complément Minéral Vitaminé
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
DB	Dark bodies
Dic	Diclazuril
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
dNTPS	Désoxynucléotides triphosphates libres
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Réticulum endoplasmique
EtMIC	<i>Eimeria tenella</i> microneme recombinant gene
g	Gramme
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissues
GPM (%)	Pourcentage du gain de poids du lot inoculé traité par rapport au lot non inoculé non traité
h	Heure
HB1	Hitchner B1
IC	Indice de consommation
IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline B
IFN	Interféron

IL	Interleukine
IM	Intramusculaire.
<i>IM</i>	<i>Inner Membranous complex</i>
INT	Inoculé Non Traité
IP	Intra-péritonéale
ITS1	Internal Transcribed Spacer region 1
ITS 2	Internal Transcribed Spacer region 2
ITS1-PCR	Internal Transcribed Spacer 1- Polymerase Chain Reaction
ITS1-rDNA	Internal Transcribed Spacer 1- ribosomal DNA
IV	Intraveineux
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Dichromate de potassium
L	Litre
<i>L</i>	<i>Inclusion lipidique</i>
Las	Lasalocide
LIE	Lymphocyte Intra-Epithéliale
LPL	Lymphocyte de la <i>lamina propria</i>
Lymphocyte B	Support de l'immunité humorale adaptative dont les effecteurs terminaux sont les immunoglobulines
Lymphocyte T	Cellules dérivées du thymus (Thymus-derived cells)
M <sup>2</sup>	Mètre carré
MEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MHz	Mégahertz
MI	Mitochondrie
mL	Millilitre
mM )	Millimole/liter (Millimolar)
mm : Millimètre	mm : Millimètre
MN	Micronèmes
Mon	Monensin
MON-R(o)-1	Oocystes de la souche (1) d' <i>Eimeria tenella</i> résistante au moensin
MON-R(o)-2	Oocystes de la souche (2) d' <i>Eimeria tenella</i> résistante au moensin
MP	Micropore
MSD	Merck Sharp and Dohme laboratory
N	Noyau
NaCl	Chlorure de sodium
Nar	Nar : Narasin
NINT	Non Inoculé Non Traité
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
NO	Nombre Oocystal moyen
NU	Nucléole
OM	Membrane externe
OPG	Oocystes par gramme de fèces
P	Anneau polaire
P.A. D.E.S.C. A	Laboratoire de recherche de pathologie animale, développement des élevages et surveillance de la chaîne alimentaire des denrées animales ou d'origine animale
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pcDNA3	Mammalian expression vector
pH	Potentiel hydrogène
pM	Picomole/liter (Picomolar)
PP	Anneau polaire postérieur

PPI-PFK	Pyrophosphate-dependant phosphofructokinase
ppm	Partie par million
PR	Résistance partielle
R	Résistant
$R_1, R_2$	<i>Anneaux pré-conoïdaux</i>
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RB	Refractile bodies
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RH	Rhoptries
S	Sensible
Sal	Salinomycine
SC	Sous-cutané
SDS	Sodium lauroyl sarcosinate
SLM	Score lésionnel moyen du lot inoculé traité
SO7' (L'antigène)	Refractile body antigen
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
S (%)	Pourcentage des survivants du lot inoculé traité.
T	Thymine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TCD4+	Les lymphocytes T auxiliaires (T helper)
TCD8+	Lymphocyte T cytotoxique
TCR	T Cell Receptor (Récepteur du lymphocyte T)
TE	Tris EDTA
Th	T Helper cells
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane (ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol)
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µm	Micron
µW	Microwatt
US\$	Dollar américain
UV	Ultraviolet
V	Vésicule
V/V (%)	Pourcentage en volume par volume
W	Watt
W/V (%)	Pourcentage en poids par volume
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfate de Zinc

## Introduction

A l'orée du 20<sup>ème</sup> siècle et à ce jour, d'importantes connaissances scientifiques en matière des coccidies du poulet ont été recueillies. Les recherches concernant ces parasites ont toujours été mises à contribution dans le contrôle sur terrain, des coccidioses du poulet, infections toujours d'actualité.

Avant les années 1920, les coccidioses aviaires et même de certains mammifères ont été attribuées à une seule espèce d'*Eimeria* spp, dénommée *Eimeria avium*. Les signes cliniques chez le poulet ont été confondus avec d'autres infections (histomonose et bien d'autres infections causées par des bactéries). Entre l'année 1923 et l'année 1932, W Johnson (Université d'Oregon- Etats Unis d'Amérique) et E Tyzzer (Ecole Médicale d'Harvard- Etats Unis d'Amérique) ont mené de solides études sur les *Eimeria* spp du poulet au terme desquelles ils ont décrit les espèces coccidiennes suivantes: *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, comme ils ont défini les segments intestinaux spécifiques pour chaque espèce (**Johnson, 1923; Johnson, 1924; Johnson, 1930; Tyzzer, 1929; Tyzzer et al., 1932**).

Ces deux chercheurs ont, également, mis en lumière plusieurs phénomènes concernant les *Eimeria* : la spécificité de l'hôte et du site d'invasion, le mécanisme de l'auto-stérilisation, la relation entre la magnitude de la dose infectante et la sévérité de l'infection, l'immunité solide acquise après une infection primaire et l'épidémiologie de ces infections.

La plupart des anciens travaux sont focalisés sur le contrôle des coccidioses. C'est ainsi que les deux leaders (Johnson et Tyzzer) ont donné une grande importance à la prophylaxie sanitaire et ce, dans le but de limiter la contamination de l'hôte par les oocystes sporulés, tout en élucidant l'impossibilité de l'éradication du parasite dans le milieu extérieur. Ils recommandent, par conséquent, une exposition de l'hôte à de faibles doses de coccidies afin de déclencher une immunité protectrice.

A l'Université Wisconsin aux Etats Unis d'Amérique, P Levine (1942) a décrit pour la première fois une nouvelle espèce coccidienne du poulet : il s'agit d'*Eimeria brunetti*. Cependant, la mise en évidence, par le même chercheur, de l'activité anticoccidienne d'une molécule sulphanilamide, a permis de relancer des travaux ultérieurs concernant la

## Introduction

chimiothérapie pendant les décennies à venir (**Levine, 1939**). Les travaux les plus intéressants sont ceux de Delaplane et ses collaborateurs qui ont développé la notion d'additif alimentaire et son rôle dans le contrôle des coccidioses et ce, par l'addition de la sulphaquinoxaline à faible dose, dans l'aliment (**Delaplane et al., 1947**).

Par le passé, la chimiothérapie anticoccidienne jouait un rôle prépondérant dans la limitation de l'impact économique et surtout clinique des coccidioses dans les élevages industriels. Actuellement, la chimiothérapie demeure la méthode dominante de contrôle. Cependant, l'utilisation des vaccins anticoccidiens vivants chez le poulet (espèce *Gallus gallus*) a, également, une longue histoire depuis les travaux d'A Edgar (entre les années 1940 et 1960) sur l'immunisation des animaux par des *Eimeria* spp non atténuées (virulentes) à des doses très faibles. Ces études se sont traduites pour la première fois, par la commercialisation d'un vaccin anticoccidien virulent (COCCIVAC<sup>TM</sup>), dans les années 1950.

L'atténuation de la durée du cycle évolutif d'*Eimeria tenella* s'est effectuée pour la première fois par T Jeffers au milieu des années 1970, sanctionnée par la sélection de lignées d'*Eimeria* spp dites précoces, caractérisées par un cycle évolutif plus court et une virulence atténuée tout en conservant leur pouvoir immunogène. Ces lignées dites précoces sont utilisées comme vaccins anticoccidiens chez le poulet (LIVACOX<sup>TM</sup>, PARACOX<sup>TM</sup>, etc.).

On a pu constater au cours de ces dernières années et particulièrement en Europe, une grande tendance à l'utilisation des vaccins anticoccidiens et à la recherche y afférente par rapport à la recherche de nouvelles molécules et l'option de la chimiothérapie. Ceci est imputable à plusieurs facteurs : la sensibilité grandissante du consommateur vis-à-vis des résidus médicamenteux dans les aliments, les procédés de la recherche de nouvelles molécules qui sont très lourds et très onéreux, le problème de la chimiorésistance des *Eimeria* spp qui est inévitable.

Les études traitant des réponses immunitaires de l'hôte à des infections coccidiennes ont été accélérées à partir des années 1970, par les efforts notables de plusieurs chercheurs, notamment, M E Rose et H Lillehoj. L'ère moderne ou l'ère moléculaire est caractérisée par le développement des techniques sophistiquées de biologie moléculaire, le développement des connaissances de la biologie des parasites, la connaissance des micro-mécanismes cellulaires (la motilité du parasite, les mécanismes d'invasion de la cellule hôte et le rôle des organelles

du complexe apical (micronèmes et rhoptries), les mécanismes de spécificité de l'hôte, etc.), la diagnose des espèces du parasites par des techniques de biologie moléculaire, notamment, la technique PCR (polymerase chain reaction) ,etc.

Enfin, et par la vertu de l'avancement technologique et le développement important dans le domaine du génie génétique, des perspectives nouvelles concernant la vaccination, sont apparues. De fait, les travaux de F Tomley et ses collaborateurs sur le génie génétique des *Eimeria* spp, ont permis d'envisager la mise au point d'un vaccin anti-eimerien du poulet à base d'une seule espèce d'*Eimeria*, portant plusieurs antigènes de plusieurs espèces (d'*Eimeria*), susceptible de protéger les animaux contre plusieurs espèces (**Chapman, 2005**).

La présente étude est axée sur quatre chapitres :

- Le premier consiste en une étude bibliographique de la coccidiose du poulet.
- Le deuxième, traite de l'évaluation la résistance (ou la sensibilité) d'un pool d'isolats de terrain (Jijel-Algérie) contenant les deux espèces : *Eimeria acervulina* et *Eimeria maxima*, vis-à-vis de cinq molécules anticoccidiennes (diclazuril, lasalocide, monensin, narasin, salinomycine) et ce, par le biais de la réalisation du *Battery test* (anticoccidiogramme ou AST pour Anticoccidial Sensitivity Test).
- Le troisième est consacré à l'élaboration de deux types de vaccins de l'espèce *Eimeria tenella* isolée à partir des élevages de poulet de chair (Algérie (Jijel), le premier est inactivé (par les radiations microondes), le deuxième étant vivant et atténué (par les rayons Ultraviolets-C). L'efficacité et l'innocuité des deux vaccins ont été testées séparément, sur deux élevages expérimentaux de poulets de chair, élevés au sol. Les sujets vaccinés ont fait l'objet d'inoculation par la suite par une dose de l'ordre de 50000 oocystes sporulés d'*Eimeria tenella*/sujet.
- Le quatrième a trait, à la description des différentes techniques de laboratoire, utilisées au cours du deuxième et du troisième chapitre.

*Première partie*

## **Synthèse bibliographique**

## *Chapitre 1*

### *Données générales sur les coccidioses aviaires*

Les coccidioses du poulet sont des Eimerioses, dues à plusieurs espèces du genre *Eimeria*, parasites monoxènes, dont les formes endogènes se développent soit dans l'intestin grêle, soit dans les caecums et le rectum. D'où deux formes cliniques et anatomiques de ces maladies :

- Coccidiose intestinale.
- Coccidiose caecale.

Ces deux formes peuvent être associées pour déterminer une entéro-typhlite, toutefois, elles évoluent, le plus souvent, aujourd'hui, dans les élevages du poulet au sol de façon sub-clinique (coccidiose intestinale), en sorte qu'elles sont économiquement contraignantes.

Elles sont connues dans tous les pays, aucune exploitation n'en est exempte (**Euzeby, 1987**), et elles sont le résultat de la rupture de l'équilibre entre :

- Les parasites (coccidies) : leur nombre, leur pouvoir pathogène et leur capacité à promouvoir une immunité chez l'hôte.
- L'hôte : sa sensibilité incluant sa protection par des molécules médicamenteuses et sa capacité à se régénérer des dommages dus au développement parasitaire.
- L'environnement, les conditions de l'élevage intensif étant favorables au développement de ces parasites (**Creveu-Gabriel et Naciri, 2001**).

## **1. IMPORTANCE**

La coccidiose du poulet est une maladie toujours d'actualité, représentant un problème majeur pesant très lourd sur l'industrie avicole, et causant de grosses pertes économiques. Ceci est imputable à plusieurs facteurs dont :

- Le coût du contrôle anticoccidien (médication, vaccination, les équipements utilisés pour lutter contre la maladie, etc.).
- La prédisposition aux maladies opportunistes de caractère secondaires (à la coccidiose).
- La morbidité (mauvaises performances : mauvais gain de poids, indice de consommation détérioré, chute ponte).
- La mortalité (**Foster, 1949 ; Williams, 1999 ; Teeter et al., 2008 ; Zhang et al., 2013**).

Le coût annuel global induit par la coccidiose à l'industrie avicole mondiale est estimé à 3 billions de US\$ (**McDonald et Shirley, 2009**). Au Royaume-Uni, les pertes annuelles (pendant les années 1990), ont culminé à 70 millions de US\$ (**Williams, 1999**). En 2013, les pertes ont dépassé 73 millions de US\$ pour la seule Chine (**Zhang et al., 2013**).

Il est très difficile de faire une évaluation financière exacte des pertes causées par les différentes espèces d'*Eimeria* spp du poulet, car certaines espèces, notamment, *E. mitis* et *E. praecox*, induisent seulement de la morbidité, la mortalité dépendant de la sévérité de l'infection (**Mayhew, 1934 ; Fitz-Coy et Edgar, 1992 ; Ruff, 1999 ; Williams, 1999 ; Chapman, 2000 ; Williams, 2002b**).

## 2. EPIDEMIOLOGIE

Les coccidies du poulet sont des parasites universels, existant partout dans le monde là où le poulet est élevé. La spécificité par rapport à l'hôte élimine la possibilité aux oiseaux sauvages d'être des réservoirs de parasites. Les principaux facteurs de propagation du parasite sont mécaniques notons : le déplacement du personnel travaillant dans les élevages entre les bâtiments d'élevages et les fermes (**McDougald et al., 1986 ; McDougald et al., 1987**).

L'infection coccidienne est caractérisée par l'auto-stérilisation (self-limiting), laquelle est une réaction du système immunitaire de l'animal atteint, dépendant elle-même de la dose oocystale ingérée et du statut immunitaire de l'oiseau. Des enquêtes épidémiologiques réalisées en Amérique du nord, Amérique du sud et en Europe, ont révélé la présence des *Eimeria* spp du poulet dans presque la totalité des élevages étudiés, avec un pourcentage plus élevé dans les élevages européens (**Braunius et al., 1986 ; Litjens, 1986**).

Le nombre des oocystes dans la litière et les fèces de poulets élevés au sol, atteint le pic de la 4<sup>ème</sup> à la 5<sup>ème</sup> semaine d'âge, suite à quoi il décline, généralement, au cours de l'élevage. Après l'enlèvement des oiseaux et au cours du vide sanitaire, le nombre des oocystes est très réduit, la litière et les fèces étant de très mauvais environnements pour la survie des oocystes.

La nature ubiquitaire de ce parasite, rend impossible son éradication par les mesures sanitaires (mise en quarantaine, désinfection, les autres moyens sanitaire) (**McDougald et Reid, 1997**).

### 3. ETUDE DU PARASITE

#### 3.1. Taxonomie des espèces *Eimeria* spp du poulet

Le premier protozoaire mis sous microscope en 1674 par Antoine Van Leeuwenhoek était probablement *Eimeria stiedae*, localisé dans la vésicule biliaire du lapin. Toutefois et à cette époque, ce chercheur, a malencontreusement attribué les lésions de cette coccidiose hépatique du lapin (due à *Eimeria stiedae*) à la tuberculose (**Chermette et Bussiéras, 1992 ; Peek, 2010**). En 1870, Eimer décrivait le cycle endogène de *Gregarina falciiformis* chez la souris, laquelle était dénommée plus tard *Eimeria falciiformis* par Schneider qui a ainsi proposé le nouveau genre *Eimeria* (**Schneider, 1875**).

La taxonomie des coccidies, était toujours un sujet de controverse entre les chercheurs et a sans répit subi des remaniements et de nouvelles définitions. Dans les anciens schémas taxonomiques (exemple celui de Bütschli entre 1880- 1882) le Phylum Protozoa était divisé en 4 classes : Mastigophora (flagellés), Sarcodina (organismes amiboïdes), Infusoria (ciliés) et Sporozoa ; Coccidia était une Sous-classe de la Classe Sporozoa. Globalement, ce schéma Bütschlien a dominé depuis les années 1880 jusqu'aux années 1980 (**Honigberg et al., 1964**).

Plus tard, le schéma Bütschlien a été remis en question et même passé de mode (les 4 classes suscitées de Protozoa sont actuellement invalides), compte tenu de l'accroissement du nombre des Phyla (**Levine et al., 1980; Cavalier-Smith, 1998; Corliss, 1998; Patterson, 2002**); du fait, également, des avancées technologiques progressives, dans le domaine de la biologie (l'utilisation du microscope électronique pour dévoiler l'ultrastructure des microorganismes, les séquençages des ARNr 16S et des gènes responsable de la synthèse de certains antigènes, la théorie de l'évolution cellulaire par endo-symbiose sériée, etc.). Tout récemment et, sur la foi des données d'ultrastructure et de biologie moléculaire, de nouveaux schémas concernant le sommet de la systématique ont été proposés avec 6 groupes reconnus d'eucaryotes (Opisthokonta, Amoebozoa, Excavata, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata) en sorte que Protozoa a été érigé au rang de Règne (**Adl et al., 2005 ; Peek, 2010**).

Les coccidioses du poulet, sont des infections digestives causées par des protozoaires appartenant à la Famille des Eimeridae. La plus grande majorité des coccidies du poulet et d'autres volailles, notamment, la dinde, la caille, la perdrix, le faisan, etc. appartient au Genre *Eimeria* (**McDougald, 2008**).

Selon **Levine (1982)**, le Phylum Apicomplexa comprend plus de 5000 espèces de protozoaires parasites (**Corliss, 2001**), incluant les gregarines, les haemogregarines, les coccidies, les plasmodiidea et les piroplasmes. La plus grande famille dans ce Phylum est celle des Eimeriidae, contenant environ 1400 espèces, dont plus de 70% appartiennent au Genre *Eimeria* spp.

Traditionnellement, au sein de la Famille des Eimeriidae, les genres sont classés selon le nombre des sporocystes dans l'oocyste et le nombre des sporozoïtes dans le sporocyste. C'est ainsi que l'*Eimeria* spp renferme 4 sporocystes contenant chacun 2 sporozoïtes.

La position taxonomique des *Eimeria* spp citée ci-dessous a été décrite et confirmée par plusieurs auteurs, notamment, **Levine (1985, 1988)**, **Lee et al., (1985)**, **Tenter et al., (2002)** pour la classification basse, **Cavalier-Smith (1998, 2002a, 2003a, 2004)**, **Cavalier-Smith et Chao (2004)**, **Adl et al., (2005)**, **Lee et al., (2001)** pour la classification haute :

- Empire **EUKARYOTA (Cavalier-Smith, 1998)**

Le domaine ou l'empire des Eukaryota (ou Eucaryotes) regroupe tous les organismes uni ou pluricellulaires, se caractérisant principalement par des cellules possédant un noyau avec enveloppe nucléaire.

- Règne **Protozoa (Cavalier-Smith, 2002a ; Cavalier-Smith, 2003a)**

Les protozoaires sont des êtres vivants de nature animale, unicellulaires, dépourvus de chlorophylle, hétérotrophes. Ils se multiplient par mitose et certains ont aussi une reproduction sexuée. A un stade au moins de leur cycle biologique, ils sont mobiles, selon diverses modalités. Bien que fondamentalement formés d'une seule cellule, les protozoaires, à certains stades (formes de multiplication asexuée, gamétocytes mâles), constituent des éléments plurinucléés (**Euzeby, 1986**).

- Infra-règne **Alveolata (Cavalier-Smith, 1991)**

Organismes unicellulaires de formes assez diverses. La monophylie du groupe est basée essentiellement sur l'étude des ARNr 18S. Il existe cependant un caractère qui leur est propre : la présence de vésicules sous-membranaires, les alvéoles (d'où ce taxon tire son nom), ces alvéoles corticaux disparaissant, parfois, à la faveur des micropores.

- **Phylum Apicomplexa (Levine et al., 1980 ; Adl et al., 2005)**  
Parasites obligatoires et intracellulaires avec des spores plurinucléées, caractérisés par une ultrastructure complexe de l'apex (d'où le nom Apicomplexa) de leurs agents de dissémination (ou germe infectieux) dénommée le complexe apical : qu'il s'agisse des éléments de dissémination intracellulaire chez l'hôte (mérozoïtes, endozoïtes) ou des éléments d'infection d'un nouvel hôte (sporozoïtes) (**Euzeby, 1986 ; Euzeby, 1987 ; Chermette et Bussiéras, 1992 ; Euzeby, 1998**).
- **Classe Conoïdasida (Levine, 1988)**  
Cette classe se divise en 2 Sous-classes : les coccidies et les grégarines. Tous les Conoïdasida possèdent un conoïde ; tronc-conique contractile sous forme d'un ressort, situé à l'apex du germe infectieux. Le conoïde exerce une action mécanique en relation avec la pénétration de l'élément infectieux dans la cellule hôte. Les grégarines ont une tendance à parasiter les invertébrés avec des gamontes extracellulaires, les coccidies infectant surtout les vertébrés et possèdent des gamontes intracellulaires (**Euzeby, 1987**).
- **Sous-classe Coccidiasina (Leuckart, 1879)**  
Parasites intracellulaires chez des hôtes essentiellement vertébrés. Ils sont monoxènes ou dixènes, leur reproduction étant surtout syngamique (mais parfois de type syzygie). Les sporocystes se développent habituellement à l'intérieur des oocystes (**Euzeby, 1987 ; Peek 2010**).
- **Ordre Eucoccidiorida (Léger et Duboscq, 1910)**  
Caractérisé par une multiplication asexuée par mérogonie, bipartition par fission longitudinale ou endogénie.
- **Sous-ordre Eimeriorina (Léger, 1911)**  
Localisations diverses chez leurs hôtes, mais la gamétogonie s'accomplit toujours dans les cellules épithéliales des organes creux. La multiplication asexuée par mérogonie ou endogénie, la reproduction sexuée par syngamie avec des microgamontes et des macrogamontes de taille sub-égale. Les microgamontes produisent de nombreux microgamètes bi ou triflagellés possédant une mitochondrie (**Euzeby, 1987**).
- **Famille Eimeriidae (Minchin, 1903)**  
Parasites monoxènes, intracellulaires (en surface de la cellule chez le *Cryptosporidium*) des cellules épithéliales essentiellement digestives, mais parfois

celles du foie et des reins. Ils possèdent une phase sexuée et une autre asexuée qui sont toutes les deux endogènes et une sporulation exogène (**Losson, 1996**).

- Genre *Eimeria* (**Schneider, 1875**)

Parasite de nombreux vertébrés (mammifères et oiseaux). Le cycle évolutif est monoxène, les oocystes sporulés contiennent 4 sporocystes renfermant chacun 2 sporozoïtes (**Euzeby, 1987 ; Chermette et Bussiéras, 1992**).

- Espèces *Eimeria* spp du poulet

Neuf espèces d'*Eimeria* spp du poulet, dont certaines sont d'une validité douteuse, notamment, *Eimeria hagani*, ont été décrites (**McDougald et Reid, 1997**) :

1. *Eimeria acervulina* (**Tyzzar, 1929**)
2. *Eimeria brunetti* (**Levine, 1942**)
3. *Eimeria hagani* (**Levine, 1938**)
4. *Eimeria maxima* (**Tyzzar, 1929**)
5. *Eimeria mitis* (**Tyzzar, 1929**)
6. *Eimeria mivati* (**Edgar et Siebold, 1964**)
7. *Eimeria necatrix* (**Johnson, 1930**)
8. *Eimeria preacox* (**Johnson, 1930**)
9. *Eimeria tenella* (**Railliet et Lucet, 1891 ; Fantham, 1909**).

### 3.2. Cycle  volutif

Semblables à tous les parasites du genre *Eimeria*, les *Eimeria* du poulet sont, également, très spécifiques vis-à-vis de l'hôte et des segments intestinaux de prédilection. Les *Eimerias* spp, achèvent leur cycle biologique après 3 phases distinctes : la sporogonie, la mérogonie (schizogonie), la gamétogonie. Toutefois, la durée de ces phases diffère d'une espèce (d'*Eimeria* spp)   une autre (**Yun et al., 2000**). Le cycle évolutif cité ci-après était proposé par **Edgar (1992)** :

Les coccidioses du poulet sont causées par l'ingestion d'oocystes sporulés, lesquels se transmettent aux poulets, par des moyens mécaniques, notamment, la litière, les chaussures, les vêtements, les équipements, les aliments et l'eau souillés par les coccidies (**McDougald et Reid, 1997 ; Conway et McKenzie, 2007**).

L'oocyste contenant le zygote diploïde est éliminé avec les matières fécales dans le milieu extérieur (**Chermette et Bussiéras, 1992 ; Losson, 1996**) ; après quoi il subit la première phase, la sporulation.

- *Sporulation* : Elle se déroule dans le milieu extérieur si les conditions ambiantes sont favorables : oxygénation, humidité relative élevée (supérieure à 70 %) et température élevée (entre 25 à 30°C). Dans des conditions favorables et quelques heures après l'émission oocystale, le zygote se contracte et subit 2 divisions successives qui vont produire 4 masses appelées sporoblastes. Ces divisions laissent parfois un reliquat cytoplasmique, le corps résiduel oocystal. Chaque sporoblaste s'entoure d'une fine paroi réfringente et subit au même moment une division le transformant en sporocyste. Chaque sporocyste contient 2 sporozoïtes haploïdes fusiformes qui sont les formes infectantes. Chez certaines espèces la formation de sporozoïtes laisse également, un reliquat, le corps résiduel sporocystal (**Losson, 1996 ; McDougald et Reid, 1997**).

Dans de meilleures conditions, le temps requis pour la sporulation est une caractéristique d'espèces que l'on utilise pour l'identification. En général et dans des conditions favorables, un minimum de 2 à 4 jours est requis, mais en pratique l'est souvent plus long. L'oocyste sporulé est une forme de résistance ; sa survie dans le milieu extérieur est très longue. Il représente aussi la forme infectante (**Chermette et Bussiéras, 1992 ; Losson, 1996**). Après ingestion par un hôte adéquat, l'oocyste sporulé subit le processus d'excystation (la libération des sporozoïtes).

- *Excystation* : Durant cette étape, la paroi oocystale se détruit sous l'action mécanique du gésier, libérant ainsi les 4 sporocystes. Dans le duodénum, les enzymes du pancréas exocrine (trypsine et chymotrypsine) et les sels biliaires agissent sur le corps de *Stieda* (épaississement de la paroi cellulaire des sporocystes) pour le dissoudre, libérant les deux sporozoïtes de chaque sporocyste (**Jeurissen et al., 1996 ; Creviu-Gabriel et Naciri, 2001**).

Une fois dans la lumière intestinale, les sporozoïtes libérés constituent les éléments infectants pénétrant activement dans les cellules épithéliales des villosités intestinales et ce, par la vertu de leur mouvement de reptation (**Losson, 1996**).

Certaines espèces comme *E. brunetti* et *E. praecox*, se développent dans les cellules épithéliales des sommets des villosités intestinales (site d'invasion), tandis que chez les espèces, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* et *E. tenella*, le sporozoïte envahit une cellule épithéliale au sommet des villosités ; après quoi il est ingéré puis transporté au fond des cryptes par les lymphocytes intra-épithéliales (L.I.E.). A ce niveau, le

sporozoïte quitte le L.I.E. et pénètre dans une cellule épithéliale des cryptes pour s'y multiplier (Al-Attar et Fernando, 1987 ; Lawn et Rose, 1982 ; Trout et Lillehoj, 1993 ; Trout et Lillehoj, 1995 ; Jeurissen et al., 1996 ; Losson, 1996). Une fois à l'intérieur des cellules épithéliales (des villosités ou des cryptes), les sporozoïtes s'enclenchent dans le processus de mérogonie (Rose, 1987 ; Edgar, 1992).

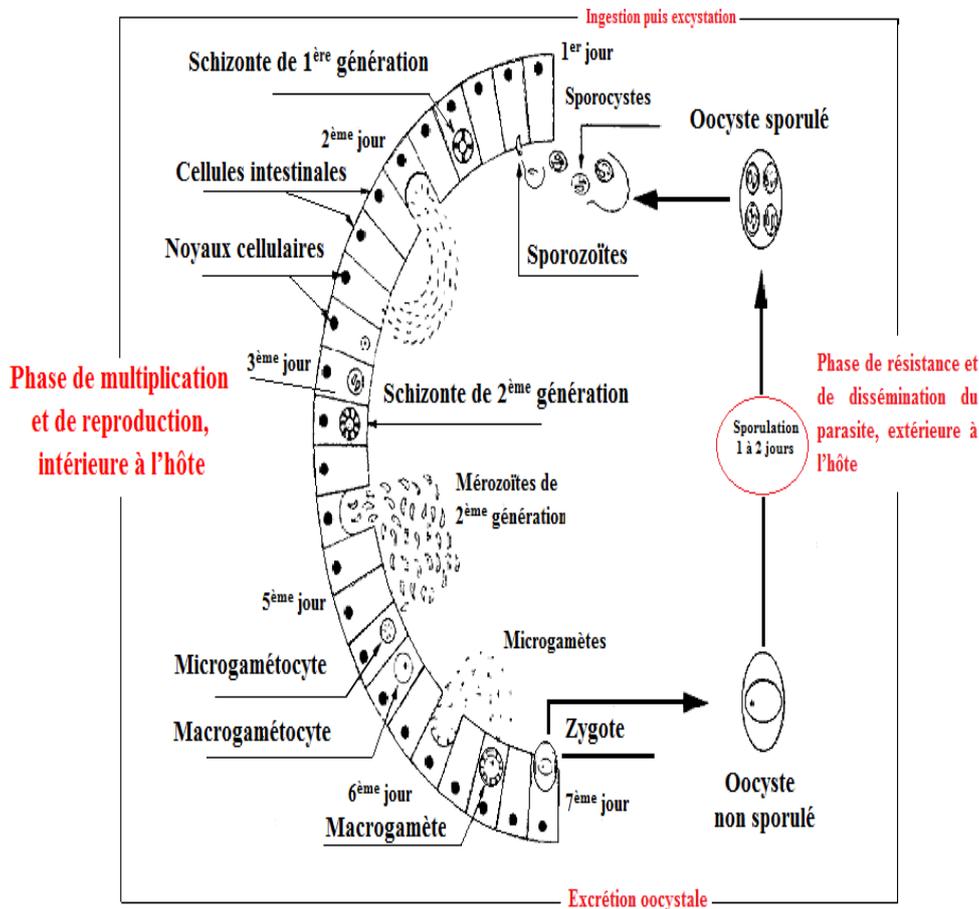
- *Mérogonie (Schizogonie)* : A l'intérieur de la cellule, le sporozoïte s'arrondit se transformant, ainsi, en un trophozoïte, 12 à 48 heures post-infections. Ce dernier ; se développe en un méronte (schizonte) jeune ou immature, dans lequel se manifestent des divisions nucléaires (mitoses) puis cytoplasmiques, donnant deux jours et demi post-infections, un méronte mûr de première génération (méronte I : 24 x 17 $\mu$ m) comportant environ 900 mérozoïtes de première génération (mérozoïtes I), pourvus chacun d'un complexe apical. La cellule parasitée finit par s'éclater le troisième jour post-infection et libère ainsi les mérozoïtes I qui pénètrent aussitôt dans de nouveaux entérocytes, subissant par la suite la mérogonie de deuxième génération pour générer trois jours et demi à quatre jours post-infection des mérontes mûrs de deuxième génération (mérontes II), très volumineux (50 $\mu$ m) pour leur grand axe), comportant chacun 200 à 350 mérozoïtes de deuxième génération (mérozoïtes II). Le nombre de mérogonies est souvent limité à 2, mais il peut aller jusqu'à 5 pour certaines espèces. A la fin du processus de mérogonie, le parasite entre dans la phase gamétogonie qui constitue la phase sexuée du cycle (Chermette et Bussiéras, 1992 ; Jeurissen et al., 1996 ; Losson, 1996 ; Conway et McKenzie, 2007).
- *Gamétogonie* : Les mérozoïtes de la dernière génération envahissent de nouvelles cellules intestinales, se différenciant en gamétocytes mâles et femelles, dénommées respectivement microgamétocytes et macrogamétocytes.

Le macrogamétocyte, unicellulaire, grossit et mûrit en un seul macrogamète. Le microgamétocyte subit un grand nombre de divisions, produisant un grand nombre de microgamètes unicellulaires et biflagellés (3 flagelles dans certaines espèces). Ces microgamètes sont allongés, fusiformes, s'accumulant à la périphérie du microgamétocyte pour donner un aspect classique en microscopie électronique « le corps chevelu ». Remarquons que le nombre de macrogamétocytes est toujours supérieur à celui des microgamétocytes (Chermette et Bussiéras, 1992 ; Jeurissen et al. 1996 ; Losson, 1996 ; McDougald et Reid, 1997 ; Yunet al., 2000).

Au terme de la gamétogonie, le macrogamétocyte est fécondé par un microgamète mâle mature donnant naissance à un zygote. Après la fécondation, une épaisse coque

se forme autour du zygote, à ce stade le zygote est considéré comme un oocyste immature. Une fois parvenu à maturité, l'oocyste se libère dans la lumière intestinale après la rupture de la cellule hôte, il sera donc expulsé dans les fèces. La durée de la période prépatente varie d'une espèce à une autre de 3 à 7 jours. Toutefois, l'excrétion des oocystes se poursuit plusieurs jours. Chez certaines espèces comme *E. tenella* et *E. necatrix*, les dommages tissulaires les plus importants sont causés après la rupture des mérontes de seconde génération. Chez les autres espèces, les mérontes ont une petite taille et causent des lésions bénignes. Toutefois, les gamétocytes peuvent engendrer de graves lésions (Jeurissen et al., 1996 ; McDougald et Reid, 1997 ; Yun et al., 2000).

La figure ci-après, schématise le cycle évolutif d'*E. tenella*, lequel est un schéma typique des espèces d'*Eimeria* spp du poulet (Jeurissen et al., 1996).



**Figure 1. Cycle évolutif d'*Eimeria tenella*. Deux générations de mérogonies ou plus et une seule génération de gamétogonie. (Jeurissen et al., 1996 ; McDougald et Reid, 1997 ; Crevieu-Gabriel et Naciri, 2001 ; Trees, 2001).**

### 3.3. Structure des germes infectieux des Apicomplexa

Les germes infectieux ou les agents de dissémination (sporozoïtes, mérozoïtes, endozoïtes) des Apicomplexes sont caractérisés par une structure complexe au niveau de leur apex, dénommée complexe apical, d'où le nom « Apicomplexa ». Ce complexe est constitué de rhoptries, d'un conoïde, de micronèmes et d'un ou plusieurs anneaux polaires. L'ensemble de ces structures sont impliquées dans le processus de l'invasion de cellules hôtes (**Jensen et Edgar, 1976 ; Perkins, 1992 ; Dubremetz et Schwartzman, 1993**). La description ci-après a été mentionnée par **Euzéby (1987)**.

#### 3.3.1. Au microscope photonique

Au microscope photonique, les germes infectieux apparaissent sous une morphologie très simple : Eléments ovalaires ou plus souvent, en forme de croissant à extrémités inégales :

- Une extrémité amincie, considérée comme antérieure et constituant l'apex de la cellule.
- Une extrémité élargie, postérieure.

Le cytoplasme, en grande partie homogène, renferme un noyau excentré, situé au gros pôle de la cellule, une formation granuleuse ovoïde, au pôle mince et des granulations plus ou moins épaisses dispersées dans le quart antérieur de la cellule.

#### 3.3.2. Au microscope électronique

Au microscope électronique, la structure est beaucoup plus riche, comportant les éléments ci-après.

##### 3.3.2.1. Membrane d'enveloppe (pellicule superficielle)

Elle est composée de deux éléments :

- *Composante externe (plasmalemme)* : Unique, de 30-120Å d'épaisseur, interrompue au niveau d'un micropore.
- *Composante interne (membrane interne)*, formée de deux membranes élémentaires souvent étroitement accolées. En réalité, elle est formée de vésicules aplaties, ce qui lui donne l'aspect bi-membranaire. Entre les vésicules se trouvent des espaces recouverts uniquement par le

plasmalemme, correspondant aux interruptions de la membrane interne. Au niveau de l'apex du germe infectieux (extrémité amincie du croissant), se trouve une interruption de la membrane interne, circulaire, dénommée : l'anneau polaire.

#### 3.3.2.2. Micropore

C'est une ouverture latérale située en un point variable du germe infectieux. Il s'agit d'une invagination du plasmalemme à l'intérieur d'un cylindre à paroi épaisse formé par la réflexion des vésicules de la membrane interne autour de l'invagination. Le micropore mesure 2000-3000Å de diamètre. Il est habituellement unique (certains éléments en possèdent deux) et joue un rôle dans la préhension des nutriments lors des stades parasitaires intracellulaires (**Scholtyssek et Mehlhorn, 1970**).

#### 3.3.2.3. Microtubules sous pelliculaire

Il s'agit de formations tubulaires, creuses, situées sous la membrane interne et fixées, en avant, sur un anneau polaire. Leurs extrémités postérieures, libres délimitent un anneau postérieur. C'est au niveau de cet anneau postérieur que, lors de la multiplication asexuée, se prépare la cellule fille. Les microtubules sont en nombre variable, de l'ordre de 20 en moyenne et ont un diamètre de 200-300Å chacun. Elles sont formées de deux membranes concentriques, enroulées sur elles-mêmes et striées longitudinalement et transversalement. Elles ont un rôle de soutien, constituées de protéines contractiles, intervenant aussi dans les mouvements de glissement du parasite.

#### 3.3.2.4. Conoïde

Il s'agit d'une formation tronc-conique, située à l'apex de la cellule, il est d'une hauteur de l'ordre 3000Å et d'un diamètre de l'ordre de 1600Å au sommet et de 2800Å à la base. Il est surmonté de 1 à 2 anneaux polaires. Tous les germes infectieux des Apicomplexes sont pourvus de conoïdes, exception faite des plasmodies et des piroplasmies. Il est constitué d'éléments fibrillaires, disposés selon une spirale enroulée dans le sens des aiguilles d'une montre, depuis le sommet ; ainsi le conoïde a-t-il la forme d'un ressort, pouvant se contracter ou se détendre. Le conoïde exerce une action mécanique en relation avec la pénétration du germe dans les cellules hôtes.

### 3.3.2.5. Anneaux polaires

Il existe de 1 à 3 anneaux polaires, pré-conoïdaux, épaissement circulaire formés par la membrane interne et sur lesquels s'attachent, en avant, les microtubules. Ils jouent un rôle dans la motilité du parasite.

### 3.3.2.6. Corps dense antérieurs

Formations osmiophiles, très denses aux électrons. Il en existe deux types :

- *Rhoptries* : Organelles paires en formes de massues, fixées à la base du conoïde par leur extrémité mince et s'étendant dans le quart antérieur de la cellule. Elles sont au nombre de deux, parfois plus. Ces éléments ont une fonction sécrétoire élaborant des enzymes protéolytiques qui, ajoutant leur action à celle des conoïdes, assurent la pénétration intracellulaire du germe infectieux.
- *Micronèmes* : Ils ont l'aspect de tubes spiralés apparaissant, à la coupe, sous forme de taches denses dispersées sur le quart antérieur de la cellule. Ils pourraient s'agir de rhoptries rudimentaires, ayant vraisemblablement, comme les rhoptries, une activité sécrétoire.

### 3.3.2.7. Mitochondrie

Les germes infectieux des Apicomplexes possèdent une ou plusieurs volumineuses mitochondries (sous forme allongée ou ovalaire), exception faite des piroplasmes, chez lesquelles les mitochondries sont remplacés par des vésicules à double membrane.

### 3.3.2.8. Appareil de Golgi

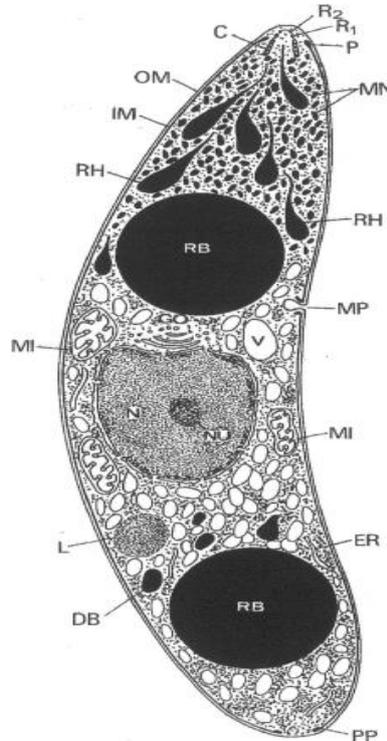
Il existe chez tous les Apicomplexa, sauf les Piroplasmes. Il est formé de 1 ou plusieurs dictyosomes, disposés en avant du noyau, parfois logés dans une dépression de celui-ci ou épars dans le cytoplasme. Il peut avoir, aussi une structure lamellaire.

### 3.3.2.9. Noyau

Situé en position postérieure ou médio-postérieure, très développé avec une membrane nucléaire double et interrompue au niveau des pores. Il renferme un nucléole et des plaquettes de chromatine.

### 3.3.2.10. Autres organites

Un réticulum endoplasmique et de nombreux ribosomes y sont également présents. Quelques grains d'amylopectine sont localisés dans la partie postérieure du parasite, ils ne sont entourés d'aucune membrane (**Fortier et Dubremetz, 1993**).



**Figure 2. Diagramme de l'ultrastructure de l'espèce *Eimeria ninakohlyakimovae* (coccidie de la chèvre).** C : Conoïde ; DB : Corps noirs (dark bodies) ; ER : Réticulum endoplasmique ; IM : Membrane complexe interne (inner membranous complex) ; L : Inclusion lipidique ; MI : Mitochondrie ; MN : Micronèmes ; MP : Micropore ; N : Noyau ; NU : Nucléole ; OM : Membrane externe ; P : Anneau polaire ; R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> : Anneaux pré-conoïdaux ; PP : Anneau polaire postérieur ; RB : Corps réfringents (refractile bodies) ; RH : Rhoptries ; V : Vésicule. (**Scholtyssek, 1979**).

### 3.4. Métabolisme

La principale source d'énergie des *Eimeria* spp au cours de leurs cycles évolutifs, parvient de composants d'hydrate de carbone (mannitol, glycogène, amylopectine sous forme de réserves), bien que les lipides puissent être également, métabolisés (**Coombs et al., 1997**). La présence des enzymes à spécificité anaérobie (PPI-PFK : pyrophosphate-dépendant phosphofructokinase) (**Muller et al., 2001**) chez les *Eimeria* spp incline à penser que ces parasites sont adaptés à ce type de métabolisme (anaérobiose) (**Denton et al., 1994**) ; à titre d'exemple, les sporozoïtes sont des anaérobies facultatifs. Le mannitol est présent à des concentrations très élevées dans les oocytes non sporulés (**Schmatz et al., 1989**). Le cycle du mannitol s'implique dans plusieurs stades du parasite, notamment, les oocystes et les

sporozoïtes (**Michalski et al., 1992**), bien que sa fonction reste incertaine. Toutefois pour certains auteurs, notamment, **Allocco et al. (1999)**, il est évident que ce cycle est nécessaire pour le déroulement de la sporulation.

La chaîne respiratoire et d'autres voies cataboliques sont similaires à celles des voies typiques des eucaryotes (**Coombs et al., 1997**).

La voie de synthèse du shikimate, absente chez les mammifères, présente chez les coccidies, est primordiale pour la synthèse des acides aminés aromatiques (**Roberts et al., 1998**). Ce caractère donne une cible additionnelle pour la chimiothérapie et pour certaines molécules herbicides manifestant une efficacité contre les enzymes de la voie de synthèse du shikimate des parasites Apicomplexes, notamment, *Plasmodium falciparum* (**McConkey, 1999**).

#### **4. DIAGNOSE DES ESPECES D'*Eimeria* spp DU POULET**

Toutes les espèces d'*Eimeria* spp du poulet parasitent l'intestin et peuvent être différenciées par leurs morphologies, tropismes cellulaires et pathogénicités (**Long et al., 1976 ; Long et Reid, 1982**). Ces critères sont largement satisfaisants pour identifier les 5 espèces les plus pathogènes et fréquentes : *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. tenella*. Leur pathogénicité varie de modérée à très sévère. Les deux autres espèces *E. praecox* et *E. mitis* considérées comme étant bénignes n'induisent pas des lésions très caractéristiques. Toutefois, dans les expérimentations menées par **Williams (1998)**, les deux espèces précitées causent des inflammations intestinales, des diarrhées et de mauvais indices de consommations. En conséquence, elles peuvent engendrer d'importantes pertes économiques.

Traditionnellement, la diagnose des coccidioses du poulet s'effectue par l'inspection des lésions et l'examen histologique. Macroscopiquement, elle est réalisée par un examen minutieux en portant plus d'attention sur la localisation et l'extension des lésions, après quoi l'étiologie des lésions est confirmée par l'analyse à l'aide d'un microscope optique, du produit de grattage (grattage des lésions examinées) par la recherche d'éventuels oocystes et/ou schizontes.

L'évaluation du score lésionnel coccidien est réalisée selon un barème mis au point par **Johnson et Reid (1970)**, pour ce faire l'intestin est divisé en 4 régions : 1- Duodénum et la

partie haute du jéjunum ; 2- L'intestin moyen (autour du diverticule de Meckel) ; 3- L'iléon et le rectum ; 4- Les caeca. Le score lésionnel est évalué selon l'espèce d'*Eimeria* en cause (par rapport à la région intestinale inspectée) et la sévérité des lésions :

- Score 0 : Pas de lésions.
- Score +1 : Lésions légères.
- Score +2 : Lésions modérées.
- Score +3 : Lésions sévères.
- Score +4 : Lésions extrêmement sévères ou la mort de l'oiseau à cause de la sévérité des lésions coccidiennes.

Il est à noter que chaque espèce d'*Eimeria* spp du poulet possède son propre barème du score lésionnel et ce, après examen des zones intestinales spécifique à chaque espèce :

- *E. acervulina* : Duodénum et la partie haute du jéjunum.
- *E. maxima* et *E. necatrix* : L'intestin moyen (autour du diverticule de Meckel).
- *E. brunetti* : L'iléon et le rectum.
- *E. tenella* : Les caeca (**Holdsworth et al., 2004**).

L'identification des espèces d'*Eimeria* spp du poulet par morphométrie est peu spécifique en raison du chevauchement des caractéristiques morphologiques des oocystes (**Eckert et al., 1995**). En 1975, Shirley a été le premier à développer une approche de diagnostic moléculaire basée sur la migration d'isoenzymes des oocystes. Cette technique de MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) est aujourd'hui largement utilisée pour la distinction des variations génétiques entre les espèces d'*Eimeria* infectant les oiseaux. **Ellis et Bumstead (1990)**, sont parmi les premiers à démontrer que les amorces d'ARN ribosomal (ARNr) et d'ADN ribosomal (ADNr) sont capables d'être utilisées pour une identification individuelle des espèces d'*Eimeria* spp et ce, à travers des profils caractéristiques des fragments de restrictions. **Procunier et al. (1993)**, ont utilisé l'analyse de l'ADN polymorphe aléatoirement amplifié (RAPD : Randomly amplified polymorphic DNA), pour différencier entre les deux espèces *E. acervulina* et *E. tenella* et identifier des souches au sein de ces espèces. Les techniques de l'ADN recombiné ont été utilisées pour distinguer entre les différentes souches d'*E. tenella* (**Shirley, 1994**) et pour développer des marqueurs pour les souches précoces et les souches résistantes aux anticoccidiens (**Shirley et Harvey, 1996**). L'amplification par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) de la séquence de l'ADN génomique « ITS1 »

(ITS1: Internal Transcribed Spacer region 1 ou l'espaceur interne transcrit 1 de l'ADN génomique) a été utilisée pour identifier six espèces d'*Eimeria* spp du poulet (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella*) (**Schnitzler et al., 1997**). La différenciation de huit espèces d'*Eimeria* spp du poulet y compris *E. hagani* et *E. mitis* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella*), a été mise au point en utilisant la technique PCR à deux étapes (**Tsuji et al., 1997**). Six espèces d'*Eimeria* spp du poulet (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella*) ont été caractérisées par l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism) de séquences « ITS2 » de l'ADNr monobrin (des différentes espèces d'*Eimeria* spp) (ITS2 : Internal Transcribed Spacer region 2 ou l'espaceur interne transcrit 2 de l'ADN ribosomal) amplifiées par PCR (**Woods et al., 2000**). Par la suite, ces différentes méthodes de PCR ont laissé apparaître une très grande efficacité, lors des études épidémiologiques de la coccidiose du poulet (**Allen et Fettere, 2002**).



## 5. SPECIFICITES ENVERS L'HOTE ET LE SITE TISSULAIRE

### 5.1. Spécificité vis-à-vis de l'hôte

Les *Eimeria* spp ont une très grande spécificité vis-à-vis de l'hôte. Généralement, les espèces d'*Eimeria* spp ne peuvent accomplir leurs cycles évolutifs que chez une seule espèce hôte, exception faite de certaines infections expérimentales ; c'est l'exemple démontré par **McLoughlin (1969)** qui a pu, expérimentalement, achever un cycle complet d'*E. meleagrimitis* (coccidies affectant naturellement la dinde) chez des poulets immunodéprimés par des injections journalières de dexaméthasone. Cependant, le même traitement chez la dinde ne peut pas les rendre vulnérables vis-à-vis de la coccidie caecale du poulet, *E. tenella*. Les mécanismes responsables de la spécificité de l'hôte sont mal connus, toutefois des auteurs font valoir l'intervention de plusieurs facteurs, notamment, les facteurs génétiques (**Mayberry et al., 1982 ; Mathis et McDougald, 1987**), nutritionnels, biochimiques et immunologiques (**Fry et al., 1984 ; Smith et Lee, 1986 ; Yun et al., 2000**).

### 5.2. Spécificité tissulaire et cellulaire

Les *Eimeira* spp ont une très forte spécificité tissulaire. Notons, à titre d'exemple, les *Eimeria* du lapin telles que :

- *E. intestinalis*, coccidie du lapin, se développant dans les cellules épithéliales du jéjunum distal et de l'iléon.
- *E. stiedai* possède un tropisme particulier pour les canaux biliaires du foie.
- *E. coecicola* se développe dans le GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissues), dont l'appendice vermiforme, le *Sacculus rotundus* et les plaques de Peyer.

Chez le poulet, cette spécificité peut être utilisée comme un moyen de diagnose entre les espèces d'*Eimeria* spp du poulet (**Johnson et Reid, 1970**). Cependant, cette spécificité est plus ou moins, stricte en fonction de l'espèce parasitaire et des conditions d'inoculation (**McDougald et Reid, 1997**) :

- *E. acervulina* : Touchant fréquemment la muqueuse duodénale, toutefois, lors des infections lourdes, l'infection peut atteindre les parties basses du jéjunum et touche même l'iléon ou le bas intestin (**Conaway et McKenzie, 2007**).
- *E. brunetti* : Parasite du bas intestin (iléon, colon), s'étendant plus bas vers le gros intestin (entre les caeca et le rectum). Les stades précoces envahissent le plus fréquemment l'intestin moyen (**Conaway et McKenzie, 2007**).

- *E. maxima* : Espèce infectant l'intestin moyen de part et d'autre du diverticule de Meckel. Lors des infections sévères, les lésions peuvent s'étendre de la portion haute du duodénum jusqu'à la jonction iléo-caecal (**Conaway et McKenzie, 2007**).
- *E. mitis* : Cette coccidie envahit la partie basse de l'intestin grêle, allant du diverticule de Meckel jusqu'à l'entrée des caeca (**McDougald et Reid, 1997**).
- *E. mivati* : La zone parasitée par cette espèce peut s'étendre du duodénum jusqu'aux caeca et cloaque (**McDougald et Reid, 1997**).
- *E. necatrix* : Espèce infectant l'intestin grêle, ciblant approximativement, les mêmes zones envahies par *E. maxima* (intestin moyen de part et d'autre du diverticule de Meckel) (**McDougald et Reid, 1997**).
- *E. praecox* : Elle parasite le duodénum, espèce apathogène ne produisant pas de lésion macroscopique (**McDougald et Reid, 1997 ; Long et Reid, 1982 ; Conaway et McKenzie, 2007**).
- *E. tenella* : Agent causal de la coccidiose caecale envahissant les deux caeca ; lors des infections lourdes, les lésions peuvent s'étendre au-dessus et au-dessous du sphincter iléo-caeco-colonique (**Johnson et Reid, 1970**).

Dans certains cas, comme pour *E. flavescens* (coccidie du lapin), les différents stades parasitaires peuvent avoir une spécificité tissulaire différente (**Norton et al., 1979**) :

- La 1<sup>ère</sup> génération de mérontes se développe dans les glandes de Lieberkühn de l'intestin grêle distal.
- Les mérozoïtes migrent ensuite vers le caecum et le côlon où ils se développent dans l'épithélium superficiel jusqu'à la 4<sup>ème</sup> génération.
- La dernière multiplication asexuée et la gamogonie se déroulent dans l'épithélium glandulaire.

Les *Eimeria* possèdent une forte spécificité cellulaire. La majorité des espèces se développe dans les cellules épithéliales d'origine endodermale de l'intestin, mais également, dans les canaux biliaires, du rein ou du poumon (**McCully et al., 1967**). Ainsi, chez le poulet, *E. brunetti* et *E. praecox* se développent dans les entérocytes du sommet des villosités intestinales (**Fernando et al., 1987**) alors que les autres espèces se développent dans les entérocytes des cryptes (**Van Doorninck et Becker, 1957 ; Challey et Burns, 1959 ; Pattillo, 1959 ; Doran, 1966**). Les différentes étapes du cycle peuvent se dérouler dans des

types cellulaires différents. Les mérozoïtes d'*E. flavescens* se développent, de la 2<sup>ème</sup> à la 4<sup>ème</sup> génération, dans la partie luminale de l'épithélium des cryptes alors que la gamogonie se déroule dans les cellules glandulaires (Norton et al., 1979).

Le tropisme spécifique vers les tissus et les cellules ciblés a été démontré expérimentalement, par des inoculations parentérales des différentes formes parasitaires : oocystes sporulés, sporozoïtes, mérozoïtes. L'inoculation intramusculaire (IM), intra-péritonéale (IP) et intraveineuse (IV) d'*E. nieschulzi* chez le rat (Landers, 1960) ou l'injection sous-cutanée (SC), IM, IP ou IV d'*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* et *E. tenella* chez le poulet (Davies et Joyner, 1962 ; Sharma et Reid, 1962 ; Sharma, 1964) aboutit au développement du parasite au niveau de son site spécifique intestinal ou cæcal.

## 6. PATHOGENIE

La pathogénicité des coccidies dépend en grande partie de l'importante multiplication des différents stades du parasite à l'intérieur de l'hôte. Théoriquement, un seul oocyste d'*E. tenella* pourrait produire 2 520 000 formes invasives, après la 2<sup>ème</sup> mérogonie (Levine, 1982). Chez l'espèce *E. Maxima*, il est observé un minimum de quatre générations de schizogonies (McDonald et al., 1986). Les coccidies du poulet envahissent la muqueuse intestinale, occasionnant des dommages aux cellules épithéliales, des inflammations et une atrophie des villosités (Pout, 1967).

Le pouvoir pathogène de l'espèce *E. acervulina* est au moins la résultante de deux actions :

- Directe par modification de la structure et de l'activité intestinale entraînant des troubles de l'absorption et de la perméabilité. Elle est due à une destruction de l'épithélium entraînant une perte sérique et des troubles de l'absorption. Il pourrait s'y ajouter une action parasitaire, probablement due à un facteur « toxique », sur le métabolisme général de l'hôte. Le parasitisme se manifeste même avec des infestations très faibles, parfois cliniquement inapparentes, entraînant une diminution de la protidémie, de la lipidémie, des phosphatases alcalines et des pigments sériques. Le volume sanguin, le taux d'éléments figurés, la glycémie et les sels minéraux présents dans le plasma ne semblent pas modifiés.
- Indirecte par sous-consommation d'aliment et d'eau. Elle n'est observée que dans les cas de maladie clinique et représente la cause essentielle de la diminution de

croissance. Par contre, elle ne semble pas intervenir dans les modifications sériques (Yvoré et al., 1972).

Les signes cliniques des coccidioses dépendront de l'ampleur des dommages et de l'inflammation produite. Ces signes comprennent des diarrhées aqueuses blanchâtres (*E. acervulina*), des diarrhées hémorragiques (*E. tenella*), des hémorragies pétéchiales et une forte production de mucus (*E. maxima*). On note, également, la présence de déshydratation, perte de poids, prolapsus rectal et dysenterie. L'importante hémorragie dans les caeca est un signe pathognomonique de l'infection par *E. tenella*, en raison de la vaste destruction de la muqueuse (Witlock et al., 1975).

## 7. SIGNES CLINIQUES DES COCCIDIOSES DU POULET

Les coccidioses du poulet sont classées comme suit :

- *Coccidioses sub-cliniques* : Les coccidioses à effet nutritionnels ou coccidioses sub-cliniques sont, généralement des « Coccidioses intestinales » causées par les deux espèces fréquemment par : *E. acervulina* et *E. maxima*. La manifestation clinique est souvent légère, caractérisée par une diminution de l'ingéré alimentaire, un mauvais indice de consommation, diarrhée, une sous pigmentation de la peau (lors de l'atteinte par *E. maxima* ; score +4) (Conway et McKenzie, 2007) et occasionnellement de la mortalité (Yvoré, 1986). Ce type d'infections provoque des effets nutritionnels sévères et ce, à travers différents stades du processus alimentaire, parmi lesquels : ingestion, digestion, absorption, transport par le sang, stockage, mobilisation et métabolisme (Ruff, 1986).
- *Coccidioses cliniques* : Les coccidioses cliniques se manifestent par des signes cliniques marqués ; elles sont causées par des espèces coccidiennes très pathogènes : *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*. Les signes cliniques manifestés lors de l'atteinte par ces espèces sont plus évidents : effets nutritionnels traduits par de mauvaises performances, diarrhée hémorragique, atteinte de l'état général, déshydratation et une importante mortalité. La perte sanguinolente est estimée entre 7 à 10% du poids vif (Yvoré, 1986).

## 8. LÉSIONS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES

Les lésions coccidiennes varient en fonction de la sévérité des infections causées par chaque espèce d'*Eimeria* spp du poulet. Les aspects lésionnels macroscopique et microscopique manifestés par les espèces coccidiennes les plus dominantes, sont décrits ci-après :

- Dans le cas d'une infection par *E. acervulina*, la paroi de la partie intestinale atteinte (duodénum) manifeste un épaissement, tandis que la muqueuse se trouve recouverte par un exsudat catarrhal blanchâtre. Les hémorragies sont très rares, exception faite des infections lourdes. Microscopiquement, les villosités sont hypertrophiées du fait de l'importante infiltration cellulaire de la *lamina propria*, les cellules épithéliales des villosités sont distordues manifestant une perte de la polarité nucléaire à l'intérieur de la cellule (**Fernando et McCraw, 1973**). L'examen histologique du duodénum, laisse apparaître également : des gamétocytes ovoïdes et de l'atrophie des villosités, celle-ci précédée par une hyperplasie transitoire des cellules des cryptes (**McDougald et Reid, 1997 ; Barker, 1993**).
- Les lésions macroscopiques causées par *E. necatrix* sont liées à la grande taille des schizontes de la 2<sup>ème</sup> génération de cette espèce ainsi, qu'à leur emplacement très profond dans l'épaisseur de la paroi jéjunale. Au cours des épisodes aigus, l'intestin atteint manifeste un épaissement marqué avec une sous-muqueuse hémorragique. Des foyers blanchâtres à jaunâtres (colonies de mérontes), atteignant un diamètre de l'ordre de 1mm et entourés par des pétéchies, peuvent être observés à partir de la séreuse des oiseaux morts. Ces lésions peuvent manifester une couleur blanche et noire donnant un aspect poivre et sel (**Soulsby, 1982 ; McDougald et Reid, 1997**). A l'examen microscopique, l'observation de nombreux amas de larges schizontes, au niveau de la sous-muqueuse, est pathognomonique pour cette espèce (**McDougald et Reid, 1997**).
- *E. praecox* est une espèce relativement apathogène ne provoquant pas ou provoquant de légères réactions inflammatoires lors d'infections lourdes (**Long, 1993a**). L'examen microscopique laisse apparaître généralement, des cellules épithéliales parasitées sur les deux flancs des villosités (les cellules du sommet des villosités ne sont pas atteintes). Les tissus infectés témoignent de légères réactions inflammatoires (**McDougald et Reid, 1997**).

- Lors d'une infection par *E. tenella*, de petits foyers d'érosion de l'épithélium caecal sont observés lors de schizontes matures de la 1<sup>ière</sup> génération (avant le 4<sup>ème</sup> jour post-inoculation). Au 4<sup>ème</sup> jour post-inoculation (seconde génération de schizontes matures), des hémorragies peuvent être constatées, les caeca deviennent distendus avec un contenu constitué de sang coagulé et de très petites pièces tissulaires (de la muqueuse caecale décollées). Du 6<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour post-infection, le contenu caecal devient dur et sec éventuellement mêlé aux fèces. La régénération des tissus détruits est rapide, pouvant être complète au 10<sup>ème</sup> jour post-inoculation. Les lésions peuvent être observées à partir de la surface séreuse, sous forme de pétéchies ou de petits foyers noirs se coalesçant lors des infections lourdes. La paroi caecale est souvent épaisse à cause de l'œdème inflammatoire et de l'infiltration des tissus. Microscopiquement, les schizontes de 1<sup>ière</sup> génération, atteignant la maturité sont largement éparpillées entre le 2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> jour post-infection. De petits foyers hémorragiques et nécrotiques peuvent apparaître, à côté des vaisseaux sanguins, de la circulation interne des muscles de la paroi musculaire. L'infiltration de la sous-muqueuse par les hétérophiles s'enclenche rapidement lorsque les schizontes de seconde génération se développent dans la *lamina propria*. La maturité des schizontes de seconde génération est le stade correspondant aux plus grands dommages tissulaires, notons : saignement, perturbations des glandes caecales et destruction de la muqueuse et de la paroi musculaire (McDougald et Reid, 1997).

## 9. ETUDE IMMUNOLOGIQUE

En général, les jeunes animaux sont plus sensibles à la coccidiose et manifestent souvent des signes cliniques de la maladie, tandis que les poulets âgés sont relativement résistants (Lillehoj, 1998).

Les jeunes animaux qui guérissent de la coccidiose sont capables de rétablir partiellement leur perte de croissance. Toutefois, cette croissance reste toujours potentiellement compromise (surtout lorsqu'il s'agit des coccidioses intestinales).

L'ampleur des signes cliniques résultant de l'infection, est fortement influencée par des facteurs génétiques de l'hôte. Lillehoj (1998) a observé une différence du degré de pathogénicité de la coccidiose (par *E. tenella* et *E. acervulina*) entre des souches,

génétiqnement différentes, de lignée naturelle de poulet (**Lillehoj, 1998 ; Lillehoj et Lillehoj, 2000**).

L'infection par les *Eimeria* induit une immunité protectrice caractérisée par : une immunité de longue durée et une spécificité par apport à l'espèce en cause.

Alors qu'un grand nombre d'oocystes est généralement nécessaire pour générer une bonne réponse immunitaire contre les *Eimeria*, certaines exceptions ont été observées, par exemple pour l'espèce *E. Maxima*, qui est très immunogène n'exigeant qu'un petit nombre d'oocystes pour induire une immunité souvent solide.

Les stades endogènes précoces des *Eimeria* sont considérés comme étant plus immunogènes que les plus tardifs (gamogonie) (**Rose et Hesketh, 1976 ; Rose et al., 1984**) bien que les antigènes de gamètes d'*E. maxima* aient été jugés immunogènes et induisent une protection solide (**Wallach et al., 1990,1995**).

### 9.1. Rôle de l'immunité humorale dans les infections dues aux *Eimeria*

*In vitro*, les anticorps peuvent inhiber la pénétration des stades invasifs du parasite dans les cellules hôtes. Ainsi, les contenus cœcaux riches en IgA, issus d'animaux en cours d'infection par *E. tenella*, sont capables d'inhiber l'invasion des cellules en culture par des sporozoïtes (**Davis et al., 1978 ; Davis et Porter, 1979**). Des sérums provenant de poulets immuns sont, également, capables d'augmenter la phagocytose des sporozoïtes et des mérozoïtes par les macrophages (**Bekhti et Pery, 1989**).

Cependant, *in vivo* le rôle joué, par les anticorps dans la protection, reste controversé. En effet, la bursectomie chez le poulet ne supprime pas la résistance des animaux (**Rose et Long, 1970 ; Lillehoj, 1987**) et rares sont les cas où le transfert passif d'anticorps protège les animaux contre la coccidiose (**Rose, 1971 ; Wallach et al., 1994**). De même, la déficience de souris en lymphocytes B semble sans implication sur l'évolution de la coccidiose et l'acquisition de l'immunité (**Kitamura et al., 1991**).

### 9.2. Réponse immunitaire cellulaire

Les mécanismes de protection contre une infection parasitaire passent par une action synergique des deux sous-populations lymphocytaires, TCD4<sup>+</sup> ou T-helper (Th)et TCD8<sup>+</sup>. Les

lymphocytes CD4<sup>+</sup> reconnaissent l'antigène associé aux molécules de classe II du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) alors que les CD8<sup>+</sup> reconnaissent l'antigène associé aux molécules de classe I du CMH. Les lymphocytes TCD4<sup>+</sup>, en fonction du type de cytokines qu'ils produisent au cours d'une infection, vont orienter la réponse immunitaire vers :

- Soit, l'immunité à médiation humorale (production de cytokines de type Th2 : IL-4(Interleukine 4), IL-5 et IL-10) et l'activation des lymphocytes B.
- Soit, l'immunité à médiation cellulaire (production de cytokines de type Th1 : IFN- $\gamma$  (Interféron  $\gamma$ ) et IL-2) et l'activation des fonctions cytotoxiques des macrophages et des lymphocytes CD8<sup>+</sup> (**Lillehoj, 1987**).

#### 9.2.1. Réponse cellulaire systémique

Les poulets thymectomisés, ne présentent que très rarement une sensibilité accrue à l'infection ; cependant, la thymectomie totale est difficile à réaliser chez ces oiseaux (**Pierce et Long, 1965 ; Rose et Long, 1970**). L'utilisation chez le poulet, de traitements immunosuppresseurs (supprimant l'immunité à médiation cellulaire), émousse l'acquisition de l'immunité et la résistance immunitaire déjà acquise (**Rose, 1987**). Ainsi, la cyclosporine A, administrée avant l'infection primaire, augmente la sensibilité des poulets et, administrée, avant la réinfection, supprime l'immunité protectrice (**Lillehoj, 1987**).

Le transfert de cellules spléniques ou de lymphocytes sanguins, issus d'animaux immuns, protège les animaux sensibles (**Rose et Hesketh, 1982**). Là aussi, des expériences de déplétion *in vivo* ont fait apparaître, dans certains cas, un rôle des lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans la résistance à la primo-infection, et un rôle prédominant des lymphocytes CD8<sup>+</sup> et TCR $\alpha\beta$  au cours de la réinfection (**Trout et Lillehoj, 1996 ; Lillehoj, 1998**).

Chez des poulets traités avec de la dexaméthasone, on observe une réduction de la prolifération des lymphocytes T, une diminution de la production de l'IL-2 et de l'IFN  $\gamma$ , une sensibilité à l'infection aux *Eimeria* spp ; les lésions observées étant significativement plus importantes par rapport aux sujets n'ayant pas été traités avec de la dexaméthasone (**Long et Rose, 1970**). Simultanément, il est constaté une augmentation des réponses en IgA et IgG spécifiques des coccidies. Par ailleurs, l'administration de dexaméthasone favorise, également, le développement des coccidies de la dinde chez le poulet (**Isobe et al., 1993**).

Les antigènes solubles, issus de différents stades de développement d'*E. acervulina* et d'*E. tenella*, induisent la prolifération de lymphocytes T chez des poulets préalablement infectés par les mêmes espèces. Toutefois, les antigènes d'*E. acervulina* induisent une faible, voire aucune prolifération de cellules T chez des poulets préalablement immunisés par *E. tenella*. Ceci confirme la spécificité à l'encontre de l'espèce d'*Eimeria* en cause (**Lillehoj et Trout, 1996**). Cependant, si de fortes concentrations d'antigènes sont utilisées, les lymphocytes T de poulets lors d'une primo-infection par *E. tenella*, prolifèrent en présence d'antigènes d'*E. acervulina* (**Prowse, 1991**).

### 9.2.2. Immunité cellulaire dans la muqueuse

Chez les poulets primo-infectés par *E. acervulina* ou *E. tenella*, à la fois, les LIE CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (lymphocytes intra-épithéliaux) augmentent à la fin de la période prépatente (**Bessay et al., 1996**). Dans les cas d'infection par *E. maxima*, une augmentation du nombre des LIE est observée à la fin de la période prépatente et de la période patente. Cette augmentation concerne à la fois les LPL CD4<sup>+</sup> (lymphocytes de la *lamina propria*) et les LPL et les LIE CD8<sup>+</sup> (**Rothwell et al., 1995**). Après réinfection par *E. maxima* ou *E. tenella* les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont présents en plus grand nombre que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans la muqueuse intestinale (**Rothwell et al., 1995 ; Jeurissen et al., 1996 ; Vervelde et al., 1996**).

Dans les cas d'infection d'*E. tenella*, chez les poulets de lignée résistante, cette augmentation concerne plus particulièrement les LIE CD8<sup>+</sup> et TCRαβ, suggérant un rôle de ces cellules dans la protection (**Lillehoj, 1994**). Au 17<sup>ème</sup> jours après une réinfection par *E. acervulina* la proportion des LIE CD8<sup>+</sup> est encore élevée (**Lillehoj et Bacon, 1991**).

Cependant, il semble se dégager de ces données que la sous-population lymphocytaire CD4<sup>+</sup> est davantage impliquée dans la résistance à la primo-infection et la sous-population lymphocytaire CD8<sup>+</sup> davantage impliquée dans la résistance à la réinfection (**Rothwell et al., 1995**).

## 10. CHIOMIOTHERAPIE ET RESISTANCE AUX ANTICOCIDIENS

Pendant de nombreuses années et à travers de nombreux pays, les anticoccidiens ont été utilisés dans les élevages de poulet de chair dans le but de prévenir la coccidiose.

Actuellement, même avec l'extension de l'industrie avicole dans plusieurs pays (Brésil, Chine, USA, etc.), la chimiothérapie reste toujours la solution compulsive indispensable pour la pérennité de cette industrie. Une enquête réalisée aux USA entre 1995 et 1999, montre, que les anticoccidiens sont utilisés dans 99% des élevages de poulet standard, à l'instar de la plupart des pays à travers le monde entier (**Chapman, 2001**). Une analyse réalisée, entre 2013 et 2014, aux USA indique que l'utilisation des anticoccidiens varient entre 60 à 99%, en fonction de la période de l'année. La conséquence de cette utilisation massive de ces molécules, a permis le développement de souches d'*Eimeria* spp du poulet résistant aux anticoccidiens. Cette résistance a été étudiée sur toutes les molécules anticoccidiennes, sous toutes les conditions d'élevages du poulet (**Chapman, 1997 ; Chapman et Jeffers, 2014**).

Généralement, les anticoccidiens sont classés en deux groupes : les produits chimiques de synthèse qui agissent sur le métabolisme du parasite et les ionophores (lasalocide, monensin, narasin, salinomycine, semduramicine), dérivés de la fermentation microbienne, qui altèrent le transport d'ions à travers la membrane du parasite, perturbant la balance osmotique (**Naciri et Brossier, 2009**).

Les produits de synthèses comportent un large éventail de molécules exerçant des modes d'actions variées à noter : Inhibition de la respiration mitochondriale (inhibition de la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie) du parasite (décoquinate, clopidol), inhibition de la voie de la synthèse de l'acide folique (sulfamides), inhibition du transport de la thiamine (en compétition avec la thiamine) à travers la membrane cellulaire (ampolium) et pour de nombreux cas, notamment, le diclazuril, l'halofuginone, le nicarbazin et la robénidine, le mode d'action est mal élucidé (**Chapman et Jeffers, 2014**).

Actuellement, les associations de certains produits de synthèses (nicarbazin) et certains produits ionophores (narasin) sont très utilisées dans de nombreux pays, tels que l'association méthylbenzoate et le clopidol employée par les passé (**Chapman et Jeffers, 2014**).

Une approche adoptée dans les élevages avicoles, afin d'éviter ou de minimiser les problèmes de résistance, est d'alterner dans le même élevage entre les molécules anticoccidiennes, ayant des modes d'actions différents. Sur terrain, cette alternance peut prendre plusieurs formes ou programmes, notamment, le programme dénommée « shuttle program ou le programme

navette » au cours duquel différents produits anticoccidiens sont incorporés dans les aliments des oiseaux en fonction de la phase d'élevage :

- Souvent les produits de synthèse tels que le nicarbazin, sont incorporés dans l'aliments démarrage.
- Les ionophores sont, généralement, introduits dans l'aliment croissance (**Chapman et Jeffers, 2014**).

Une autre approche, celle dénommée « rotation program ou le programme rotation », consiste à alterner entre différentes bandes successives par différents produits anticoccidiens, ayant des modes d'actions différents (**McDougald, 1982**).

Le but visé par l'utilisation de ces programmes, réside dans la lutte contre la sélection de souches résistantes ; S'il y avait une éventuelle sélection de souches résistante vis-à-vis du premier anticoccidien utilisé, elles seraient éliminées par l'effet du second anticoccidien. Cette approche demeure sans fondement. (**Chapman et Jeffers, 2014**), toutefois, le « shuttle program ou le programme navette » et le « rotation program ou le programme rotation », ont témoigné d'un ralentissement de l'acquisition de la résistance des *Eimeria* isolées de terrain (**Chapman, 1997 ; Peek et Landman, 2003 ; Chapman et Jeffers, 2014**).

## 11. VACCINATION

Les vaccins anticoccidiens les plus commercialisés, à travers le monde, contiennent des oocystes vivants atténués ou non atténués, de souches de coccidies (**Shirley et al., 2007**), l'utilisation de ces types de vaccins ayant été limitée à la poule pondeuse (**Chapman et Jeffers, 2014**).

L'utilisation des vaccins commerciaux dans les élevages est, généralement, axée sur l'administration dans l'eau de boisson ou la pulvérisation sur l'aliment ; ces méthodes laborieuses, rendent la vaccination peu pratique. La pulvérisation du vaccin dans l'éclosoir est une méthode très pratique chez le poulet de chair (**Chapman, 2000 ; Williams, 2002a, Chapman et Jeffers, 2014**).

Les vaccins vivants, comportent des doses oocystales très faibles par sujet ; il paraît anecdotique que le faible nombre d'oocystes vaccinaux, ait un impact significatif sur la

population des coccidies, quasi présente dans les élevages poulet. Toutefois, des expérimentations ont montré qu'une dose ingérée d'*E. tenella*, de l'ordre de 10 oocystes/sujet peut donner 500000 oocystes de progéniture (**Chapman, 1978**).

L'administration des vaccins anticoccidiens, via la méthode de pulvérisation dans l'éclosoir, n'assure pas l'ingestion des oocystes par tous les poussins ; la majorité des oiseaux reçoivent les oocystes vaccinaux par la glande uropygienne, ou par l'œil ; les oocystes atteignent l'intestin en passant par le tractus lacrymal, gagnant par la suite les cavités nasales, le pharynx (**Chapman et al., 2002**).

Il est admis, que lors de la pulvérisation vaccinale dans l'éclosoir, seuls, 50% de poussins présents dans la chambre de pulvérisation, reçoivent une dose de l'ordre de 10 oocystes (ou plus) ; 50000 poussins vaccinés, peuvent produire plus de 1 billion d'oocystes d'*Eimeria spp* dérivés du vaccin et donc fort probablement sensible aux molécules anticoccidiennes.

Certains vaccins, comme COCCIVAC<sup>TM</sup> et PARACOX<sup>TM</sup> contiennent des souches d'*Eimeria* isolées avant l'introduction d'un grand nombre de molécules anticoccidiens, donc, fort probablement sensibles aux anticoccidiens, d'autant qu'elles (souches d'*Eimeria* vaccinales isolées) sont stockées et préservées pendant de nombreuses années dans des laboratoires. Ainsi, les coccidies vaccinales restent génétiquement sensibles aux anticoccidiens ; on soutient, que leurs progénitures sont, également, sensibles. Il est concevable, que l'utilisation de ce genre de vaccins, permet d'augmenter la population des coccidies chimio-sensibles, à l'intérieur d'un élevage avicole (**Chapman et Jeffers, 2014**).

Certains auteurs, notamment, **Long et al. (1985)**, admettent que dans une population coccidienne mixte contenant des coccidies résistantes et des coccidies sensibles aux anticoccidiens, la prédominance est imputable à ces dernières en l'absence d'un traitement anticoccidien permettant la sélection des population chimiorésistance (**Chapman et Jeffers, 2014**). L'approche de la restauration de la sensibilité d'une molécule anticoccidienne est très recommandée; elle s'effectue par l'utilisation de vaccins anticoccidiens pendant une période suffisante, permettant le recyclage, à partir de la litière, des coccidies dérivées du vaccin anticoccidiens. L'ingestion répétée, de faibles doses d'oocystes de coccidies vaccinales, permet le développement d'une immunité solide (**Chapman et Jeffers, 2014**).

## 12. RESTAURATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTICOCCIDIENS

L'introduction, dans une population coccidienne chimio-résistante, de souches coccidiennes sensibles aux anticoccidiens telles que les souches vaccinales ou les souches maintenues dans des laboratoires, peut influencer le profil de la population coccidienne, devenant sensible (**Jeffers, 1976a**).

**Ball (1966)**, a obtenu à travers une experimentation réalisée sur des poulets non traités par les anticoccidiens, une diminution de la population de souches chimio-résistantes d'*E. tenella* après l'inoculation des oiseaux par un grand nombre d'oocystes d'une souche d'*E. tenella* sensible aux anticoccidiens. Des résultats similaires ont été obtenus par **McLoughlin et Chute (1979)**, ayant constaté une perte de la résistance à l'amprolium des souches d'*Eimeria* du poulet après les avoir mixées à des souches sensibles au même anticoccidien.

La restauration de la sensibilité vis-à-vis du monensin, après utilisation, du vaccin COCCIVAC-B™ a été démontrée par **Chapman (1994)**. Ce vaccin anticoccidien qui a été commercialisé pour la première fois en 1952, contient des souches d'*Eimeria* spp virulentes non atténuées, isolées et maintenues (par propagation) depuis cette année dans le laboratoire (**Williams, 2002b**). Une augmentation de la sensibilité vis-à-vis du diclazuril et la salinomycine, des souches d'*Eimeria* spp de terrain a été observée après l'utilisation du même vaccin (**Mathis et Broussard, 2006; Jenkins et al., 2010**).

**Jeffers (1975) et Shirley (1989)**, soutiennent que l'utilisation des vaccins contenant des parasites atténués, a peu d'effet sur la restauration de la sensibilité aux anticoccidiens des *Eimeria*, tant que le potentiel du pouvoir de reproduction des parasites vaccinaux est altéré. Toutefois, une restauration partielle vis-à-vis du diclazuril et du monensin a été obtenue après utilisation du vaccin vivant atténué, PARACOX™ (**Peek et Landman, 2006**).

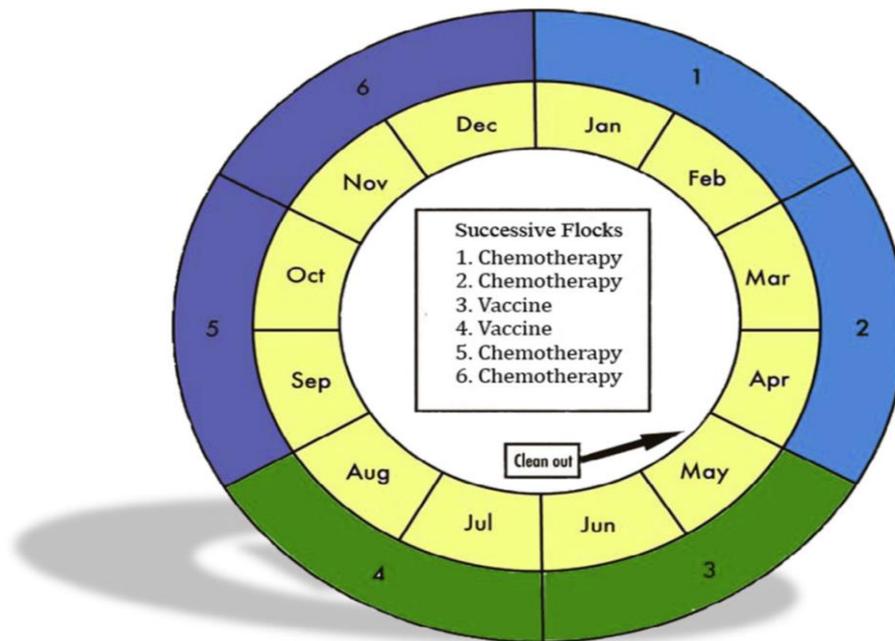
L'approche de la restauration de la sensibilité aux anticoccidiens ne concerne pas uniquement les *Eimeria* spp du poulet mais, également, celles de la dinde (**Mathis et McDougald, 1989**).

En se basant sur cette approche, plusieurs auteurs proposent des programmes de rotation annuels, en alternant la chimiothérapie anticoccidiennes et la vaccination (**Chapman et al.,**

2002, 2010). La figure 3, décrit une variante de « rotation program ou le programme rotation », appliquée sur les élevages de poulet de chair:

- Sur les deux premières bandes de l'année (de Janvier au mois d'Avril): Il est procédé à l'application de la chimiothérapie anticoccidienne par utilisation d'un des programmes suivants:
  - *Programme continu*: Il est effectué par l'utilisation d'ionophores dans l'aliment démarrage et l'aliment croissance.
  - *Shuttle program ou le programme navette* : Le programme navette consiste à utiliser un anticoccidien de synthèse dans l'aliment démarrage et un ionophore dans l'aliment croissance ou un ionophore potentialisé par une association (Exemple : L'association nicarbazin et narasin).
- Sur les troisième et quatrième bandes de l'année (de Mai au mois d'Aout): La vaccination anticoccidienne peut être utilisée sur les deux bandes correspondant à cette période. Le but de cette vaccination à l'instar de prévenir les coccidioses cliniques et subcliniques, est de repeupler les bâtiments d'élevages par des souches d'*Eimeria* spp sensibles aux anticoccidiens (**Chapman et Jeffers, 2014**).
- Sur les cinquième et sixième bandes de l'année (de Septembre à Decembre): Il est recommandé la réalisation d'un autre programme de chimiothérapie basé sur l'utilisation d'anticoccidiens différents (**Chapman et Jeffers, 2014**).

Sur la foi type de programme est employé aux USA, à une proportion de l'ordre de 35–40% et ce, dans les élevages de poulet chair. Les procédures de nettoyages et de vides sanitaires entre chaque bande permettent de réduire au maximum la population coccidiennes à l'intérieur des élevages (**Chapman et Jeffers, 2014**).



**Figure 3. Programme anticoccidien annuel proposé et appliqué sur les six bandes de poulet de chair au cours de l'année. La chimiothérapie consiste à administrer des anticoccidiens ionophores, de synthèses et des ionophores potentialisées (Chapman et Jeffers, 2014).**

*Deuxième partie*

## **Etude expérimentale**

## Chapitre 2

### ***Evaluation de la sensibilité d'un pool d'isolats d'*Eimeria acervulina* et d'*Eimeria maxima*, isolées à partir des élevages Algériens- Jijel- de poulet de chair, vis-à-vis de cinq molécules anticoccidiennes***

Durant la seconde moitié du siècle dernier et à travers le monde, la chimiothérapie a donné lieu à un contrôle efficient de la coccidiose du poulet, de sorte que l'utilisation si répandue des anticoccidiens dans l'aliment de la volaille rend très difficile l'estimation des éventuelles pertes causées par leurs éventuelles absences (**Chapman, 1984 ; Chapman, 2005**).

Cependant, des doutes considérables ont été avancés au sujet de la perspective à long terme de la chimiothérapie (**Fayer et Reid, 1982 ; Ryley, 1982 ; Chapman, 1984**). Deux raisons peuvent être suggérées à propos de cette perspective pessimiste :

- L'augmentation du coût de la recherche dans le domaine de développement de nouvelles molécules anticoccidiennes.
- Le développement de la résistance anticoccidienne a été observé vis-à-vis de presque toutes les molécules anticoccidiennes utilisées ; dans certains cas, tant et si bien que la durée de la commercialisation d'un nouveau produit a été insuffisante pour justifier les coûts engendrés pour son développement (**Chapman, 1984**).

De prime abord, on pensait que les *Eimeria* spp ne pouvaient pas développer de résistance aux ionophores mais de nombreuses études relativement récentes ont laissé apparaître le contraire. C'est le cas par exemple, de **Mathis (1999)** qui a examiné la sensibilité des isolats d'*Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* et *Eimeria tenella*, aux monensin, salinomycine, narasin et lasalocide et a constaté que ces molécules ont été d'une efficacité médiocre vis-à-vis de ses isolats. D'autres chercheurs, notamment, **Chapman et Hacker (1994)** ont obtenu des conclusions identiques. Actuellement, la résistance aux anticoccidiens est reconnue comme étant le principal facteur d'échec de la chimiothérapie dans le contrôle de la coccidiose.

Il existe 3 types de tests permettant l'évaluation de la sensibilité (ou la résistance) des *Eimeria* spp du poulet aux anticoccidiens :

- **Battery test (ou anticoccidiogramme)**, test réalisé sur batterie, comportant au moins 3 lots : a/ Inoculé Traité b/ Inoculé Non Traité c/ Non Inoculé Non Traité. Il permet d'étudier l'efficacité des anticoccidiens vis-à-vis des isolats d'*Eimeria* spp de terrain.

Il est utilisé, également, pour déterminer la dose efficace (dose préventive ou curative) d'un nouveau produit, susceptible de contrôler la coccidiose.

- **Floor test (ou test réalisé sur sol)**, est une méthode très fiable pour mesurer l'effet des anticoccidiens dans le contrôle de la maladie et dans l'amélioration (ou la détérioration) des performances des oiseaux. Il permet, également, de confirmer l'efficacité d'une dose sélectionnée. Il doit comporter, au moins 3 lots : a/ Inoculé Traité b/ Inoculé Non Traité c/ Non Inoculé Non Traité.
- **Commercial test (ou test commercial)**, méthode permettant de tester un anticoccidien dans des conditions d'élevage intensif de poulet de chair (**Chapman, 1998 ; Holdsworth et al., 2004 ; Conway et Mckenzie, 2007**).

En Algérie, la prophylaxie anticoccidienne dans la production de poulet de chair, est focalisée sur la chimio-prévention, basée surtout sur l'addition des coccidiostatiques dans l'aliment, notamment, les antibiotiques ionophores ou certaines molécules de synthèses et sur la prescription du vétérinaire traitant d'un schéma prophylactique anticoccidien au cours de la bande, souvent dans l'eau de boisson, par l'utilisation différentes molécules (sulfamides, amprolium, toltrazuril, etc.).

Il a été procédé, dans ce chapitre, à la réalisation du *Battery test*, au cours duquel a été testé la sensibilité d'un pool d'isolats d'*Eimeria acervulina* et d'*Eimeria maxima*, issues de certains élevages de poulet de chair, dans la Wilaya de Jijel (Algérie), vis-à-vis de 5 molécules anticoccidiennes utilisées dans le terrain algérien.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Description du schéma expérimental

Dans le but d'évaluer la sensibilité et/ou la résistance de deux espèces *E. acervulina* et *E. maxima* d'un pool d'isolats, prélevés dans la région de Jijel, vis-à-vis de certaines molécules anticoccidiennes un *battery test* (anticoccidiogramme ou AST pour Anticoccidial Sensitivity Test), a été mis en place. Ce faisant, nous avons choisi 5 produits anticoccidiens utilisés dans le terrain algérien, chacun comportant une seule molécule anticoccidienne.

Chaque produit correspond à un lot traité, lequel est l'objet d'inoculation par une dose déterminée d'*E. acervulina* et *E. maxima*. Les lots correspondant aux produits ont été

comparés deux à deux entre eux ; une comparaison étant, également, réalisée entre les 5 lots traités et deux autres lots témoins non traités d'anticoccidiens, l'un inoculé, l'autre non inoculé (Conway et McKenzie, 2007).

### 1.2. Molécules anticoccidiennes testées

Les produits testés sont utilisés dans les élevages algériens, notamment, de poulets de chair, de poulette future pondeuse élevée au sol, de poulette future reproductrice (ponte et chair), de reproductrice (ponte et chair), de dinde de chair, etc. Ils appartiennent à deux groupes d'anticoccidiens communément reconnus, ainsi qu'en fait foi le tableau 1.

**Tableau 1. Molécules anticoccidiennes utilisées.**

Produit de synthèse	Antibiotique ionophore
Diclazuril	Lasalocide-sodium
	Monensin- sodium
	Narasin
	Salinomycine-sodium

Le tableau ci-dessous laisse apparaître les produits anticoccidiens testés dans l'étude :

**Tableau 2. Produits anticoccidiens testés.**

Générique	Produit testé	Mode d'addition	Dose administrée (ppm)
Clinacox 0.5% Premix™ (Elanco®, Division Eli Lilly, Canada)	1 Kg contient 5 g de diclazuril	Aliment	1
Avatec Medicated Premix™ (Alpharma, Canada)	1 Kg contient 150 g de lasalocide-sodium	Aliment	125
Elancoban G200™ (Elanco Animal Health, Lilly House, UK)	1 Kg contient 200 g de monensin-sodium	Aliment	125
Monteban G100™ (Elanco Animal Health, Lilly House, UK)	1 Kg contient 100 g de narasin	Aliment	70
Sacox™ (MSD Animal Health, USA)	1 Kg contient 120 g de salinomycine-sodium	Aliment	60

Il est à faire remarquer, qu'il a été tenu compte du strict respect des doses et des modes d'administration prescrits par les producteurs.

### 1.3. Conception de l'élevage expérimental

280 poussins d'un jour, non sexés, ont été mis en place sur une batterie. Les oiseaux appartiennent :

- A la même souche de poulet de chair ; Cobb 500.
- Au même élevage de reproductrice.
- Au même couvoir.

Les oiseaux sont élevés, en batterie en métal inoxydable, répartis à 10 sujets/cage (hauteur x largeur x longueur = 50 cm x 60 cm x 100 cm) pour une densité de l'ordre de 1 poussin/60

cm<sup>2</sup> (Shirley, 1995 ; Holdsworth et al., 2004 ; Conway et McKenzie, 2007 ; Peek, 2010), dans des températures ambiantes variant de 32°C au démarrage (maîtrisée par des éleveuses à gaz dans un espace confiné) à 25°C à la fin de l'élevage expérimental (22<sup>ème</sup> jour d'âge).

Durant toute la période de l'élevage expérimental, les poussins reçoivent l'eau et l'aliment *ad-libitum*, subissant une durée d'éclairage de 24 heures sur 24 heures, assurée par des lampes incandescentes classiques (Holdsworth et al., 2004 ; Conway et McKenzie, 2007 ; Peek, 2010).

Il faut signaler qu'il est utilisé une seule formule alimentaire couvrant tous les besoins de la phase démarrage du poulet standard. La formule alimentaire, préconisée aux poussins, est énoncée dans le tableau ci-après :

**Tableau 3. Composition de l'aliment utilisé dans l'étude.**

Ingrédients	Proportion (%)
Maïs	61.75
Tourteaux de soja	35
Carbonate de calcium	0.7
Phosphate bicalcique	1
NaCl	0.025
Bicarbonate de sodium	0.025
C.M.V (sans anticoccidiens*)	1.5

\* : Au 12<sup>ème</sup> jour d'âge, il a été procédé à l'ajout des anticoccidiens aux lots correspondants ; C.M.V: Complément Minéral Vitaminé.

Au 5<sup>ème</sup> jour d'âge, il a été procédé à la vaccination des poussins contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse et ce, en appliquant dans l'eau de boisson, un vaccin bivalent (HIPRAVIAR<sup>TM</sup> B1/H120, Spain) comportant les 2 valences suivantes :

- Virus vivant atténué de la maladie de Newcastle : Souche HB1 (Hitchner B1).
- Virus vivant atténué de la bronchite infectieuse : Souche H120.

#### 1.4. Identification des lots

Au 12<sup>ème</sup> jour d'âge, les poussins (280 sujets) sont répartis selon leur poids sur 7 lots, dont chacun comporte 40 sujets répartis sur 4 répétitions de 10 poussins. Chaque lot a été identifié par un numéro (Tableau 4).

**Tableau 4. Lots identifiés dans l'étude.**

Numéro du lot	Traitement	Inoculation
1	Diclazuril	+
2	Lasalocide-sodium	+
3	Monensin-sodium	+
4	Narasin	+
5	Salinomycine-sodium	+
6 (Témoin)	Non traité	+
7 (Témoin)	Non traité	-

+ : Inoculé ; - : Non inoculé.

## 1.5. Description de l'inoculum

### 1.5.1. Origines des isolats

L'inoculum est élaboré à partir d'un pool d'isolats d'*Eimeria* spp (de terrain) non sporulés, prélevés sur 34 élevages de poulet de chair, de taille variant entre 3000 à 5000 sujets et répartis sur différentes régions de la Wilaya de Jijel.

Il est à noter que dans tous les élevages sélectionnés, le monensin-sodium est le seul additif anticoccidien utilisé dans l'aliment et ce, à travers plusieurs lots antérieurs (Tableau 5).

**Tableau 5. Origines des isolats.**

Région	Nombre d'élevage
Beni-Ahmed	5
Jijel	3
Kaous	5
Kennar	6
Taher	9
Texanna	6

Dans tous les élevages sélectionnés, les prélèvements ont été effectués à la fréquence d'une fiente fraîchement émise pour 100 sujets tout en évitant les régions humides entourant les abreuvoirs (fientes mouillées et fermentées).

Les prélèvements sont introduits dans des boîtes de 160mL, contenant chacune 60mL de dichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) à 2.5%. Ils sont réalisés une journée par semaine et ce, pendant les semaines d'âge suivantes : 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> semaine, 5<sup>ème</sup> ou 6<sup>ème</sup> semaine, 8<sup>ème</sup> ou 9<sup>ème</sup> semaine (Williams, 2006).

### 1.5.2. Sporulation et stockage des oocystes

Les prélèvements réalisés sont transférés au laboratoire; après quoi les oocystes non sporulés sont séparés de la matière fécale. Après le rinçage avec de l'eau distillée, les oocystes non sporulés sont remis dans une solution de dichromate de potassium à 2.5%. La suspension oocystale est incubée à une température de l'ordre de 28-30°C pendant 48 heures, sous les conditions d'aération forcée, assurée par une pompe à air pour aquarium (afin d'assurer un apport suffisant d'oxygène).

Il est à faire observer que la sporulation doit se réaliser en mettant la suspension en couche mince (en évitant une grande profondeur), dans le récipient, pour assurer une bonne concentration en oxygène.

A l'issue de l'incubation des oocystes, le taux de sporulation est vérifié par le décompte des oocystes sporulés en procédant à plusieurs lectures aux grossissements 10 (100x) et 40 (400x). Il importe de noter, également, qu'un bon inoculum, doit posséder un taux de sporulation supérieur à 80% (**Shirley, 1995**).

Avant le stockage des oocystes sporulés, on procède à plusieurs décomptes de parasites par la technique de McMaster Modifiée (**Taylor et al., 1995**), tout en réalisant des dilutions répétées par le dichromate de potassium entre chaque comptage, permettant, ainsi, d'obtenir la concentration oocystale recherchée (**Shirley, 1995**).

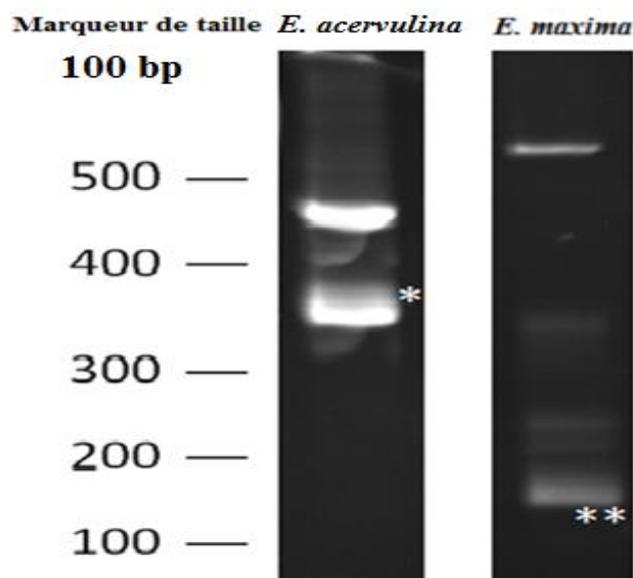
Les oocystes sporulés sont conservés dans la solution de dichromate de potassium à 2.5%, à une température de réfrigération de l'ordre de 4°C et ce, jusqu'au jour de l'utilisation (environ 1 mois) (**Shirley, 1995**).

### 1.5.3. Identification des espèces d'*Eimeria* spp dans l'inoculum

L'inoculum préparé dans cette étude est mixte, contenant 2 espèces d'*Eimeria* spp du poulet: *E. acervulina* (66 %), *E. maxima* (34 %). L'identification de ces 2 Espèces d'*Eimeria* spp s'effectue par 2 techniques :

- Identification par morphométrie, réalisée dans le laboratoire « P.A.D.E.S.C.A, Université des frères Mentouri Constantine 1- Algérie », basée sur plusieurs critères morphologiques dont les plus importants sont les mensurations des parasites.
- Identification par biologie moléculaire par la technique ITS1-PCR (Internal Transcribed Spacer 1- Polymerase Chain Reaction), basée sur l'amplification des séquences ITS1-rDNA (Internal Transcribed Spacer 1- ribosomal DNA) spécifiques à chaque espèce d'*Eimeria* spp du poulet (**Jenkins et al., 2006**), réalisée dans le laboratoire « Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, Agricultural Research Service, Beltsville, USA ».

Il est d'importance de remarquer que les proportions des 2 espèces identifiées dans le pool d'isolats (*E. acervulina*, *E. maxima*) sont mises en évidence par la morphométrie.



**Figure 1. Détermination, par la technique ITS1-PCR, des espèces présentes dans l'inoculum utilisé dans l'étude.** \* : Bande correspondant à l'espèce *E. acervulina* (Taille du fragment d'ADN amplifié = 310 nt). \*\* : Bande correspondant à l'espèce *E. maxima* (Taille du fragment d'ADN amplifié = 144 nt). 100-bp DNA markers (HyperLadder™100bp, Bioline, UK).

#### 1.5.4. Rendement oocystal

Au total il a été effectué, environ 102 prélèvements, pesant chacun environ 100 g. Le nombre oocystal moyen par gramme de fèces (OPG) prélevés étant de l'ordre de 9200 oocystes.

#### 1.5.5. Dose oocystale par sujet

Avant l'inoculation, les oocystes sont lavés 2 à 3 fois par des centrifugations répétées dans de l'eau de robinet, après quoi ils sont remis dans une solution de tampon phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline ; pH =7.2).

Le nombre d'oocystes sporulés par millilitre de suspension est fixé à 170150. Ce nombre est obtenu par des dilutions répétées après comptages des parasites par la technique McMaster modifiées (Taylor et al., 1995).

La dose oocystale inoculée pour chaque oiseau est de l'ordre de 340300 oocystes sporulés/2 ml de solution PBS (Holdsworth et al., 2004 ; Williams, 2006 ; Conway et McKenzie, 2007 ; Bafundo et al., 2008 ; Peek, 2010).

## 1.6. Schéma expérimental

### 1.6.1. Médication

Depuis leur mise en place au 11<sup>ème</sup> jour d'âge (48 heures avant l'inoculation), les poussins reçoivent un aliment de démarrage sans anticoccidiens. Pendant cette période, il est confirmé que les poussins mis en place sont exempts de coccidies et ce, par la recherche des parasites (technique de flottation) dans 5 à 10 g de fientes prélevées de chaque cage pendant les journées suivantes : 1<sup>ier</sup>, 4<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jours d'âge.

Au 12<sup>ème</sup> jour d'âge (2 jour avant l'inoculation), les oiseaux sont répartis en 7 lots de 40 sujets, dont chacun est divisé en 4 répétitions de 10 poussins recevant l'anticoccidien correspondant dans l'aliment, jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour post-inoculation (22<sup>ème</sup> jour d'âge : date correspondant à la fin de l'élevage expérimental).

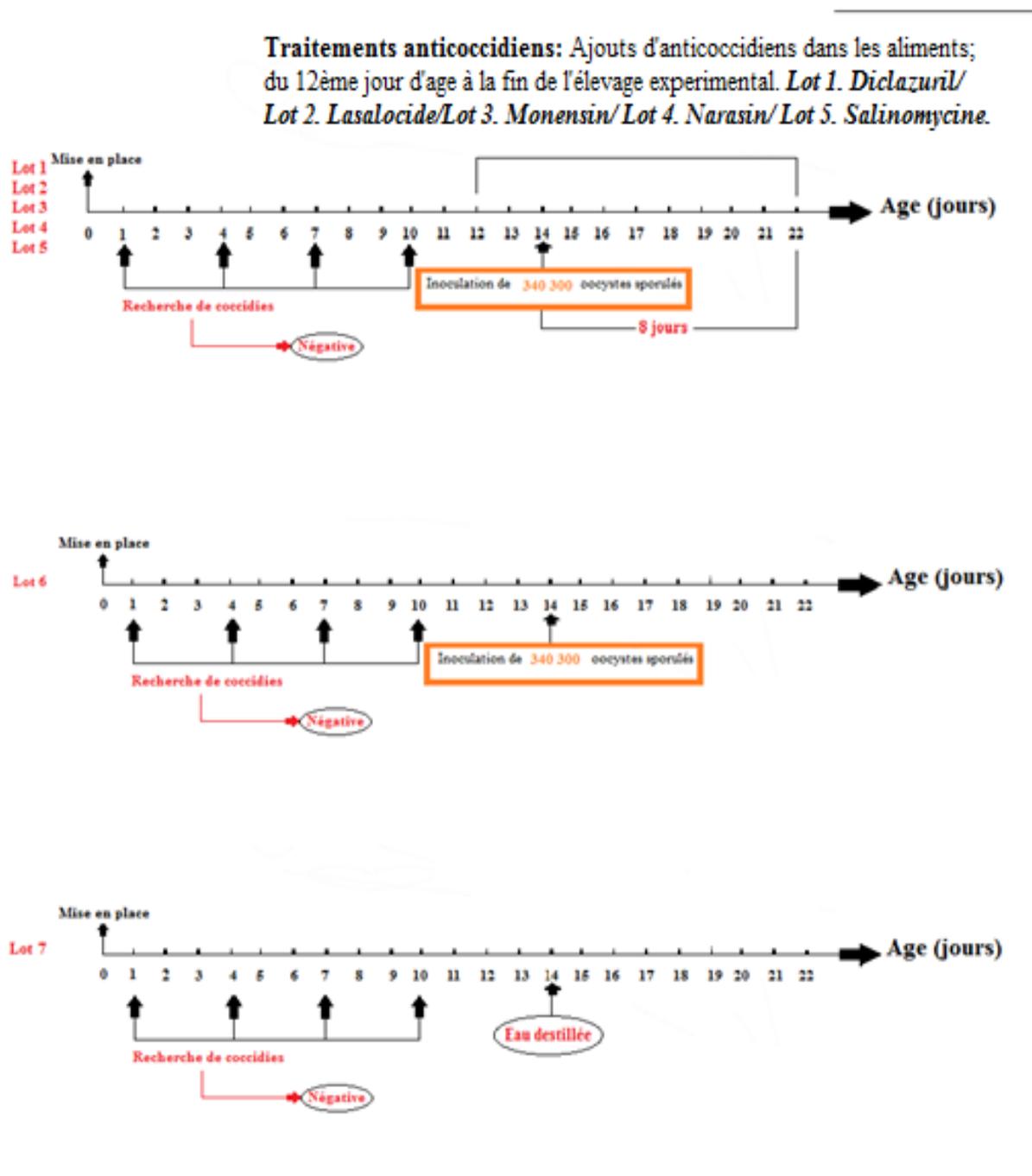
Il est à noter que les lots témoins 6 et 7 (Inoculé Non Traité et Non Inoculé Non Traité) ne reçoivent aucun produit (**Holdsworth et al., 2004 ; Williams, 2006 ; Conway et McKenzie, 2007 ; Bafundo et al., 2008 ; Peek, 2010**).

Dans les lots 1, 2, 3, 4 et 5, les anticoccidiens sont incorporés continuellement dans l'aliment et ce, dans l'intervalle allant de 48 heures avant l'inoculation (12<sup>ème</sup> jour d'âge) au 8<sup>ème</sup> jour post-inoculation.

### 1.6.2. Inoculation

Au 14<sup>ème</sup> jour d'âge, chaque poussin des lots 1 à 6, reçoit, via le gavage, un volume de 2 mL de suspension contenant une dose de 340300 oocystes sporulés d'*E. acervulina* (224500 oocystes) et *E. maxima* (115 600 oocystes) et ce, à l'aide de seringues reliées aux sondes urétrales pour chats (Buster Cat Catheter ; sterile, 1.0 x 130mm, Chine).

Il est à noter que les poussins du lot témoin numéro 7 (Non Inoculé Non Traité), reçoivent chacun 2 mL d'eau distillée, au 14<sup>ème</sup> jour d'âge (**Logan et al., 1993 ; Naciri et al., 2003 ; Holdsworth et al., 2004 ; Conway et McKenzie, 2007 ; Bafundo et al., 2008 ; Peek, 2010**).



**Figure 2. Schéma expérimental.**

### 1.6.3. Paramètres retenus

Lors d'un anticoccidiogramme (AST), les paramètres considérés pour l'évaluation de la sensibilité sont: mortalité, gain de poids, indice de consommation, score lésionnel, hémocrite, taux des caroténoïdes dans le sérum ou le plasma, indice fécal et excrétion oocystale. Les 4 premiers critères sont les plus communément étudiés, les autres

étant laissés au choix de l'investigateur (**Holdsworth et al., 2004**). Pour ce faire il a été procédé à l'évaluation des critères suivants :

#### 1.6.3.1. Paramètres zootechniques

- *Poids moyen et gains de poids*

Des pesées individuelles et journalières, ont été effectuées, sur tous les poussins des 4 réplifications des 7 lots, y compris les sujets morts et ce, à l'aide d'une balance électronique, après quoi il a été procédé au calcul des gains de poids cumulés, sur 3 trois intervalles de temps suivants:

- 1<sup>ier</sup> au 14<sup>ème</sup> jour d'âge.
- 14<sup>ème</sup> au 22<sup>ème</sup> jour d'âge.
- 1<sup>ier</sup> au 22<sup>ème</sup> jour d'âge (**Guo et al., 2007**).

- *Ingéré alimentaire et indice de consommation*

Dans chaque lot, les ingérés quotidien et cumulé sont calculés et enregistrés après soustraction de l'aliment restant dans les mangeoires. Il est ensuite procédé au calcul de l'indice de consommation (IC) dans toutes les réplifications de chaque lot:

$$IC = \frac{\text{Quantité d'aliment distribuée}}{\text{Somme des gains de poids}}$$

#### 1.6.3.2. Paramètres lésionnels et parasitologiques

- *Excrétion oocystale*

La mesure de l'excrétion oocystale du 19<sup>ème</sup> au 22<sup>ème</sup> jour (du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-inoculation) dans les 7 lots étudiés est effectuée par la méthode quantitative de McMaster modifiée (**Taylor et al., 1995**). Celle-ci est réalisée sur 3 prélèvements de fientes effectués le matin (entre 8 heures et 9 heures, pendant les journées sélectionnées : 19<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup>, 21<sup>ème</sup>, 22<sup>ème</sup> jour) sur les 4 répétitions de chaque lot. Il est prélevé de 10 à 20 g de fèces/cage/prélèvement.

- *Scores lésionnels*

A 21 jours d'âge (7<sup>ème</sup> jour post-inoculation), la moitié des poulets de chaque lot (5 sujets/répétition = 20 sujets/lot) est sacrifiée (par saignée) dans le but de parfaire les scores lésionnels selon la méthode et le barème de **Johnson et Reid (1970)**. Il importe

d'observer que l'autre moitié est différée d'un un jour pour évaluer l'excrétion d'oocystes au 22<sup>ème</sup> jour d'âge (8<sup>ème</sup> jour post-inoculation).

Le score lésionnel établi par **Johnson et Reid (1970)** est une notation permettant de classer numériquement les lésions macroscopiques causées par les coccidies. Ce faisant, et selon les espèces d'*Eimeria* spp existant dans notre inoculum (*E. acervulina*, *E. maxima*), il a été procédé aux scores lésionnels correspondant à ces 2 espèces (**Johnson et Reid, 1970 ; Conway et McKenzie, 2007 ; Peek, 2010**) :

➤ *E. acervulina*

Elle envahit, généralement, la muqueuse duodénale, mais dans les infections lourdes elle peut même s'étendre jusqu'au jéjunum inférieur, l'iléon et le bas intestin.

**Score 0** : Pas de lésions macroscopiques.

**Score +1**: Lésions blanchâtres en forme de plaques, éparpillées et confinées au niveau du duodénum, contenant des oocystes en développement. Ces lésions sont disposées transversalement par rapport au grand axe de l'intestin, lui donnant l'aspect de barreaux d'échelle. Elles sont visibles à partir de la muqueuse et de la surface séreuse, ne dépassant pas 5 lésions par cm<sup>2</sup>.

**Score +2**: Les lésions sont plus nombreuses, étroitement agglomérées mais non coalescées pouvant s'étendre 20 cm au-dessous du duodénum à la 3<sup>ème</sup> semaine d'âge. La paroi intestinale n'est pas épaissie, le contenu intestinal est normal.

**Score +3**: Les lésions sont très nombreuses entraînant leur coalescence avec la réduction de la taille de lésions, donnant à l'intestin un aspect d'enduit. La paroi intestinale est épaissie, le contenu intestinal est aqueux. Les lésions peuvent s'étendre au-delà du diverticule du sac vitellin.

**Score +4**: La muqueuse paraît grisâtre avec des lésions complètement coalescées. Des pétéchies peuvent être observées, toutefois, et lors des infections lourdes la congestion peut atteindre la muqueuse entière lui donnant une couleur rouge vif (**Morehouse et McGuire, 1958**). Les lésions individuelles sont confondues au niveau du haut-intestin. Les

lésions en barreaux d'échelle typique de cette espèce se manifestent dans le l'intestin moyen. La paroi intestinale est considérablement épaissie, la lumière intestinale est remplie d'un exsudat crémeux très chargé en parasites (oocystes). Le score +4 est généralement accompagné de la mort des sujets atteints.

➤ *E. maxima*

Les infections à *E. maxima* sont localisées dans l'intestin moyen de part et d'autre du diverticule de Meckel. Lors des infections sévères, les lésions peuvent s'étendre de la portion haute du duodénum jusqu'à la jonction iléo-caecal. Les lésions manifestées par cette espèce sont tardives, aux environs du 6<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour post-infection.

**Score 0** : Pas de lésions macroscopiques.

**Score +1**: Un nombre restreint de pétéchies peut être discerné à partir de la face séreuse de l'intestin moyen. On n'observe ni ballonnement ni épaississement de l'intestin, bien que de petites quantités de mucus orangé puissent être présentes.

**Score +2**: La séreuse laisse apparaître un nombre important de pétéchies. La lumière intestinale peut être remplie de mucus orangé. La paroi intestinale est épaissie avec absence ou présence d'un léger ballonnement.

**Score +3**: La paroi intestinale est épaissie, l'intestin ballonné, la muqueuse rugueuse, le contenu intestinal est rempli de caillots de sang et du mucus.

**Note +4** : L'intestin est ballonné pour la majeure partie de sa longueur. Le contenu intestinal contient de très nombreux caillots de sang et du sang digéré générant une couleur caractéristique et une odeur putride. La paroi est très épaissie. La mort survient, généralement, avec ce score (**Johnson et Reid, 1970**).

➤ *Raclage de la muqueuse*

Afin de confirmer les lésions coccidiennes observées lors de la nécropsie, il a été procédé aux raclages des muqueuses intestinales inspectées (duodénum, jéjunum, iléon) à l'aide des lames de bistouri. Les produits de raclages sont ensuite étalés entre lames et lamelles, après quoi elles sont observées au microscope optique, aux

grossissements 10 (100x) et 40 (400x), en vue de rechercher des oocystes non sporulés, schizontes ou gamétocytes. Il est à faire remarquer qu'il est observé sur tous les produits de raclages, des oocystes non sporulés et/ou des schizontes et/ou des gamétocytes des espèces *E. acervulina* et *E. maxima*.

A partir des produits de raclages intestinaux réalisés sur les sujets autopsiés, on a élaboré un pool purifié d'oocystes non sporulés et ce, dans une solution de dichromate de potassium à 2.5%, après quoi, il a été procédé à la mise à sporulation des oocystes. Un aliquote de ce pool (d'oocystes sporulés) obtenu a été transféré aux Etats Unis, au laboratoire « Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, Agricultural Research Service, Beltsville, USA » pour identifier les espèces d'*Eimeria* spp qu'il contient en utilisant la technique ITS1-PCR.

Il faut signaler que les espèces identifiées dans le pool, extrait des produits de raclages, sont celles présentes dans l'inoculum : *E. acervulina* et *E. maxima*.

- *Taux de Mortalité*

Du 14<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour, la mortalité journalière a été enregistrée dans les 4 réplifications de tous les lots, après quoi il a été procédé au calcul des taux de mortalité. Il est à noter que les sujets morts ont été pesés et autopsiés et ce, dans le but de déceler d'éventuelles lésions coccidiennes.

- *Coupe histologique*

Il a été effectué des coupes histologiques sur des segments intestinaux des poulets autopsiés. Pour ce faire, 1 sujet ayant fait l'objet d'autopsie (au 21<sup>ème</sup> jour d'âge) a été pris au hasard sur chaque lot. Suite à quoi, un segment de 3 cm linéaire, de la partie la plus haute du duodénum a été découpé et mis dans le formol 10%.

La coloration histologique d'hématoxyline-Eosine (**Fortier et Hould, 2003**) a été réalisée, dans le Laboratoire d'Hygiène- Jijel, sur toutes les sections intestinales prélevées et ce, dans le but :

- D'observer les lésions coccidiennes microscopiques sous les grossissements suivants : 10 (100×), 20 (200×), 40 (400×) et 100 (1000× avec l'huile d'immersion).
- De comparer les lésions microscopiques et macroscopiques.
- D'estimer les éventuels effets des traitements anticoccidiens sur l'atténuation (ou l'exacerbation) des lésions.

L'interprétation cyto-histologique a été faite avec l'aide d'un médecin spécialiste en cyto-histologie du Laboratoire d'Hygiène- Jijel.

### 1.6.3.3. Interprétation et évaluation de la sensibilité du pool d'isolats

Dans le but d'interpréter les résultats obtenus et d'évaluer la sensibilité (ou la résistance) du pool d'isolats étudié, vis-à-vis des molécules anticoccidiennes testées, il a été convenu de deux approches :

- Barème établi par **McDougald et al. (1986)**

Il consiste à évaluer la réduction du score lésionnel par rapport au lot Inoculé Non Traité (INT), pour chaque espèce (ou souche) d'*Eimeria* spp :

***Souche (ou espèce) d'Eimeria spp résistante*** : Si la réduction du score lésionnel par rapport au lot INT est inférieure ou égale à 30 %.

***Souche (ou espèce) partiellement résistante (ou partiellement sensible)*** : Si la réduction du score lésionnel par rapport au lot INT est supérieure à 30 % et inférieure à 50 %.

***Souche (ou espèce) pleinement sensible*** : Si la réduction du score lésionnel par rapport au lot INT est supérieure ou égale à 50 %.

- Index Anticoccidien (ACI)

Il s'agit d'une évaluation de l'efficacité anticoccidienne par le calcul de l'Index Anticoccidien (ACI), s'accordant avec la procédure utilisée par Chapman (1989b), fondée sur des bases décrites par **McManus et al. (1968)**:

$$ACI = (\%S + \% GPM - (SLM \times 10 + NO \times 10^{-6}) \times 0.4)$$

*ACI* : Index Anticoccidien (Anticoccidial Index).

*%S* : Pourcentage des survivants du lot inoculé traité.

*%GPM* : Pourcentage du gain de poids du lot inoculé traité par rapport au lot non inoculé non traité (NINT).

*NO* : Nombre Oocystal moyen.

*SLM* : Score lésionnel moyen du lot inoculé traité.

Après le calcul de l'ACI, il a été donné l'interprétation des résultats selon le l'échelle suivante :

**Index Anticoccidien supérieur ou égal à 160** : L'isolat est considéré comme étant sensible (S).

**Index Anticoccidien compris entre 120-160** : L'isolat est considéré comme étant partiellement résistant (PR).

**Index Anticoccidien est inférieur à 120** : L'isolat est considéré comme étant résistant (R) (Chapman, 1989b).

#### 1.6.3.4. Analyse statistique

Toutes les données ont été saisies dans une base informatique classique (Microsoft Excel 2010, USA), après quoi la vérification et le traitement statistique ont été effectués à l'aide du logiciel SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social) par l'utilisation du modèle analyse de variance (ANOVA), avec un seuil de signification de l'ordre de  $p < 0.05\%$ , pour comparer les moyennes des différentes variables étudiées (poids moyens, gains de poids, indices de consommation, taux de mortalité, indices lésionnels, excréments d'oocystes) entre les 7 lots. Le Tukey test a été utilisé dans le but de déterminer une différence significative entre les moyennes comparées.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Paramètres zootechniques

Le récapitulatif des résultats des paramètres zootechniques retenus dans l'étude est donné dans le tableau ci-après :

**Tableau 6. Récapitulatif des résultats des paramètres zootechniques.**

Lot*	Gain de poids Moyen (g)**			Indice de consommation**	Poids moyen (g)**
	1 <sup>ier</sup> au 14 <sup>ème</sup> jour	14 <sup>ème</sup> au 22 <sup>ème</sup> jour	1 <sup>ier</sup> au 22 <sup>ème</sup> jour		
1 (Dic)	294 ± 3 <sup>a</sup>	312 ± 7 <sup>a</sup>	606 ± 7 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.01 <sup>c</sup>	646.7 ± 8 <sup>a</sup>
2 (Las)	289 ± 4 <sup>a</sup>	250 ± 8 <sup>b</sup>	538 ± 6 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.01 <sup>b</sup>	579.2 ± 8 <sup>b</sup>
3 (Mon)	289 ± 5 <sup>a</sup>	179 ± 10 <sup>c</sup>	468 ± 7 <sup>c</sup>	1.48 ± 0.03 <sup>a</sup>	508.9 ± 8 <sup>c</sup>
4 (Nar)	292 ± 4 <sup>a</sup>	205 ± 9 <sup>b</sup>	497 ± 8 <sup>c</sup>	1.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	537.8 ± 9 <sup>b</sup>
5 (Sal)	293 ± 3 <sup>a</sup>	279 ± 8 <sup>b</sup>	572 ± 9 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.02 <sup>bc</sup>	612.2 ± 7 <sup>ab</sup>
6 (INT)	292 ± 4 <sup>a</sup>	140 ± 11 <sup>c</sup>	433 ± 11 <sup>c</sup>	1.52 ± 0.02 <sup>a</sup>	473.7 ± 11 <sup>c</sup>
7 (NINT)	290 ± 5 <sup>a</sup>	332 ± 7 <sup>a</sup>	622 ± 8 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.01 <sup>c</sup>	662.3 ± 9 <sup>a</sup>

\*: Chaque lot comporte 4 répétitions de 10 poulets/ \*\*: Les valeurs de la même colonne suivies d'une lettre différente sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ) et ce, par l'ANOVA et le Tukey test / Dic: Lot Diclazuril/ Las: Lot Lasalocide-sodium/ Mon: Lot Monensin- sodium/ Nas: Lot Narasin/ Sal: Lot Salinomycine-sodium/ INT: Lot Inoculé Non Traité/ NINT: Lot Non Inoculé Non Traité.

Au cours des deux périodes étudiées : **14<sup>ème</sup> au 22<sup>ème</sup> jour et du 1<sup>ier</sup> au 22<sup>ème</sup> jour**, les performances zootechniques (Gain de poids; IC ; poids moyens) (Tableau 6) sont meilleures dans le lot Dic (Gain de poids<sub>14<sup>ème</sup>-22<sup>ème</sup> jour</sub> = 312 ± 7g; Gain de poids<sub>1<sup>ier</sup>-22<sup>ème</sup> jour</sub> = 606 ± 7g;

IC=1.37±0.01; Poids moyen=646.7±8), très altérés dans les lots Nar (Gain de poids<sub>14ème-22èmejour</sub>=205±9g;Gain de poids<sub>1ier-22èmejour</sub>=497±8g;IC=1.43 ± 0.02;Poids moyen=537.8± 9g), Mon (Gain de poids<sub>14ème-22ème jour</sub>=179±10g; Gain de poids<sub>1ier-22ème jour</sub>=468±7g; IC=1.48 ± 0.03; Poids moyen=508.9± 8g). Une réduction significative des performances zootechniques (p<0.05) est observée dans les traités inoculés : lots Las (Gain de poids<sub>14ème-22èmejour</sub>=250±8g;Gain de poids<sub>1ier-22èmejour</sub>=538±6g;IC=1.41±0.01;Poids moyen=579.2±8g), Nar, Mon, INT (Gain de poids<sub>14ème-22èmejour</sub>=140±11g;Gain de poids<sub>1ier-22èmejour</sub>=433±11g;IC=1.52±0.02;Poids moyen=473.7±11g) par rapport au lot témoin NINT(Gain de poids<sub>14ème-22èmejour</sub>=332±7g;Gain de poids<sub>1ier-22èmejour</sub>=622±8g;IC=1.34±0.01;Poids moyen=662.3±9g), exception faite des lots Dic et Sal (Gain de poids<sub>14ème-22èmejour</sub>=279±8g;Gain de poids<sub>1ier-22èmejour</sub>=572±9g;IC=1.40±0.02;Poids moyen=612.2±7g) (Tableau 6).

Dans les conditions pratiques, la résistance anticoccidienne se traduit, généralement, par une détérioration de l'indice de consommation et du poids moyen, associée aux lésions coccidiennes et à une excrétion oocystale (**Stephan et al., 1997**). Par conséquent, lors des expérimentations, les performances zootechniques sont, généralement, prises en compte pour évaluer l'effet d'un traitement sur l'infection coccidienne.

Fréquemment, le gain de poids est non affecté ou légèrement réduit lors des infections légères causées par les coccidies intestinales, tandis que lors d'atteintes sévères, le gain de poids est susceptible de réduction de 40 à 60 % par rapport à un lot non inoculé non traité (**Conway et al., 1990**).

Une infection expérimentale de l'ordre de 500 000 oocystes sporulés d'*E. acervulina* (souche Ongar) par sujet, est responsable d'un indice de consommation très altéré (3.11) et d'une réduction du gain de poids de 40 % et ce, pendant les 7 jours post-infection (**Williams, 1998**). Lors d'une expérimentation réalisée sur des poulets mâles de souche White Leghorn, **Reid et Johnson (1970)**, ont mis en évidence une baisse de gain de poids avec une augmentation des scores lésionnels et ce, après une inoculation par l'espèce *E. acervulina*. **Long et al. (1980)** ont observé une importante dépression du poids moyen et des scores lésionnels élevés (allant de 3 à 4), sur des poulets non immunisés inoculés par *E. tenella*, pour les poulets immunisés le gain de poids et les scores lésionnels n'ayant pas été détériorés.

**Conway et al. (1990)**, ont fait observer que les traitements anticoccidiens, notamment, par la salinomycine ont un effet bénéfique sur l'amélioration des performances zootechniques.

D'autre part, nous ne pouvons pas négliger le fait que les anticoccidiens, notamment les ionophores (monensin, narasin, salinomycine, maduramycine, etc.), les dérivés triazines (toltrazuril, diclazuril, clazuril, etc.) (**Reid et al., 1972 ; Clarke et al., 1974 ; Frigg et Schramm, 1977 ; Chappel et Babcock, 1979 ; Migaki et al., 1979 ; Jeffers et al., 1988 ; Kutzer et Leibetseder, 1985 ; Kutzer et al., 1985 ; Seikh et al., 1988**) et la robenidine (**Reid et al., 1970**) sont, également, des facteurs de croissance. Il est donc concevable que cette vertu peut masquer l'effet d'une infection eimerienne ; par conséquent les résultats expérimentaux peuvent être mal interprétés surtout s'agissant des souches d'*Eimeria* spp développant une faible résistance (**Stephan et al., 1997**).

**Chapman (1980)**, définit un isolat comme étant :

- Résistant à un anticoccidien, si le gain de poids des poulets Inoculés Traités n'est pas significativement différent de celui du lot Inoculé Non Traité.
- D'une sensibilité réduite, si le gain de poids du lot Inoculé Traité est significativement différent des deux lots témoins Inoculé Non Traité et Non Inoculé Non Traité.

Sur la foi des résultats des paramètres zootechniques, l'observation établie par **Chapman (1980)**, incline à penser que les oocystes d'*E. acervulina* et d'*E. maxima* présentes dans le pool d'isolat étudié, laissent apparaître une :

- **Sensibilité vis-à-vis du diclazuril** : La différence du gain de poids (14<sup>ème</sup> -22<sup>ème</sup> jour, 1<sup>ier</sup>-22<sup>ème</sup> jour) et de l'indice de consommation étant non significative ( $P > 0.05$ ) entre le lot Dic et le lot NINT.
- **Sensibilité réduite (ou résistance partielle) vis-à-vis du lasalocide** : Le gain de poids (14<sup>ème</sup> -22<sup>ème</sup> jour, 1<sup>ier</sup>-22<sup>ème</sup> jour) et l'indice de consommation du lot lasalocide sont significativement meilleurs ( $P < 0.05$ ) que ceux observés dans le lot INT, en revanche, ils sont significativement plus mauvais ( $P < 0.05$ ) que ceux obtenus dans le lot NINT.

- **Résistance contre le mosensin** : La différence du gain de poids (14<sup>ème</sup> -22<sup>ème</sup> jour, 1<sup>ier</sup>-22<sup>ème</sup> jour) et de l'indice de consommation étant non significative ( $P > 0.05$ ) entre le lot Mon et le lot INT.
- **Sensibilité réduite (ou résistance partielle) vis-à-vis du narasin** : Le gain de poids (14<sup>ème</sup> -22<sup>ème</sup> jour, 1<sup>ier</sup>-22<sup>ème</sup> jour) et l'indice de consommation du lot narasin sont significativement meilleurs ( $P < 0.05$ ) que ceux observés dans le lot INT, en revanche, ils sont significativement plus mauvais ( $P < 0.05$ ) que ceux obtenus dans le NINT.
- **Sensibilité vis-à-vis de la salinomycine**: Le gain de poids (1<sup>ier</sup>-22<sup>ème</sup> jour) et l'indice de consommation obtenus dans le lot Sal sont significativement meilleurs ( $P < 0.05$ ) que ceux observés dans le lot INT. La différence des paramètres suscités, n'étant pas significative ( $P > 0.05$ ) entre le lot Sal et le lot NINT.

## 2.2. Espèces d'*Eimeria* spp présentes dans l'inoculum étudié

Notre inoculum est un pool d'isolats d'*Eimeria* spp du poulet, élaboré à partir de 34 isolats issus de 34 élevages de poulets de chair situés sur différentes régions de la Wilaya de Jijel. En dépit du nombre relativement grand des élevages sélectionnés, il n'a pu être identifié que 2 espèces : *E. acervulina* et *E. maxima*, avec une prédominance de la première espèce à 66 %. Cela incline à penser à la faible diversité des espèces d'*Eimeria* spp du poulet dans les élevages sélectionnés.

*E. acervulina* est l'espèce la plus répandue dans les élevages de poulets de chair. Ce résultat corrobore les conclusions des enquêtes antérieures, notamment, celle menée en France, par **Williams et al. (1996)**, axée sur la prévalence de chaque espèce d'*Eimeria* spp sur 22 élevages de poulets de chair ; les résultats obtenus sont les suivants : *E. acervulina* (100%), *E. mitis* (82%), *E. tenella* (77%), *E. maxima* (73%), *E. praecox* (45%) et *E. brunetti* (27%). En Suède (**Haug et al., 2008**), Tchécoslovaquie (**Kučera, 2007**), Royaume-Uni (**Chapman, 1982 ; Williams, 2006**) et en Pays-Bas (**Braunius, 1987**), la prévalence d'*E. acervulina* était, également, de l'ordre de 100%.

Sur 75 % de prélèvements réalisés sur des litières de différents élevages de poulets de chair traités exclusivement par le narasin, **Haug et al. (2008)**, n'ont décelé qu'une seule ou 2 espèces d'*Eimeria* spp ; *E. acervulina* étant présente dans tous les prélèvements.

S'agissant de la prévalence d'*E. maxima*, différentes conclusions ont été obtenues. **Morris et al. (2007)** rapportent que les espèces les plus répandues en Australie sont *E. acervulina*, *E. maxima* et *E. mitis*. En Norvège la prévalence d'*E. maxima* est faible ; ce qui peut être expliqué, selon **Haug et al. (2008)**, par l'âge d'abattage précoce (38 à 40 jours), le pic d'excrétion de cette espèce étant compris entre la 5<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine d'âge.

D'autres chercheurs utilisant la technique PCR, ont obtenu une composition en espèces d'*Eimeria* spp de poulet plus diversifiée ; toutefois, ils n'ont pas mentionné le type de programme anticoccidien utilisé dans les élevages étudiés (**Morgan et al., 2009 ; Vrbaet al., 2010 ; Carvalho et al., 2011**).

L'importante prévalence des deux espèces *E. acervulina* et *E. maxima*, dans les élevages de poulet de chair, est expliquée par les réflexions suivantes :

- Le développement rapide de la résistance aux anticoccidiens, comparé aux autres espèces d'*Eimeria* spp du poulet.
- Dans les conditions de terrain, ces 2 espèces possèdent des avantages sélectifs (Résistance à la dessiccation, espèces très prolifiques, invasion et développement des sites intestinaux envahis par d'autres espèces) tendant à augmenter leur nombre dans la litière (**Morgan et al., 2009 ; Vrbaet al., 2010 ; Carvalho et al., 2011**).

### 2.3. Paramètres lésionnels et parasitologiques

Les résultats des paramètres lésionnels et parasitologiques retenus dans l'étude sont énoncés dans les tableaux ci-après :

**Tableau 7. Scores lésionnels retenus.**

Lot	Espèces d' <i>Eimeria</i> spp	R1	R2	R3	R4	Scores moyens	Raclage de la muqueuse
1(Dic)	<i>E. acervulina</i>	2	2	2	2	2	Positifs
	<i>E. maxima</i>	1.2	1.4	1.8	1.6	1.5	
2 (Las)	<i>E. acervulina</i>	2.4	2.6	2.4	2.2	2.4	Positifs
	<i>E. maxima</i>	1.8	2	1.8	2	1.9	
3 (Mon)	<i>E. acervulina</i>	3.4	3.4	3.4	3.6	3.45	Positifs
	<i>E. maxima</i>	3	3.2	3.4	3	3.15	
4 (Nar)	<i>E. acervulina</i>	2.8	2.8	2.8	3	2.85	Positifs
	<i>E. maxima</i>	2.2	2	2.6	2.6	2.35	
5 (Sal)	<i>E. acervulina</i>	2.2	2	2.2	2.2	2.15	Positifs
	<i>E. maxima</i>	1.8	2	2	2	1.95	
6 (INT)	<i>E. acervulina</i>	3.6	3.4	3.6	3.8	3.6	Positifs
	<i>E. maxima</i>	3.4	3.2	3	3.4	3.25	

R : Répétition/ Le score lésionnel dans chaque répétition a été réalisé sur 5 sujets.

**Tableau 8. Récapitulation des résultats de score lésionnel, de nombre oocystale moyen, de taux de mortalité.**

Lot <sup>*</sup>	Inoculation	Score lésionnel intestinal <sup>**</sup>		Excrétion oocystale (x 10 <sup>4</sup> OPG) <sup>**1</sup>	Mortalité (%) <sup>**</sup>
		<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>		
1 (Dic)	+	2.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	11.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>b</sup>
2 (Las)	+	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	35.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>b</sup>
3 (Mon)	+	3.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	70.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
4 (Nar)	+	2.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>ab</sup>	20.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>b</sup>
5 (Sal)	+	2.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	17.0 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>c</sup>
6 (INT)	+	3.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	65.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.6 <sup>a</sup>
7 (NINT)	-	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.5 ± 0.6 <sup>c</sup>

<sup>\*</sup>: Chaque lot comporte 4 répétitions de 10 poulets/ <sup>\*\*</sup>: Les valeurs de la même colonne suivies d'une lettre différente sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ) et ce, par l'ANOVA et le Tukey test/ OPG: Nombre d'oocystes par gramme de fèces. <sup>1</sup>: La mesure de l'excrétion oocystale a été effectuée du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge sur 3 prélèvements de fèces effectués le matin sur les 4 répétitions de chaque lot.

Les scores lésionnels relatifs à *E. acervulina* et *E. maxima*, enregistrés dans les lots et Dic (SL<sub>*E.acervulina*</sub>=2.0±0.4; SL<sub>*E.maxima*</sub>=1.5±0.3), Sal (SL<sub>*E.acervulina*</sub>=2.2±0.2; SL<sub>*E.maxima*</sub>=2.0±0.2) et Las (SL<sub>*E.acervulina*</sub>=2.4±0.2; SL<sub>*E.maxima*</sub>=1.9 ± 0.1) sont significativement meilleurs ( $P < 0.05$ ) que ceux observés dans les lots INT (SL<sub>*E.acervulina*</sub>=3.6±0.3; SL<sub>*E.maxima*</sub>=3.3±0.3), Mon (SL<sub>*E.acervulina*</sub>=3.5±0.4; SL<sub>*E.maxima*</sub>=3.2±0.3), Nar (SL<sub>*E.acervulina*</sub>=2.9±0.2; SL<sub>*E.maxima*</sub>=2.4±0.3) (Tableau 8).

Toutefois, aucun anticoccidien ne s'avère efficace pour une atténuation complète des scores lésionnels, suggérant que les 2 espèces (*E. acervulina* et *E. maxima*) composant l'inoculum étudié, présentent :

- **Une sensibilité réduite** vis-à-vis du diclazuril, lasalocide, Salinomycine.
- **Résistance** contre le monensin, narasin.

**Conway et al. (1999)**, avaient mis en évidence l'effet dose oocystale (dose oocystale inoculée) sur le degré des lésions entre un lot de poulets non traités et d'autres traités par la salinomycine; ainsi ils ont obtenu des scores lésionnels élevés dans tous les lots (traités et non traité). C'est pourquoi, la dose oocystale importante utilisée dans notre étude (340 300 oocystes/ sujet), atteste des scores lésionnels élevés. Ainsi, certains auteurs, notamment, **Conway et al. (1990)** pensent que le score lésionnel est un paramètre très limité pour interpréter l'efficacité anticoccidienne ne reflétant pas par conséquent la gravité causée par la coccidiose. Des scores lésionnels élevés, imputables à *E. acervulina*, *E. maxima* et *E. tenella*, enregistrés sur des poulets traités peuvent être associés à de légères réductions du poids moyen, tandis qu'avec le même degré lésionnel enregistré sur des oiseaux non traités, le gain de poids peut être sévèrement réduit.

La plupart des chercheurs ayant travaillé sur les notations lésionnelles, reconnaissent que pour chaque degré lésionnel, il existe un large éventail de variations pathologiques. La notion du score lésionnel permet d'évaluer le degré des lésions macroscopiques, ne permettant pas de mesurer l'étendue des changements physiopathologiques causées par l'infection (**Conway et al., 1990**).

Statistiquement, on peut admettre que toutes les molécules testées, dans l'étude, ont significativement réduit (par rapport au lot INT) l'excrétion oocystale (avec une très bonne maîtrise du diclazuril), exception faite du monensin (par rapport au lot INT) (Tableau 8).

L'excrétion oocystale obtenue dans le lot INT ( $65.0 \pm 0.4 \times 10^4$  OPG) est :

- 6 fois plus importante que celle notée dans le lot Dic ( $11.0 \pm 0.1 \times 10^4$  OPG).
- 2 fois plus importante que celle obtenue dans le lot Las ( $35.0 \pm 0.2 \times 10^4$  OPG).
- Presque égale à celle indiquée dans le lot Mon ( $70.0 \pm 0.4 \times 10^4$  OPG).
- 3 fois plus élevée que celle notée dans le lot Nar ( $20.0 \pm 0.8 \times 10^4$  OPG).
- 4 fois plus importante que celle relevée sur le lot Sal ( $17.0 \pm 1.2 \times 10^4$  OPG).

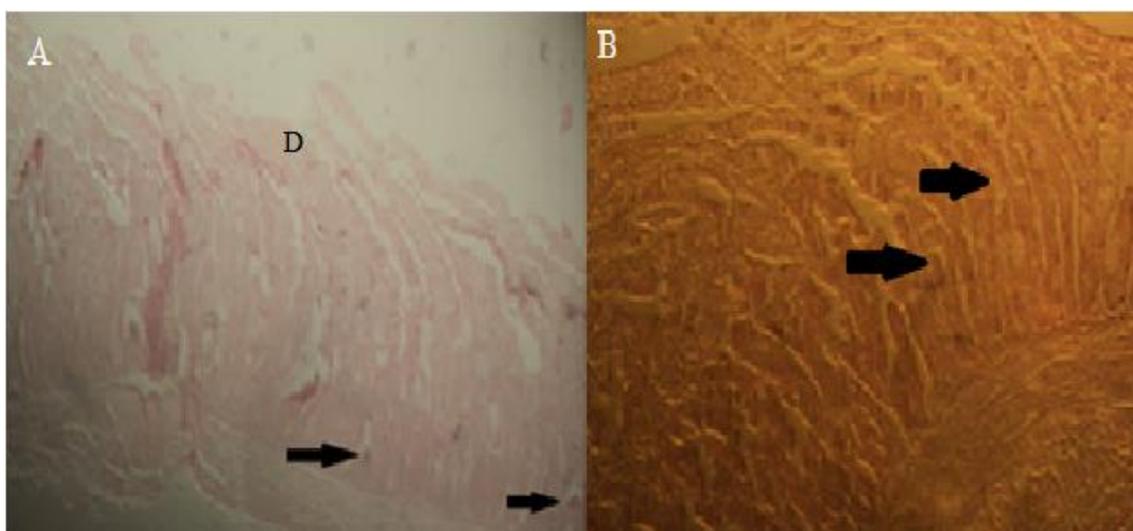
Lors des traitements par les ionophores, l'excrétion oocystale est toujours présente même si le parasite est sensible à la molécule utilisée, permettant lors d'un élevage au sol, la survenue de légères réinfections successives « trickle infections » des oiseaux engendrant ainsi une immunité protectrice (**Chapman, 1976**).

Dans certains cas, notamment, lors des infections lourdes et/ mixtes, on ne peut pas corréler entre la production oocystale et le degré des lésions coccidiennes, car on assiste dans ces 2 cas à un effet inverse traduit par une excrétion plus faible d'oocystes. Cet effet est connu sous le nom « crowding effect » ou effet de foule. Ce phénomène se produit lorsqu'un grand nombre de cellules intestinales hôtes se trouvent détruites au cours de la phase asexuée (schisogonie), ne laissant pas suffisamment de cellules pour un bon accomplissement de la phase sexuée (gamétogonie), réduisant par de ce fait, la production d'oocystes (**Williams, 2001**).

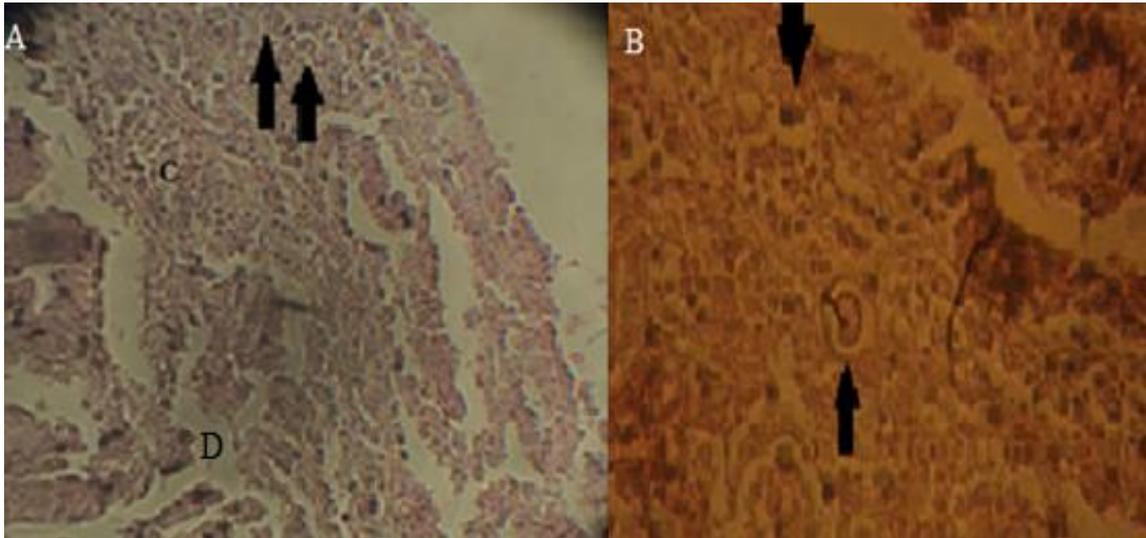
Généralement, le traitement par les ionophores induit une excrétion oocystale élevée ; selon **Jeffers (1989)** c'est un avantage qui caractérise les ionophores, leur effet chimiothérapeutique particulier permettant à l'animal de développer une réponse immunitaire adéquate.

Toutes les études antérieures, affirment qu'en post-mortem, les lésions coccidiennes sont toujours présentes dans les lots inoculés et traités (**Vetrommen et Peek, 1989**). Cependant, le diclazuril a laissé apparaître une très grande efficacité en matière d'atténuation des lésions et de suppression de l'excrétion oocystale. Cette vertu, est le résultat du large spectre de la molécule affectant les deux phases schizogonie et gamétogonie, provoquant sur celle-ci la dégénérescence des gamontes, (**Maes et al. 1988 ; Verheyen et al., 1989 ; Peek, 2010**).

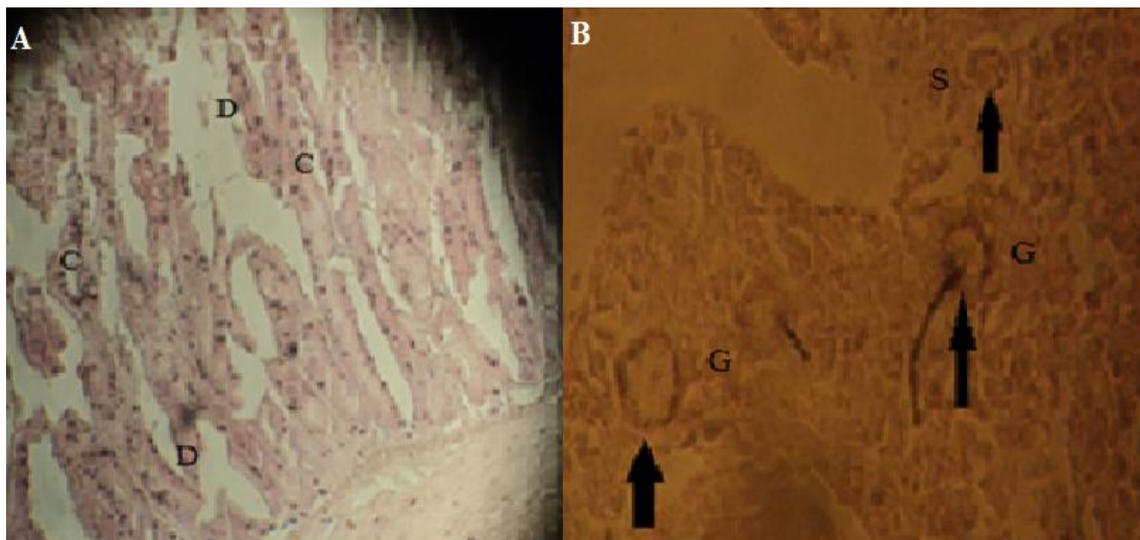
Dans cette étude, la mortalité est considérée comme étant un paramètre peu spécifique, les cas enregistrés dans tous les lots, n'étant pas imputable à la coccidiose (Tableau 8). Les autopsies réalisées sur les sujets morts, ont révélé d'autres problèmes infectieux (viraux et/ou bactériens) causant des entérites (non coccidiennes) et des problèmes respiratoires (aérosacculite, trachéite, pneumonie).



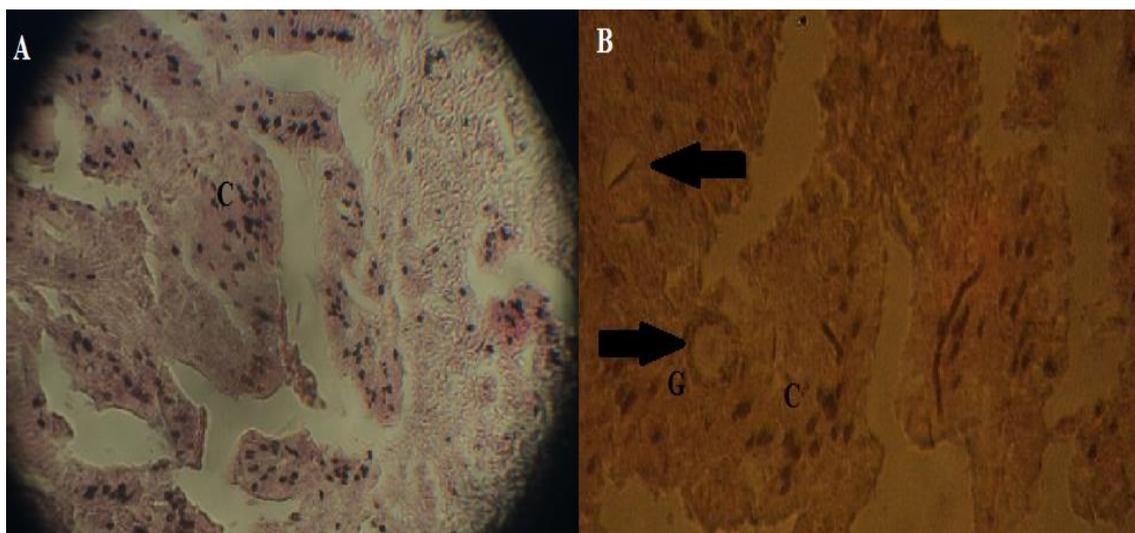
**Photo 1. Observation histopathologique :** Lot N° 1 (Dic). (A) Légère abrasion des villosités (D). On note la présence de différents stades du parasite (Flèches) (200×). (B) Abrasion et hypertrophie des villosités avec une évidente hyperplasie des cryptes (Flèches) (400×) (photographie personnelle).



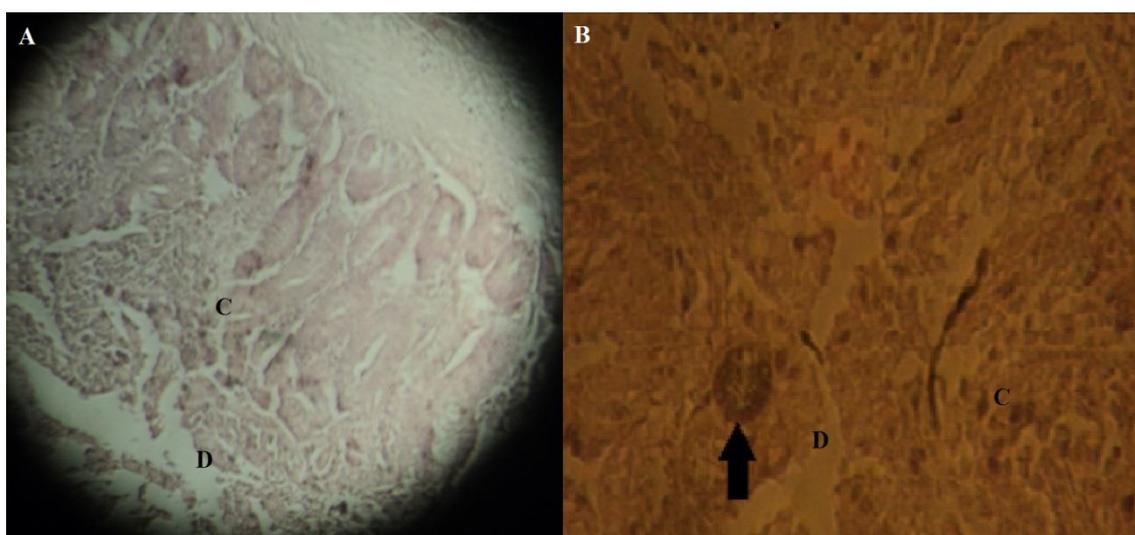
**Photo 2. Observation histopathologique : Lot N° 2 (Las).** (A) *Importante destruction des villosités et des cryptes (D) avec un léger processus inflammatoire traduit par une faible infiltration des mononuclées (C). On note, également, la présence de différentes phases du parasite (Flèches) (400×).* (B) *Destruction et invasion des cryptes par des schizontes (Flèches) (1000×) (photographie personnelle).*



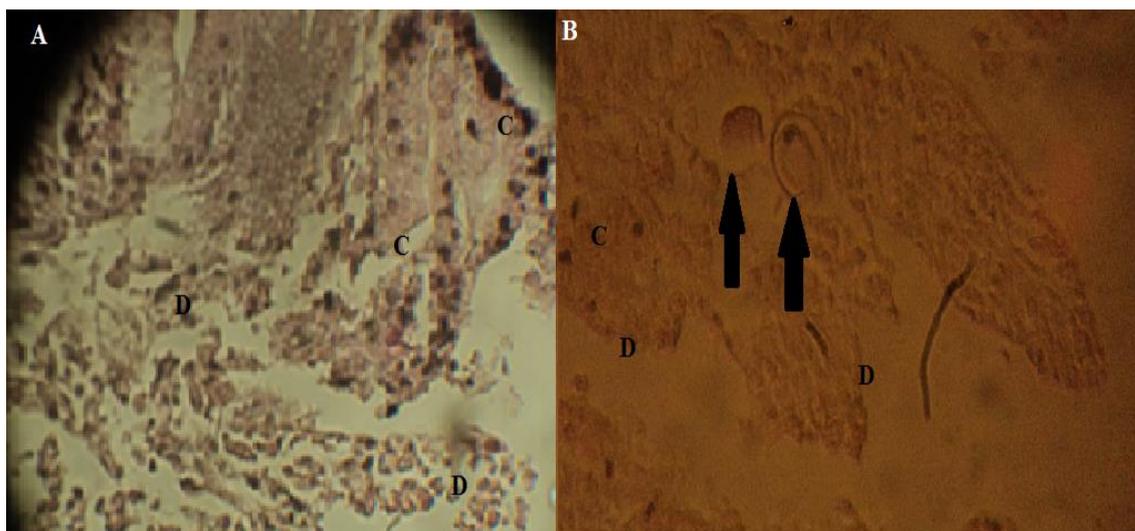
**Photo 3. Observation histopathologique : Lot N° 3 (Mon).** (A) *Destruction massive des villosités et des cryptes intestinales (D) avec une infiltration envahissante du fait des mononuclées traduisant (C) un phénomène inflammatoire très prononcé (400×).* (B) *Destruction massive des cryptes. On note, également, la présence de différentes phases du parasite (Flèches), notamment les schizontes (S) et les gamétocytes (G) (1000×) (photographie personnelle).*



**Photo 4. Observation histopathologique : Lot N° 4 (Nar).** (A) *Importante destruction des villosités et des cryptes avec un processus inflammatoire prononcé traduit par une importante infiltration des mononuclées (C) (400×).* (B) *Processus inflammatoire prononcé attesté par une importante infiltration des mononuclées (C). On note, également, la présence de différentes phases du parasite (Flèches), notamment, les gamétocytes (G) (1000×) (photographie personnelle).*



**Photo 5. Observation histopathologique : Lot N° 5 (Sal).** (A) *Abrasion des villosités (D) caractérisée par un processus inflammatoire traduit par une légère infiltration des mononuclées (C) (400×).* Destruction des villosités (D) associée à un processus inflammatoire attesté par une légère infiltration des mononuclées (C). On note la présence de différentes phases du parasite (Flèches) (1000×) (photographie personnelle).



**Photo 6. Observation histopathologique : Lot N° 6 (INT).** (A) Destruction massive et envahissante des villosités et des cryptes intestinales (D) avec une importante infiltration des mononuclées traduisant (C) un phénomène inflammatoire très prononcé (400×). (B) Destruction massive et envahissante des villosités et des cryptes intestinales (D) associée à une importante infiltration par les mononuclées (C). On note, également, la présence de différentes phases du parasite (Flèches) (1000×) (photographie personnelle).

Quoiqu'on n'ait pu réaliser des études morphométriques sur les coupes histologiques ni de corrélation statistique entre les lésions macroscopiques et microscopiques par manque de coupes histologiques suffisantes, on peut constater clairement la gravité des lésions histopathologiques dans les lots ayant les scores lésionnels les plus détériorés (INT, Mon, Nar), caractérisés par d'importantes abrasions de l'épithélium de la muqueuse et une destruction invasive des villosités et des cryptes. On observe, également, dans les 3 lots suscités une infiltration massive de la muqueuse intestinale par les cellules inflammatoires mononucléaires et une importante destruction de celles-ci (Kogut et al., 1984).

Il est utilisé, dans cette étude, une dose oocystale de l'ordre de 340 300 oocystes sporulés (d'*E. acervulina* et *E. maxima*)/sujet, dose suffisante pour provoquer des scores lésionnels supérieurs à +2 (Conway et al., 1993). Les 4 ionophores testés sont de loin incapables d'atténuer les lésions microscopiques de l'isolat utilisé.

En revanche, on peut conclure à partir des résultats des lésions macroscopiques et microscopiques que l'application du diclazuril atténue relativement le degré lésionnel de la coccidiose. Cette observation corrobore les résultats obtenus par de nombreux auteurs, notamment, El-Banna et al. (2005), Amer et al. (2007) et Assis et al. (2010).

Ces mêmes chercheurs affirment que le diclazuril est capable de contrôler l'infection coccidienne par l'atténuation des lésions et la réduction de l'excrétion oocystale. Ceci est expliqué par le spectre d'action assez large de cette molécule affectant plusieurs phases du cycle évolutif des *Eimeria* spp ; **Maes et al. (1988)** ont fait valoir qu'une dose de l'ordre de 1 ppm de diclazuril, possède un effet létal sur les stades sexué et asexué du parasite.

## 2.4. Profils de la sensibilité anticoccidienne

### 2.4.1. Profil établi par **McDougald et al. (1986)**

Le Profil de la sensibilité anticoccidienne (par espèces d'*Eimeria* spp) de l'isolat étudié, établi selon le barème mis au point par **McDougald et al. (1986)**, est mentionné dans le tableau ci-après :

**Tableau 9. Profil de la sensibilité anticoccidienne de l'isolat étudié (McDougald et al., 1986).**

Lot	Réduction des scores lésionnels (%)		Profil de la sensibilité anticoccidienne 1 (PSA1)	
	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>
1 (Dic)	44.4	53.8	RS	S
2 (Las)	33.3	41.5	RS	RS
3 (Mon)	4.2	3.2	R	R
4 (Nar)	20.8	27.7	R	R
5 (Sal)	40.3	40.0	RS	RS

PSA1: Profil de la sensibilité anticoccidienne selon le barème mis au point par McDougald et al. (1986). R : Résistante ; RS : Partiellement sensible ou partiellement résistante (réduction de la sensibilité) ; S : Sensible.

### 2.4.2. Profil établi par **Chapman (1989b)**

Le Profil de la sensibilité anticoccidienne de l'isolat, selon le barème mis au point par **Chapman (1989b)**, est mentionné dans le tableau ci-après :

**Tableau 10. Profil de la sensibilité anticoccidienne de l'isolat étudié (Chapman, 1989b).**

Lot	Index anticoccidien (ACI)	Profil de la sensibilité anticoccidienne 2 (PSA 2)
1 (Dic)	171.4	S
2 (las)	148.6	RP
3 (Mon)	113.0	R
4 (Nar)	130.7	RP
5 (Sal)	160.8	S

PSA2: Profil de la sensibilité anticoccidienne selon le barème mis au point par Chapman (1989b). R : Résistante ; RP : Partiellement sensible ou partiellement résistante (réduction de la sensibilité) ; S : Sensible.

Le barème, basé sur la réduction des scores lésionnels, (**McDougald et al., 1986**) révèle :

- **Une résistance très marquée (R)** de l'isolat étudié vis-à-vis du monensin-sodium et ce, pour les deux espèces *E. acervulina* (Réduction des scores lésionnels =4.2%) et *E. maxima* (Réduction des scores lésionnels=3.2%). **La résistance étant moins prononcée (R)** vis-à-vis du narasin (*E. acervulina*

(Réduction des scores lésionnels=20.8%) et *E. maxima* (Réduction des scores lésionnels=27.7%)).

- Une **résistance partielle (ou sensibilité partielle) (RS)** des 2 espèces est observée vis-à-vis du lasalocide-sodium (*E. acervulina* (Réduction des scores lésionnels=33.3%) et *E. maxima* (Réduction des scores lésionnels=41.5%)) et de la salinomycine-sodium (*E. acervulina* (Réduction des scores lésionnels =40.3%) et *E. maxima* (Réduction des scores lésionnels=40.0%)).
- Dans le lot diclazuril, *E. acervulina* laisse apparaître une **résistance partielle (ou sensibilité partielle) (RS** : Réduction des scores lésionnels=44.4%), tandis qu'*E. maxima* développe une **sensibilité (S** : Réduction des scores lésionnels= 53.8%).

Le barème établi par **Chapman (1989b)** fait valoir :

- Une **résistance** du pool d'Isolats d'*Eimeria* spp vis-à-vis du monensin-sodium (ACI = 113.0).
- Une **résistance partielle** vis-à-vis du narasin (ACI = 130.7) et du lasalocide-sodium (ACI = 148.6).
- Une **sensibilité** vis-à-vis de la salinomycine-sodium (ACI = 160.8) et du diclazuril (ACI = 171.4).

Dans le lot Mon, les valeurs de l'Index anticoccidien (ACI =113.0) et de la réduction des scores lésionnels par rapport au lot NINT (*E. acervulina* = 4.2, *E. maxima* = 3.1), indiquent une résistance complète d'*E. acervulina* et *E. maxima* issues du terrain Algérien (Jijel) vis-à-vis du monensin. Les scores lésionnels du haut et du moyen intestin ont confirmé la résistance des 2 espèces *E. acervulina* et *E. maxima* à l'encontre du monensin. Selon **Chapman (1997)**, la résistance aux ionophores anticoccidiens est inévitable dans le cas de leur utilisation massive.

Plusieurs auteurs, ont mis en évidence des résistances des *Eimeria* spp au monensin après une utilisation continue de la molécule, soit expérimentalement (**Zhu et McDougald, 1992**), soit au cours des études de terrain (**Chapman, 1982b ; Chapman et Shirley, 1989 ; Peek et Landman, 2006**).

Expérimentalement, des auteurs ont pu développer des coccidies résistant aux anticoccidiens, après des expositions répétées d'une souche d'*Eimeria* spp à la même molécule, c'est le cas par exemple de :

- **Jeffers et Bentley (1980)**, qui ont pu obtenir une souche d'*E. meleagrimitis*, résistant aux monensin et ce, après des sélections sur 10 générations à travers la dinde traitée par cette molécule.
- **Chapman (1984b)** a rapporté qu'après des sélections sur 16 générations, à travers des poulets traités à une dose de 100 ppm de monensin, il a pu développer une souche d'*E. tenella* résistant à la molécule suscitée.
- **Zhuo et al. (2006)** ont développé deux souches d'*E. tenella* résistant au monensin et ce, après 35 passages successifs d'un isolat d'*E. tenella* à travers des concentrations croissantes du monensin (La souche **MON-R(o)-1** résiste à la concentration 125 ppm/ La souche **MON-R(o)-2** résiste à la concentration 200 ppm).

En Algérie, le monensin est l'additif anticoccidien le plus utilisé, d'autant qu'on ne procède pas, généralement, dans nos élevages, à la réalisation des programmes d'alternances (entre les anticoccidiens ionophores/ de synthèses/vaccins anticoccidiens) permettant d'éviter ou de ralentir les phénomènes de chimiorésistance. La plupart des unités de fabrication de l'aliment de volailles utilisent uniquement le programme continu ; d'où une seule molécule anticoccidienne utilisée dans de nombreux élevages avicoles au sol (poulet de chair, reproductrice, poulette future pondeuse, poulette future reproductrice, dinde de chair) pendant de nombreuses années, favorisant le développement de souches d'*Eimeria* spp du poulet résistant aux anticoccidiens utilisés.

Le narasin développe, également, une résistance en dépit de son utilisation limitée dans le terrain Algérien ; ceci incline à penser à une résistance croisée avec le monensin. La résistance croisée entre le monensin, le narasin, le lasalocide et la salinomycine a été rapportée par plusieurs auteurs (**Chapman, 1986; Stallbaumer et Daisy, 1988; Chapman et Shirley, 1989; Zhu et McDougald, 1992; Chapman et Hacker, 1994; Peeters et al., 1994; Stephen et al., 1997; Dauschies et al., 1998; Witcombe et Smith, 2014**), elle peut être liée au même mode d'action ciblé par les ionophores (**Chapman, 1989**), sachant que ces molécules agissent en capturant les cations des coccidies, notamment, le sodium, le potassium

et le calcium pour former des complexes liposolubles, capables de traverser les membranes lipidiques et de les transporter hors de la cellule du parasite, entraînant une fuite des cations (surtout le sodium et le potassium). Les perturbations osmotiques engendrées par les ionophores se traduisent par une augmentation du volume du parasite et sa déformation (**Jeffers, 1989**).

Le problème de la résistance croisée aux ionophores reste un sujet de controverse : La similarité des propriétés pharmacologiques et des modes d'actions entre les anticoccidiens de cette famille, sont les points sur lesquels se fondent les auteurs soutenant la présomption de l'existence d'une résistance croisée entre tous les ionophores, en rapportant que si une souche d'*Eimeria* spp développe une résistance vis-à-vis d'un ionophore elle révèle, également, une multi-résistance croisée à tous les anticoccidiens de cette famille (**Jeffers et Bentley, 1980 ; Jeffers, 1984 ; Ruff et al., 1985 ; Chapman, 1986**). En revanche, d'autres chercheurs ont fait valoir que les souches résistant aux ionophores monovalents (captant un seul cation, tel que le monensin le narasin, et la salinomycine) ont été très bien contrôlées par les ionophores bivalents (captant 2 cations, tels que le lasalocide) (**Weppelman et al., 1977 ; McDougald, 1981 ; Bedrník, 1983 ; Bedrník et al., 1989**).

Dans cette étude la valeur de l'Index anticoccidien du lot lasalocide (ACI =148.6) ainsi que la réduction des scores lésionnels par rapport au lot NINT (*E. acevulina* = 33.3, *E. maxima* = 41.5), indiquent une résistance partielle des *Eimeria* spp de notre inoculum à l'encontre du lasalocide. En revanche, il a été observé une sensibilité de l'inoculum vis-à-vis de la salinomycine et ce, sur la foi de l'Index anticoccidien (ACI =160.8) et la réduction des scores lésionnels par rapport au lot NINT (*E. acevulina* = 40.3, *E. maxima* = 40.0).

Dans cette optique, la résistance croisée aux ionophores n'est pas bien démarquée entre la salinomycine et les 3 autres ionophores testés (lasalocide, monensin, narasin), phénomène probablement lié à la rare utilisation de cette molécule dans les élevages de poulet de chair à Jijel ce qui incline à penser à la réflexion de **Jeffers (1989)** : *La résistance aux ionophores apparaît lentement et de façon inconstante, probablement grâce à leur mode d'action très particulier.*

**Stephan et al. (1997)**, ont précisé que l'étude de la résistance anticoccidienne des oocystes d'*Eimeria*, prélevés à partir des litières, doit tenir en compte de la diversité des souches

d'*Eimeria* existant dans la population prélevée ; il est probable que des sous-populations d'*Eimeria* spp existant dans l'isolat prélevé, soient sensibles à un seule ionophore (salinomycine : C'est, éventuellement, le cas de notre pool d'isolat) (**Zhu et McDougald, 1992 ; Stephen et al., 1997**).

Dans le même contexte, **McDougald et al. (1986)** ont prouvé que la salinomycine avait laissé apparaître une très grande efficacité sur des isolats d'*E. acervulina* moins sensibles aux autres ionophores et ainsi, ils ont supposé que la résistance croisée n'était pas complète dans ce cas. Dans tous les cas, **Jeffers (1989)**, a conclu que la résistance croisée est un phénomène très difficile à étudier, en sorte qu'elle demeure une question importante à démêler, notamment, si on veut alterner un anticoccidien à un autre (programmes de rotation ou Shuttle program).

En tenant compte des deux profils retenus dans l'étude et des paramètres zootechniques enregistrés, le diclazuril s'avère l'anticoccidien le plus efficace, secondé par la salinomycine. L'efficacité du diclazuril dans notre étude est sans doute liée à la rare utilisation de ce produit dans le terrain Algérien, quoiqu'il soit démontré, également, sa très grande efficacité dans des études antérieures, notamment, celles de **Peeters et al. (1994)** et **Peek (2010)**. Toutefois, ce même produit n'a pu prévenir l'apparition des lésions intestinales et l'excrétion oocystale ; probablement, imputable au stade d'action tardif de cet anticoccidien au cours du cycle évolutif. Verheyen et al. (1989) ont confirmé que le diclazuril affecte, principalement, la phase sexuée du cycle évolutif des *Eimeria* spp donnant, ainsi, naissance à des oocystes déformés, caractérisés par des nécroses au niveau du zygote, paroi oocystale épaisse et incomplète.

En accord avec les observations faites par **Vertommen et Peek (1989)**, il peut être établi qu'il n'existe pas de résistance croisée (dans notre étude) entre le diclazuril et les produits ionophores.

En dépit de très nombreuses publications qui attestent de la résistance et de la perte de sensibilité des coccidies vis-à-vis des polyéthers ionophores, ceux-ci restent relativement efficaces et utilisés de façon prédominante en Algérie tout comme dans de nombreux pays à travers le monde entier (**Jeffers, 1989**). **Jeffers (1989)**, souligne que la résistance à cette famille d'anticoccidiens est instable en l'absence d'une exposition continue. Ainsi, le retrait d'une molécule ionophore et l'utilisation d'autres anticoccidiens de synthèses, peuvent

conduire à la restauration de l'efficacité de la molécule ionophore. Jenkins (Données non publiées), affirme que les programmes prophylactiques de rotation entre les ionophores et les anticoccidiens de synthèses (Diclazuril, nicarbizin, etc.) permettent de surmonter le problème de résistance aux ionophores.

**Jeffers et Bentley (1980)** soutiennent que la résistance au monensin, d'une souche sélectionnée de la coccidie de dinde *E. meleagrimitis*, est stabilisée après un arrêt de traitement (par le monensin) pendant 10 générations successives. **Chapman (1984b)**, rapporte que la sensibilité au monensin, d'une souche sélectionnée d'*E. tenella* est restaurée après 5 passages en l'absence de cet anticoccidien. Pour mieux comprendre le phénomène de la stabilité de résistance des *Eimeria* spp vis-à-vis des ionophores, **Jeffers (1989)**, préconise aux chercheurs de travailler plus profondément sur la sensibilité des souches parentales des *Eimeria* spp à cette famille d'anticoccidien.

### Chapitre 3

#### *Immunisation des poulets élevés au sol par deux différents types de vaccins d'*Eimeria tenella**

La coccidiose du poulet demeure l'infection parasitaire la plus préoccupante dans les élevages de poulet au sol (poulet de chair, reproductrice, poulette démarrée, etc.) et ce, à travers le monde entier. Elle cause annuellement de grosses pertes économiques liées :

- Aux coûts de la chimio-prophylaxie instaurée.
- Aux coûts des traitements curatifs, prescrits par les vétérinaires et administrés, particulièrement, dans l'eau de boisson.
- A la mortalité, la morbidité et la baisse des performances zootechniques (**Williams, 1998 ; Williams et al., 1999**).

*Eimeria tenella* est l'espèce coccidienne la plus redoutable chez le poulet, elle se développe et se multiplie dans l'épithélium caecal, causant la coccidiose caecale, réputée comme étant la plus néfaste des coccidioses chez cette espèce animale (**Vervelde et al., 1995 ; Shirley, 2000 ; Yun et al., 2000**).

La chimio-prophylaxie anticoccidienne réalisée en administrant des additifs dans l'aliment du poulet, a pu contrôler la coccidiose, pendant des décennies. Toutefois, l'émergence de souches résistantes vis-à-vis des anticoccidiens, ainsi que la préoccupation ascendante du consommateur vis-à-vis des risques liés aux problèmes des résidus médicamenteux dans les denrées alimentaires d'origines animales, attestent que la vaccination anticoccidienne est une solution attractive et salubre pour contrôler cette parasitose.

Actuellement, plusieurs vaccins anticoccidiens sont commercialisés à travers le monde (**Danforth, 1998 ; Crouch et al., 2003**) ; en Algérie, par exemple, des vaccins comme PARACOX<sup>TM</sup>-5 et PARACOX<sup>TM</sup>-8 du laboratoire MSD, HIPRACOX<sup>TM</sup> du laboratoire HIPRA, ont été introduits sur le marché, dans le but de vacciner nos cheptels avicoles :

- Le PARACOX<sup>TM</sup>-5, vaccin vivant atténué, contient des oocystes sporulés dérivés de 5 lignées atténuées précoces d'*Eimeria* spp du poulet : *Eimeria acervulina* HP, *Eimeria maxima* CP, *Eimeria maxima* MFP, *Eimeria mitis* HP, *Eimeria tenella* HP. Ce vaccin est destiné à immuniser activement le poulet de chair vis-à-vis des coccidioses, causées par les espèces d'*Eimeria* spp suscitées.

- Le PARACOX™-8 est un vaccin vivant atténué renfermant des oocystes sporulés dérivés de 8 lignées atténuées précoces d'*Eimeria* spp du poulet : *Eimeria acervulina* HP, *Eimeria brunetti* HP, *Eimeria maxima* CP, *Eimeria maxima* MFP, *Eimeria mitis* HP, *Eimeria necatrix* HP, *Eimeria praecox* HP, *Eimeria tenella* HP. Ce produit est destiné à la vaccination des cheptels de la poulette future reproductrice, des reproducteurs et de la poulette future pondeuse.
- HIPRACOX™ est un vaccin vivant atténué, destiné à immuniser activement les cheptels de poulet de chair. Il renferme des oocystes sporulés dérivés de 5 lignées atténuées précoces d'*Eimeria* spp du poulet : *Eimeria acervulina* 003, *Eimeria maxima* 013, *Eimeria mitis* 006, *Eimeria praecox* 007, *Eimeria tenella* 004.

Quoiqu'ils s'avèrent relativement efficaces, quant à la prévention de la maladie, les vaccins suscités demeurent chers, par rapport à notre contexte socio-économique. Les problèmes des vaccins anticoccidiens importés de laboratoires étrangers, ne résident pas uniquement, dans leur prix onéreux. Selon plusieurs auteurs, notamment, **Fitz-Coy (1992)** et **Martin et al. (1997)**, les vaccins commercialisés, notamment, les vaccins vivants (virulents et atténués) ne demeurent pas sans risque puisqu'introduisant des souches d'*Eimeria* spp non désirées et anti-géniquement différentes par rapport aux souches coccidiennes de l'environnement concerné.

Les problèmes de l'existence de l'immunité croisée entre des souches d'*Eimeria* spp de la même espèce, restent toujours un sujet de controverse, à l'approche contraignante sur laquelle est basée la vaccination anticoccidienne. **Smith et al. (2002)**, confirment ce problème chez l'espèce *Eimeria maxima*. Celle-ci, la plus immunogène parmi les 7 espèces d'*Eimeria* spp du poulet (une faible dose oocystale d'*Eimeria maxima* en primo-infection procure une immunité très solide à l'encontre d'une infection homologue subséquente) est caractérisée, par une très grande diversité de populations, anti-géniquement différentes, ne pouvant assurer une immunité croisée complète.

L'immunisation par des vaccins élaborés à partir de souches locales d'*Eimeria* spp s'avère d'une efficacité égale à celle induite par les vaccins commercialisés (**Hashmi et al., 1994**). En outre, les contraintes liées à l'introduction dans le territoire Algérien, des souches d'*Eimeria* spp anti-géniquement différentes et à l'immunité croisée incomplète, peuvent être, éventuellement, évitées par l'utilisation de souches locales.

Plusieurs types de tests sont recommandés pour évaluer l'efficacité et l'innocuité d'un vaccin anticoccidien :

- L'épreuve réalisée sur batterie ou battery trial.
- L'épreuve réalisée au sol ou floor-pens trial.
- L'épreuve effectuée sous les conditions de terrain ou field trial (**Bedrnik et al., 1995**).

La présente étude est consacrée à l'élaboration de deux types de vaccins de l'espèce *Eimeria tenella*, le premier est inactivé (par les radiations microondes), le deuxième étant vivant atténué (par les rayons Ultraviolets-C). L'efficacité et l'innocuité des deux vaccins ont été testées séparément, sur deux élevages expérimentaux de poulets de chair élevés au sol (floor-pens trial). Les sujets vaccinés ont fait l'objet d'inoculation par la suite par une dose de l'ordre de 50000 oocystes sporulés d'*Eimeria tenella*/sujet.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Conception des élevages expérimentaux

Il a été procédé à l'évaluation de l'efficacité de deux types de vaccins anticoccidiens (vivant atténué, inactivé) préparés à partir de souches de terrain Algérien de l'espèce *E. tenella*. Pour ce faire, il a été réalisé un floor-pen trial (expérimentation effectuée sur des poulets au sol) séparément, pour chaque type de vaccin.

Les caractéristiques des deux élevages expérimentaux réalisés, sont mentionnées dans le tableau ci-après :

**Tableau 1. Conception des élevages expérimentaux (Long et Millard, 1977 ; Bedrnik et al., 1995 ; Chapman et Rayavarapu, 2007).**

	Expérimentation 1 Elevage 1	Expérimentation 2 Elevage 2
Souche	Cobb 500	Cobb 500
Taille (Poussins)	240	240
Type d'élevage	Au sol	Au sol
Densité (Sujet/ m <sup>2</sup> ) à la fin de l'expérimentation	18-20	18-20
Litière	Copeaux de bois	Copeaux de bois
Température	32-33°C au démarrage 25-30°C à la fin de l'expérimentation	32-33°C au démarrage 25-30°C à la fin de l'expérimentation
Alimentation	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>
Eclairage	24 heures / 24 heures (Lampes incandescentes)	24 heures /24 heures (Lampes incandescentes)

Les poussins des deux expérimentations, reçoivent *ad libitum*, le même aliment démarrage sans anticoccidiens et ce, pendant toute la durée d'élevage (Tableau 2).

**Tableau 2. Composition de l'aliment utilisé.**

Ingrédients	Proportion (%)
Maïs	61.75
Tourteaux de soja	35
Carbonate de calcium	0.7
Phosphate bicalcique	1
NaCl	0.025
Bicarbonate de sodium	0.025
C.M.V (sans anticoccidiens <sup>*</sup> )	1.5

C.M.V: Complément Minéral Vitaminé.

Il est à faire remarquer qu'il a été confirmé l'absence de coccidies chez les poussins mis en place par la recherche de parasites, en moyen de la technique de flottation et ce, dans 5 à 10 g de fientes prélevées de chaque lot, au cours des journées suivantes : 1<sup>ier</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> jours d'âge.

### 1.2. Vaccins anticoccidiens (*E. tenella*) élaborés et testés dans l'étude

Le tableau ci-après mentionne les deux types de vaccins anticoccidiens préparés et testés dans chacune des expérimentations :

**Tableau 3. Vaccins anticoccidiens (*E. tenella*) élaborés et testés.**

	Identifiant	Vaccin utilisé
Expérimentation 1	M	Vaccin inactivé : Application des doses relativement élevées d'oocystes de l'espèce coccidienne <i>E. tenella</i> , inactivées par le chauffage à micro-ondes et ce, par l'utilisation du four micro-onde (Electrolux EMM 21150W) à la puissance 800 W pendant 90 s (82.5 à 85°C) (Bouchet et Boulard, 1991 ; Ortega et Liao, 2006).
Expérimentation 2	A	Vaccin vivant atténué : Administration des oocystes d' <i>E. tenella</i> vivants, atténués par les rayonnements Ultraviolets (160 mW/cm <sup>2</sup> , 254 nm ; 60 min), par l'utilisation d'une lampe UV (TUV T8 : TUV 30W G30T8, Philips, Holland) (Kniel et al., 2007 ; Abdel-Baki et al., 2009 ; Jenkins, données non publiées).

### 1.3. Identification des élevages et des lots

A leur mise en place (élevage au sol), les poussins (240 sujets/ expérimentation) des deux élevages expérimentaux, sont divisés en 4 lots. Chaque lot comporte 60 poussins répartis sur 3 répétitions de 20 sujets (Jenkins et al., 1991 ; Bedrnik et al., 1995 ; Chapman et Rayavarapu, 2007).

Il importe de souligner que les deux expérimentations sont réalisées séparément (Tableau 4).

**Tableau 4. Identification des élevages et des lots (Jenkins et al., 1991 ; Bedrnik et al., 1995 ; Chapman et Rayavarapu, 2007).**

Expérimentations	Elevages expérimentaux	Vaccin utilisé	Traitements de chaque lot	Identifiants des lots
Expérimentation 1 (M) Immunisation via un vaccin inactivé (mort) par les radiations micro-ondes.	Elevage 1	Vaccin inactivé	Immunisé: 1 fois	M <sub>1</sub>
			Inoculé	
			Immunisé: 2 fois	M <sub>2</sub>
			Inoculé	
			Non-Immunisé	M <sub>i</sub>
Expérimentation 2 (A) Immunisation via un vaccin vivant atténué par les rayons Ultraviolets C.	Elevage 2	Vaccin vivant atténué	Inoculé	
			Immunisé: 1 fois	A <sub>1</sub>
			Inoculé	
			Immunisé: 2 fois	A <sub>2</sub>
			Inoculé	
		Non-Immunisé	A <sub>i</sub>	
		Inoculé		
		Non-Immunisé	A <sub>0</sub>	
		Non-Inoculé		

## 1.4. Description des vaccins et des inocula

### 1.4.1. Origine des isolats

Les vaccins et les inocula utilisés dans les deux élevages expérimentaux, sont élaborés à partir de deux isolats d'*E. tenella* (chaque isolat correspond à un élevage expérimental), extraits des caeca de poulets atteints de la coccidiose caecale et prélevés sur des élevages de poulet de chair, subissant des épisodes cliniques de la coccidiose à *E. tenella*. La méthode utilisée pour purifier les oocystes de l'espèce *E. tenella* à partir des caeca est décrite par Shirley (1995).

Les caractéristiques des élevages sur lesquels sont prélevés les isolats, sont mentionnés dans le tableau ci-après :

**Tableau 5. Récapitulatif des caractéristiques des élevages d'origine des isolats.**

Expérimentations	Origine des Isolats (Vaccins et inocula)	Emplacement	Taille (Sujet)	Observation
M	Elevage de poulet de chair.	Kaous/ Wilaya de Jijel.	2500	Episode clinique de coccidiose caecale à 35 jours d'âge : Diarrhée sanguinolente, abattement, mortalité (3.2 % en 2 jours). L'épisode est stoppé par le Tolrazuril, 2 jours après le début des symptômes.
A	Elevage de poulet de chair.	Emir Abdelkader/ Wilaya de Jijel.	3600	Episode clinique de coccidiose caecale à 40 jours d'âge : Diarrhée sanguinolente, abattement, mortalité (3 % en 36 heures). L'épisode clinique est stoppé par le Tolrazuril, 36 heures après le début des symptômes.

Les caeca sont prélevés sur des sujets malades sacrifiés ou fraîchement morts. Il faut signaler que l'extraction des oocystes a été réalisée sur un nombre de paires de caeca de l'ordre de 35 et 28 respectivement dans les expérimentations M et A.

#### 1.4.2. Sporulation et stockage d'oocystes

Les prélèvements réalisés sont transférés au laboratoire ; après quoi les oocystes non sporulés sont séparés de la matière fécale. Après le rinçage avec de l'eau distillée, les oocystes non sporulés sont remis dans une solution de dichromate de potassium à 2.5%. La suspension oocystale est incubée à une température de l'ordre de 28-30°C pendant 48 heures, dans des conditions d'aération forcée, assurée par une pompe à air pour aquarium (afin d'assurer un apport suffisant d'oxygène).

Il importe de souligner que la sporulation doit se réaliser en mettant la suspension en couche mince (en évitant une grande profondeur) dans le récipient pour assurer un bon apport en oxygène.

A l'issue de l'incubation des oocystes, le taux de sporulation est vérifié par le décompte des oocystes sporulés, en procédant à plusieurs lectures aux grossissements 10 (100x) et 40 (400x). Il importe de noter, également, qu'un bon inoculum, doit posséder un taux de sporulation supérieur à 80% (**Shirley, 1995**).

Avant le stockage des oocystes sporulés, il est procédé à plusieurs décomptes de parasites par la technique de McMaster Modifiée (**Taylor et al., 1995**), tout en réalisant des dilutions répétées par le dichromate de potassium entre chaque comptage, permettant, ainsi, d'obtenir la concentration oocystale recherchée (**Shirley, 1995**).

Les oocystes sporulés sont conservés dans la solution de dichromate de potassium à 2.5%, à une température de réfrigération de l'ordre de 4°C et ce, jusqu'au jour d'utilisation (environ 1 mois) (**Shirley, 1995**).

#### 1.4.3. Identification de l'espèce *E. tenella* dans les isolats

Les identifications de l'espèce *E. tenella*, dans les isolats élaborés pour les deux expérimentations, sont réalisées par la technique de biologie moléculaire ITS1-PCR et ce, dans les laboratoires de biologie moléculaire de « School of Environment and life Sciences, University of Salford- UK ».

Il faut signaler qu'il a été confirmé l'absence de 6 autres espèces d'*Eimeria* spp du poulet (*E. acevulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. preacox*) dans les deux isolats suscités et ce, par l'utilisation de la même technique (ITS1-PCR).

#### 1.4.4. Rendement oocystal

Le nombre d'oocystes moyen, par gramme de fèces, obtenu dans chaque expérimentation, est énoncé dans le tableau ci-après :

**Tableau 6. Rendement oocystal.**

Expérimentations	Nombre de paires de caecums prélevés	Poids moyen par paire de caecum (g) <sup>*</sup>	O.P.G
M	35	16	120 000
A	28	15.9	98 400

<sup>\*</sup>: Le poids du contenu des caeca est inclus dans la valeur du poids moyen par paire de caecum / O.P.G : Oocystes par gramme de fèces.

#### 1.4.5. Doses oocystales vaccinales et infectantes

Avant l'élaboration des vaccins et des inocula, les oocystes sporulés sont suspendus dans la solution phosphate-buffered saline (PBS ; pH= 7.2), après élimination du dichromate de potassium par 5 lavages répétés dans la solution PBS.

Les doses oocystales vaccinales et infectantes, sont obtenues par des dilutions répétées (dans de la solution PBS), après réalisation des enrichissements par sédimentation. L'ajustement des doses requises est effectué par des comptages du parasite par la technique de McMaster modifiée, autant de fois qu'il est nécessaire (**Taylor et al., 1995**).

Les doses vaccinales et d'inoculations, choisies dans chaque expérimentation, sont mentionnées dans le tableau ci-après :

**Tableau 7. Doses vaccinales et d'inoculations (Bajwa et Gill, 1975 ; Long et Millard, 1977 ; Jenkins et al., 1991 ; Li et al., 2005).**

Expérimentation	Lot	Identifiant des lots	Dose oocystale vaccinale (Oocystes/sujet)	Challenge
M	Immunisé: 1 fois Inoculé	M <sub>1</sub>	50 000 oocystes/2ml de solution PBS/sujet, au 1 <sup>ier</sup> jour d'âge (18 heures après l'éclosion).	50 000 oocystes/2mL de solution PBS/sujet, au 20 <sup>ème</sup> jour d'âge.
	Immunisé: 2 fois Inoculé	M <sub>2</sub>	50 000 oocystes/2ml de solution PBS/sujet, au 1 <sup>ier</sup> jour d'âge (18 heures après l'éclosion). 50 000 oocystes/2ml de solution PBS/sujet, au 8 <sup>ème</sup> jour d'âge.	50 000 oocystes/2mL de solution PBS/sujet, au 20 <sup>ème</sup> jour d'âge.
	Non Immunisé Inoculé	M <sub>i</sub>	-	50 000 oocystes/2mL de solution PBS/sujet, au 20 <sup>ème</sup> jour d'âge.
	Non Immunisé Non Inoculé	M <sub>0</sub>	-	-
A	Immunisé: 1 fois Inoculé	A <sub>1</sub>	5000 oocystes /ml de solution PBS/sujet, au 1 <sup>ier</sup> jour d'âge (18 heures après l'éclosion).	50 000 oocystes/2mL de solution PBS/sujet, au 20 <sup>ème</sup> jour d'âge.
	Immunisé: 2 fois Inoculé	A <sub>2</sub>	5000 oocystes /ml de solution PBS/sujet, au 1 <sup>ier</sup> jour d'âge (18 heures après l'éclosion). 5000 oocystes/ml de solution PBS/sujet, au 8 <sup>ème</sup> jour d'âge.	50 000 oocystes/2mL de solution PBS/sujet, au 20 <sup>ème</sup> jour d'âge.
	Non Immunisé Inoculé	A <sub>i</sub>	-	50 000 oocystes/2mL de solution PBS/sujet, au 20 <sup>ème</sup> jour d'âge.
	Non Immunisé Non Inoculé	A <sub>0</sub>	-	-

L'administration des doses vaccinales et infectantes est faite par gavage, à l'aide de seringues reliées aux sondes urétrales pour chats (Buster Cat Catheter ; sterile, 1.0 x 130mm, Chine).

### 1.5. Paramètres d'évaluation de l'efficacité et de l'innocuité des vaccins élaborés

Dans le but d'évaluer l'efficacité et l'innocuité des deux vaccins élaborés, il est recueilli les paramètres suivants, dans les deux expérimentations (**Bedrnik et al., 1995**).

#### 1.5.1. Poids moyen et gain de poids

Des pesées individuelles sont réalisées, le 1<sup>ier</sup> jour d'âge ; le jour de l'inoculation (20<sup>ème</sup> jour d'âge) ; et les jours suivants : 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 8<sup>ème</sup> jour post-challenge (22<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup>, 26<sup>ème</sup>, 28<sup>ème</sup> jour d'âge) ; après quoi, il est procédé au calcul des gains de poids de chaque lot.

Il est à noter que les pesées sont effectuées sur tous les poussins (y compris les sujets morts) des 4 lots, à l'aide d'une balance électronique.

### 1.5.2. Indice de consommation

Il est calculé les indices de consommations dans chaque lot durant les jours suivants : 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jours post-challenge.

### 1.5.3. Excrétion oocystale

Il est procédé au décompte des oocystes par gramme de fiente (OPG), sur les 4 lots, par la méthode quantitative de McMaster modifiée (**Taylor et al., 1995**), la technique étant réalisée sur 4 prélèvements matinaux/répétition/jour, durant les intervalles de temps suivants :

- Du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour d'âge.
- Du 12<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour d'âge.
- Du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge (25<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour d'âge) (**Bajwa et Gill, 1975**).

### 1.5.4. Score fécal caecal

Les tâches de sang dans les fientes, ainsi que les diarrhées sanguinolentes sont recherchées dans tous les lots, dans le but d'évaluer le score fécal caecal établi par **Williams (1997)** :

- (-) : Absence de fientes sanguinolentes.
- (±) : ≤ 1 fiente sanguinolente par poussin.
- (+) : > 1 ≤ 2 fientes sanguinolentes par poussin.
- (++) : > 2 fientes sanguinolentes par poussin.

Le score fécal caecal est évalué dans les intervalles de temps suivants :

- Du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour d'âge.
- Du 12<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour d'âge.
- Du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge (25<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour d'âge) (**Bajwa et Gill, 1975**).

### 1.5.5. Score lésionnel

Il a été procédé, aux cours des deux expérimentations et dans l'ensemble des lots, à la finalisation du score lésionnel (Tableau 8) correspondant à l'espèce *E. tenella*, dont le barème établi par de **Johnson et Reid (1970)**, est donné ci-après :

- *E. tenella*

Agent causal de la coccidiose caecale envahissant les 2 caeca ; lors des infections lourdes, les lésions peuvent s'étendre au-dessus et au-dessous du sphincter iléo-caeco-colonique.

**Score 0** : Pas de lésions macroscopiques.

**Score +1** : Un nombre très restreint de pétéchies dispersées sur la paroi caecale. Cette dernière est non épaissie, le contenu caecal est normal.

**Score +2** : Un nombre plus important de pétéchies, est observé sur la paroi caecale légèrement épaissie, avec présence de sang visible dans le contenu des caeca. Toutefois, l'aspect de leur contenu reste normal.

**Score +3** : Une quantité importante de sang ou de caillots caecaux sont présents dans la lumière des caeca. La paroi caecale est très épaissie. Absence, ou présence d'une légère quantité de contenu fécal caecal.

**Score +4** : Les caeca sont fortement distendus avec présence de sang ou de gros caillots caséux. Les débris fécaux sont rarissimes ou mêlés aux caillots. Le score manifesté par les oiseaux morts est généralement de l'ordre de +4.

Il est à noter que les scores lésionnels sont réalisés sur des animaux sacrifiés par saignée.

**Tableau 8. Réalisation des scores lésionnels dans les deux expérimentations.**

Expérimentation	Lot	Après l'immunisation	Après l'inoculation (5 <sup>ème</sup> jour post-challenge)
1 (M)	M <sub>1</sub>	Score lésionnel au 5 <sup>ème</sup> jour d'âge ; réalisé sur 5 sujets/ répétition.	Score lésionnel au 25 <sup>ème</sup> jour d'âge ; réalisé sur 5 sujets/répétition.
	M <sub>2</sub>		
	M <sub>i</sub>		
	M <sub>0</sub>		
2 (A)	A <sub>1</sub>	Score lésionnel au 12 <sup>ème</sup> jour d'âge ; réalisé sur 5 sujets/ répétition.	
	A <sub>2</sub>		
	A <sub>i</sub>		
	A <sub>0</sub>		

- **Raclage de la muqueuse**

Pour confirmer l'attribution des lésions coccidiennes observées, lors des nécropsies, à la coccidiose caecale, il a été procédé, dans les deux expérimentations, aux raclages des muqueuses caecales inspectées à l'aide des lames de bistouri stériles. Les produits de raclages sont ensuite étalés entre lames et lamelles, après quoi elles sont observées au microscope optique, aux grossissements 10 (100x) et 40 (400x), en vue de rechercher des oocystes non sporulés et/ou des schizontes et/ou des gamétocytes.

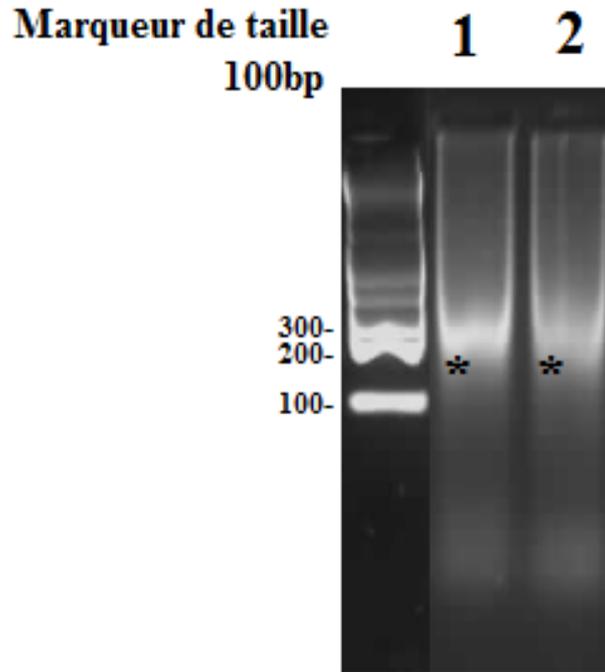
A partir des produits de raclages caecaux réalisés sur les sujets autopsiés, il est élaboré 2 pools purifiés d'oocystes non sporulés (1 pool d'oocystes pour chaque expérimentation) dans la solution de dichromate de potassium à 2.5% ; suite à quoi il est procédé à la mise à sporulation des oocystes.

L'extraction et la purification de l'ADN génomique du parasite, présent dans les pools oocystaux suscités, sont réalisées par la technique Phénol/Chloroforme selon le protocole décrit par **Duncanson et al. (2001)**, **Bajnok et al. (2015)** et **Dodd et al. (2014)**.

A noter que la technique d'extraction de l'ADN parasitaire est effectuée dans le laboratoire « Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Mentouri de Constantine-Algérie ».

L'ADN purifié est transféré, dans des tubes de 1.5mL, à l'Université de Salford au Royaume-Uni, dans le but d'identifier l'espèce *E. tenella* dans les 2 pools élaborés. L'identification est réalisée par la technique ITS1-PCR (**Jenkins et al., 2006a ; Jenkins et al., 2006b**), dans les laboratoires de biologie moléculaire de « School of Environment and life Sciences, University of Salford- UK ».

Il faut signaler que la seule espèce identifiée dans les produits de raclages est celle présente dans les inocula (Figure 1) et les vaccins : *E. tenella*.



**Figure 1. Détermination, par la technique ITS1-PCR, des espèces présentes dans les inocula utilisés dans l'étude.** \*: Bande correspondant à l'espèce *E. tenella* (Taille du fragment d'ADN amplifié = 271 nt). 1: Inoculum utilisé dans la 1<sup>ière</sup> expérimentation. 2: Inoculum utilisé dans la 2<sup>ième</sup> expérimentation. 100-bp DNA markers (HyperLadder™100bp, Bioline, UK).

#### 1.5.6. Taux de Mortalité

Du 20<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour d'âge (1<sup>ier</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge), le taux de mortalité a été enregistré dans chacun des 4 lots des deux expérimentations réalisées. Les sujets morts ont été pesés et autopsiés afin de déceler d'éventuelles lésions coccidiennes.

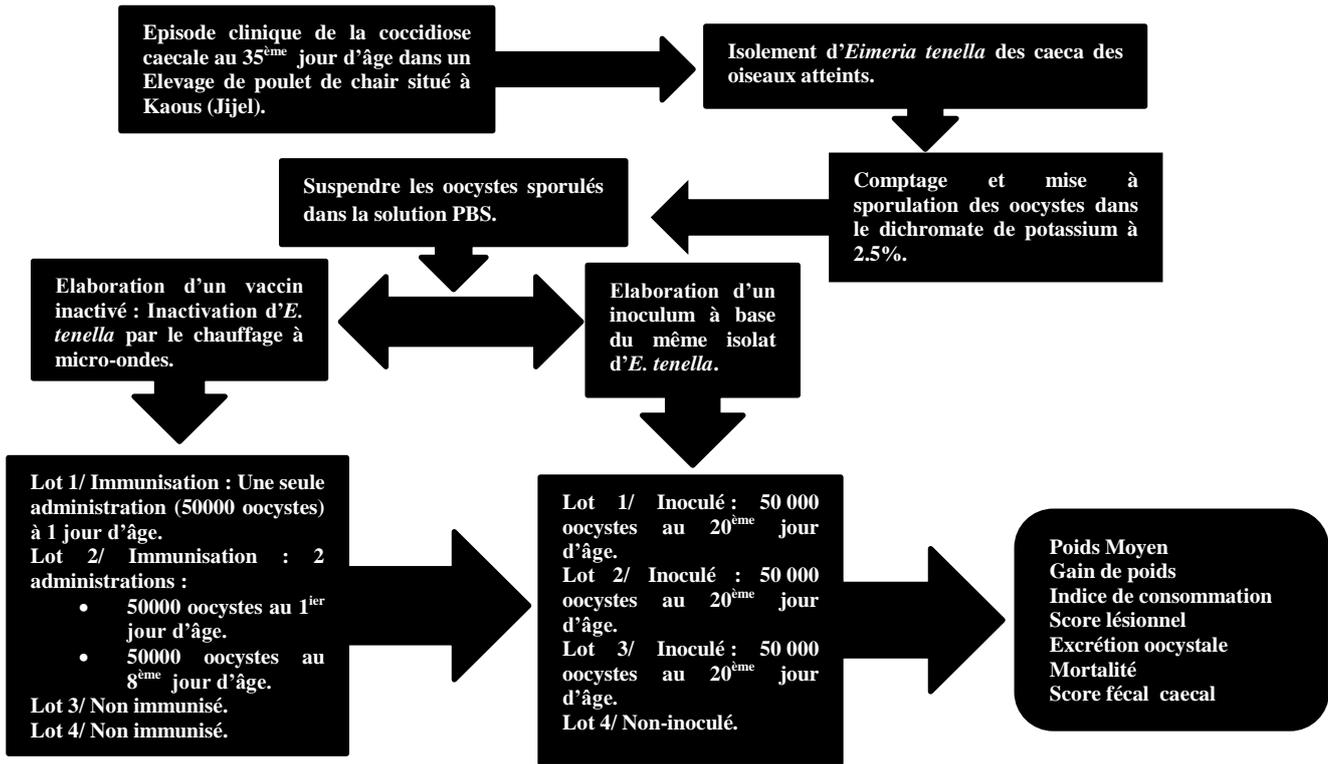


Figure 2. Schéma de l'expérimentation 1 (M).

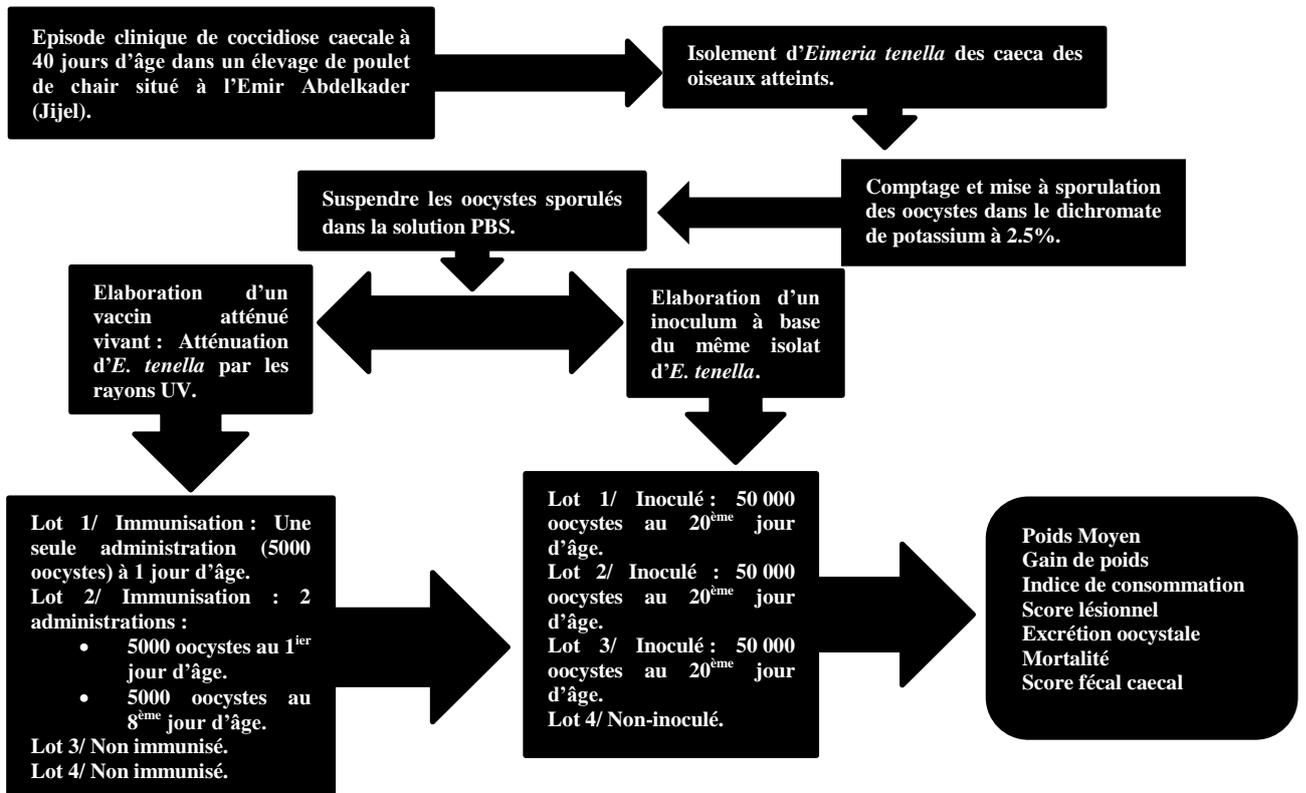


Figure 3. Schéma de l'expérimentation 2 (A).

## 1.6. Analyse statistique

Toutes les données ont été saisies dans une base informatique classique (Microsoft Excel 2010, USA), après quoi la vérification et le traitement statistique ont été effectués à l'aide du logiciel SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences) par l'utilisation du modèle analyse de variance (ANOVA), avec un seuil de signification de l'ordre de  $p < 0.05\%$ , pour comparer les moyennes des différentes variables étudiées (Poids moyens, gains de poids, indices de consommation, taux de mortalité, indices lésionnels, excréments d'oocystes) entre les 4 lots et ce, dans chaque expérimentation. Le Tukey test a été utilisé afin de déterminer une différence significative entre les moyennes comparées.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Paramètres zootechniques

Les résultats des paramètres zootechniques obtenus dans les deux expérimentations sont énoncés dans le tableau ci-après :

**Tableau 9. Poids moyen, gain de poids et indice de consommation.**

Expérimentation	Lot	Poids Moyen (g)*	Gain de poids (g)**	Indice de consommation**
Expérimentation (M)	M <sub>1</sub>	918.7±5 <sup>b</sup>	316.2±8 <sup>b</sup>	1.41±0.01 <sup>a</sup>
	M <sub>2</sub>	932±7 <sup>b</sup>	331.1±4 <sup>b</sup>	1.39±0.01 <sup>a</sup>
	M <sub>i</sub>	875±9 <sup>b</sup>	275±5 <sup>b</sup>	1.43±0.03 <sup>a</sup>
	M <sub>0</sub>	1093.7±1 <sup>a</sup>	492.1±5 <sup>a</sup>	1.37±0.01 <sup>a</sup>
<i>a, b, c: Les valeurs de la même colonne suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (p &lt; 0,05) et ce, par le Tukey test.</i>				
Expérimentation (A)	A <sub>1</sub>	976.1±8 <sup>b</sup>	377.7±7 <sup>b</sup>	1.40±0.03 <sup>a</sup>
	A <sub>2</sub>	998±6 <sup>b</sup>	399±2 <sup>b</sup>	1.37±0.02 <sup>a</sup>
	A <sub>i</sub>	849.5±7 <sup>c</sup>	250.9±9 <sup>c</sup>	1.42±0.03 <sup>a</sup>
	A <sub>0</sub>	1095.7±8 <sup>a</sup>	498.9±8 <sup>a</sup>	1.36±0.02 <sup>a</sup>
<i>a, b, c: Les valeurs de la même colonne suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (p &lt; 0,05) et ce, par le Tukey test.</i>				

\* : Poids moyens et indice de consommation au 28<sup>ème</sup> jour d'âge. \*\* : Gains de poids du 20<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour d'âge.

#### 2.1.1. Expérimentation 1 (M)

##### 2.1.1.1. Gain de poids et poids moyen

Le poids moyen et le gain de poids enregistrés dans les deux lots immunisés inoculés (Poids Moyen M<sub>2</sub>=932±7g, Gain de poids M<sub>2</sub>=331.1±4g ; Poids Moyen M<sub>1</sub>=918.7±5g, Gain de poids M<sub>1</sub>=316.2±8g) sont significativement inférieurs ( $p < 0.05$ ) à ceux du lot non-immunisé non-inoculé (Poids Moyen M<sub>0</sub>=1093.7±1g, Gain de poids M<sub>0</sub>=492.1±5g). On note une légère amélioration des paramètres zootechniques suscités dans les lots M<sub>1</sub> (Immunisé une seule fois et inoculé), M<sub>2</sub> (Immunisé à deux reprises et inoculé), par rapport à ceux du lot non-immunisé et inoculé (Poids Moyen M<sub>0</sub>=875±9g, Gain de poids M<sub>0</sub>=275±5g), toutefois, sur le plan statistique la différence n'est pas significative ( $p > 0.05$ ) (Tableau 9).

Numériquement, les gains de poids et les poids moyens observés dans le lot immunisé à deux reprises ( $M_2$ ) sont meilleurs que ceux retenus dans le lot immunisé une seule fois ( $M_1$ ) (Tableau 9).

#### 2.1.1.2. Indice de consommation

Numériquement, les indices de consommation du lot non-immunisé non-inoculé ( $IC_{M_0}=1.37\pm 0.01$ ) et du lot immunisé 2 fois inoculé ( $IC_{M_2}=1.39\pm 0.01$ ) sont meilleurs que ceux observés dans les deux lots : immunisé 1 fois inoculé ( $IC_{M_1}=1.41\pm 0.01$ ) et non-immunisé inoculé ( $IC_{M_i}=1.43\pm 0.03$ ) (Tableau 9).

#### 2.1.2. Expérimentation 2 (A)

##### 2.1.2.1. Gain de poids et poids moyen

Le poids moyen et le gain de poids enregistrés dans les lots immunisés inoculés (Poids Moyen  $A_2=998\pm 6g$ , Gain de poids  $A_2=399\pm 2g$  ; Poids moyen  $A_1=976.1\pm 8g$ , Gain de poids  $A_1=377.7\pm 7g$ ) sont statistiquement inférieurs ( $p < 0.05$ ) à ceux du lot non-immunisé non-inoculé (Poids Moyen  $A_0=1095.7\pm 8g$ , Gain de poids  $A_0=498.9\pm 8g$ ), et statistiquement supérieurs ( $p < 0.05$ ) à ceux du lot non-immunisé et inoculé (Poids Moyen  $A_i=849.5\pm 7g$ , Gain de poids  $A_i=250.9\pm 9g$ ) (Tableau 9).

Numériquement, le gain de poids et le poids moyen observés dans le lot immunisé 2 fois inoculé ( $A_2$ ) sont meilleurs que ceux retenus dans le lot immunisé 1 seule fois inoculé ( $A_1$ ) (Tableau 9).

##### 2.1.2.2. Indice de consommation

Numériquement les indices de consommation du lot non-immunisé non-inoculé ( $IC_{A_0}=1.36\pm 0.02$ ) et du lot immunisé 2 fois inoculé ( $IC_{A_2}=1.37\pm 0.02$ ) sont meilleurs que ceux observés dans le lot immunisé 1 fois inoculé ( $IC_{A_1}=1.40\pm 0.03$ ) et le lot non-immunisé et inoculé ( $IC_{A_i}=1.42\pm 0.03$ ) (Tableau 9).

Dans chacune des deux expérimentations, on constate une faible croissance des poulets inoculés par *E. tenella* et non-immunisés, traduite par des gains de poids peu élevés et des indices de consommations détériorés. Statistiquement, les poids moyens, les gains de poids dans les lots non-immunisés inoculés ( $M_i$ ,  $A_i$ ) sont significativement altérés ( $p < 0.05$ ) par rapport à ceux des lots non-immunisés non-inoculés ( $M_0$ ,  $A_0$ ).

L'évaluation de l'efficacité d'un vaccin anticoccidien s'effectue en premier lieu en comparant le taux de croissance entre des poulets vaccinés inoculés et des poulets non vaccinés inoculés ; l'indice de consommation et le score lésionnel sont des paramètres qui viennent en second lieu (**Crouch et al., 2003**). **Crouch et al. (2003)**, attestent que le potentiel du pouvoir pathogène d'un inoculum est confirmé par sa capacité à réduire le gain de poids.

Dans cette étude l'immunisation répétée des poulets par le vaccin vivant atténué d'*E. tenella*, s'avère la plus intéressante (par rapport au vaccin inactivé), particulièrement, en matière d'amélioration des performances zootechniques. Malgré la dose relativement faible du vaccin vivant atténué utilisé (5000 oocystes sporulés d'*E. tenella*/sujet et par prise) et sa faible répétition (au maximum : 2 répétitions), nos résultats corroborent les conclusions obtenues antérieurement par plusieurs auteurs à noter :

- **Maes et al. (1991)**, ont observé de meilleures performances zootechniques sur des lots de poulets inoculés par 200 000 oocystes d'*E. tenella*/sujet et immunisés par des doses répétées (au 4<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 8<sup>ème</sup>, 11<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> jour d'âge) de l'ordre de 2000 oocystes vivants virulents d'*E. tenella*/sujet/jour.
- **Nakai et al. (1992)**, ont noté une amélioration des performances zootechniques des poulets immunisés pendant 13 jours par des doses journalières de l'ordre de 50 oocystes vivants virulents d'*E. tenella*/sujet/jour.

Il est établi que l'évaluation du gain de poids et de l'indice de consommation, durant les 7 jours post-inoculation par une souche virulente d'*Eimeria* spp du poulet, fournit des conclusions évidentes sur le statut immunitaire des oiseaux contre l'espèce coccidienne en cause.

En revanche, l'utilisation de la sévérité des lésions coccidiennes comme étant le critère majeur dans l'évaluation de l'immunité protectrice induite par un vaccin anticoccidien, peut mener à des conclusions incorrectes dues à un manque de corrélation entre les gains de poids et les lésions coccidiennes (**Williams, 1997**). Selon **Norton et al. (1989)**, **Weber (1989)**, **Shirley et Long (1990)** et **Williams (1997)**, l'absence des lésions eimeriennes, suite à une inoculation virulente d'un oiseau vacciné, est un signe de protection vaccinale, tandis que la présence des lésions n'indique pas nécessairement une faible protection et n'implique pas obligatoirement une dépression significative du taux de croissance.

A partir de ces approches fournies par les auteurs suscités, on peut soutenir que les deux vaccins élaborés et testés, ont un effet favorable sur l'amélioration des performances zootechniques, particulièrement, les gains de poids, en d'autres termes, ils procurent une bonne protection contre les doses virulentes d'*E. tenella*, infligées aux oiseaux reflétant ainsi un bon statut immunitaire.

### 2.2. Paramètres lésionnel, parasitologique et clinique

Les résultats des paramètres lésionnel, parasitologique et clinique, obtenus, sont énoncés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 10. Paramètres cliniques et lésionnels.**

		Après immunisation				Après challenge		Mortalité (%) <sup>*****</sup>
		OPG (x 10 <sup>3</sup> ) <sup>*</sup>	OPG (x 10 <sup>3</sup> ) <sup>**</sup>	SL <sup>***</sup>	SL <sup>****</sup>	OPG (x10 <sup>3</sup> ) <sup>*****</sup>	SL <sup>*****</sup>	
Experimentation 1 (M)	M <sub>1</sub>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.3 <sup>a</sup>	1.9± 0.5 <sup>a</sup>	6.6 <sup>b</sup>
	M <sub>2</sub>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>a</sup>	1.4± 0.5 <sup>a</sup>	2.2 <sup>b</sup>
	M <sub>i</sub>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	18.0±0.1 <sup>b</sup>	3.9± 0.2 <sup>b</sup>	63.3 <sup>a</sup>
	M <sub>0</sub>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>b</sup>

*a, b, c: Les valeurs de la même colonne suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (p < 0.05) et ce, par le test de Tukey.*

		Après immunisation				Après challenge		Mortalité (%) <sup>*****</sup>
		OPG (x 10 <sup>3</sup> ) <sup>*</sup>	OPG (x 10 <sup>3</sup> ) <sup>**</sup>	SL <sup>***</sup>	SL <sup>****</sup>	OPG (x10 <sup>3</sup> ) <sup>*****</sup>	SL <sup>*****</sup>	
Experimentation 2 (A)	A <sub>1</sub>	0.6±0.5 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5± 0.1 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.7±0.4 <sup>a</sup>	1.7± 0.2 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>
	A <sub>2</sub>	0.5±0.3 <sup>a</sup>	0.2±0.3 <sup>a</sup>	0.5± 0.4 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>	1.5± 0.1 <sup>a</sup>	2.2 <sup>b</sup>
	A <sub>i</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	13.5±0.5 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	70.0 <sup>a</sup>
	A <sub>0</sub>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.2 <sup>b</sup>

*a, b, c: Les valeurs de la même colonne suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (p < 0.05) et ce, par le test de Tukey.*

OPG : Oocystes par gramme de fientes. \* : Excrétion oocystale calculée du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour d'âge. \*\* : Excrétion oocystale calculée du 12<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour d'âge. \*\*\* : Score lésionnel au 5<sup>ème</sup> jour d'âge (15 sujets/ lot). \*\*\*\* : Score lésionnel au 12<sup>ème</sup> jour d'âge (15 sujets/ lot). \*\*\*\*\* : Excrétion oocystale calculée du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge (25<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour d'âge). \*\*\*\*\* : Score lésionnel au 25<sup>ème</sup> jour d'âge (15 sujets/ lot). \*\*\*\*\* : Mortalité enregistrée après l'inoculation (1<sup>ère</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge).

**Tableau 11. Score fécal caecal réalisé avant l'inoculation.**

Jour d'âge		Score fécal caecal									
		5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
Experimentation 1 (M)	M <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M <sub>i</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Experimentation 2 (A)	A <sub>1</sub>	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	A <sub>2</sub>	±	±	±	±	-	±	±	±	-	-
	A <sub>i</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tableau 12. Score fécal caecal après inoculation.**

Jour post-inoculation		Score fécal caecal			
		5	6	7	8
Experimentation 1 (M)	M <sub>1</sub>	+	+	+	-
	M <sub>2</sub>	+	±	±	-
	M <sub>i</sub>	++	++	++	++
	M <sub>0</sub>	-	-	-	-
Experimentation 2 (A)	A <sub>1</sub>	+	+	+	-
	A <sub>2</sub>	±	±	±	-
	A <sub>i</sub>	+	++	++	++
	A <sub>0</sub>	-	-	-	-

### 2.2.1. Expérimentation 1 (M)

#### 2.2.1.1. *Après immunisation*

On constate une absence totale de l'excrétion oocystale, des lésions coccidiennes caecales et des scores fécaux caecaux dans les lots immunisés par le vaccin anticoccidien inactivé (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) (Tableaux 10, 11) et ce, après l'administration du vaccin. Ceci incline à penser à une inactivation totale des coccidies présentes dans le vaccin administré au cours de la première expérimentation, sous l'effet du traitement physique (micro-ondes) visant à tuer le parasite.

Le traitement physique par chauffage à micro-ondes (800 W pendant 90 secondes ; 82.5 à 85°C) a inactivé les oocystes sporulés de l'espèce *E. tenella* présentes dans le vaccin élaboré. Les radiations micro-ondes et la haute température générée, s'avèrent, très efficaces pour inactiver les microorganismes pathogènes, notamment, les coccidies et les spores, en particulier, celles des *Bacillus subtilis*, qui tolèrent des conditions environnementales difficiles ou extrêmes (Celandroni et al., 2004). D'ailleurs, le chauffage micro-ondes est considéré comme étant un éco-procédé en industrie agroalimentaire (pasteurisation et stérilisation), appliqué aux fruits, aux légumes et aux liquides alimentaires, notamment, pour la pasteurisation des jus de fruits frais et la stérilisation du lait, etc. (Orsat et Raghavan, 2007).

**Bouchet et Boulard (1991)**, ont étudié l'effet des radiations micro-ondes sur l'ultrastructure des oocystes d'*E. magna*. Les oocystes sporulés d'*E. magna* ont été exposés à une énergie micro-ondes de l'ordre de 2450MHz ; 600W, pendant des intervalles de durées différentes (10, 15 et 20 secondes), ce qui a progressivement détruit les parois oocystales. Le traitement a induit, également, des lésions au niveau des structures internes du parasite, notamment, les mitochondries et les réticulums endoplasmiques rugueux.

**Ortega et Liao (2006)**, ont démontré l'habilité des micro-ondes à inactiver les coccidies, notamment, *Cyclospora* et *Cryptosporidium*. Le *Cryptosporidium* ayant été inactivé à des puissances de l'ordre de 1100W pendant 20secondes ou de 650W pendant 30secondes. Il est à noter que les oocystes de *Cryptosporidium* n'ont été inactivés qu'au seuil d'une température de 80°C.

Il est à faire remarquer, que la température du prélèvement, pendant le traitement, est le facteur majeur pour contrôler la technique (technique d'inactivation par les radiations micro-ondes). De ce fait, il n'est pas recommandé de se baser sur le facteur temps. Dans cette étude, l'utilisation du four à micro-ondes à une puissance de l'ordre 800W pendant 90s, procure une température variant entre 82.5 à 85°C et ce, en profondeur de la suspension oocystale traitée, sachant que le volume total, de la solution PBS à chaque traitement est de 5mL.

**Fish (1931, 1932)**, admet qu'une température de 60°C est capable de tuer à 100% les oocystes sporulés ou non sporulés d'*E. tenella* en 20 secondes, tandis qu'à 80°C, il constate un effet létal de 100% en 3 secondes.

**Reinhart et Becker (1933)**, attestent que l'exposition de 15 secondes, à la température de l'ordre 53°C, détruit totalement, les oocytes non sporulés d'*E. neischulzi*. Alors que pour des oocystes sporulés de cette même espèce murine, la température nécessaire pour tuer 100% de parasites en 2 minutes, est de l'ordre de 52°C.

Le mécanisme exact d'action des micro-ondes sur les oocystes sporulés d'*E. tenella*, reste mal élucidé, toutefois, leur l'effet létal est, généralement, attribué à la haute température qui en fait suite, provoquant éventuellement, la dénaturation des protéines parasitaires (**Jay, 2000 ; Banik et al., 2003**). Cependant, les effets non thermiques des micro-ondes ont, également, été observés. Pour expliquer cet effet des auteurs ont avancé des suggestions, en particulier la suivante : Les micro-ondes sont capables de produire des dipôles, ceux-ci se pivotant et s'alignant au champ électrique des micro-ondes, parviennent à des modifications des structures secondaires et tertiaires des protéines des micro-organismes (**Banik et al., 2003**).

#### 2.2.1.2. Après inoculation

Après le challenge, les scores lésionnels (5<sup>ème</sup> jour post inoculation :  $SL_{M1}=1.9\pm 0.5$ ;  $SL_{M2}=1.4\pm 0.5$ ), les excréctions oocystales (5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge : Excrétion oocystale<sub>M1</sub>= $5.0\pm 0.3 \times 10^3$ OPG; Excrétion oocystale<sub>M2</sub>= $3.1\pm 0.3^a \times 10^3$ OPG) ainsi que les taux de mortalité enregistrés (1<sup>ier</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge : Taux de mortalité  $M1=6.6\%$ ; Taux de mortalité  $M2=2.2\%$ ) dans les deux lots immunisés inoculés ( $M_1, M_2$ ) sont statistiquement ( $P < 0.05$ ) meilleurs que ceux observés dans le lot non-immunisé inoculé ( $SL_{Mi}=3.9\pm 0.2$ , excrétion oocystale<sub>Mi</sub>= $18.0\pm 0.1 \times 10^3$ OPG, taux de mortalité  $Mi=63.3\%$ ) (Tableau 10).

Numériquement, tous les paramètres suscités, observés dans le lot immunisé 2 fois inoculé, sont meilleurs que ceux enregistrés dans le lot immunisé une seule fois inoculé (Tableau 10). Les scores fécaux caeaux (du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post inoculation), observés dans les deux lots vaccinés inoculés ( $M_1, M_2$ ), sont très atténués (Tableau 12).

Il est à noter que le score lésionnel, la mortalité et le score fécal caecal enregistrés, après inoculation, dans le lot non-immunisé inoculé ( $M_i$ ) sont très affectés (Tableau 10, 12).

Le vaccin inactivé utilisé, ne s'avère pas efficient pour freiner complètement la manifestation lésionnelle, l'excrétion oocystale et les taches de sang dans les fientes émises et ce, à travers les deux méthodes effectuées (avec ou sans répétition).

Toutefois, la comparaison de tous les paramètres cliniques, lésionnels et parasitologiques étudiés (Tableaux 10,12), entre les lots vaccinés inoculés ( $M_1, M_2$ ) et le lot non-immunisé inoculé ( $M_i$ ), permet d'affirmer que l'immunisation à l'aide du vaccin inactivé élaboré et testé, a réduit la gravité des paramètres cliniques et lésionnels de l'infection, empêchant l'apparition d'une coccidiose caecal aigue mortelle en dépit de la concentration oocystale très élevée (50000 oocystes d'*E.tenella*/sujet) de l'inoculum utilisé.

L'immunité engendrée par un vaccin d'*Eimeria* spp inactivé, est sans doute enclenchée par des antigènes, issus de différents compartiments de l'oocyste sporulé, dont les plus importants sont ceux des sporozoïtes.

**Jenkins et al. (1991)**, ont mis en évidence une immunité protectrice, contre *E. tenella*, chez des poulets immunisés par des oocystes de la même espèce, inactivés par les rayons X. Selon les mêmes auteurs le parasite inactivé est incapables de se développer à l'intérieure de la cellule, suggérant un pouvoir immunogène des sprozoïtes, capable d'assurer une immunité protectrice.

**Murray et al. (1986)**, ont fait valoir qu'il est possible d'induire une immunité anticoccidienne contre *E. tenella* avec des extraits de parasites tués (extraits protéiques de sporozoïtes d'*E. tenella*), en les administrant plusieurs fois à des poulets, à une semaine d'intervalle, par voie orale ou par injection intramusculaire. Les oiseaux obtiennent une protection partielle vis-à-vis d'une réinfection par la même espèce. Cependant, cette

résistance est étroitement spécifique, en particulier avec l'espèce *E. acervulina*, où l'on constate, après l'administration d'extraits protéiques de cette espèce, l'induction d'un certain degré d'immunité vis-à-vis d'*E. tenella* et d'*E. maxima*. L'immunité obtenue persiste au moins 5 semaines après la dernière immunisation.

De nombreux auteurs se sont enquis des antigènes vaccinnants, notamment, les antigènes des sporozoïtes. L'antigène SO7', extrait du corps réfringent des sporozoïtes d'*E. tenella*, possède un très grand pouvoir immunogène avec des épitopes à la fois, pour les cellules B et T (**Miller et al., 1989**). Il s'agit d'un antigène très intéressant pour l'élaboration des vaccins sous-unitaires (subunit vaccine). Il a été utilisé, maintes fois, avec succès, par plusieurs auteurs, notamment, **Crane et al. 1991**, **Kopko et al. (1999)**, **Konjufca et al. (2008)**, **Xu et al. (2013)**. **Crane et al. (1991)**, attestent qu'une seule dose d'un vaccin recombinant à base de la protéine de fusion recombinée « CheY-SO7' », de l'espèce *E. tenella*, permet non seulement, de protéger partiellement des poulets contre une infection lourde d'*E. tenella*, mais, également, de les protéger contre des infections hétérologues à base d'*E. acervulina*, *E. maxima* et *E. necatrix*. Toutefois, les mêmes auteurs, affirment que l'effet de ce vaccin reste en deçà du seuil de rivalité avec la chimio-prophylaxie (**Crane et al., 1991**).

**Kopko et al. (1999)**, ont utilisé un vaccin recombinant, en injectant, à des poulets, en intramusculaire, 25µg d'ADN (pcDNA3-SO7'), codant la protéine antigénique du corps réfringent des sporozoïtes d'*E. tenella*. Les oiseaux ont développé, par la suite, une immunité protectrice à l'encontre d'une inoculation de l'ordre de 2500 oocystes sporulés d'une souche américaine d'*E. tenella* « USDA Strain 80 ».

**Hyun et al. (2005)**, ont cloné le gène codant la protéine « EtMIC2 » (Microneme protein ou protéine de micronèmes) des sporozoïtes de l'espèce *E. tenella*. Exprimée puis purifiée, la protéine encodée « EtMIC2 » est injectée dans le sac amniotique des œufs de poulet de la souche « White Leghorn SC », au 18<sup>ème</sup> jour d'incubation. Les poulets immunisés ont développé une immunité protectrice, contre une infection expérimentale, au 18<sup>ème</sup> jour post-éclosion, de l'ordre de 10000 oocystes sporulés d'*E. tenella* issues du terrain américain (souche sauvage). Les auteurs ont retenu comme réponse immunitaire, un titre sérologique très élevé d'anticorps (mis en évidence par la technique ELISA), une faible excrétion oocystale et une amélioration du gain de poids, en comparaison avec le lot non-vacciné

inoculé. Les auteurs mettent en avant l'immunité protectrice croisée induite par l'antigène « EtMIC2 » à l'encontre d'*E. acervulina*.

Si beaucoup d'études ont fait appel à ce stade parasitaire (sporozoïtes), c'est sans doute du fait de la facilité d'obtention et de purification des sporozoïtes (**Geysen et al., 1991**).

A partir des observations suscitées, on peut admettre que le vaccin anticoccidien inactivé utilisé dans cette étude a permis le développement d'une immunité protectrice qui a prévenu le déclenchement d'une coccidiose caecale aiguë mortelle.

### 2.2.2. Expérimentation 2 (A)

#### 2.2.2.1. *Après immunisation*

Après immunisation, les lots immunisés inoculés ( $A_1$ ,  $A_2$ ) via le vaccin vivant atténué par les radiations UV, ont développé de légers scores lésionnels ( $SL_{A1}=0.5\pm 0.1$  ;  $SL_{A2}=0.5\pm 0.4-0.6\pm 0.0$ ), de faibles excréctions oocystales (Excrétion oocystale $_{A1}=0.6\pm 0.5\times 10^3$ OPG ; Excrétion oocystale $_{A2}=0.5\pm 0.3\times 10^3-0.2\pm 0.3\times 10^3$ OPG) et d'insignifiants scores fécaux caeaux et ce, malgré la dose vaccinale relativement importante (5000 oocystes/sujet) (Tableaux 10, 11).

**Johnson (1927)**, affirme que la sévérité de la coccidiose caecale dépend en premier lieu du nombre d'oocystes sporulés d'*E. tenella* reçus par oiseau.

**Jankiewicz et Scofield (1934)** ont rapporté ce qui suit :

- Une dose oocystale d'*E. tenella* comprise entre 150 à 500 oocystes/ sujet, peut produire de légères hémorragies, sans mortalité.
- Une dose oocystale d'*E. tenella* comprise entre 1000 à 3000 oocystes/ sujet, provoque d'importantes hémorragies avec un léger taux de mortalité.
- Une dose oocystale d'*E. tenella* supérieure à 5000 oocystes/ sujet, produit des hémorragies sévères avec un important taux de mortalité.

Ces observations, font valoir que les coccidies vaccinales exposées aux radiations UV (254 nm ; 60 minutes) préservent leur pouvoir de reproduction sexuée et asexuée (présence de légères taches de sang et des oocystes non sporulés d'*E. tenella* dans les fientes des oiseaux immunisés), toutefois leur pouvoir pathogène a été atténué, car l'administration d'une dose

supérieure à 3000 oocystes sporulés non atténués d'*E. tenella*, provoque une forme clinique de coccidiose caecale.

#### 2.2.2.2. Après inoculation

Après le challenge, les scores lésionnels (5<sup>ème</sup> jour post inoculation :  $SL_{A1}=1.7\pm 0.2$ ;  $SL_{A2}=1.5\pm 0.1$ ), les excréctions oocystales (5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge : Excrétion oocystale $_{A1}=3.7\pm 0.4\times 10^3$ OPG; Excrétion oocystale $_{A2}=2.5\pm 0.1\times 10^3$ OPG), ainsi les taux de mortalités enregistrés (1<sup>er</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post-challenge : Taux de mortalité  $_{A1}=4.4\%$ ; Taux de mortalité  $_{A2}=2.2\%$ ) dans les 2 lots immunisés inoculés ( $A_1$ ,  $A_2$ ) sont statistiquement ( $P < 0.05$ ) inférieurs que ceux constatés dans le lot non-immunisé inoculé ( $A_i$ ) (Tableaux 10,12).

Numériquement, tous les paramètres suscités, observés dans le lot immunisé 2 fois inoculés ( $A_2$ ) sont meilleurs que ceux enregistrés dans le lot immunisé une seule fois inoculés ( $A_1$ ) (Tableaux 10,12).

Les scores fécaux caeaux (du 5<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour post inoculation), observés dans les 2 lots vaccinés inoculés ( $A_1$ ,  $A_2$ ) sont atténués (Tableau12).

Remarquons que le score lésionnel ( $SL_{A_i}=3.5\pm 0.2$ ), l'excrétion oocystale (Excrétion oocystale $_{A_i}=13.5\pm 0.5\times 10^3$ OPG), la mortalité (Taux de mortalité  $_{A_i}=70.0\%$ ) et le score fécal caecal enregistrés, après inoculation, dans le lot non-immunisé inoculé ( $A_i$ ) sont très détériorés (Tableaux 10, 12).

Il importe de signaler, également, que le vaccin vivant atténué élaboré dans notre laboratoire, ne s'avère pas efficace pour prévenir totalement le développement des lésions, de l'excrétion oocystale et des taches de sang dans les fientes émises et ce, par suite des 2 méthodes de vaccination effectuées (avec ou sans répétition).

Toutefois, la comparaison de tous les paramètres cliniques, lésionnels et parasitologiques étudiés (Tableaux 10,12), entre les lots vaccinés inoculés ( $A_1$ ,  $A_2$ ) et le lot non-immunisé inoculé ( $A_i$ ), permet de conclure que l'immunisation à l'aide du vaccin vivant atténué élaboré et testé, peut sans doute juguler la gravité des paramètres cliniques et lésionnels de l'infection, empêchant l'avènement d'une coccidiose caecal aigue mortel, en dépit de la concentration oocystale très élevée (50000 oocystes d'*E. tenella* / sujet) de l'inoculum administré.

La radiation UV est un traitement physique non thermique, s'avérant très efficace pour inactiver de nombreux micro-organismes, notamment, les protozoaires, les virus et les bactéries (**Erickson et Ortega, 2006 ; Cho et al., 2007**). L'effet antimicrobien de la lumière UV a été mis en évidence pour la première fois par Downs et Blunt en 1877 (**Phillips, 1983**). Au sein de la cellule, les molécules affectées par le rayonnement UV sont les acides nucléiques (ADN, ARN) (**Harm, 1980 ; Diffey, 1991**). Les nucléotides sont des molécules chromophores (groupement insaturé responsable de l'absorption de l'énergie de la lumière dans une gamme du spectre visible ; Exemple : C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N, C=S, N=N, etc.), représentant des centres d'absorption des rayonnements UV, à l'intérieur des acides nucléiques. Les bases pyrimidiques sont 10 fois plus sensibles à la lumière que les bases puriques (**Smith, 1966**). Ainsi, les bases pyrimidiques adjacentes (Thymine et cytosine) sont-ils les sites les plus réactifs de l'excitation de l'ADN par des photons UV-C (100nm- 280nm) et dans une moindre mesure, ceux des UV-B (280-315nm). L'énergie absorbée au niveau de deux pyrimidines (cytosine (C) ou thymine (T)) adjacentes fournit l'énergie nécessaire à la formation d'une liaison covalente entre ces deux bases, au détriment des liaisons hydrogène assurant la cohésion de la double hélice d'ADN. Les dimères de pyrimidine majoritairement induits par les UV-C et les UV-B, sont les dimères cyclobutaniques de pyrimidines (cyclobutane pyrimidine dimer : CPD) et les pyrimidines (6-4) pyrimidone (**Nabih et Abd El-Hamid, 1984 ; Diffey, 1991**).

Les liaisons covalentes formées entre les bases pyrimidiques au détriment des liaisons hydrogènes provoquent la cohésion de la double hélice d'ADN, empêchant, ainsi la réplication de l'ADN et modifiant, par conséquent, ses fonctions biologiques. Les cellules ont la capacité de réparer les dommages. Cependant, certaines atteintes sont plus sérieuses et permanentes, ne pouvant pas être réparées, et pouvant affecter ainsi la survie et le développement de la cellule (**Freifelder, 1987 ; Lehmann et Norris, 1990 ; Nilsson, 1996**).

Les rayonnements UV peuvent, donc, endommager les molécules d'ADN et d'ARN, lesquelles sont responsables respectivement du transport de l'information génétique des cellules et de la traduction de l'information génétique.

**Khan et Casciotti (1999)**, constatent que l'exposition des stades invasifs (sporozoïtes pour les *Eimeria* spp), aux radiations atténuantes demeure l'une des meilleures méthodes pour obtenir des vaccins, conférant des niveaux élevés d'immunité protectrice contre de nombreuses protozooses.

**AbdelBaki et al. (2009)** ont induit une immunité protectrice contre la sacrosporidiose ovine chez des agneaux immunisés par un vaccin contenant des sporocystes de *Sarcocystis ovis* atténués par les radiations UV (Vaccin 1 : 254 nm, pendant 30 minutes, vaccin 2 : 254 nm, pendant 60 minutes). Les animaux immunisés par le 2<sup>ème</sup> vaccin (UV-60) sont caractérisés par un niveau sérologique très élevé de l'IFN- $\gamma$  ; d'où une prédominance de la réponse Th1, pouvant avoir un effet protecteur contre l'infection (**AbdelBaki et al., 2009**).

**Lin et al. (2011)**, ont pu induire un très haut niveau d'immunité protectrice chez des porcs vaccinés par des cercaires de *Schistosoma japonicum* atténués par les radiations UV (400  $\mu$ W) et inoculés ensuite par le même trématode. Ils ont mentionné, également, qu'une triple immunisation par ces cercaires atténuées s'avère plus efficace qu'une seule immunisation.

**Zhao et al. (2013)**, ont pu déclencher une immunité protectrice chez des souris vaccinés par des injections intra-péritonéales de tachyzoites de *Toxoplasma gondii* atténués par les radiations UV, puis inoculés via la même voie par les tachyzoites de cette coccidie.

La lumière UV a, également, l'avantage d'être moins chère, plus commode à la manipulation et plus sécurisante en comparaison aux rayonnements X et  $\gamma$  (**Shi et al., 1990**).

En guise de conclusion, le vaccin vivant atténué utilisé dans cette étude, s'avère efficace quant à la stimulation d'une immunité protectrice prévenant la survenue d'une forme clinique de la coccidiose caecale aigue.

### 3. DISCUSSION GENERALE

L'immunité protectrice des deux vaccins testés, se manifeste sur deux volets :

- L'amélioration des performances zootechniques, particulièrement, les gains de poids et l'indice de consommation.
- La réduction des scores lésionnels, des scores fécaux, de la production oocystale et de la mortalité. Cette réduction s'avère plus intéressante dans le vaccin vivant atténué, particulièrement, lors de son application répétée (2 reprises). Selon **Horton-Smith et al. (1961)**, les principaux critères pour l'appréciation de la résistance des poulets, vis-

à-vis de la coccidiose caecale, sont le taux de mortalité et le taux de l'excrétion oocystale.

Quoiqu'elle n'ait pas été attestée statistiquement, l'immunsation répétée (Trickle immunization), sur deux administrations, s'avère plus intéressante quant à la réduction des lésions caecales, de la production oocystale et du taux de mortalité. **Nakai et al. (1992)**, ont pu prévenir totalement l'apparition des lésions caecales (après challenge par *E. tenella*) chez des poulets immunsés pendant 13 jours par des doses journalières de l'ordre de 50 oocystes vivants virulents d'*E. tenella*/sujet/jour. Néanmoins, l'excrétion oocystale n'a pu être réduite complètement.

**Joyner et Norton (1973)**, attestent que l'administration journalière de faibles doses d'oocystes d'*Eimeria* spp du poulet, induit un meilleur degré de protection par rapport à celui produit par une seule administration de ces faibles doses oocystales conjuguées. Cependant, dans les élevages de poulet au sol, la vaccination répétée contre la coccidiose s'avère peu pratique, d'autant que le contrôle de cette parasitose est jugé par l'absence de signes cliniques et de lésions macroscopiques (**Joyner et Norton, 1973**).

**Long et al. (1980)**, remarquent que l'immunsation contre les différentes espèces d'*Eimeria* spp du poulet, peut se manifester par l'un des degrés de protection mentionnés ci-après :

- Les oiseaux peuvent manifester une résistance totale contre le développement du parasite, traduite par l'absence de l'excrétion oocystale, des lésions macroscopiques et des signes cliniques.
- Le système immunitaire des poulets peut développer un degré de protection, caractérisé par l'absence de lésions macroscopiques et la présence d'une excrétion oocystale.
- Les oiseaux peuvent ne pas manifester des signes cliniques, développant en revanche des lésions macroscopiques.

Ces trois manifestations dépendent du statut immunitaire des animaux, de la nature et de la concentration de l'inoculum. D'autres facteurs peuvent y contribuer, notamment, l'identité des espèces présentes dans le vaccin et dans l'inoculum, la concentration de la dose vaccinale, le temps qui espace l'immunsation du challenge (**Long et al., 1980**).

Le contrôle de la coccidiose par l'utilisation de vaccins vivants renfermant des souches d'*Eimeria* spp, atténuées ou virulentes est effectué dans l'industrie de volaille à un degré limité et ce, pendant plus de 50 ans. Leur efficacité repose sur le recyclage de la très faible dose oocystale initiale et ce, via des passages répétés (Trickle immunization) de petites doses d'oocystes vivants à travers les poulets élevés au sol, permettant l'installation progressive d'une immunité solide. Ces vaccins ont été employés principalement pour protéger des bandes de reproductrices et de pondeuses (Shirley et al., 1995). Toutefois, leur utilisation dans les élevages de poulets de chair s'avère augmentée au fil des années.

L'administration, durant la première semaine d'âge, des vaccins anticoccidiens vivants (PARACOX<sup>TM</sup> et LIVACOX<sup>TM</sup>: Vaccins vivants atténués; COCCIVAC<sup>TM</sup> et IMMUCOX<sup>TM</sup>: Vaccins vivants virulents), commercialisés à travers le monde, permet de produire une immunité solide, dans de bonnes conditions d'utilisation et d'élevage (**Danforth, 1998**). Toutefois, l'immunité croisée incomplète (ou absente) entre les souches d'une même espèce d'*Eimeria* spp, ainsi que l'intrusion, dans le terrain Algérien, de souches d'*Eimeria* spp du poulet anti-géniquement différentes, demeurent les problèmes majeurs de l'utilisation de ces vaccins commercialisés, d'où l'intérêt d'élaborer des vaccins à base de souches locales.

Selon **Shirley (1989)**, les vaccins anticoccidiens procurent une immunité protectrice permettant de contrôler la maladie, toutefois, les effets les plus subtiles de la vaccination sur l'épizootiologie de la coccidiose ont été, également, évalués en surveillant le nombre d'oocystes présents sur les litières des bandes de poulets vaccinés et non vaccinés, traités et non traités par des molécules anticoccidiennes. Les résultats de ces études laissent apparaître une présence permanente d'oocystes dans la litière d'un élevage surveillé de poulettes futures pondeuses vaccinés et ce, tout au long de la période d'élevage, pouvant atteindre 20 semaines; avec une production oocystale comprise entre 10000 et 70000 oocystes par gramme de fèces.

Dans le même site et sur d'autres bandes traitées aux anticoccidiens, on a enregistré une production oocystale de l'ordre de 2000 à 300000 oocystes par gramme de fèces. D'une façon générale, on note moins d'oocystes sur la litière des bandes vaccinées comparées aux bandes traitées aux ionophores.

C'est la preuve que les vaccins utilisés permettent de prévenir la maladie en protégeant l'animal d'une forme clinique de la maladie, sans éradiquer du parasite.

## *Chapitre 4*

### ***Techniques utilisées dans l'étude***

Le présent chapitre consiste à décrire les différentes techniques utilisées dans les deux chapitres précédents. Il s'agit de méthodes classiques de coprologies (Méthode de flottation, séparation et isolement des oocystes de la matière fécale, technique de McMaster modifiée, etc.), de coloration histologique (Hématoxyline Eosine) et de technique de biologie moléculaire (ITS1-PCR), etc.

Les techniques suscitées, se sont répétées à travers les deux études réalisées dans cette thèse, en sorte que nous avons consacré ce quatrième chapitre à la présentation détaillée de ces techniques.

#### **1. METHODE DE FLOTTATION**

Son principe consiste en la concentration des éléments parasitaires, confinés dans une petite quantité de fèces mélangées à un liquide dense (de densité supérieure à celle de la plupart des éléments parasitaires), afin que sous l'action de la pesanteur ou de la centrifugation, les débris sédimentent dans le culot tandis que les éléments parasitaires remontent à la surface du liquide où ils sont recueillis puis identifiés.

Il s'agit de la méthode coproscopique qualitative la plus utilisée. Elle comporte plusieurs variantes ; le protocole décrit ci-après est très proche de ceux mentionnés par de nombreux auteurs, notamment, **Thienpont et al. (1979)**, **Euzéby (1981)**, **Losson (1996)** et **Beugnet et al. (2004)** :

- Homogénéiser 5g de fèces dans un volume d'eau de robinet.
- Tamiser le mélange dans une passoire (diamètre orifice=250µm).
- Centrifuger le filtrat 5 minutes à 2000 tours/minute, après quoi éliminer le surnageant et resuspendre le sédiment dans une solution dense (densité égale à 1.2) ; ajouter ensuite la solution dense jusqu'à 5 mm du sommet du tube.
- Centrifuger la suspension pendant 5 minutes à la vitesse de 2000 tours/minute. Après la centrifugation, ajouter la solution dense (afin de remplir le tube) jusqu'à la formation d'un ménisque convexe, sur lequel est posée une lamelle (ou une lame) pour couvrir le ménisque sans emprisonner les bulles d'air.

- Laisser reposer durant environ 4 à 5 minutes, après quoi récupérer la lamelle sur laquelle les éventuels éléments parasitaires se sont collés (face inférieure) et l'observer sur une lame au microscope au grossissement 10 (100×), 40 (400×).

Il importe de souligner que les principales solutions denses utilisées sont :

- Solution saturée de sel de cuisine (NaCl), à densité égale à 1.2 (NaCl à raison de 40 grammes dans 100 mL d'eau).
- Solution dense de sulfate de zinc (37% (w/v) ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Zinc Sulphate, BIOCHEM Chemopharma, Quebec), à raison de 370g par litre d'eau (**Ryley et al., 1976**).

## **2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES OOCYTES DE LA MATIÈRE FÉCALE**

La technique de séparation et d'isolement des oocystes de la matière fécale, décrite par **Shirley (1995)** est donnée ci-après :

- Transférer la matière fécale fraîchement émise (24-48h) dans des récipients en plastique transparent (1-5L) après quoi ajouter de l'eau de robinet.
- Mixer le contenu du récipient, à l'aide d'un agitateur magnétique (Drehzahl electronic- IKA-COMBIMAG REO, Germany), jusqu'à l'obtention d'une mixture homogène.
- Filtrer l'homogénat à travers 2 pièces de gaze ; centrifuger ensuite le filtrat à une vitesse de 2000 tours/ minute pendant 10 minutes.
- Soustraire le surnageant et ajouter une solution saturée d'une densité égale à 1.2 au culot formé, après quoi remuer vigoureusement le tout jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (ainsi que mentionné antérieurement).
- Centrifuger la suspension obtenue à une vitesse de 2000 tours/ minute pendant 10 minutes.
- Collecter les oocystes au sommet du liquide à l'aide d'une seringue stérile reliée à une longue aiguille.
- Déposer les oocystes dans l'eau distillée (dans des tubes à centrifuger) afin de procéder aux lavages des oocystes.

- Les lavages s'effectuent en procédant à 3 à 4 centrifugations successives dans l'eau distillée à une vitesse de l'ordre de 2000 tours/minute pendant 10 minutes tout en récupérant le sédiment à chaque centrifugation (**Conway et McKenzie, 2007**).
- Après le dernier lavage les oocystes sont mis dans une solution de dichromate de potassium à 2.5% ( $K_2Cr_2O_7$ ) (Potassium dichromate Analytical Reagent, BIOCHEM Chemopharma, Quebec) pour assurer la sporulation.

### 3. TECHNIQUE DE McMaster MODIFIEE

C'est une méthode permettant de mesurer l'excrétion oocystale, par décompte du nombre d'oocystes par gramme de fèces consistant à :

- Diluer, puis mixer 3g de fèces de poulet dans 42mL d'eau, jusqu'à l'obtention d'une suspension fécale homogène, après quoi filtrer l'homogénat à travers deux pièces de gaze (0.15mm).
- Récupérer le filtrat dans un récipient sec et propre, après quoi l'homogénéiser par une bonne agitation.
- Prélever un aliquote (de cette dernière solution) pour faire remplir un tube de centrifugation (de 15mL) jusqu'à 5mm de son sommet.
- Centrifuger l'aliquote prélevé à une vitesse de 1500 tours/minute, pendant 5 minutes.
- Soustraire le surnageant tout en récupérant le sédiment.
- Diluer et mixer le sédiment dans une solution saturée, à une densité égale à 1.2 et ce, jusqu'à l'obtention du même volume initial (volume de l'aliquote), puis faire retourner le tube plusieurs fois jusqu'à homogénéisation de la solution.
- Prélever un aliquote du centre du tube, à l'aide d'une pipette propre, après quoi faire remplir les 2 chambres de la cellule McMaster à deux grilles (CHALEX CORPORATION, USA) (3 chambres pour certaines cellules McMaster). Chaque chambre comporte un volume de 0.15mL et est gravée d'une grille de 6 colonnes.
- Après 5 minutes il est procédé au décompte de tous les oocystes se situant à l'intérieur de la grille (dans les 6 colonnes) de chaque chambre en utilisant le grossissement 10 (100×).
- Le calcul du nombre d'oocystes par gramme de fèces (O.P.G) s'effectue de la façon suivante :

$$O. P. G = \frac{N \times 45}{\frac{0.3}{3}}$$

*N* : Nombre total d'oocystes dans les deux chambres de la cellule McMaster.

*45mL* : Volume de la suspension fécale.

*0.3mL* : Volume des deux chambres de la cellule McMaster.

*3g* : Poids des fèces utilisées dans la technique.

NB : Si le nombre d'oocystes est très élevé, on peut réaliser des dilutions de 1/10 ou de 1/100 dans la solution dense, puis on multiplie par le facteur de dilution (**Taylor et al., 1995**).

#### 4. PREPARATION DES DOSES OOCYSTALES PURIFIEES

La préparation d'une dose oocystale exige une attention minutieuse, particulièrement lorsqu'il s'agit de faibles doses d'oocystes (exemple : 100 oocystes/ml). La procédure y afférente mentionnée ci-après est décrite par **Shirley (1995)** :

- Oter le dichromate de potassium par des centrifugations répétées dans l'eau (lavages répétés), en prenant soin, si nécessaire, de réduire la taille des tubes (ou de boîtes) à centrifuger autant que la procédure le permet. Pour ce faire, il est possible de commencer le lavage dans des récipients en verre de 1L ou des tubes de 100mL, après quoi, continuer, les lavages, dans des tubes de 50 et 15mL.
- Ajouter l'hypochlorite de sodium (10% v/v) à la concentration oocystale finale et la laisser dans un bain de glace pendant 5-10 minutes, afin d'éviter l'agrégation des oocystes et d'avoir un bon pourcentage de sporulation (s'il s'agit d'oocystes non sporulés).
- Centrifuger (2000 tours/ minute pendant 10 minutes), puis éliminer le surnageant, après quoi diluer et mixer le sédiment dans un volume restreint de solution saturée. Remplir le tube jusqu'à de 2cm de son sommet avec la solution saturée et recouvrir après avec de l'eau distillée. Centrifuger, le tout, pendant 5 minutes à la vitesse de 1500 tours/ minute.
- Collecter les oocystes (à l'aide de seringue stérile) lavés et exempts de bactéries (bacteria-free) à partir de l'interface entre le sel (solution dense) et l'eau. Déposer, après, les oocystes dans des tubes stériles.
- Diluer et mixer les oocystes dans de l'eau distillée stérile ; centrifuger à 1500 tours/ minute pendant 5 minutes, après quoi ôter le surnageant et conserver le sédiment.

#### **4.1. Doses oocystales relativement grandes (5000-100000 oocystes/ml) pour les passages, scores lésionnels, gains de poids, etc.**

- Diluer les oocytes dans une solution de Phosphate Buffer Saline (PBS ; pH =7.2) et les transférer dans des tubes coniques (15mL ou 50mL).
- Effectuer ensuite, des comptages oocystaux, à l'aide de la technique McMaster modifiée, afin de déterminer le nombre d'oocystes par millilitre de suspension.
- Diluer la suspension, autant de fois que nécessaire, si la concentration oocystale est trop élevée.
- Une fois la concentration requise (par millilitre de suspension) obtenue, il est fondamental d'effectuer ensuite, plus de 10 comptages pour chaque dose, afin de confirmer la dose recherchée.
- La dose finale est généralement obtenue par 1 millilitre de suspension (**Shirley, 1995**).

#### **4.2. Doses oocystales faibles pour infection et immunisation expérimentales, etc.**

- Diluer les oocytes dans une solution de Phosphate Buffer Saline (PBS ; pH =7.2) et les transférer dans des tubes coniques (15mL ou 50mL).
- Effectuer ensuite, des comptages oocystaux, à l'aide de la technique McMaster modifiée, afin de déterminer le nombre d'oocystes par millilitre de suspension.
- A l'aide d'une pipette Pasteur calibrée en verre ou une seringue en verre (30 gouttes/mL), prélever 6 à 10 aliquotes sur de la suspension oocystale, après quoi les mettre (les aliquotes) dans un tube conique et remuer fermement le prélèvement.
- Placer une goutte de la suspension prélevée, entre lame et lamelle.
- Effectuer des comptages des oocystes sporulés dans chaque goutte, après quoi calculer le nombre oocystal moyen/goutte.
- Multiplier le nombre oocystal moyen/goutte obtenu, par le coefficient approprié afin d'obtenir la concentration oocystale/mL.
- La dose finale est généralement obtenue par 1 millilitre de suspension.

### **5. PURIFICATION DES OOCYSTES D'*E. tenella* A PARTIR DES CAECA**

La méthode utilisée afin de purifier les oocystes de l'espèce *E. tenella* à partir des caeca est celle décrite par **Shirley (1995)**, elle est adaptée pour obtenir des extraits oocystaux purifiés (exempts des débris extrinsèques) de cette espèce. La technique est décrite ci-après :

- Sectionner les caeca atteints de la coccidiose caecale à partir du reste de l'intestin, à l'aide d'une paire de ciseaux propres ou d'un bistouri stérile. Suite à quoi, couper longitudinalement, chaque ceacum, avant le raclage de la muqueuse caecale par un bistouri stérile.
- Ajouter aux tissus et aux contenus caecaux une solution de Phosphate Buffer Saline (PBS ; pH =7.2), après quoi, les hacher et les homogénéiser à l'aide d'un hachoir (MSM6150, Bosch, Slovénie).
- Ajouter la trypsine (Gibco™ Trypsin 1 :250, ThermoFisherScientific, USA) à une concentration finale de l'ordre de 1.5% w/v et incubé à une température d'environ 41°C, pendant 30 minutes, par la suite, filtrer l'homogénat à travers deux pièces épaisses de gaze.
- Centrifuger le filtrat pendant 10 minutes à une vitesse de 1500 tours/ minute et éliminer ensuite le surnageant.
- Diluer et mixer le sédiment dans une solution saturée, après quoi, ajouter un surplus de solution saturée jusqu'à obtention du volume initial. Centrifuger, le tout, pendant 5 minutes à la vitesse de 1500 tours/ minute.
- Collecter les oocystes à partir du sommet de la solution saturée, après quoi effectuer plusieurs lavages oocystaux.
- Mettre les oocystes lavés à sporuler pendant au moins 48 heures (**Shirley, 1995**).

## 6. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Dans le but de finaliser l'observation des lésions histologiques des duodénums des animaux sacrifiés au cours de la première étude, il a été réalisé des coupes histologiques, colorées par la technique « Hématoxyline-Eosine ».

### 6.1. Préparation des coupes histologiques

Il existe de nombreuses méthodes de préparations des coupes histologiques, celle utilisée dans notre étude (2<sup>ème</sup> chapitre) est décrite par **Fortier et Hould (2003)**, **Carson et Hladik (2009)**.

Les différentes étapes de la préparation des coupes, exception fait de la fixation, sont automatisées par un automate pour histologie (Sakura Tissue-Tek™ 4640 Rotary Tissue Processor, Japan). Les morceaux de tissus sont introduits dans des cassettes d'histologie (Tissue-Tek™ Système de Mégacassettes™, Japan).

### 6.1.1. Fixation

La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des tissus tout en évitant l'autolyse des structures cellulaires. Elle s'effectue par l'utilisation de plusieurs fixateurs chimiques (provoquant la coagulation du protoplasme cellulaire), notamment, le formol 10%. La durée minimale de fixation est de l'ordre de 48 heures.

Les segments duodénaux prélevés, sur chaque lot (2<sup>ème</sup> chapitre), sont mis dans du formol 10%, jusqu'au jour de la manipulation (**Fortier et Hould, 2003**).

### 6.1.2. Déshydratation

C'est une étape préalable à l'inclusion, permettant de chasser l'eau des tissus et de préparer ainsi son remplacement par des produits hydrophobes (paraffine).

Les fragments intestinaux sont retirés du formol, coupés en petits morceaux à l'aide d'un couteau puis déshydratés dans des bains successifs de :

1. 20 minutes dans l'éthanol 70%.
2. 20 minutes dans l'éthanol 95%.
3. 20 minutes dans l'éthanol 95%.
4. 20 minutes dans l'éthanol 100%.
5. 20 minutes dans l'éthanol 100% (**Fortier et Hould, 2003 ; Carson et Hladik, 2009**).

Il est préférable que la déshydratation se fasse à une température allant de 20 à 37°C (**Fortier et Hould, 2003**).

### 6.1.3. Eclaircissement

Il s'effectue par la réalisation de 2 bains d'une heure chacun, de xylène (ou le toluène) à 100% (solvant de l'alcool absolu), avec agitation. Les bains servent à remplacer l'alcool dans les tissus afin que celui-ci (xylène) soit miscible avec la paraffine. Le xylène éclaircira le tissu pour que son indice de réfraction soit plus élevé et augmentera sa transparence. Ainsi les tissus sont prêts pour leur inclusion dans la paraffine au terme de laquelle les blocs sont confectionnés (de paraffine). La température du bain ne devrait pas dépasser 37°C (**Fortier et Hould, 2003**).

#### 6.1.4. Imprégnation

Le prélèvement imbibé de solvant est ensuite imprégné à chaud dans deux bains successifs de paraffine liquéfiée à 56°C pendant 1heure pour chacun. La paraffine est le milieu le plus utilisé, permettant de bien remplir toutes les cavités tissulaires, de donner une consistance uniforme aux tissus et d'en fournir un support interne (**Fortier et Hould, 2003**).

#### 6.1.5. Inclusion (enrobage)

L'enrobage permet de fournir aux tissus un support externe pour la coupe au microtome et d'assurer une meilleure conservation du tissu par la suite. Il s'effectue en plaçant des fragments dans des moules en plastique (ou en métal inoxydable), préalablement remplis de paraffine liquéfiée, à 56°C. Il est recommandé de déposer les tissus au centre du moule pour éviter qu'ils adhèrent aux parois. Il faut, également, éviter qu'ils se touchent entre eux (**Fortier et Hould, 2003**).

Après refroidissement sur une plaque froide à -8°C, il est obtenu un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse, les blocs doivent être conservés au froid jusqu'à la coupe (**Fortier et Hould, 2003**).

La bonne orientation du tissu dans le moule est de la plus haute importance, puisque facilitant la coupe au microtome et favorisant l'observation optimale des structures microscopiques (**Fortier et Hould, 2003**).

#### 6.1.6. Microtomie

Les fragments duodénaux inclus dans les blocs de paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome en de fines coupes de 3µm d'épaisseur. Il est à noter qu'il a été réalisé plusieurs coupes (ruban de coupes) par bloc de prélèvement.

#### 6.1.7. Étalement

Les coupes histologiques sont récupérées dans l'eau contenant 1% de gélatine (colle biologique), étalées sur des lames en verre (en évitant les plis et les cassures) puis ramenées à l'étuve à 50°C pendant une heure pour séchage.

## 6.2. Coloration Hématoxyline-Eosine et montage des lames

Au lendemain du séchage, les lames sont colorées par la technique « Hématoxyline-Eosine », laquelle est une coloration standard utilisée en histologie. L'hématoxyline colore les noyaux en violet, l'éosine, le cytoplasme en rose.

### 6.2.1. Déparaffinage et réhydratation

La paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (xylène ou toluène) puis dans des bains d'alcools de concentration décroissante (de 100° jusqu'à 70°), avant un bain dans l'eau assurant la réhydratation finale :

1. 2 bains successifs de 15 minutes chacun, de xylène.
2. 2 bains successifs d'éthanol 100% de 15 minutes chacun.
3. 1 bain d'éthanol 95% de 15 minutes.
4. 2 bains successifs d'éthanol 70% de 15 minutes chacun.
5. 1 bain d'eau distillée de 10 minutes.

### 6.2.2. Coloration

La coloration « Hématoxyline-Eosine », utilisée dans l'étude, est celle décrite par **Mayer (1896)**. Les coupes sont colorées par l'hématoxyline suivie de l'éosine :

1. 1 bain d'hématoxyline (Mayer) pendant 5 minutes.
2. Rincer sous l'eau courante de robinet, pendant 10 minutes.
3. 10 trempages dans de l'éthanol 95%.
4. 1 bain d'éosine Y, pendant 1 minute.
5. 3 bains de 5 minutes chacun, dans l'éthanol 100%.
6. 1 bain de 5 minutes, dans le xylène (**Mayer, 1896 ; Schmitz et al., 2010**).

### 6.2.3. Montage manuel des lames

Une lamelle propre et suffisamment grande (couvrant toute la surface du prélèvement), utilisée pour y déposer une goutte de milieu de montage (résine : avec a un indice de réfraction se situant très près de celui du verre, soit autour de 1.50), est appliquée sur chaque lame. Après quoi, les lames prêtes à l'observation sont identifiées (**Fortier et Hould, 2003**).

### 6.3. Observation microscopique

Les lames asséchées sont observées au microscope optique aux grossissements 10 (100×), 20 (200×), 40 (400×) et 100 (1000×, avec l'huile d'immersion), afin d'en identifier les lésions coccidiennes et de rechercher les différents stades parasitaires au niveau de l'épaisseur de la paroi duodénale.

## 7. IDENTIFICATION DES ESPECES D'*Eimeria* spp DU POULET

Les oocystes sporulés des espèces d'*Eimeria* spp du poulet présentes dans les inocula utilisés dans les 2 études et les vaccins préparés dans la 2<sup>ème</sup> étude, sont identifiés par deux méthodes :

- Identification par morphométrie.
- Identification par la technique ITS1-PCR.

### 7.1. Diagnose morphologique

L'identification morphologique est axée sur l'évaluation des différents caractères, des oocystes sporulés des espèces d'*Eimeria* spp, notamment, mensuration et forme oocystales, index de dimension, présence ou absence de granule polaire, présence ou absence de micropyle, etc. (Figure 1 ; Tableau 1)

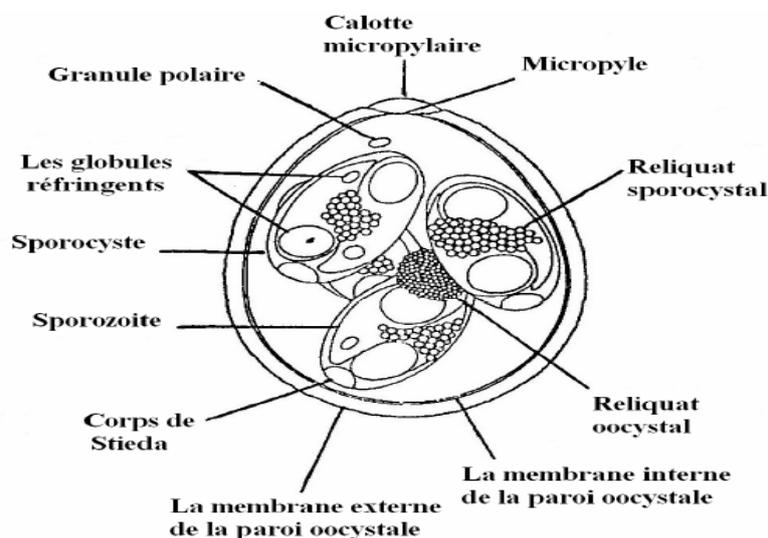


Figure 1. Schéma d'un oocyste sporulé d'*Eimeria* (McDougald et Reid, 1997, traduite par Djemai, 2008).

**Tableau 1. Récapitulatif des caractères oocystaux évalués (Euzéby, 1987 ; McDougald et Reid, 1997, compilés par Djemai, 2008).**

Espèce	Forme de l'oocyste	Longueur x Largeur (µm)	Index de dimension	Couleur	Micropyle	Granule polaire
<i>E. acervulina</i>	Ovoïde	17.7-20.2x13.7-16.3 (18.3x14.6)	1.25		- (très petit)	+
<i>E. brunetti</i>	Ovoïde	20.7-30.3 x18.1-24.2 (24.6 x18.8)	1.31	Incolore	-	+(au gros pôle)
<i>E. maxima</i>	Ovoïde	21.5-42.5x16.5-29.8 (30.5x20.7)	1.47	Jaune clair	-(ou présence d'un micropyle très petit)	+
<i>E. mitis</i>	Sub-sphérique	11.7-18.7x11.0-18.0 (15.6 x14.2)	1.09		+(petit)	+
<i>E. necatrix</i>	Sub-globuleux ou ovoïde	13.2-22.7 x11.3-18.3 (20.4 x17.2)	1.19	Incolore	+	+
<i>E. praecox</i>	Ovoïde	19.8-24.7x15.7-19.8 (21.3 x17.1)	1.24		-	
<i>E. tenella</i>	Ovoïde	19.5-26.0 x16.5-22.8 (22.0 x19.0)	1.16	Incolore		+(au petit pôle)
Espèce	Reliquat oocystal	Reliquat sporocystal	Paroi	Cytoplasme	Sporozoïtes	
<i>E. acervulina</i>	-	-	Paroi fine et lisse			
<i>E. brunetti</i>		-	Paroi lisse		1 ou 2 corps réfringent dans le sporozoïtes	
<i>E. maxima</i>	-	+(petit)	Plus ou moins rugueuse		Sporozoïtes renferment un globule très réfringent	
<i>E. mitis</i>	-	+(petit)	Paroi lisse			
<i>E. necatrix</i>	-	Inconstant	Paroi lisse	Cytoplasme emplit presque tout le volume de l'oocyste	Sporozoïtes à noyau proche de l'extrémité pointue et à globule réfringent	
<i>E. praecox</i>	-		Paroi lisse			
<i>E. tenella</i>	-	-	Paroi lisse	Cytoplasme n'emplit pas tout le volume de l'oocyste		

Il importe de faire observer que l'identification morphologique des espèces d'*Eimeria* spp du poulet est considérée par de nombreux auteurs, notamment, **Eckert et al. (1995)**, comme étant un procédé peu fiable et moins précis, du fait du chevauchement des dimensions et des autres caractères entre les espèces.

La lecture des caractères oocystaux s'effectue à l'aide d'un microscope optique et d'un micromètre calibré, ce dernier étant utilisé pour mesurer la taille des oocystes, ainsi que d'autres mensurations et est composé de 2 pièces :

- Micromètre objectif : C'est une lame porte-objet gravée d'une échelle graduée en millimètre. Le millimètre est divisé en 100 parties égales ; une sous-division correspond à :  $1 \text{ mm}/100=10\mu\text{m}$ .
- Micromètre oculaire : Un oculaire spécial sur lequel est gravée une échelle graduée. Tous les oculaires micrométriques n'ont pas le même nombre de divisions (**Thienpont et al., 1979**).

Le calibrage (étalonnage) du microscope oculaire est une phase importante à réaliser, s'effectuant conformément aux étapes suivantes :

- Installer le micromètre objectif sur la platine du microscope et ajuster l'échelle. Tourner, ensuite, le micromètre jusqu'à superposer les images des 2 échelles.
- Tourner ou déplacer la platine jusqu'à ce que les lignes Zéro des 2 échelles coïncident.
- Réaliser le décompte du nombre de divisions du micromètre oculaire.
- Déterminer le trait du micromètre oculaire correspondant exactement avec le milieu du trait du milieu du micromètre objectif.
- Commencer l'étalonnage avec l'objectif le plus faible en suivant l'ordre de grossissement croissant 10 (100×), 40 (400×) et 100 (1000× avec l'huile d'immersion), en obtenant pour chaque objectif un chiffre index, représentant la longueur en microns d'une division du micromètre oculaire (**Thienpont et al., 1979**).
- En fonction du grossissement utilisé, calculer en microns la mensuration recherchée (Exemple : largeur du parasite) en utilisant la formule suivante (**Thienpont et al., 1979**) :

$$\text{Longueur en Microns } (\mu\text{m}) = \text{Nombre de graduation du micromètre oculaire} \times \text{Index d'agrandissement}^*$$

\* : Exemple de l'index d'agrandissement :

Agrandissement objectif 10 : Index d'agrandissement=15 $\mu\text{m}$ .

Agrandissement objectif 40 : Index d'agrandissement=3.75 $\mu\text{m}$ .

Agrandissement objectif 100 : Index d'agrandissement=1.5 $\mu\text{m}$ .

## 7.2. Identification par la technique ITS1-PCR

Plusieurs techniques de biologie moléculaire, basées sur la polymérisation en chaîne (PCR), par amplification de certaines séquences de l'ADN ribosomique (exemple : ITS1, ITS2, etc.), ont été développées afin de distinguer entre les sept espèces d'*Eimeria* spp infectant le poulet (**Schnitzler et al., 1998 ; Schnitzler et al., 1999 ; Woods et al., 2000 ; Gasser et al., 2001 ; Su et al., 2003 ; Gasser et al., 2005 ; Jenkins et al., 2006**).

L'identification des espèces d'*Eimeria* spp du poulet par la technique ITS1-PCR, est axée sur l'amplification des séquences ITS1-rDNA spécifiques à chaque espèce d'*Eimeria* spp par l'utilisation des amorces spécifiques pour chaque espèces (**Jenkins et al., 2006**).

### 7.2.1. Extraction de l'ADN génomique du parasite

L'extraction de l'ADN génomique des oocytes purifiés (dans la solution PBS), a été réalisée par la méthode au phénol/chloroforme, décrite par **Duncanson et al. (2001)** et **Bajnok et al. (2015)** avec certaines modifications concernant le type de tissus utilisés (**Dodd et al., 2014**) :

1. Réaliser, par centrifugations (2000 tours/minute, pendant 5 minutes), des lavages répétés (4 centrifugations) de la suspension oocystale (dans la solution PBS) à identifier. Enlever entre chaque lavage le surnageant, suite à quoi resuspendre le culot dans de l'eau distillée.
2. Placer 1cm<sup>3</sup> (1ml) du culot final dans un tube eppendorf de 1.5 mL.
3. Ajouter 400µl de tampon de lyse (lysis buffer) et remuer à l'aide d'un vortex (Thermo Scientific MaxiMix™, UK).
4. Ajouter 4µl de la protéinase K (Protéinase K, EO0491, 1mL, 600unit/mL, Thermo Scientific™, UK) pour une concentration de l'ordre de 50mg/mL de solution, ou 10µl de la protéinase K pour la concentration de 20mg/mL.
5. Incuber la suspension, durant toute la nuit, à la température de 56°C.
6. Ajouter 500µL de la solution tamponnée « Tris phénol/chloroforme pH8.0 », après quoi mixer pendant 10 minutes.
7. Centrifuger à la vitesse de 13000 tours/minutes, pendant 10 minutes.
8. Transférer le surnageant dans un tube stérile.
9. Répéter les étapes « 1, 2 et 3 » deux fois.
10. Ajouter 90µL d'acétate de sodium (3M, pH5.3) et 900µL de l'éthanol 100%.
11. Conserver la suspension, durant toute la nuit, à -20°C.
12. Centrifuger à la vitesse de 13000 tours/minutes, pendant 20 minutes.
13. Enlever et éliminer le surnageant.
14. Laver le culot dans 500µL l'éthanol 70%.
15. Centrifuger à la vitesse de 13000 tours/minutes, pendant 10 minutes.
16. Enlever et éliminer le surnageant.
17. Laisser dessécher le culot dans l'air à la température de la chambre pendant 10 minutes.
18. Dissoudre le culot dans une quantité appropriée (généralement 100µl) de tampon T.E. (TE buffer : 10 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM EDTA ; Invitrogen™, USA) après quoi maintenir la suspension, à la température de réfrigération (4°C).

La composition du tampon de lyse (lysis buffer) est donnée dans le tableau ci-après :

**Tableau 2. Composants chimiques du tampon de lyse (G Hide, données non publiées).**

Composant Chimique*	Concentration finale	Quantité
NaCl	100mM	5.844g
EDTA pH8.0	25mM	50ml de 0.5M
SDS (Sodium lauroyl sarcosinate)	0.5%	5g
Tris pH8.0	0.5%	20ml de 1.0M
Eau		1 litre

\* : Autoclaver la solution 20 minutes à 121°C.

### 7.2.2. Lecture de densité optique (DO) de l'ADN par spectrophotométrie

Avant d'élaborer le mélange PCR, il importe de s'assurer de la pureté et de la bonne concentration en ADN des prélèvements utilisés, par une lecture faite au moyen d'un spectrophotomètre (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific<sup>TM</sup>, UK; avec un intervalle de longueur d'onde compris entre 190-840nm) et ce, en déposant 1µl de prélèvement sur le lecteur de l'appareil, après quoi il est utilisé plusieurs longueurs d'ondes dont les plus importantes sont : 260nm et 280nm (la durée de la mesure est de 5 secondes). Le spectrophotomètre, NanoDrop 2000 Spectrophotometer, est relié à un Laptop configuré (Windows<sup>®</sup> XP, USA), sur lequel sont affichés les paramètres suivants :

- *Densité optique (DO)*, définie comme étant l'absorption A (ou absorbance). Elle correspond à l'absorption maximale (Exemple : de l'ADN) à une longueur donnée.
- *Concentration d'ADN ou d'ARN ou des protéines* : La concentration du prélèvement en ADN est affichée en ng/µL (1ng/µL=1µg/mL), toutefois, elle peut être calculée par l'équation suivante (Tableau 3).

$$1 \text{ unité de } DO_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$$

*DO<sub>260</sub> : Densité optique à la longueur d'onde 260nm.*

- *Pureté* : Les protéines absorbent davantage les UV à 280nm, tandis que l'ADN absorbe mieux à 260nm. Le ratio  $A_{260}/A_{280}$  est utilisé pour estimer la pureté du prélèvement en acide nucléique. L'ADN pur doit avoir un ratio d'environ 1.8, l'ARN pur ayant une valeur d'environ 2.0.

**Tableau 3. Concentration en acides nucléiques.**

Acide Nucléique	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) par unité d' $A_{260}$
ADN double-brin	50*
ADN monobrin	33**
ARN monobrin	40***

*A<sub>260</sub>*: unité d'absorbance à 260 nm ; \* : 1 unité d'absorbance à 260 nm (*A<sub>260</sub>*) représente 50 $\mu\text{g/ml}$  ; \*\* : 1 unité d'absorbance à 260 nm (*A<sub>260</sub>*) représente 33 $\mu\text{g/ml}$  ; \*\*\* : 1 unité d'absorbance à 260 nm (*A<sub>260</sub>*) représente 40 $\mu\text{g/ml}$ .

### 7.2.3. Préparation de la réaction de PCR (PCR master mix)

La préparation de la réaction de PCR, s'effectue dans un volume final de l'ordre de 25 $\mu\text{l}$ /échantillon (ou réaction). Au lieu de préparer le master mix pour chaque réaction, on prépare un volume de master mix pour tous les échantillons à identifier (au cours d'une même manipulation) en ajoutant deux volumes de plus (Exemple : Pour 2 échantillons, il faut préparer un volume de PCR master mix = 2+2=x4).

Laisser les réactifs se décongeler à la température ambiante, ceux-ci étant conservés dans de la glace pilée.

Lors de la préparation du mélange PCR, les microtubes utilisés pour le PCR master mix et les microtubes pour PCR (0.2ml), sont stérilisés et mis dans de la glace pilée. Les quantités des produits ajoutés pour une seule réaction PCR (25 $\mu\text{L}$ ) mentionnées ci-après, doivent être ajoutées dans l'ordre suivant :

1. 2.5 $\mu\text{l}$ : De tampon PCR (Bioline, 10xNH<sub>4</sub>reaction Buffer without MgCl<sub>2</sub>, UK).
2. 1 $\mu\text{l}$  : De la solution MgCl<sub>2</sub> (Bioline ; 50mM MgCl<sub>2</sub>, UK).
3. 0.25 $\mu\text{l}$  : De dNTPs (désoxynucléotides triphosphates libres) (Amersham, Piscataway, NJ ; dATP+dTTP+dCTP+dGTP ; 25mM chacun, UK).
4. 0.5 $\mu\text{l}$  : De l'amorce F (amorce sens) (Eurofins ; Forward primer ; 25pM/ $\mu\text{L}$ , UK).
5. 0.5 $\mu\text{l}$  : De l'amorce R (amorce antisens) (Eurofins ; Reverse primer ; 25pM/ $\mu\text{L}$ , UK).
6. 18.75 $\mu\text{l}$  : De l'eau pour PCR.
7. 0.5 $\mu\text{l}$  : De Taq polymérase (Bioline-BIOTAQ™DNA Polymerase ; 5unités/ $\mu\text{L}$ , UK).
8. Au master mix, ajouter à la fin 1 $\mu\text{L}$  de l'ADN du prélèvement à identifier. Dans le contrôle négatif (H<sub>2</sub>O), ajouter 1 $\mu\text{L}$  d'eau au mélange master mix PCR suscité.
9. Mettre les microtubes PCR (master mix+1 $\mu\text{L}$  de l'ADN de l'échantillon) dans le thermocycleur (Stratagene Gradient Robocycler™ 96, UK) programmé pour lancer l'amplification.

Les programmes utilisés dans les amplifications de l'ADN, dépendent de l'espèce d'*Eimeria* spp du poulet à déterminer. Le tableau ci-après mentionne les différents programmes :

**Tableau 4. Programmes d'amplification selon l'espèce d'*Eimeria* spp du poulet (ITS1 primers, Eurofins ; 25pM/ $\mu$ L, UK).**

Fenêtre	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée
Fenêtre 1	1	95	7 minutes
		95	20 secondes
		60	<i>E. acervulina</i>
		45	<i>E. brunetti</i>
		51	<i>E. maxima</i>
Fenêtre 2	35	54	<i>E. mitis</i>
		44	<i>E. necatrix</i>
		54	<i>E. praecox</i>
		60	<i>E. tenella</i>
		72	
Fenêtre 3	1	72	1 minute 5 minutes

**Tableau 5. Séquences d'ADN et températures d'hybridations des amorces ITS1 (ITS1 primers, Eurofins ; 25pM/ $\mu$ L, UK) ; tailles prévues des produits d'amplifications, de l'ADN des espèces *Eimeria* spp, par l'ITS1-PCR (Jenkins et al., 2006).**

Espèce d' <i>Eimeria</i>	Amorce (Primer)	Séquence des produits PCR (5'-3') des amorces (Primers) des espèces d' <i>Eimeria</i> spp	Température d'hybridation (°C)	Taille (Nucléotide)
<i>E. acervulina</i>	EAF <sup>A</sup>	GGCTTGGATGATGTTTGCTG	60	321
	EAR <sup>A</sup>	CGAACGCAATAACACACGCT		
<i>E. brunetti</i>	EBF <sup>A</sup>	GATCAGTTTGAGCAAACCTTCG	45	310
	EBR <sup>A</sup>	TGGTCTTCCGTACGTCGGAT		
<i>E. maxima</i>	EMAF <sup>B</sup>	CGTGTGAGAARACTGRAAGGG	51	144
	EMAR <sup>B</sup>	GCGGTTTCATCATCCATCATCG		
<i>E. mitis</i>	EMIF <sup>C</sup>	TATTCCTGTCGTCGTCGTCGC	54	306
	EMIR <sup>C</sup>	GTATGCAAGAGAGAATCGGGA		
<i>E. necatrix</i>	ENF <sup>A</sup>	TACATCCCAATCTTTGAATCG	44	285
	ENR <sup>A</sup>	GGCATACTAGCTTCGAGCAAC		
<i>E. praecox</i>	EPF <sup>C</sup>	CATCATCGGAATGGCTTTTTGA	54	368
	EPR <sup>C</sup>	AATAAAATAGCGCAAAATTAAGCA		
<i>E. tenella</i>	ETF <sup>A</sup>	AATTTAGTCCATCGCAACCCT	60	271
	ETR <sup>A</sup>	CGAGCGCTCTGCATACGACA		

<sup>A</sup> : Séquences des amorces ITS1 des espèces, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. tenella* (Schnitzler et al., 1998) ; <sup>B</sup> : Séquence de l'amorce ITS1 de l'espèce *E. maxima* (Lew et al., 2003) ; <sup>C</sup> : Séquences des amorces ITS1 des espèces *E. mitis*, *E. praecox* (Schnitzler et al., 1999).

#### 7.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

##### 7.2.4.1. Préparation du gel d'agarose 2%

La taille des produits d'amplifications, de l'ADN des espèces d'*Eimeria* spp du poulet, par l'ITS1-PCR, est comprise entre 144 et 368 nucléotides ; il s'agit de petits segments d'ADN. Pour ce faire, il est recommandé d'utiliser un gel d'agarose à la concentration de 2% (au lieu de 1%).

Le protocole de préparation du gel d'agarose à 2% est donné ci-après :

- À l'aide d'une bande adhésive (ou d'un autre moyen), sceller les extrémités d'un moule d'électrophorèse (en plastique propre et sec). Positionner le peigne adéquat de façon à former des puits complets au moment de couler la solution d'agarose.
- Peser 0.6g d'agarose (en poudre), après quoi déposer la quantité pesée dans une fiole conique de 250mL.
- Ajouter 30ml de tampon 1xTBE (Tris-Borate-EDTA; 89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA; Thermo Fisher Scientific, UK).
- Mélanger en remuant doucement, ensuite, faire chauffer (30 secondes environ), au micro-ondes à la puissance maximale, jusqu'à dissolution totale de la poudre d'agarose.
- Placer la fiole sur l'agitateur, afin de faire refroidir (jusqu'à atteindre environ la température de 50°C) la solution d'agarose 2%.
- Ajouter 3µL du gel GelRed™ (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10000x in Water ; Biotium, UK), après quoi faire remuer sur l'agitateur. Le GelRed™ est un colorant d'acides nucléiques en gel qui remplace le Bromure d'éthidium (toxique et mutagène).
- Verser la quantité totale, de la solution d'agarose 2%, dans le moule et laisser le gel se figer. La quantité de gel utilisée devrait correspondre à une épaisseur d'environ 3 à 5mm.
- Laisser le gel se solidifier à la température de la salle d'électrophorèse.

#### 7.2.4.2. Préparation et dépôt des échantillons

A l'issue du programme appliqué sur le thermocycleur, les microtubes PCR (0.2ml) sont transférés à partir de la machine vers la salle d'électrophorèse et placés dans de la glace pilée.

Une fois à l'intérieur de la salle d'électrophorèse on procède aux étapes suivantes :

*1. Immersion du gel dans le tampon TBE :* Enlever la bande adhésive, placer le gel solidifié (le gel reste dans le moule) dans un réservoir d'électrophorèse horizontal (Jencons™, UK), puis immerger, totalement, le gel dans le tampon 1xTBE (environ 200mL), après quoi, retirer soigneusement le peigne.

2. *Densification de l'ADN* : Déposer, puis mixer à l'aide d'une micropipette, dans des tubes stériles (0.5mL) ou sur des morceaux de parafilm (Parafilm<sup>TM</sup>M, SIGMA, USA) : 10µL du produit PCR (solution d'ADN) avec 5µl de la solution tampon de charge (Loading buffer : Bioline Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue, UK ; 1 volume du tampon de charge dans 4 volumes de la solution d'ADN de l'échantillon).

L'ajout du tampon de charge, permet de suivre l'avancée de l'ADN dans le gel (le bleu de bromophénol qui est un marqueur coloré) permettant à l'échantillon de sombrer dans le gel.

3. *Dépôts des échantillons dans les puits du gel* : A l'aide d'une micropipette, prélever 10µl du mélange (ADN+ tampon de charge), après quoi déposer, doucement et verticalement (la micropipette), toute la quantité aliquotée dans le puits du gel, en veillant soigneusement à ne déchirer le gel.

Il est recommandé de déposer les échantillons dans les puits, en suivant un ordre bien déterminé afin de ne pas perdre la traçabilité de chaque prélèvement.

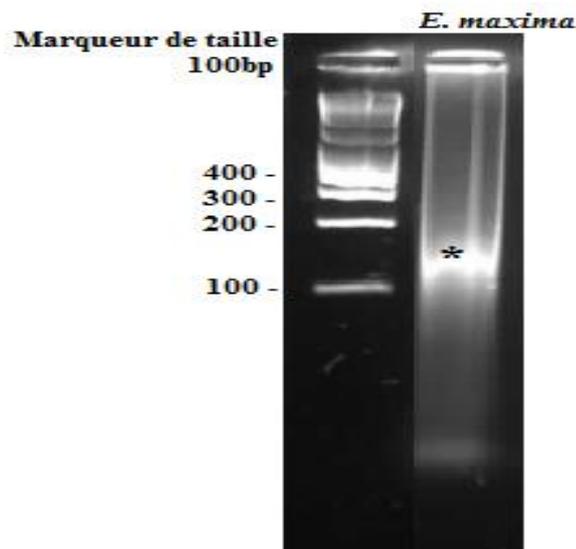
Le contrôle négatif (H<sub>2</sub>O) est, généralement, déposé au dernier puits à un volume de l'ordre de 10µL, tandis que le marqueur ADN (HyperLadder<sup>TM</sup>100bp, Bioline, UK) est déposé dans le premier et/ou le dernier puits, à un volume de 5µL.

S'il existe des contrôles positifs, il est recommandé de les déposer directement entre la première ligne du marqueur ADN et les prélèvements à identifier.

4. *Migration électrophorétique horizontale* : Après le dépôt des échantillons dans les puits du gel, le réservoir d'électrophorèse est fermé par le couvercle puis relié à un générateur d'électrophorèse (Consort EV233, Dominique Dutscher, Germany), sous une tension de l'ordre de 110volts pendant 1h30. Les fragments d'ADN, chargés négativement (groupements phosphate) se séparent et se déplacent vers l'anode d'autant plus vite qu'ils sont plus petits. Ils ne sont jamais directement repérables dans le gel à l'œil nu. Le suivi de la migration électrophorétique s'effectue en observant le bleu de bromophénol (colorant), qui migre à la vitesse d'un fragment d'ADN de 120pb.

5. *Révélation du gel* : Lorsque la migration s'achève, le gel est sorti de la cuve puis mis dans un transilluminateur installé dans une chambre à UV (UV

Transilluminators for use with G : BOX systems, Syngene, UK), le tout étant relié à un microordinateur et un écran. Le but est de visualiser les bandes d'ADN colorés par le GelRed™ et d'interpréter la migration en se référant à la taille des segments d'ADN amplifiés des sept espèces d'*Eimeria* spp du poulet (Tableau 5). Les image des bandes d'ADN migrées sur le gel sont observées sur l'écran, capturées et enregistrées à l'aide d'un logiciel spécial (GeneSys software, Syngene, UK) (Figure 2).



**Figure 2. Détermination, par la technique ITS1-PCR, de l'espèce *E. maxima* dans un prélèvement de fientes de poulet de chair-Jijel, Algérie.** \*: Bande correspondant à l'espèce *E. maxima* (Taille du fragment d'ADN amplifié = 144 nt). 100-bp DNA markers (HyperLadder™100bp, Biorline, UK).

## 8. ELABORATION DES VACCINS TESTES

### 8.1. Vaccin inactivé (mort) par les radiations micro-ondes

Les oocystes sporulés d'*E. tenella* sont lavés plusieurs fois puis resuspendus dans la solution PBS (pH =7.2) (voir les techniques ci-dessus), après quoi, un décompte oocystal est réalisé, par la technique McMaster modifiée (Taylor et al., 1995), dans le but de déterminer la dose oocystale/ml (50 000 oocystes/2mL).

La suspension oocystale est fractionnée en quantités de 6ml dans des récipients en verre à microonde, les quantités fractionnées étant mises individuellement dans un four micro-ondes (Electrolux EMM21150W, Sweden) à la puissance de 800 W pendant 90secondes (82.5 à

85°C) et ce, dans le but d'inactiver les oocystes sporulés *E. tenella* (**Bouchet et Boulard, 1991 ; Ortega et Liao, 2006**).

## 8.2. Vaccin vivant atténué par les rayons Ultraviolets C

Les oocystes sporulés d'*E. tenella* sont lavés plusieurs fois puis resuspendus dans la solution PBS (pH =7.2) (voir les techniques ci-dessus), après quoi, un décompte oocystal est réalisé, par la technique McMaster modifiée (Taylor et al., 1995), dans le but de déterminer la dose oocystale/mL (5000 oocystes/mL).

La suspension oocystale est fractionnée en quantités de 5-10mL, puis déposées en couche mince ( $\leq 1$  mm) dans des récipients en verre à microondes (**Zhao et al. 2013**). Les quantités fractionnées étant mises individuellement dans une chambre noire en bois fermée (Longueur=100cm ; Largeur=50cm ; Hauteur=50cm), tapissée totalement de papier aluminium, d'une épaisseur de l'ordre de 0.2mm. Le rôle du papier aluminium est d'assurer une bonne réflexion des rayons UV sur les suspensions oocystales mises à l'intérieur (**Coblentz et Stair, 1929**).

La chambre est équipée intérieurement :

- A son plafond d'une lampe germicide à UV-C (TUV T8 ; TUV 30W G30T8, Philips, Holland), reliée à une alimentation électrique, une minuterie et un variateur de tension électrique (**Kniel et al., 2007 ; Abdel-Baki et al., 2009 ; Jenkins, données non publiées**).
- Sur le plancher (au-dessous de la lampe) d'un UV-mètre (UV Light Meter, YK-35UV, China), afin de mesurer l'intensité ( $160 \text{ mW/cm}^2$ ) et la longueur d'onde (253.7-254nm) des radiations UV-C produites par la lampe UV (**Kniel et al., 2007 ; Abdel-Baki et al. 2009**).
- Sur le plancher (au-dessous de la lampe) d'un agitateur (Drehzahl electronic- IKA-COMBIMAG REO, Germany) sur lequel sont déposés les récipients de prélèvements, assurant une exposition homogène des oocystes aux UV.

L'atténuation des oocystes sporulés d'*E. tenella* est réalisée par leur exposition aux rayons UV-C (253.7-254nm), pendant 60minutes (**Kniel et al., 2007 ; Abdel-Baki et al., 2009**).

## Conclusion

Les coccidioses du poulet sont des maladies toujours d'actualité, pesant encore très lourd sur l'aviculture algérienne et mondiale. La chimiothérapie anticoccidienne a jugulé partiellement ces parasitoses autorisant la pérennité des élevages et de l'industrie avicole sur plusieurs décennies. Toutefois, la chimiorésistance manifestée par les *Eimeria* spp du poulet vis-à-vis de toutes les molécules anticoccidiennes utilisées, rend incertain l'avenir de cette industrie mondiale. A l'instar des études de la chimiorésistance des *Eimeria* spp, faites sur presque les quatre coins du monde, notre travail (axé sur la résistance ou la sensibilité) sur les deux espèces *Eimeria maxima* et *Eimeria acervulina* présentes dans le pool d'isolats étudié, révèle une résistance complète de celles-ci, vis-à-vis du monensin et du narasin, une résistance partielle envers la salinomycine et le lasalocide, une sensibilité complète vis-à-vis du diclazuril. Ce profil de sensibilité (ou de résistance) anticoccidienne, a été basé sur la réduction des scores lésionnels, par rapport au lot non inoculé non traité et l'index anticoccidien (ACI) décrit par le Professeur H David Chapman.

L'émergence de souches d'*Eimeria* spp résistantes aux anticoccidiens a permis aux chercheurs de penser à des solutions alternatives, notamment, l'immunisation par des vaccins anticoccidiens vivant virulent, vivant atténué, ou recombinant. Quoique la vaccination anticoccidienne s'avère une solution attractive et efficace, peu d'études ont traité de l'aspect pratique de la vaccination anticoccidienne et les désavantages qui s'en sont suivis, notamment, la cherté des vaccins importés (commercialisé en Algérie) et l'introduction de souches vivantes des différentes espèces d'*Eimeria* spp du poulet antigéniquement différentes par rapport aux souches locales. Sur la foi des résultats de la deuxième étude expérimentale, de ce travail, nous pouvons conclure que les deux vaccins élaborés dans notre laboratoire (inactivé et atténué) et qui contiennent l'espèce *Eimeria tenella* ont permis le développement d'un statut immunitaire capable d'enrayer une coccidiose caecale aigue mortelle. La protection développée après une double immunisation est plus forte que celle manifestée après immunisation en une seule reprise.

L'utilisation de vaccins à base de souches locales, permet d'éviter éventuellement le problème du manque de l'immunité croisée entre les différentes souches et/ou espèces d'*Eimeria* spp, de là on peut conclure, également, que l'immunisation par les souches locales d'*Eimeria* spp

## Conclusion

du poulet s'avère plus intéressante d'autant que l'élaboration des vaccins anticoccidiens peut s'effectuer par des moyens moins onéreux, ce qui est le cas dans ce travail.

L'atténuation ou l'inactivation des microorganismes, notamment, les protozoaires par les moyens physiques et/ou chimiques, dans le but d'élaborer des vaccins, est un créneau captivant qui mérite d'être lancé dans notre pays et ce, pour lutter contre certaines maladies potentiellement dévastatrices, notamment, les protozooses telles que les coccidioses des autres espèces, les piroplasmoses, la leishmaniose etc.

## Recommandations et perspectives

Pour mieux contrôler la coccidiose du poulet et de là, rentabiliser davantage les élevages du poulet au sol, il est très recommandé d'utiliser les molécules anticoccidiennes les plus efficaces et tâcher de les préserver en procédant régulièrement :

1-A la réalisation d'anticoccidiogrammes afin :

- D'identifier les différentes espèces d'*Eimeria* spp présentes dans les isolats du terrain Algérien et d'évaluer leur pouvoir pathogène.
- D'évaluer l'efficacité de différentes molécules anticoccidiennes utilisées dans le terrain.
- De sélectionner les molécules les plus efficaces dans les élevages concernés.
- De bien choisir le moment de l'administration ou de retrait d'une molécule.

2- A l'élaboration de programmes navette et de rotation (molécules de synthèse/ ionophores/ vaccins anticoccidiens) permettant de restaurer ou d'augmenter la sensibilité des *Eimeria* spp vis-à-vis des produits anticoccidiens (**Chapman, 2000 ; Chapman et al., 2002**).

Toutefois, la réalité du terrain fait apparaître que les molécules anticoccidiennes existantes sur le marché, notamment, celles testées dans cette étude (Diclazuril, monensin, narasin, lasalocide, salinomycine) ne sont pas aussi efficaces que par le passé, et l'introduction des additifs anticoccidiens dans les aliments de volailles peuvent être limitées à l'avenir.

La vaccination paraît comme étant une solution attractive ; Selon **Chapman (2000)**, le contrôle immunologique de la coccidiose s'avère la seule alternative à la chimiothérapie dans la lutte contre cette parasitose. Bien que de considérables recherches aient été entreprises sur les mécanismes de base impliqués dans l'acquisition de l'immunité, peu d'attention a été donnée aux aspects pratiques de la vaccination, notamment, l'élaboration de vaccins à base de souches locales d'*Eimeria* spp (issues du terrain), qui s'avère selon plusieurs recherches, très efficaces à stimuler, chez les poulets vaccinés, une immunité protectrice capable de prévenir un épisode aigüe mortel d'une coccidiose caecale.

En sus de leur efficacité, les vaccins anticoccidiens à base de souches locales permettent, également, d'éviter les problèmes de diversité antigéniques de souches d'*Eimeria* spp (problème entraîné par les vaccins commercialisés) et ceux de l'immunité croisée incomplète

## Recommandations et perspectives

(ou absente) entre souches d'*Eimeria* spp d'une même espèce et par conséquent le manque (ou absence) d'efficacité des vaccins anticoccidiens.

## مرض الكوكسيديا عند الدجاج: دراسة دوائية ومناعية

مرض الكوكسيديا عند الدجاج مرض طفيلي كثير الانتشار، يسببه طفيلي من نوع اليميريا *Eimeria* وهو من الطفيليات الداخلية وحيدة الخلية والذي يصيب امعاء هذه الدواجن، فمنها ما يصيب الامعاء الدقيقة كيميريا ماكسيا *Eimeria maxima* و ايميريا اسيرفولينا *Eimeria acervulina* مؤدية الى تأخر كبير في النمو مما يؤثر على الناحية الاقتصادية لقطع التسمين، ومنها ما يصيب الاعورين كيميريا تينبلا *Eimeria tenella* وهي شديدة الخطورة تؤدي الى نسبة نفوق مرتفعة نتيجة اسهال دموي.

ينقسم هذا العمل الى دراستين:

- 1- الأولى تتمثل في إجراء اختبار على الدجاج اللاحم (سلالة Cobb 500) مربى في بطارية من أجل تقييم مقاومة (أو حساسية) نوعين من اليميريا *Eimeria*: ايميريا ماكسيا *Eimeria maxima* و ايميريا اسيرفولينا *Eimeria acervulina* موجودان في مركز ايميري محلي مكون من مجموعة من العزلات الميدانية (جيجل-الجزائر)، ضد خمسة ادوية مضادة للكوكسيديا (ديكلازوريل Diclazuril، لازالوسيد Lasalocide، موننسين Monensin، ناراسين Narasin، سالينومايسين Salinomycine). في مجمل تقييم المقاومة الكوكسيديا، وذلك استنادا الى المؤشر المضاد للكوكسيديا (anticoccidial index) و درجة انخفاض الالتهابات المعوية مقارنة بزمرة الدجاج الغير مصاب بالكوكسيديا و الغير معالج بالمضادات الكوكسيديا، نستطيع ان نستخلص النتائج التالية: مقاومة كلية للايميريا المختبرة ضد الموننسين و Monensin و الناراسين Narasin، مقاومة جزئية ضد السالينومايسين و Lasalocide و الازالوسيد Salinomycine و حساسية كاملة إزاء الديكلازوريل Diclazuril.
- 2- الثانية تهدف إلى تقييم فعالية وسلامة لقاحين مضادين للكوكسيديا الاعورية المسببة من طرف ايميريا تينبلا *Eimeria tenella*. اللقاحان صنعا داخل مخبرنا ويحتويان على مركز ايميري مكون من سلالة محلية (جيجل-الجزائر) للايميريا تينبلا *Eimeria tenella*: الأول عبارة عن لقاح ميت (تم قتل اليميريا تينبلا *Eimeria tenella* بواسطة اشعة الميكروويف)، اما الثاني فيتمثل في لقاح حي مضعف (تم تضعيف اليميريا تينبلا *Eimeria tenella* بواسطة الأشعة فوق البنفسجية). تم اختبار سلامة وفعالية اللقاحات بشكل منفصل في تجربتين منفصلتين على الدجاج اللاحم (سلالة Cobb 500) مربى على الأرض. في كل تجربة تم تحصين زميرتين من الكتاكيت باستخدام اللقاح (لقاح واحد لكل تجربة) بعدها قمنا بإصابة هذه الكتاكيت باليميريا تينبلا *Eimeria tenella* وذلك في اليوم ال 20 من العمر، ثم بعد ذلك تم تطعيم المجموعة الأولى مرة واحدة فقط في اليوم الاول من العمر، وتم تطعيم المجموعة الثانية مرتين: في اليومين الأول ثم الثامن من العمر. يجدر الإشارة الى انه وفي كلتا التجربتين تم اعتماد زميرتين اخرتين، الكتاكيت فيها غير مطعمة: الأولى أصيبة الكتاكيت فيها تجريبيا باليميريا تينبلا *Eimeria tenella*، اما الثانية فلا. لقد قمنا في هذه الدراسة من خلال التجربتين السالفتي الذكر باتخاذ المعايير التالية وذلك لتقييم فعالية وسلامة اللقاحين: الوزن الصافي للطيور، معامل التحويل الغذائي، نسبة الدم في البراز، نسبة النفوق، درجة الالتهاب المعوي الاعوري، نسبة الإنتاج البرازي للبويضات الناضجة المتبوعة. في كل من التجربتين نستنتج ما يلي: كل من اللقاحين استطاعا تخفيف مناعة وقائية حصنت الدجاج المصاب باليميريا تينبلا *Eimeria tenella* من وقوعه في المرض. نستطيع القول أيضا ان التطعيم المضاعف (بجرعتين) أكثر فعالية من التطعيم بجرعة واحدة.

**الكلمات المفتاحية:** الدجاج اللاحم، الكوكسيديا، ايميريا، الاعورين، المضادات الكوكسيديا، لقاح مضاد للكوكسيديا، معامل التحويل الغذائي، الالتهاب المعوي، البويضات الناضجة المتبوعة.

## RESUME

### Coccidiose du poulet : Etude pharmacologique et immunologique

Les coccidioses du poulet sont des parasitoses, causées par des coccidies du genres *Eimeria* spp, se développant et se multipliant dans le tube digestif du poulet et causant : soit une forme clinique aigue, mortelle, traduite par des diarrhées hémorragiques, il s'agit de la coccidiose caecale, due à l'espèce *Eimeria tenella* ; soit des formes sub-cliniques manifestées par des performances de croissances (Poids et indice consommation) médiocres, elles sont causées par plusieurs espèces dont les plus fréquentes *Eimeria acervulina* et *Eimeria maxima*.

La présente étude est axée sur deux volets :

- 1- Le premier consiste à évaluer la résistance (ou la sensibilité) d'un pool d'isolats de terrain (Jijel-Algérie) contenant les deux espèces *Eimeria acervulina* et *Eimeria maxima*, vis-à-vis de cinq molécules anticoccidiennes (diclazuril, lasalocide, monensin, narasin, salinomycine) et ce, par le biais de la réalisation d'un anticoccidiogramme sur des poussins chair de souche Cobb 500 .Le profil de sensibilité anticoccidienne, basé sur la réduction des scores lésionnels, par rapport au lot non inoculé non traité, et l'index anticoccidien (ACI), révèle une résistance complète aux monensin, narasin ; une résistance partielle envers la salinomycine et le lasalocide, une sensibilité complète vis-à-vis du diclazuril.
- 2- Le deuxième est consacré à l'élaboration de deux types de vaccins anticoccidiens contenant l'espèce *Eimeria tenella*, isolée à partir des élevages de poulet de chair (Algérie-Jijel). Le premier vaccin est inactivé, par les radiations microondes, tandis que le deuxième est vivant atténué par les rayons Ultraviolets-C. L'efficacité et l'innocuité des deux vaccins ont été testées séparément, sur deux élevages expérimentaux séparés de poulets de chair élevés au sol. Les sujets vaccinés ont fait l'objet d'inoculation par la suite, par une dose de l'ordre de 50000 oocystes sporulés d'*Eimeria tenella*/sujet. Dans les deux expérimentations, l'immunisation s'est effectuée sur deux programmes : Un lot a été vacciné en une seule prise (1<sup>er</sup> jour d'âge), le second a été immunisé à deux reprises (1<sup>er</sup> jour d'âge, 8<sup>ème</sup> jour d'âge). Les deux vaccins élaborés, ont manifesté une efficacité partielle ayant jugulé des épisodes cliniques aigus de la coccidiose caecale, à travers les critères évalués dans l'étude, notamment, le poids moyen, l'indice de consommation, les taches de sang sur la litière, le score lésionnel et l'excrétion oocystale. La vaccination à la fréquence de deux reprises s'avère plus efficace que l'immunisation en une seule fois.

**Mots clés :** Coccidioses, *Eimeria*, molécule anticoccidienne, anticoccidiogramme, Cobb 500, scores lésionnels, index anticoccidien, vaccin anticoccidien, oocystes sporulés, radiations microondes, Ultraviolets-C.

## ABSTRACT

### Chicken's coccidiosis: Pharmacological and immunological study

Broiler coccidiosis is caused by coccidia parasites of the genus *Eimeria* spp, developing and multiplying in the gut of the chicken and causing either an acute deadly clinical form manifested by bloody diarrhea, it is caecal coccidiosis caused by *Eimeria tenella* ; or subclinical forms manifested by poor growth performance (weight index and consumption), they are caused by several species, the most frequent *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*.

This work has been done on two studies:

- 1- The first, consists in carrying out a battery test on broiler chickens (Cobb 500), in order to evaluate the resistance (or sensitivity) of a pool of field isolates (Jijel-Algeria) containing the two species *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*, against five anticoccidial drugs (Diclazuril, lasalocid, monensin, narasin, salinomycin). The anticoccidial sensitivity profile, based on the reduction of lesion scores compared to non-infected non-medicated control and the anticoccidial index (ACI), reveals complete resistance to monensin, narasin; partial resistance to salinomycin and lasalocid, complete sensitivity to diclazuril.
- 2- The second study aimed to evaluate the efficacy and safety of two anticoccidial vaccines, derived from local strains, against caecal coccidiosis, caused by *Eimeria tenella*, in broiler chickens. The first is inactivated (by microwave radiation) while the second is a live attenuated vaccine (attenuation by Ultraviolet-C). The safety and efficacy of the two vaccines were tested separately on two separate experiments on boiler chicks (Cobb 500) raised on floor. Two groups of chicks were vaccinated using the prepared vaccine and challenged at day 20 of age. The first group was vaccinated only once, at day 1 post hatching, the second group was vaccinated twice (day 1 and day 8 post hatching). The study used two non-vaccinated control groups; the first group was challenged with *Eimeria tenella* (50 000 sporulated oocysts/bird), while the second remained uninfected. The evaluation criteria were body weight, feed conversion ratio (FCR), blood in faeces, survival rate, lesion scores and oocyst output per gram of faeces (OPG). In both experiments, the two vaccinated groups had an overall better performance comparing to the non-vaccinated challenge group. In conclusion, it seems that the two anticoccidial vaccines are effective in stimulating protective immunity in vaccinated chickens against caecal coccidiosis. Although vaccination with two divided doses seems more effective than immunization with a single dose.

**Keywords :** Broiler, Coccidiosis, *Eimeria*, battery test, anticoccidial drugs, Cobb 500, lesion score, anticoccidial index, anticoccidial vaccine, oocystes sporulés, conversion ratio.

## Références bibliographiques

- **AbdelBaki, A., Allam, G., Sakran, T., El-Malah.** 2009. Attenuated *Sarcocystis ovicanis* sporocysts induced protective immunity to lambs. *The Korean Journal of Parasitology* **47**: 131-138.
- **Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Anderson, R.A., Anderson, R.O., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., Mccourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Q., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R.** 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**: 399-451.
- **Al-Attar, M. A., Fernando, M. A.** 1987. Transport of *Eimeria necatrix* sporozoites in the chicken: effects of irritants injected intraperitoneally. *Journal of Parasitology* **73**: 494-502.
- **Allen, P. C., Fetterer, R. H.** 2002. Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 58–65.
- **Allocco, J. J., Profous-Juchelka, H., Myers, R. W., Nare, B., Schmatz, D. M.** 1999. Biosynthesis and catabolism of mannitol is developmentally regulated in the protozoan parasite *Eimeria tenella*. *Journal of Parasitology* **85** : 167-173.
- **Amer, M. M., Ghany, W. A.A., Amer, M. A., Hanafei, A. E. A., Zohair, G. A.** 2007. The efficacy of Diclazuril (liquid formulation) in the prevention and control of coccidiosis in broiler chicken. *Journal of Veterinary Medicine* **5<sup>th</sup> Scientific Conference**: 96- 101.
- **Assis, R. C.L., Luns, F. D., Belleti, M. E., Assis, R. L., Nasser, N. M., Faria, E. S. M., Cury, M. C.** 2010. Histomorphometry and macroscopic intestinal lesions in broiler broilers infected with *Eimeria acervulina*. *Veterinary Parasitology* **168**: 185-198.
- **Bafundo, K.W., Cervantes, H.M., Mathis, G.F.** 2008. Sensitivity of *Eimeria* Field Isolates in the United States : Responses of Nicarbazin-Containing Anticoccidials. *Poultry Science* **87**: 1760-1767.
- **Bajnok, J., Boyce, K., Rogan, M.T., Craig, P.S., Lun, Z.R., Hide, G.** 2015. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in localized populations of *Apodemus sylvaticus* is linked to population genotype not to population location. *Parasitology* **142**: 680-690.
- **Bajwa, R.S., Gill, B.S.** 1975. Effect of irradiation (Gamma-Rays) on oocysts of *Eimeria tenella*. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* **1** : 31-36.
- **Ball, S.J.** 1966. The development of resistance to glycarbylamide and 2-chloro-4-nitrobenzamide in *Eimeria tenella* in chicks. *Parasitology* **56** : 25–37.
- **Banik, S., Bandyopadhyay, S., Ganguly, S.** 2003. Bioeffects of microwave- a brief review. *Bioresource Technology* **87**: 155-159.
- **Barker, I.K.** 1993. Pathological processes associated with coccidiosis. In: Barta, J.R., Fernando, M.A. Proceeding of the VI<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference, Guelph, Department of Pathology, Ontario College, University of Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada. pp. 81-94.

- **Bedrnik, P.** 1983. Evaluation of sensitivity of coccidia to ionophores. *Arch.Geflügelk* **47**: 129-133.
- **Bedrník, P., Jurkovic, P., Kucera, J., Firmanová, A.** 1989. Cross resistance to the ionophorous polyether anticoccidial drugs in *Eimeria tenella* isolates from Czechoslovakia. *Poultry Science* **68** : 89-93.
- **Bedrnik, P., Yvoré, P., Hiepe, Th., Mielke, D., Drossigk, U.** 1995. Guidelines for evaluation the efficacy and safety in chickens of live vaccines against coccidiosis and recommendations for registration. In : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp. 190-201.
- **Bekhti, K., Perry, P.** 1989. *In vitro* interactions between murine macrophages and *Eimeria falciformis* sporozoites. *Research in Immunology* **140** : 697-709.
- **Bessay, M., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Yvoré, P., Quéré, P.** 1996. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in chickens : comparative study between *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Veterinary Research* **27** : 503-517.
- **Beugnet, F., Polack, B., Dang, H., ANG., H.,** 2004. *Atlas de coproscopie. Techniques de coproscopie*, Clichy: Ed. Kalianxis, France, pp. 5-15.
- **Bouchet, F., Boulard, Y.** 1991. Ultrastructural changes following treatment with a microwavepulse in the oocyst of *Eimeria magna* Perard, 1925. *Parasitology Research* **77** : 585-589.
- **Braunius, W.W.,** 1986. Incidence of *Eimeria* species in broilers in relation to the use of anticoccidial drugs, Proc Georgia Conference, University of Georgia, Athens, pp. 116-123.
- **Braunius, W.W.,** 1987. Some aspects of epidemiology and control of coccidiosis in broilers. Ph.D. Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Utrecht, Utrecht, Netherlands.
- **Bukhari, Z., Hargy, T. M., Bolton, J. R., Dussert, B., Clancy, J. L.** 1999. Medium-pressure UV for oocyst inactivation. *Journal - American Water Works Association* **91** : 86-94.
- **Carson, F.L., Hladik, C.** 2009. Histotechnology A Self-Instructional Text, troisième édition, Chicago, ASCP Press, pp.400.
- **Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Teixeira, M., Albuquerque, G.R.** 2011. Molecular diagnosis of *Eimeria* species affecting naturally infected Gallus gallus. *Genetics and Molecular Research* **10** : 996-1005.
- **Cavalier-Smith, T.** 1991. Cell diversification in heterotrophic flagellates. In: Patterson D.J., Larsen, J. (eds). The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates, Oxford University Press, pp. 113-131.
- **Cavalier-Smith, T.** 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **73** : 203-266.
- **Cavalier-Smith, T.** 2002a. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 297-354.
- **Cavalier-Smith, T.** 2003a. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology* **39** : 338-34.
- **Cavalier-Smith, T.** 2004. Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London* **271** : 1251-1262.

- **Cavalier-Smith, T., Chao, E. E.** 2004. Protalveolate phylogeny and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.) *European Journal of Protistology* **40** : 21-48.
- **Celandroni, F., Longo, I., Tosoratti, N., Giannessi, F., Ghelardi, E., Salvetti, S., Baggiani, A., Senesi, S.** 2004. Effects of Microwave Radiation on *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 1220-1227.
- **Challey, J. R., Burns, W. M. C.** 1959. The Invasion of the Cecal Mucosa by *Eimeria tenella* sporozoites and their Transport by Macrophages. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **6** :238-241.
- **Chapman, H.D.** 1976. *Eimeria tenella* in chickens: studies on resistance to the anticoccidial drugs monensin and lasalocid. *Veterinary Parasitology* **2**:187-196.
- **Chapman, H.D.** 1978. The effect of monensin on the immunity arising from repeated low-level infections with *Eimeria maxima*, *E. brunetti* and *E. tenella*. *Avian Pathology* **7** : 269-277.
- **Chapman, H. D.** 1980. Studies on the sensitivity of field isolates of *Elmeria maxima* to combinations of anticoccidial drugs. *Avian Pathology* **9** : 67-76.
- **Chapman, H.D.** 1982a. The use of enzyme electrophoresis for the identification of the species of *Eimeria* present in field isolates of coccidia. *Parasitology* **85** : 437-442.
- **Chapman, H.D.** 1982b. The sensitivity of field isolates of *Eimeria acervulina* type to monensin. *Veterinary Parasitology* **9**: 179-83.
- **Chapman, H. D.** 1984a. Drug resistance in avian coccidia (A review). *Veterinary Parasitology* **15** : 11-27.
- **Chapman, H. D.** 1984b. *Eimeria tenella*: experimental development of resistance to monensin in the chicken. *Parasitology* **89**: 9-19.
- **Chapman, H. D.** 1986. Isolates of *Eimeria tenella*: Studies on resistance to ionophorous anticoccidial drugs. *Research in veterinary science* **41**: 281- 282.
- **Chapman, H. D.,** 1989a. Field isolates of *E. tenella*: sensitivity to diclazuril, maduramicin, narasin, salinomycin and mixture of nicarbasin/narasin. In: Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, *Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France* Paris, INRA Publications, pp. 323- 326.
- **Chapman, H. D.** 1989b. The sensitivity of field isolates of *E. tenella* to anticoccidial drugs in the chicken. *Research in veterinary science* **47**: 125-128.
- **Chapman, H.D.** 1994. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to monensin following the use of a coccidiosis vaccine in broiler chickens. *Poultry Science* **73** : 476-478.
- **Chapman, H. D.** 1997. Biochemical, genetics and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology* **28**: 221-224.
- **Chapman, H. D.** 1998. Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. *International Journal for Parasitology* **28** : 1141-1144.
- **Chapman, H.D.** 2000. Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World Poultry Science Journal* **56**:7-20.
- **Chapman, H.D.** 2001. Use of anticoccidial drugs in broiler chickens in the USA : analysis for the years 1995–1999. *Poultry science* **80** : 572-580.
- **Chapman, H. D.,** 2005. Perspectives for the control of coccidiosis in poultry by chemotherapy and vaccination. In: Proceedings of The IX<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference. Foz de Iguassu, Parana, Brazil, pp.99- 103.

- **Chapman, H.D., Cherry, T. D., Danforth, T.H.D., Richards, G., Shirley, M.W., Williams, R.B.** 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology* **32**:617-629.
- **Chapman, H. D., Hacker, A.B.** 1994. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken. *Poultry Science* **73**: 1404-1408.
- **Chapman, H.D., Jeffers, T.K., Williams, R.B.** 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry Science* **89**: 1788-1801.
- **Chapman, H., Jeffers, T. K.** 2014. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal for Parasitology : Drugs and Drug Resistance* **4** :214–217.
- **Chapman, H. D., Rayavarapu, S.** 2007. Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens on new or reused litter. *Avian Pathology* **36** : 319-323.
- **Chapman, H.D., Shirley, M.W.** 1989. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* species to monensin and lasalocid in the chicken. *Research in Veterinary Science* **46** : 114-117.
- **Chapman, H. D., Shirley, M.W.** 2005. Eight decades of research on *Eimeria* in poultry. In: Proceedings of The IX<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference. Foz de Iguassu, Parana, Brazil, pp. 29-34.
- **Chappel, L.R., Babcock, W.E.** 1979. Field trials comparing salinomycin (Coxistac), monensin and lasalocid in the control of coccidiosis in broilers. *Poultry science* **58** : 304-307.
- **Chermette, R., Bussi eras, J.** 1992. Parasitologie V et erinaire, Vol 2 : Protozoologie, Edit e par le S ervice de Parasitologie, ENVA, pp.10-60.
- **Cho, M., Choi, Y., Park, H., Kim, K., Woo, G. J., Park, J.** 2007. Titanium dioxide/UV photocatalytic disinfection in fresh carrots. *Journal of Food Protection* **70** : 97-101.
- **Clancy, J. L., Hargy, T. M., Marshall, M. M., Dyksen, J. E.** 1998. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. *Journal - American Water Works Association* **90** : 92-102.
- **Coblentz, W.W., Stair, R.,** 1929. Ultra-violet reflecting power of aluminium and several other metals. *Bureau of Standards Journal of Research* **4**: 189-193.
- **Conder, G.A., Williams, J.F.** 1983. The microwave oven : A novel means of decontaminating parasitological specimens and glassware. *Journal of Parasitology* **69** : 181-1855.
- **Conway, D.P., Dayton, A.D., Mckenzie, M.E.** 1999. Comparative testing of anticoccidials in broiler chickens: the role of coccidial lesion scores. *Poultry Science* **78**: 529-535.
- **Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, A.D.** 1990. Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. *Avian Pathology* **19** : 489-496.
- **Conaway, D, P., McKenzie, M.E.** 2007. Poultry coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures, 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp.5-138.
- **Conway, D. P., Sasai, K., Gaafar, S. M., Smothers, C. D.** 1993. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. *Avian Diseases* **37** : 118-123.
- **Coombs, G. H., Denton, H., Brown, S. M., Thong, K. W.** 1997. Biochemistry of the coccidia. *Advances in Parasitology* **39** : 141-226.

- **Corliss, J.O.** 1998. Classification of protozoa and protists: the current status. In: Coombs, G.H, Vickerman, K., Sleigh, M.A., Warren, A. (eds). Evolutionary relationships among Protozoa, Kluwer, Dordrecht, pp.409-447.
- **Corliss, J.O.** 2001. Protozoan Taxonomy and Systematics. Nature Publishing Group, pp 1-7.
- **Clarke, M.L., Diaz, M., Guilloteau, B., Hudd, D.L., Stoker, J.W.** 1974. European field evaluation of monensin, a new anticoccidial agent. *Avian Pathology* **3** : 25-35.
- **Coudert, P., Licois, D., Drouet-Viard, F.** 1995. *Eimeria* species and strains of rabbits. In : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp. 52-78.
- **Crane, M.S.J., Goggin, B., Pellegrino, R. M., Ravino, O. J., Lange, C., Karkhanis, Y. D., Kirk, K. E., Chakraborty, P. R.,** 1991. Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen. *Infection and Immunity* **59** :1271-1277.
- **Creveu-Gabriel, I., Naciri, M.** 2001. Effet de l'alimentation sur les coccidioses du poulet. *INRA Production Animale* **14** : 231-246.
- **Crouch, C.F., Andrews, S. J., Ward M. J. Francis, M. J.** 2003. Protective efficacy of a live attenuated anticoccidial vaccine administered to 1-day-old chickens. *Avian Pathology* **32** :297-304.
- **Danforth, H.D.** 1998. Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *International Journal for Parasitology* **28**:1099-1109.
- **Dauguschies, A., Gässlein, U., Rommel, M.** 1998. Comparative efficacy of anticoccidials under the conditions of commercial broiler production and in battery trials. *Veterinary Parasitology* **76**:163-171.
- **Davies, F. M., Joyher, L.P.** 1962. Infection of the fowl by the parenteral inoculation of oocysts of *Eimeria*. *Nature* **194**: 996-997.
- **Davis, P.J., Parry, S.H., Porter, P.**1978. The role of secretory IgA in anticoccidial immunity in the chicken. *Immunology* **34** : 879-888.
- **Davis, P.J., Porter, P.**1979. A mechanism for secretory IgA-mediated inhibition of the cell penetration and intracellular development of *Eimeria tenella*. *Immunology* **36** : 471-477.
- **Delaplane, J. F., Batchelder, R.M., Higgins, T.C.** 1947. Sulfaquinoxaline in the prevention of *Eimeria tenella* infections in chickens. *North American Veterinarian* **28**: 19-24.
- **Denton, H., Thong, K. W., Coombs, G. H.** 1994. *Eimeria tenella* contains a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase and a pyruvate kinase with unusual allosteric regulators. *FEMS Microbiol Lett* **115**: 87-91.
- **Dodd, N.S., Lord, J.S., Jehle, R., Parker, S., Parker, F., Brooks, D.R., Hide, G.** 2014. *Toxoplasma gondii*: prevalence in species and genotypes of British bats (*Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*). *Experimental Parasitology* **139** : 6-11.
- **Diffey, B.L.** 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology* **36** : 299-328.
- **Doran, J. D.** 1966. The Migration of *Eimeria acervulina* Sporozoites to the Duodenal Glands of Lieberkühn. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **13**: 27-33.
- **Dubremetz, J.F., Schwartzman, J.D.,** 1993. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Research in Immunology* **144**: 31-33.

- **Duncanson, P., Terry, R.S., Smith, J.E., Hide, G.** 2001. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal for Parasitology* **31**: 1699-1703.
- **Edgar, S. A.** 1992. Field diagnosis of coccidiosis in chickens. Agri-Bio Corporation.
- **Eckert, J., Taylor, M., Catchpole, J., Licois, D., Coudert, P., Bucklar, H.** 1995. Identification of *Eimeria* species and strains. In : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp.103-119.
- **El-Banna, H. A., El-Bahy, M. M., El-Zorba, H. Y., El-Hady, M.** 2005. Anticoccidial efficacy of drinking water soluble Diclazuril on experimental and field coccidiosis in broiler chickens. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* **52** : 287-291.
- **El-Bastawaisy, R., Khalafalla, I.** 2009. Evaluation of inhibition of *Eimeria tenella* sporozoites by antibody fragments expressed in pea. Thesis: Doctor medicinae veterinariae. Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, pp 2-80.
- **Erickson, M. C., Ortega, Y.R.** 2006. Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection* **69** : 2786-2808.
- **Euzéby, J.**, 1981. Diagnostic expérimental des helminthoses animales. Travaux pratiques d'helminthologie vétérinaire. Tome I: généralités, diagnostic ante mortem, Informations Techniques des Services Vétérinaires, Paris, France, pp. 340.
- **Euzéby, J.** 1986. Protozoologie médicale comparée, Vol I : Généralités-Sarcomastigophores (Flagellés, Rhizopodes) - Ciliés, Fondation Mérieux Edition, pp. 3-26.
- **Euzéby, J.** 1987. Protozoologie médicale comparée, Vol II : Infection déterminées par les Myxozoa (Myxosporidioses.l.) et les Microspora (Microsporidioses.l.) - Infection déterminées par les Sporozoa (Sporozoaires) : Généralités sur les Sporozoa, Coccidioses s.l., (incluant les infections coccidiennes du mésenchyme et des parenchymes et, notamment, la Toxoplasmose), Fondation Mérieux Edition, pp. 62-257.
- **Euzéby, J.**, 1987. Protozoologie médicale comparée, Vol II, Fondation Mérieux Edition, pp. 62-257.
- **Euzéby, J.** 1998. Les parasites des viandes : épidémiologie, physiopathologie incidences zoonosiques, Edition Médicales Internationales, pp. 13-19.
- **Fayer, R., Reid, W.M.** 1982. Control of coccidiosis. In : Long, P. L. (eds). The Biology of the Coccidia, University Park Press, Baltimore, Md, pp. 453-487.
- **Fernando, M. A., McCraw, B. M.** 1973. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. *Journal of Parasitology* **59** : 493-501.
- **Fernando, M. A., Rose, M.R., Millard, B.J.** 1987. *Eimeria* spp. of Domestic Fowl: The Migration of Sporozoites Intra- and Extra-Enterically. *The Journal of Parasitology* **73**: 561-567.
- **Fish, F.** 1931. The effect of physical and chemical agents on the oocysts of *Eimeria tenella*. *Science* **73** : 292-293.
- **Fish, F.** 1932. Some factors in the control of coccidiosis of poultry. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **80** : 543-559.
- **Fitz-Coy, S. H.** 1992. Antigenic variation among strains of *Eimeria maxima* and *E. tenella* of the chicken. *Avian Diseases* **36**: 40-43.
- **Fitz-Coy, S. H., Edgar, S. A.** 1992. Effects of *Eimeria mitis* on egg production of single-comb White Leghorn hens. *Avian Diseases* **36**: 718-721.

- **Fortier, B., Dubermetz, J.F.**, 1993. Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. **23** : 148-153.
- Fortier, J., Hould, R. 2003. Histotechnologie Théories et procédés, Montréal, Centre collégial de développement de matériel didactique, pp. 717.
- **Foster, A. O.** 1949. The economic losses due to coccidiosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **52**: 434-442
- **Freifelder, D.** 1987. Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> ed. Boston, USA. Jones and Bartlett, pp. 277-292.
- **Frigg, M., Schramm, H.** 1977. Comparative anticoccidial activity of lasalocid sodium (Avatec) in chicks. Efficacy against European strains of coccidia. *Arch Geflügelk* **41** :31-34.
- **Fry, M., Hudson, A.T., Randall, A.W., Williams, R.B.** 1984. Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in *Eimeria tenella* (Apicomplexa : Coccidia). *Biochemical Pharmacology* **33** :2115-2137.
- **Fu, H.M., Lee, Y.C.** 1976. Immunological studies on chemically attenuated oocysts of chicken caecal coccidia. *Journal of the Chinese Society of Veterinary Science* **2** : 51-55.
- **Gasser, R. B., Skinner, R., Fadavi, R., Richards, G., Morris, G.** 2005. High-throughput capillary electrophoresis for the identification and differentiation of seven species of *Eimeria* from chickens. *Electrophoresis* **26** : 3479-3485.
- **Gasser, R. B., Woods, W. G., Wood, J. M., Ashdown, L., Richards, G., Whithear, K. G.** 2001. Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. *Electrophoresis* **22** : 3546-3550.
- **Geysen, J., Ausma, J., Van den Bossche, H.** 1991. Simultaneous purification of merozoites and schizonts of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) by percoll flotation and assessment of cell viability with a double fluorescent dye assay. *Journal of Parasitology* **177** : 989-993.
- **Guo, F.C., Suo, X., Zhang, G.Z., Shen, J.Z.** 2007. Efficacy of decoquinate against drug sensitive laboratory strains of *Eimeria tenella* and field isolates of *Eimeria* spp. in broiler chickens in China. *Veterinary Parasitology* **147**: 239-245.
- **Hamet, N., Bertrand, F., Tremblay, C.**, 1988. Le diagnostic de la coccidiose clinique dans les élevages industriel de poulets de chair, Edition Lilly, pp. 214-254.
- **Harm, W.**, 1980. Biological Effects of Ultraviolet Radiation. Cambridge University Press, UK, pp. 2331.
- **Hashmi, H., Issot, N. J., Maqbool, A.** 1994. Experimental induction of coccidiosis in broiler chicks with *Eimeria tenella* and comparative efficacy of different prophylactic measures against the disease. *Journal of Animal Health and Production* **14**: 55-63.
- **Haug, A., Anne-Gerd Gjevne, A. G., Thebo, P., Jens G. Mattsson, J. G., Kaldhusda, M.** 2008. Coccidial infections in commercial boilers : epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. *Avian Pathology* **37** : 161- 170.
- **Holdsworth, P.A., Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, D., Chapman, H.D., Mathis, G.H., Skinner, J.T., Mundt, H.C., Williams, R.B.** 2004. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Veterinary Parasitology* **121**: 189-212.
- **Honigberg, B.M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.O., Gojdics, M., Hall, R.P., Kudo, R.R., Levine N.D., Loeblich, A.R. Jr., Weiser, J., Wenrich, D.H.** 1964. A revised classification of the phylum Protozoa. *Journal of Protozoology* **11**: 7-20.

- **Horton-Smith, J., Beattie, J., Long, P. L.** 1661. Resistance to *Eimeria tenella* and its Transference from one Caecum to the other in Individual Fowls. *Immunology* **4** : 111-121.
- **Isobe, T., Lillehoj, H. S.** 1993. Dexamethasone suppresses T cell-mediated immunity and enhances disease susceptibility to *Eimeria mivati* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **39** :431-446.
- **Jankiewicz, H, A., Scofield, R. H.,** 1934. The administration of heated oocysts of *Eimeria tenella* as a means of establishing resistance and immunity to cecal coccidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **84** : 507-526.
- **Jay, J.M.** 2000. Modern Food Microbiology, 6<sup>th</sup> edition. Springer – Verlag, pp. 323-339.
- **Jeffers, T.K.** 1975. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *Journal of Parasitology* **61** : 1083-1090.
- **Jeffers, T.K.** 1976a. Reduction of anticoccidial drug resistance by massive introduction of drug sensitive coccidia. *Avian diseases* **20**: 649-653.
- **Jeffers, T., K.** 1984. Correlated response of coccidia to polyether ionophorous antibiotics. In : Proceedings of the 17<sup>th</sup> World's Poultry Congress, Helsinki, Finland, pp. 589.
- **Jeffers, T., K.** 1989. Anticoccidial drug resistance : a review with emphasis on the polyether ionophores. In: Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, *Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France* Paris, INRA Publications, pp. 295- 308.
- **Jeffers, T. K., Bentley, E. J.** 1980. Experimental development of monensin resistance in *Eimeria meleagridis*. *Poultry Science* **59**: 1731-1735.
- **Jeffers, T.K., Tonkison, L.V., Callender, M.E.** 1988. Anticoccidial efficacy of narasin in battery cage trials. *Poultry Science* **67**: 1043-1049.
- **Jenkins, M. C., Augustine, P. C., Danforth., H. D., Barta, J.R.** 1991. X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response. *Infection and Immunity* **59** : 4042- 4048.
- **Jenkins, M., Klopp, S., Ritter, D., Miska, K., Fetterer, R.** 2010. Comparison of *Eimeria* species distribution and salinomycin resistance in commercial broiler operations utilizing different coccidiosis control strategies. *Avian diseases* **54** :1002-1006.
- **Jenkins, M.C., Miska, K., Klopp, S.,** 2006a. Improved polymerase chain reaction technique for determining the species composition of *Eimeria* in poultry litter. *Avian Diseases* **50**: 632-635.
- **Jenkins, M.C., Miska, K., Klopp, S.,** 2006b. Application of polymerase chain reaction based on ITS1 rDNA to speciate *Eimeria*. *Avian Diseases* **50**: 110-114.
- **Jenson, J.B., Edgar, S.A,** 1976. Possible secretory function of the rhoptries of *Eimeria magna* during penetration of cultured cells. *Journal of Parasitology* **62** : 988-992.
- **Jeurissen, S. H. M., Janse, E. M., Vemeulen, A. N., Vervelde., L.** 1996. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **54**:231-238.
- **Johnson, W.T.** 1923. Avian coccidiosis. *Poultry Science* **2**: 146-163.
- **Johnson, W.T.**1924. *Eimeria avium* and the diagnosis of avian coccidiosis. *Poultry Science* **3**: 41-57.

- **Johnson, W.T.**1927. Immunity or resistance of chickens to coccidial infection. *Oregon Agricultural College Experiment Station, Station Bulletin 230*, pp. 5-31.
- **Johnson, J., Reid, W.M.** 1970. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental parasitology* **28**: 30-36.
- **Joyner, P., Norton, C. C.** 1973. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitology* **67** : 333-340.
- **Kawazoe, U., Bordin, E.L., De Lima, C.A., Viana Dias, L.A.** 2005. Characterisation and histopathological observations of a selected Barazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. *Veterinary parasitology* **131**: 5- 14.
- **Khan, I.A., Casciotti, L.,** 1999. IL-15 prolongs the duration of CD8+ T cellmediated immunity in mice infected with a vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* **163** : 4503-4509.
- **Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K.** 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* **350** : 423-429.
- **Kniel, K. E., Shearer, A.H., Cascarino, J. L., GARY C. Wilkins, G. C., Jenkins, M.C.** 2007. High Hydrostatic Pressure and UV Light Treatment of Produce Contaminated with *Eimeria acervulina* as a *Cyclospora cayetanensis* Surrogate. *Journal of Food Protection* **70** : 2837-2842.
- **Kokut, M. H., Gore, T. C., Long, P. L.** 1984. *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, and *Eimeria adenoides*: Peripheral blood leukocyte response of chickens and turkeys to strains adapted to the turkey embryo. *Experimental Parasitology* **58**: 63-71.
- **Konjufca, V., Jenkins, M., Wang, S., Juarez-Rodriguez, M.D.** 2008. Immunogenicity of recombinant attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine strains carrying a gene that encodes *Eimeria tenella* antigen SO7. *Infection and Immunity* **76** : 5745-5753.
- **Kopko, S. H., Martin, D.S., Barta, J.R.,** 2000. Responses of Chickens to a Recombinant Refractile Body Antigen of *Eimeria tenella* Administered Using Various Immunizing Strategies. *Poultry Science* **79**: 336-342.
- **Kučera, J.** Identification of *Eimeria* species in Czechoslovakia. *Avian Pathology* **19**: 59-66.
- **Kutzer, E., Freiler, I., Leibetseder, J., Mitterlehner, A.** 1985. Untersuchungen fiber die Wirkung eines neuen Antikokzidiums (Bay Vi 9142) bei Broilern. II. *Wien Tierztl Mschr* **72** : 330-334.
- **Kutzer, E., Leibetseder, J.** 1985. Untersuchungeniiber die Wirkung eines neuen Antikokzidiums (Bay Vi 9142) bei Broilern. *Wien Tierirztl Mschr* **72** : 321-330.
- **Landers, E.J.** 1960. Studies on excystation of coccidial oocysts. *Journal of Parasitology* **46** :195–200.
- **Lawn, A. M., Rose, M. E.** 1982. Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *Journal of Parasitology* **68** :1117-1123.
- **Lee, J.J., Hutner, S.H., Bovee, E.C.** 1985. An Illustrated Guide to the Protozoa. Allen Press, Lawrence, Kansas, pp. 599.
- **Lehmann, A. R., Norris, P.G.** 1990. DNA repair deficient hotodermatoses. *Seminars in Dermatology* **9** : 55-62.
- **Leuckart, R.** (1879-1886). Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herru hrenden Krankheiten. C.F, Winter Leipzig, pp. 221–334.
- **Levine, P. P.** 1939. The effect of sulfanilamide on the course of experimental avian coccidiosis. *Cornell Veterinarian* **29**: 309-320.

- **Levine, N. D.** 1982. Taxonomy and life cycles of Coccidia. In : Long, P.L. (eds). The Biology of the Coccidia, University Park Press, Baltimore, Md, pp. 1-33.
- **Levine, N.D.** 1985. Phylum II. Apicomplexa Levine 1970. In: Lee, J.J., Hutner, S.H., Bovee, E.C. (eds.), An Illustrated Guide to the Protozoa, Allen Press, Lawrence. KS, 322-74.
- **Levine, N.D.** 1988. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. Journal of Protozoology **35**: 518-520.
- **Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Hoigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D. H., Merinfeld, D., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F. G.** 1980. A newly revised classification of the Protozoa. Journal of Protozoology **27**:37-58.
- **Lew, A. E., Anderson, G. R., Minchin, C. M., Jeston, P. J., Jorgensen, W. K.,** 2003. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Veterinary Parasitology* **112**: 33-50.
- **Lillehoj, H. S.** 1987. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis : cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and Immunity* **55** :1616-1621.
- **Lillehoj, H.S.** 1991. Cell-mediated immunity in parasitic and bacterial diseases. In : Sharma, J.M. (eds). In : Avian Cellular Immunology, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 155-182.
- **Lillehoj, H. S.** 1994. Analysis of *Eimeria acervulina* induced-changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Research in Veterinary Science* **56** :1-7.
- **Lillehoj, H.S.** 1998. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *International Journal for Parasitology* **28**:1071-1081.
- **Lillehoj, H.S, Bacon, L.D.** 1991. Increase of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 antigen following challenge infection with *Eimeria acervulina*. *Avian Diseases* **35** : 294-301.
- **Lillehoj, H.S., Ding, X., Dalloul, R.A., Sato, T, Yasuda, A, Lillehoj, E.P.** 2005. Embryo vaccination against *Eimeria tenella* and *E. acervulina* infections using recombinant proteins and cytokine adjuvante. *Journal of Parasitology* **91** : 666-673.
- **Lillehoj, H.S., Lillehoj, E. P.** 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases* **44**:408-425.
- **Lillehoj, H.S., Trout, J. M.** 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical Microbiology Reviews* **9** :349-360.
- **Lillie, R.D.** 1965. Histopathologic Technique and Practical Histochemistry. 3<sup>rd</sup> ed. New York, NY, USA: McGraw-Hill, pp. 525-558.
- **Litjens, J.B.,** 1986. The relationship between coccidiosis and the use of anticoccidials in broilers in southern part of the Netherlands. Proc Georgia Conference, University of Georgia, Athens, pp. 442-448.
- **Long, P.L., Johnson, J., Baxter, S.** 1985. *Eimeria tenella* : relative survival of drugresistant and drug-sensitive populations in floor pen chickens. *Poultry Science* **64** : 2403-2405.
- **Long, P.L., Johnson, J., Wyeth, R.D.** 1980. *Eimeria tenella* : Clinical effects in partially immune and susceptible chickens. *Poultry Science* **59** : 2221-2224.

- **Long, P.L., Millard, B. J.** 1976. Studies on site finding and site specificity of *Eimeria praecox*, *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* in chickens. *Parasitology* **73**: 327-336.
- **Long, P.L., Millard, B. J.** 1977. *Eimeria*: Immunisation of young chickens kept in litter pens. *Avian Pathology* **6** : 77-92.
- **Long, P.L., Reid, W.M.** 1982. A guide for diagnosis of coccidiosis in chickens, Research report 404, August 1982, department of poultry science, the University of Georgia, Athens.
- **Long, P.L., Rose, M. E.** 1970. Resistance to *Eimeria* infections in the chicken : the effects of thymectomy, bursectomy, whole body irradiation and cortisone treatment. *Parasitology* **60** : 291-299.
- **Logan, N.B., McKenzie, M.E., Conway, D.P., Chappel, L.R., Hammet, N.C.** 1993. Anticoccidial efficacy of semduramicin. 2. Evaluation against field isolates including comparisons with salinomycin, maduramicin and monensin in battery tests. *Poultry Science* **72**: 2058-2063.
- **Li, G.Q., Kanu, S., Xiao, S.M., Xiang, F.Y.** 2005. Responses of chickens vaccinated with a live attenuated multi-valent ionophore-tolerant *Eimeria* vaccine. *Veterinary Parasitology* **129** : 179-186.
- **Lin, D., Tian, F., Wu, H., Gao, Y., Wu, J., Zhang, D., Ji, M., McManus, D. P., Driguez, P., Wu, G.** 2011. Multiple vaccinations with UV- attenuated cercariae in pig enhance protective immunity against *Schistosoma japonicum* infection as compared to single vaccination. *Parasites & Vectors* **4** : 1-10.
- **Losson, B.** 1996. Protozoologie vétérinaire. Cours de parasitologie vétérinaire. Université de Liège, pp. 53-110.
- **Maes, L., Coussemont, W., Vanparijs, O., and F. Verheyen, F.** 1989. Species-specificity action of diclazuril (Clinacox) against different *Eimeria* species in the chicken. In: Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, *Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France* Paris, INRA Publications, pp. 259-264.
- **Maes, L., Vanparijs, O., Marsboom, R.** 1991. Effect of diclazuril (Clinacox<sup>®</sup>) on the development of protective immunity against *Eimeria tenella* : laboratory trial in broiler chickens. *Poultry Science* **70** : 504-508.
- **Martin, A. G., Danforth, H. D., Barta, J. R., Fernando, M. A.** 1997. Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. *International Journal for Parasitology* **27**: 527-533.
- **Mathis, G. F.** 1999. Anticoccidial sensitivity of recent field isolates of chicken coccidia. *Poultry Science* **78** :116.
- **Mathis, G.F., Broussard, C.** 2006. Increased level of *Eimeria* sensitivity to diclazuril after using a live coccidial vaccine. *Avian diseases* **50**: 321-324.
- **Mathis, G. F., McDougald, L.R.** 1987. Evaluation of interspecific hybrids of the chicken, guinea fowl, and Japanese quail for innate resistance to coccidia. *Avian diseases* **31**:740-745.
- **Mathis, G.F., McDougald, L.R.** 1989. Restoration of drug sensitivity on turkey farms after introduction of sensitive coccidia during controlled-exposure immunization. In: Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, *Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France* Paris, INRA Publications, pp. 339-343.

- **Mayberry, L.F., Marquardt, W.C., Nash, D, J., Plan, B.** 1982. Genetic dependent transmission of *Eimeria separata* from *Rattus* to three strains of *Mus musculus*, an abnormal host. *Journal of Parasitology* **68** :1124-1129.
- **Mayhew, R. L.** 1934. Studies on coccidiosis VI. Effect of early attack on egg production. *Poultry Science* **136**: 148-154.
- **Mayer, P.** 1869. Hematoxylin and eosin (H&E) staining protocol. *Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel* **12** :303.
- **McDonald, V., Shirley, M. W., Bellatti, M. A.** 1986. *Eimeria maxima* : characteristics of attenuated lines obtained by selection for precocious development in the chicken. *Experimental Parasitology* **61** :192-200.
- **McDonald, V., Shirley, M. W.** 2009. Past and future: Vaccination against *Eimeria*. *Parasitology* **136**: 1477-1489.
- **McDougald, L. R.** 1981. Anticoccidial drug resistance in the South-eastern United States: polyether, ionophorous drugs. *Avian diseases* **26**: 600- 609.
- **McDougald, L.R.** 1982. Chemotherapy of coccidiosis. In : Long, P.L. (eds). *The Biology of the Coccidia*, University Park Press, Baltimore, MD, pp. 373-427.
- **McDougald, L.R., DaSilva, J.M.L., Solis, J.,** 1986. Drug sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms. *Avian diseases* **30**: 690- 694.
- **McDougald, L.R., Fuller, L., Solis, J., Barga, M.** 1987. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler in Brazil and Argentina. *Avian diseases* **31**: 287-292.
- **McDougald, L. R., Reid, W. M.** 1997. Coccidiosis. In: Calnek, H. J. Barnes, C. W., Beard, W. M., Reid, H. W., Yoder, Jr. (eds). *Diseases of Poultry*, 10<sup>th</sup> Edition, Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 865-883.
- **McConkey, G. A.** 1999. Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** : 175-177.
- **McCully, R.M., van Niekerk, J.W., and Kruger, S.P.** 1967. Observations on the pathology of Bilharziasis and other parasitic infestations of *Hippopotamus amphibius* Linnaeus, 1758, from the Kruger National Park. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **34** : 563-618.
- **McLoughlin, D.K.** 1969. The influence of dexamethasone on attempts to transmit *Eimeria meleagrimitis* to chickens and *E. tenella* to turkeys. *The Journal of Protozoology* **16** :145-152.
- **McLoughlin, D.K., Chute, M.B.** 1979. Loss of amprolium resistance in *Eimeria tenella* by admixture of sensitive and resistant strains. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **46** :138-141.
- **McManus, E.C., Campbell, W.C., Cuckler, A. C.** 1968. Developpement of resistance to quinoline coccidiostats under field and laboratory conditions. *Journal of Parasitology* **54** :1190- 1193.
- **Michalski, W. P., Edgar, J. A., Prowse, S. J.** 1992. Mannitol metabolism in *Eimeria tenella*. *International Journal for Parasitology* **22**: 1157-1163.
- **Migaki, T.T., Chappel, L.R. and Babcock, W.E.** 1979. Anticoccidial efficacy of a new polyether antibiotic, salinomycin, in comparison to monensin and lasalocid in battery trials. *Poultry Science* **58** : 1192-1196.
- **Miller, G.A., Bhogal, B. S., Mccandiiss, R., Strausberg, R. L., Jessee, E.J.,** 1989. Characterization and vaccine potential of a novel recombinant coccidial antigen. *Infection and immunity* **57** : 2014-2020.
- **Morehouse, N. F., McGuire, W. C.** 1958. The pathogenicity of *Eimeria acervulina*. *Poultry Science* **37** : 665-672.

- **Morgan, J.A., Morris, G.M., Wlodek, B.M., Byrnes, R., Jenner, M., Constantinoiu, C.C., Anderson, G.R., Lew-Tabor, A.E., Molloy, J.B., Gasser, R.B., Jorgensen, W.K.** 2009. Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. *Molecular and Cellular Probes* **23**: 83-89.
- **Morris, G. M., Woods, W. G., Grant Richards, D., Gasser, R. B.** 2007. The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments. *Molecular and Cellular Probes* **21**: 288-294.
- **Muller, M., Lee, J. A., Gordon, P., Gaasterland, T., Sensen, C. W.** 2001. Presence of prokaryotic and eukaryotic species in all subgroups of the PP(i)- dependent group 11 phosphofructokinase protein family. *Journal of Bacteriology* **183** : 6714-6716.
- **Murray, P.K., Bhogal, B.S., Crane, MStJ., McDonald, T.T.** 1986. *Eimeria tenella*. In vivo immunization studies with sporozoite antigen. Research in Avian Coccidiosis. *Proceeding of the Georgia Coccidiosis Conference*, pp. 564-573.
- **Nabih, I., Abd El-Hamid, A.** 1984. Biochemical studies on the genetic material of fresh water snails intermediate hosts of schistosomiasis. I. Effect of UV-radiation as physical mutagen on the chemical nature of DNA. *Cellular and molecular biology***30** : 33-36.
- **Naciri, M., Brossier, F.** 2009. Les coccidioses aviaires : Importance et perspectives de recherche. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* **Tome 162**: 47-50.
- **Naciri, M., De Gussem, K., Fort, G., Bernardet, N., Nérat, F., Chaussé, A.M.** 2003 .Intérêt d'un anticoccidiogramme pour une prévention efficace de la coccidiose dupoulet. Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole.
- **Nakai, Y., Uchida, T., Kanazawa, K.** 1992. Immunization of young chicks by trickle infection with *Eimeria tenella*. *Avian Diseases* **36** :1034-1036.
- **Nilsson, A.,** 1996. Ultraviolet Reflections : Life Under a Thinning Ozone Layer. New York, USA. Wiley and Sons, Inc, pp. 26-37.
- **Norton, C.C., Catchpole, J., Evans, N. A.** 1989. Performance of an attenuated coccidiosis vaccine in floor-pen challenge studies. In: *Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France* Paris, INRA Publications, pp.677-682.
- **Norton, C.C., Catchpole, J., Joyner, L.P.** 1979. Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology* **79** : 231-248.
- **Patterson, D.J.** 2002. Changing views of protistan systematics: the taxonomy of protozoa: an overview. In: Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P. (eds). An illustrated guide to the protozoa, 2<sup>nd</sup> edi, Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, pp. 2-9.
- **Bedrnik, P., Yvoré, P., Hiepe, Th., Mielke, D., Drossigk, U.** 1995. Guidelines for evaluation the efficacy and safety in chickens of live vaccines against coccidiosis and recommendations for registration. In : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp. 190-201.
- **Pattillo, W. H.** 1959. Invasion of the Caecal Mucosa of the Chicken by Sporozoites of *Eimeria tenella*. *Journal of Parasitology* **45**: 253-258.
- **Peek, H.** 2010. Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers. Terverkrijging van de graad van doctor aande Universiteit Utrecht, pp. 1-401.

- **Peek, H.W., Landman, J.M.** 2003. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathology* 32: 391-401.
- **Peek, H.W., Landman, J.M.** 2004. Anticoccidial drug sensitivity profiles of German, Spanish and Dutch *Eimeria* spp. field isolates. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 127: 210-214.
- **Peek, H.W., Landman, W.J.** 2006. Higher incidence of *Eimeria* spp. Field isolates sensitive for diclazuril and monensin associated with the use of live coccidiosis vaccination with paracox-5 in broiler farms. *Avian Diseases* 50: 434-439.
- **Peeters, J.E., Derijcke, J., Verlinden, M., Wyffels, R.,** 1994. Sensitivity of avian *Eimeria* spp. To seven chemical and five ionophore anticoccidials in five Belgian integrated broiler operations. *Avian Diseases* 38: 483-93.
- **Perkins, M.E.** 1992. Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitology Today* 8 : 28-32.
- **Phillips, R.** 1983. Sources and applications of UV radiation. Academic Press, New York, 410-440.
- **Pierce, A. E., Long, P. L.** 1965. Studies on acquired immunity to coccidiosis in bursaless and thymectomized fowls. *Immunology* 9: 427-439.
- **Pout, D. D.** 1967. Villous atrophy and coccidiosis. *Nature* 213 : 306-307.
- **Prowse S.J.** 1991. Cell-mediated immunity to *Eimeria* in the fowl : the absence of cross- species protection is not due to the lack of cross-reactive T cells. Résultats de recherche. *International Journal for Parasitology* 21 : 133-138.
- **Orsat, V., Raghavan, G.S.V.** 2007. Microwaves in Postharvest Applications with Fresh Fruits and Vegetables. *Fresh Produce* 1 :16-22.
- **Ortega, Y.R., and Liao, J.** 2006. Microwave inactivation of *Cyclospora cayetanensis* sporulation and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Food Protection* 69 : 1957-1960.
- **Reid, W.M., Kowalski, L., Rice, J.** 1972. Anticoccidial activity of monensin in floor-pen experiments. *Poultry Science* 51 : 139-146.
- **Reid, W.M., Kowalski, L., Taylor, E.M., Johnson, J.** 1970. Efficacy evaluations of robenzidene for control of coccidiosis in chickens. *Avian Diseases* 14: 788-796.
- **Reinhardt, J. P., Booker, S. R.** 1933. Time of exposure and temperature as lethal factors in the death of the oocysts of *Eimeria mayairii*. a coccidium of the rat. *Iowa State College journal of science* 7 : 505-510.
- **Roberts, F., Roberts, C. W., Johnson, J. J., Kyle, D. E., Krell, T., Coggins, J. R., Coombs, G. H., Milhous, W. K., Tzipori, S., Ferguson, D. J., Chakrabarti, D., McLeod, R.** 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* 393 : 801-805.
- **Rose, M.E.** 1971. Immunity to coccidiosis : protective effect of transferred serum in *Eimeria maxima* infections. *Parasitology* 62 : 11-25.
- **Rose, M. E.** 1987. Immunity to *Eimeria* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17:333-343.
- **Rose M.E., Hesketh, P.** 1976. Immunity to coccidiosis : stages of the life-cycle of *Eimeria maxima* which induce, and are affected by, the response of the host. *Parasitology* 73 :25-37.
- **Rose, M. E., Hesketh, P.** 1982. Coccidiosis : T-lymphocyte dependent-effects of infection with *Eimeria nieschulzi* in rats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3 :499-508.

- **Rose, M. E., Lawn, A. M., Millard, B. J.** 1984. The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken. *Parasitology* **88** :199-210. 1984.
- **Rose, M. E., Long, P. L.** 1970. Resistance to *Eimeria* infections in the chicken : the effects of thymectomy, bursectomy, whole body irradiation and cortisone treatment. *Parasitology* **60** : 291-299
- **Rothwell, L, Gramzinski, R.A, Rose, M.E, Kaiser, P.** 1995. Avian coccidiosis : changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. *Parasite Immunology* **17**: 525-558.
- **Rousset, J. J.** 1993. Copro-parasitologie pratique: intérêt et méthodologie, notions sur les parasites du tube digestif. Editions ESTEM Paris, France, pp. 20-21.
- **Ruff, M. D.** 1986. Reasons for inadequate nutrient utilization during avian coccidiosis. Research in Avian Coccidiosis. In: McDougald, L.R., Joyner, J.P., Long, P. L. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp. 190-201.
- **Ruff, M. D.,** 1999. Important parasites in poultry production systems. *Veterinary Parasitology* **84**: 337-347.
- **Ruff, M. D., Chute, M. B., McLoughin, D. K.** 1985. Resistance to monensin medication in *Eimeria tenella*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **52** : 114- 118.
- **Ryley, J.F.** 1982. Treatment of veterinary protozoan infections. In : D.F. Merrick, D.F., S.S. Desser, S.S. (eds). Parasites -Their World and Ours. Elsevier, Amsterdam, pp. 319-326.
- **Ryley, J. F., Meade, R., Hazelhurst, J., Robinson, T. E.** 1976. Methods in coccidiosis research : separation of oocysts from faeces. *Parasitology* **73** : 311-326.
- **Scholtyssek, E.** 1979. Fine Structure of Parasitic Protozoa. An Atlas of Micrographs, Drawings and Diagram. *Journal of Basic Microbiology* (**20**): 362-363
- **Scholtyssek, E., d Mehlhorn, H.,** 1970. Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **34**: 97-127.
- **Schmatz, D. M., Baginsky, W. F., Turner, M. J.** 1989. Evidence for and characterization of a mannitol cycle in *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **32**: 263-270.
- **Schmitz, Y. N., Laverty, Z. S., Kraus, X.V.B., Aigner, T.** 2010. Basic methods in histopathology of joints tissus. *Osteoarthritis and Cartilage* **18** : 113-116.
- **Schneider, A.** 1875. Note sur la psorospermie oviforme du poulpe. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* **4** : 40-45.
- **Schnitzler, B. L., Thebo, P. L., Tomley, F. M., Uggla, A., Shirley, M. W.** 1999. PCR identification of chicken *Eimeria* : a simplified read-out. *Avian Pathology* **28**: 89-93.
- **Schnitzler, B. L., Thebo, P. L., Mattsson, J. G., Tomley, F. M., Shirley, M. W.** 1998. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathology* **27**: 490-497.
- **Schnitzler, B. E., P. Thebo, F. M. Tomley, M. W. Shirley, and A. Uggla.** 1997. Identification of *Eimeria* sp in poultry by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. In : Shirley, M. W., Tomley, F. M., Freeman, B. M. (eds). Control of coccidiosis into the next millennium. *Proceedings of the VII<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference*, pp.64.

- **Seikh, G.N., Verma, B.B., Thakur, D.K.** 1988. Chemoprophylactic and chemotherapeutic efficacy of lasalocid sodium (Avatec I), in: experimental intestinal coccidiosis of poultry. *Indian Veterinary Journal* **65** : 779-782.
- **Shi, Y.E., Jiang, C.F., Han, J.J., Li, Y.L., Ruppel, A.** 1990. *Schistosoma japonicum* : an ultraviolet-attenuated cercarial vaccine applicable in the field for water buffaloes. *Experimental Parasitology* **71** : 100-106.
- **Sharma, N. N.** 1964. Response of the Fowl (*Gallus domesticus*) to Parenteral Administration of Seven Coccidial Species. *The Journal of Parasitology* **50**: 509-517.
- **Sharma, N.N., Reid, M.W.** 1962. Successful infection of chickens after parenteral inoculations of oocysts of *Eimeria* spp. *Journal of Parasitology* **48**, pp. 33.
- **Shirley, M.W.** 1975. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitology* **71** : 369-76.
- **Shirley, M.W.** 1989. Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis of poultry. *Parasite Immunology* **11** :117- I24.
- **Shirley, M.W.** 1995. *Eimeria* species and stains of chickens. In : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp.1-25.
- **Bedrnik, P., Yvoré, P., Hiepe, Th., Mielke, D., Drossigk, U.** 1995. Guidelines for evaluation the efficacy and safety in chickens of live vaccines against coccidiosis and recommendations for registration. In : Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp. 190-201.
- **Shirley, M. W.** 2000. The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*-a coccidium from the chicken. *International Journal for Parasitology* **30**: 485-493.
- **Shirley, M. W., Bushell, A.C., Bushell, J.E., McDonald, V., Roberts, B.** 1995. Alive attenuated vaccine for the control of avian coccidiosis: trials in broiler breeders and replacement layer flocks in the United Kingdom. *Veterinary Record* **137**: 453-457.
- **Shirley, M. W., Long, P. L.,** 1990. Control of coccidiosis in chickens: immunization with live vaccines. In: Long, P. L. (eds). Coccidiosis of Man and domestic animals. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 321-341.
- **Shirley, M.W., Smith, A.L., Blake, D.P.** 2007. Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine* **25** : 5540–5547.
- **Smith, A. L., Hesketh, P., Andrew Archer, A., Shirley, M.S.** 2002. Antigenic Diversity in *Eimeria maxima* and the Influence of Host Genetics and Immunization Schedule on Cross-Protective Immunity. *Infection and Immunity* **70** : 2472-2479.
- **Smith, K.C.** 1966. Physical chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light. *Radiation Research* **6** : 54-79.
- **Smith, K. C., Lee, D.E.** 1986. Monosaccharide transport by *Eimeria tenella* sporozoites. *Journal of Parasitology* **72**:163-171.
- **Soulsby, E.J.L.** 1982. Coccidia of domestic fowl. In : Helinths, Arthropods and Protozoa of domesticated Animals, 7<sup>th</sup> edition, Edited by E.J.L. Soulsby. Baillière Tindall, London, UK. pp. 631-647.
- **Stallbaumer, M., Daisy, K.J.** 1988. The effects of monensin, narasin, salinomycin and nicarbazin, on field strains of chicken coccidia. *Avian Pathology* **17** : 793-801.
- **Stephan, B., Rommel M., Daugschies, A., Haberkorn, A.** 1997. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Veterinary Parasitology* **69** :19-29.

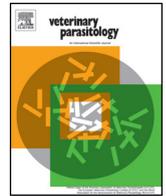
- **Su, Y. C., Fei, A. C., Tsai, F. M.** 2003. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence. *Veterinary Parasitology* **117**:221-227.
- **Taylor, M., Catchpole, J., Marshall, C., Norton, C., Green, J.** 1995. *Eimeria* species of sheep. In: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (eds). Guidelines on techniques in coccidiosis research, European Commission, Luxemburg, pp.25-39.
- **Trees, A, J.** 2001. Parasitic diseases. In: Alexander, D., Faragher, T., Pattison, M. (eds). Poultry diseases, 5<sup>th</sup> edition, Saunders, London, pp. 405-421.
- **Teeter, R. G., Beker, A., Brown, C., Broussard, C., Fitz-Coy, S., Radu, J., Newman, L.** 2008. Transforming coccidiosis-mediated lesion scores into production and calorific cost. *Proceedings of the Proceedings of the 23rd World Poultry Congress*, Brisbane, Australia, pp. 18-21.
- **Tenter, A.M., Bartab, J.R., Beveridgec, I., Duszynski, D.D., Mehlhorne, H.D., Morrisonf, D.A., Thompsong, R.C.A., Conrad, P.A.** 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. *International Journal for Parasitology* **32**: 595–616.
- **Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.,** 1979. Le diagnostic des verminoses par examen coprologique. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgique, pp. 33-35.
- **Trout, J. M., Lillehoj, H. S.** 1993. Transport of *Eimeria acervulina* sporozoites, evidence of a role for intestinal CD8lymphocytes and macrophages. *Journal of Parasitology* **79**:790-792.
- **Trout, J.M., Lillehoj, H. S.** 1995. *Eimeria acervulina* infection: evidence for the involvement of CD8T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poultry Science* **74** :1117-1125.
- **Trout, J.M., Lillehoj, H. S.** 1996. T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **53** :163-172.
- **Tsuji, N., Kawazu, S., Ohta, M., Kamio, T., Isobe, T., Shimura, K., Fujisaki, K.** 1997. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology* **83**:966–970
- **Tyzzler, E.E.** 1929. Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Hygiene* **10**: 269-383.
- **Tyzzler, E.E., Theiler, H., Jones, E.E.** 1932. Coccidiosis in gallinaceous birds II. A comparative study of species of *Eimeria* of the chicken. *American Journal of Hygiene***15**: 319-393.
- **Van Doornick, W. M., Becker, E. R.** 1957. Transport of *Eimeria necatrix* in macrophages. *Journal of Parasitology* **43**:40-44.
- **Velkers, F. C., Swinkels, W. J., Rebel, J. M., Bouma, A., Daemen, A. J., Klinkenberg, D., Boersma, W. J., Stegeman, J. A., De Jong, M. C., Heesterbek, J. A.,** 2010. Effect of *Eimeria acervulina* infection history on the immune response and transmission in broilers. *Veterinary Parasitology* **173**: 184-192.
- **Verheyen, A., Maes, L., Coussement, W., Vanparijs, O., Lauwers, F., Vlamincx, E., Marsboom, R.** 1989. Ultrastructural evaluation of the effects of diclazuril on the endogenous stages of *Eimeria maxima* and *E. brunetti* in experimentally inoculated chickens. *Parasitology Research* **75**: 604-610.
- **Vervelde, L., Vermeulen, A. N., Jeurissen, S. H.** 1995. *Eimeria tenella*: sporozoites rarely enter leukocytes in the cecal epithelium of the chicken (*Gallus domesticus*). *Experimental Parasitology* **81**: 29-38.

- **Vervelde, L., Vermeulen, A. N., Jeurissen, S. H.** 1996. In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunology* **18**: 247-303.
- **Vertommen, M. H., Peek, H.W.** 1989. Laboratory experiments on sensitivity of Dutch coccidia fields isoates to diclazuril. In: *Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France Paris*, INRA Publications, pp. 329- 332.
- **Vrba, V, Blake, D.P., Poplstein, M.,** 2010. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* specie sthat infect the chicken. *Veterinary Parasitology* **174**: 183-190.
- **Wallach, M., Pillemer, G., Yarus, S., Halabi, A., Pugatsch, T., Mencher, D.** 1990. Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen. *Infection and Immunity* **58**:557-562.
- **Wallach, M, Smith, N.C, Miller, C.M, Eckert, J, Rose, M.E.** 1994. *Eimeria maxima* : ELISA and western blot analyses of protective sera. *Parasite Immunology* **16** : 377-460.
- **Wallach, M., Smith, N.C., Petracca, M., Miller, C.M., Eckert, J., Braun, R.** 1995. *Eimeria maxima* gametocyte antigens : potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens. *Vaccine* **13** :347-454.
- **Wang, C., C.** 1982. Biochemistry and physiology of Coccidia. In: Long, P.L. (eds). *The biology of the coccidia*, Edward Arnold, London, pp. 167- 228.
- **Weber, G.M.,** 1989. Immunization of chicks by trickle infection with *Eimeria tenella* under medication with lasalocid. In: *Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France Paris*, INRA Publications, pp.693-696.
- **Weppelman, R. M., Battaglia, J. A., Wang, C. C.** 1977. *Eimeria tenella* : The selection and frequency of drug resistant mutants. *Experimental Parasitology* **42** : 56-66.
- **Williams, R.B.** 1996. Tracing the emergence of drug-resistance in coccidia (*Eimeria* spp.) of commercial broiler flocks medicated with decoquinate for the first time in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology* **135** : 1-14.
- **Williams, R.B.** 1997. The Mode of action of anticoccidial Quinolones (6-Decyloxy-4-hydroxyquinoline-3- carboxylates) in chickens. *International Journal for Parasitology* **27** : 101-111.
- **Williams, R.B.** 1998. The epidemiology of coccidiosis of chickens. In: Van Der Sluis, W.(eds). *World poultry, special supplement coccidiosis* **2**: 9-11.
- **Williams, R.B.** 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis in the world's chicken production industry. *International Journal of Parasitology* **29**: 1209-1229.
- **Williams, R.B.** 2001. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. *International Journal for Parasitology* **31**:1056-1069.
- **Williams, R.B.** 2002a. Anticoccidial vaccines for broiler chickens : pathways to success. *Avian Pathology* **31** : 317–353.
- **Williams, R.B.** 2002b. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). *Avian Diseases* **46**: 775-802.

- **Williams, R.B.** 2006. Tracing the emergence of drug-resistance in coccidia (*Eimeria* spp.) of commercial broiler flocks medicated with decoquinate for the first time in United Kingdom. *Veterinary Parasitology* **135** : 1-14.
- **Williams, R.B., Bushell, A.C., Répérant, J.M., Doy, T.G., Morgan, J.H, Shirley, M.W., Yvoré, P., Carr, M. M., Frémont, Y.** 1996. A survey of *Eimeria* species in commercially-reared chickens in France during 1994. *Avian Pathology* **25** : 113-130.
- **Williams, R. B., Carlyle, W. W., Bond, D. R., Brown, I. A.** 1999. The efficacy and economic benefits of Paracox, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom. *International Journal for Parasitology* **29**: 341-355.
- **Williams, R.B., Cathchpole, J.** 2000. A new protocol for challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. *Vaccine* **18**: 1178-1185.
- **Witcombe, D.M., Smith, N.C.** 2014. Strategies for anti-coccidial prophylaxis. *Parasitology* **141**: 1379-1389.
- **Witlock, D. R., Lushbaugh, W. B., Danforth, H. D., Ruff, M. D.** 1975. Scanning electron microscopy of the cecal mucosa in *Eimeria-tenella*-infected and uninfected chickens. *Avian Diseases* **19** :293-304.
- **Woods, W. G., Richards, G., Whithear, K. G., Anderson, G. R., Jorgensen, W. K., Gasser, R. B.,** 2000. High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation. *Electrophoresis* **21**: 3558-3563.
- **Xu, J., Peng, J., Tao, J.,** 2013. Adjuvant effect of Ginsenosides on recombinant SO7 antigen against *Eimeria tenella* in chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **12**:283-288.
- **Yvoré, P.** 1986. Physiology of the host response to coccidial infections. In: McDougald, L.R, Joyner, J.P., Long, P.L. (eds). Proceeding of the Georgia Coccidiosis Conference. Edited by Georgia University, Athens, Georgia, USA. pp. 128-168.
- **Yvoré, P., Dubois, M., Sauveur, B., Aycardi, J.** 1972. Pathogénie de la coccidiose duodénale à *Eimeria acervulina*. *Annales de recherches vétérinaires***3** : 61-82.
- **Yvoré, P., Pery, P., Laurent, F., Bessay, M.** 1993. Vaccins anticoccidiens. Bilan et perspectives. Article de synthèse. *Veterinary Research* **24** : 229-250.
- **Yun, C. H., Lillehoj, H. S., Lillehoj, E. P.,** 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 303-324.
- **Zhang, J. J., Wang, L. X., Ruan, W. K., AN, J.** 2013. Investigation into the prevalence of coccidiosis and maduramycin drug resistance in chickens in China. *Veterinary Parasitology* **191**: 29-34.
- **Zhu, G., McDougald, L.R.** 1992. Characterization in vitro and in vivo of resistance to ionophores in a strain of *Eimeria tenella*. *Journal of Parasitology* **78**:1067-1073.
- **Zhuo, W., Jianzhong, S., Xun, S., Shiyun, Z., Xingyun, G.,** 2006. Experimentally induced monensin-resistant *Eimeria tenella* and membrane fluidity of sprozoites. *Veterinary Parasitology* **138**: 186- 193.
- **Zhao, Y., Huang, B., Huang, S., Zheng, H., Li, Y., Lun, Z., Shen, J., Wang, Y., Kasper, L. H., Lu, F.** 2013. Evaluation of the adjuvant effect of pidotimod on the immune protection induced by UV-attenuated *Toxoplasma gondii* in mouse models. *Parasitology Research* **112**: 3151-3160.

# Annexe

Article paru dans la revue « Veterinary Parasitology », le 15 juillet 2016, intitulé :  
« *Evaluation of ionophore sensitivity of Eimeria acervulina and Eimeria maxima isolated from the Algerian to Jijel province poultry farms* »



## Research paper

# Evaluation of ionophore sensitivity of *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* isolated from the Algerian to Jijel province poultry farms



Samir Djemai<sup>a,\*</sup>, Abdeslam Mekroud<sup>a</sup>, Mark C. Jenkins<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory, P.A.D.E.S.C.A, University of Constantine, Algeria

<sup>b</sup> Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, ARS, USDA, Beltsville, MD 20705, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 January 2016

Received in revised form 23 April 2016

Accepted 26 April 2016

## Keywords:

Ionophore

*Eimeria*

Internal transcribed spacer 1 PCR

Anticoccidial index

## ABSTRACT

The present study represents the first description of ionophore resistance in recovered from commercial Algerian (Jijel-Algeria) broiler farms. Microscopy and intervening transcribed sequence 1 PCR (ITS1 PCR) revealed only 2 *Eimeria* species present in litter from these farms- namely *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. A pool of these isolates were evaluated in broiler chickens (Cobb 500) for sensitivity to 5 anticoccidial compounds-diclazuril (1 ppm), lasalocid (125 ppm), monensin (125 ppm), narasin (70 ppm) and salinomycin (60 ppm). As indicated by anticoccidial sensitivity profiles based on lesion scores and anticoccidial index (ACI), complete resistance to monensin and narasin, partial resistance to salinomycin and lasalocid, and complete sensitivity to diclazuril was observed. While lack of sensitivity to monensin is not surprising given its use for years as the sole anticoccidial compound, the resistance to monoether (narasin) and polyether (lasalocid) ionophores suggests that cross-resistance has developed in a segment of the *Eimeria* population. The fairly uniform *Eimeria* species composition among all poultry farms suggests that *E. acervulina* and *E. maxima* more rapidly develop resistance to ionophore drugs.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Control of avian coccidiosis continues to rely heavily on medication of poultry feed with ionophore drugs or synthetic chemicals. As a result, resistance in *Eimeria* to anticoccidial drugs has increased, forcing poultry producers to rotate among different compounds between grow outs (Jeffers, 1974; Chapman, 1993, 1997, 1998; Chapman and Hacker, 1994; Stephen et al., 1997; Peek and Landman, 2011). Another strategy is to alternate between anticoccidial compounds and vaccination in order to replace the drug-resistant strains in a poultry house with drug-sensitive strains in the vaccine (Chapman, 1994; Peek and Landman, 2006). Knowing which *Eimeria* species are present and the ionophore or synthetic chemical sensitivity of these coccidia is critical to making informed management decisions on when to rotate to a different anticoccidial compound or switch to vaccination. In Algeria, coccidiosis prevention in broiler production is dependent solely on chemoprophylaxis, and restricted to medication of feed with monoether ionophores. In the present study, *Eimeria* oocysts were isolated

from 34 poultry farms of which size varying between 3000–5000 birds, located in the Wilaya of Jijel (Algeria), and tested for sensitivity to 4 different ionophores and 1 synthetic chemical.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and their maintenance

A total of 280 one-day-old Cobb 500 broilers (mixed run) were purchased from a commercial hatchery and reared in disinfected stainless steel brooder batteries, and grown under 24 h lighting. The chickens were placed in groups of 10 animals per cage (height × width × length = 50 cm × 60 cm × 100 cm) at a density of 1 chick/60 cm<sup>2</sup>. Standard non-medicated poultry ration (corn 61.75%, soybean cake 35%, calcium carbonate 0.7%, bicalcic phosphate 1%, sodium chloride 0.025%, sodium bicarbonate 0.025%, mineral and vitamin supplement without anticoccidial 1.5%) and water was provided *ad libitum* for days 1–11. On day 5, all chicks received a bivalent vaccine against the Newcastle disease (HB1) and Infectious Bronchitis disease (H120) via drinking water administration.

### 2.2. *Eimeria* oocysts collection and sporulation

Feces were collected from a total of 100 broilers (20 day old) from 34 poultry houses located in the Wilaya of Jijel (Algeria).

\* Corresponding author at: Laboratory, PADESCA, Institut des Sciences Vétérinaires Elkhroub, Université Mentouri de Constantine, Algeria.

E-mail addresses: [djemaiaamersamir@gmail.com](mailto:djemaiamersamir@gmail.com), [djemaiaamersamir@gmail.com](mailto:djemaiamersamir@gmail.com) (S. Djemai), [mark.jenkins@ars.usda.gov](mailto:mark.jenkins@ars.usda.gov) (M.C. Jenkins).

Broiler facilities in this province had been experiencing outbreaks of coccidiosis despite prophylactic use of monensin in starter and grower feeds. Fecal material from individual poultry houses were analyzed for species composition (see below), and the remaining fecal material was combined into a single pool from which *Eimeria* oocysts were recovered using standard procedures (Ryley et al., 1976). Isolated *Eimeria* oocysts were suspended in 2.5% potassium dichromate and sporulated for 72 h at 29 °C by aeration and continuous agitation in a shaking water bath. When sporulation had reached >80%, the *Eimeria* oocysts were stored at 4 °C until use.

### 2.3. Identification of the species of *Eimeria* spp. in the inoculum

The *Eimeria* species composition of oocysts from 30 individual broiler farms was determined first by morphometry in laboratory P.A.D.E.S.C.A (University of Constantine 1–Algeria) at 1000× magnification and using known average length and width of the 7 *Eimeria* species infecting chickens (Long and Reid, 1982). Initial species designation was verified using PCR directed to *Eimeria* species-specific ITS1 sequences following standard procedures (Jenkins et al., 2006). Morphometry and ITS1-PCR revealed the suspension to contain only *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*, in a ratio of 2:1 small (*E. acervulina*) to large (*E. maxima*) oocysts.

### 2.4. Drug sensitivity testing

On day 12, the 280 chicks were randomly distributed by weight into 7 treatment groups, with 4 replicates of 10 chicks/replicate. Groups 1–5 were given medicated feed starting on day 12 which was continued for the duration of the study (Table 1), while groups 1 and 2 were given non-medicated feed for the entire study. After 48 h (day 14), chickens in groups 1–6 were inoculated per os (by gavage) with 225,000 *E. acervulina* and 115,000 *E. maxima* oocysts. Chickens in group 7 were not challenged with *Eimeria* oocysts.

### 2.5. Data collection

All chickens were weighed individually at 1 day, 14 days (day of *Eimeria* oocysts challenge), and 22 days (day of termination) of age. Weight gain for individual chickens was calculated for 3 time intervals: days 1–14 (pre-*Eimeria* challenge), days 14–22 (post-*Eimeria* challenge), and 1–22 (entire study). Feed consumption for each replicate during the infection period was calculated by weighing feed on days 14 and 22. The feed conversion ratio (FCR) was calculated by dividing the average amount of feed consumed by the average weight gain in each replicate. Intestinal lesion scores were determined for 5 chickens/replicate (20 chickens/group) on day of termination using standard techniques (Johnson and Reid, 1970). Fecal material was also collected between days 19–22 (days 5–8 post-*Eimeria* challenge), and processed for estimating *Eimeria* oocysts levels using a modified McMaster method (Taylor et al., 1995). Daily mortality was recorded in all groups from days 14–22. Dead animals were weighed and autopsied for intestinal coccidial lesions.

### 2.6. Statistical analysis

All data were entered into a Microsoft Excel 2010 worksheet, and analyzed by one-way ANOVA using SPSS 10.0 software (Statistical Package for the Social Sciences). Treatment groups were compared by ANOVA using the parameters-body weight at 22 days, weight gain between days 1–14, days 14–22, and days 1–22, feed conversion ratio between days 14–22, and lesion scores, fecal oocysts levels, and cumulative mortality on day 22. Treatment groups were compared to the non-medicated *Eimeria* challenge control (ING) and non-medicated, non-challenge control (NNG) for

statistical difference ( $P < 0.05$ ) using Tukey's post-test. Mean values for all parameters were assigned a superscript letter to indicate significant difference from ING and NNG controls.

### 2.7. Evaluation of resistance

Sensitivities of the *Eimeria* oocysts were evaluated using two different approaches. First, lesion scores between non-medicated, *Eimeria* challenge groups and medicated *Eimeria* challenge groups were compared using a standard scale (McDougald et al., 1986). In this method, designated in this report as anticoccidial sensitivity profile 1 (ASP1), a reduction percentage is calculated as follows:  $100\% - (\text{MLS of treated group} / \text{MLS of the non-medicated, } Eimeria \text{ challenge group} \times 100\%)$ . A reduction percentage of 0–30% indicates resistance, 31–49% indicates reduced sensitivity or partial resistance, and  $\geq 50\%$  indicates full sensitivity to the tested anticoccidial compound.

The second approach, designated in this report as ASP2, uses an anticoccidial index (ACI) (Chapman, 1989). ACI is calculated as follows:  $(\% \text{ survival} + \% \text{ weight gain relative to non-} Eimeria \text{ challenge control}) - (\text{mean lesion score} \times 10 + (\text{mean number of oocysts}/10^6) \times 0.4)$ . Isolates were considered sensitive when the ACI >160, reduced sensitivity or partial resistance when the ACI was 120–160 and complete resistance when the ACI <120.

## 3. Results

No significant difference ( $P > 0.05$ ) was observed in weight gain among all treatment groups prior to *Eimeria* oocysts challenge (day 14) (Table 2).

### 3.1. Diclazuril

The *Eimeria* oocysts were sensitive to diclazuril as indicated by average weight gain between days 14–22 (infection period) and days 1–22 (entire study), as well as by feed conversion ratio (FCR) showing no significant difference ( $P > 0.05$ ) from the respective parameters in the non-*Eimeria* challenge controls (NNG) (Table 2). Average weight gain and FCR in broiler chickens fed diclazuril-medicated feed showed a significant improvement ( $P < 0.05$ ) compared to *Eimeria* challenge controls (ING) (Table 2). Oocyst output was about 6-fold less in diclazuril-treated broilers while mortality was increased by 2.5% compared to ING controls, suggesting incomplete sensitivity to this synthetic chemical (Table 3). This partial sensitivity was probably due to both *E. acervulina* and *E. maxima* because both duodenal and jejuna lesions were observed (Table 3). Using reduction in lesion score (RILS) to compute ASP1 indicates reduced sensitivity of *E. acervulina* and complete sensitivity of *E. maxima* to diclazuril (Table 4). Complete sensitivity to diclazuril was indicated by ASP2 based on the anticoccidial index (ACI) (Table 4).

### 3.2. Lasalocid

The *Eimeria* oocysts exhibited reduced sensitivity to lasalocid as indicated by average weight gain between days 14–22 (infection period) and days 1–22 (entire study), as well as by feed conversion ratio (FCR). Weight gain and FCR were intermediate between NNG and ING controls ( $P < 0.05$ ) (Table 2). Oocyst output was about 2-fold less in lasalocid-treated broilers while mortality was increased by 2.5% compared to ING controls, suggesting incomplete sensitivity to this ionophore (Table 3). This partial sensitivity was probably due to both *E. acervulina* and *E. maxima* because both duodenal and jejuna lesions were observed (Table 3). Using RILS to compute an ASP1 indicates reduced sensitivity of both *E. acervulina* and *E. maxima* to

**Table 1**Description of treatment groups in study of anticoccidial sensitivity testing of *Eimeria acervulina* and *E. maxima* isolated from Algerian poultry farms.

Group no.	Type of anti-coccidial drug	Trade name	Concentration (ppm)	<i>Eimeria</i> oocyst challenge
1	Diclazuril	Clinacox	1	Yes
2	Lasalocid	Avatec	125	Yes
3	Monensin	Elancoban	125	Yes
4	Narasin	Monteban	70	Yes
5	Salinomycin	Sacox	60	Yes
6	None			Yes
7	None			No

**Table 2**Sensitivity of *Eimeria acervulina* and *E. maxima* oocysts isolated from Algerian to Jijel province broiler farms to 4 ionophore drugs and 1 synthetic chemical as measured by weight gain and feed conversion efficiency.

Group no. (treatment)	<i>Eimeria</i> challenge	Weight gain (g) <sup>*</sup>			Feed conversion Ratio (FCR) <sup>*</sup>
		Days 1–14	Days 14–22	Days 1–22	
1 (Diclazuril)	+	294 ± 3 <sup>a</sup>	312 ± 7 <sup>a</sup>	606 ± 7 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.01 <sup>a</sup>
2 (Lasalocid)	+	289 ± 4 <sup>a</sup>	250 ± 8 <sup>b</sup>	538 ± 6 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.01 <sup>b</sup>
3 (Monensin)	+	289 ± 5 <sup>a</sup>	179 ± 10 <sup>c</sup>	468 ± 7 <sup>c</sup>	1.48 ± 0.03 <sup>c</sup>
4 (Narasin)	+	292 ± 4 <sup>a</sup>	205 ± 9 <sup>b</sup>	497 ± 8 <sup>c</sup>	1.43 ± 0.02 <sup>b</sup>
5 (Salinomycin)	+	293 ± 3 <sup>a</sup>	279 ± 8 <sup>b</sup>	572 ± 9 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.02 <sup>ab</sup>
6 (ING)	+	292 ± 4 <sup>a</sup>	140 ± 11 <sup>c</sup>	433 ± 11 <sup>c</sup>	1.52 ± 0.02 <sup>c</sup>
7 (NNG)	–	290 ± 5 <sup>a</sup>	332 ± 7 <sup>a</sup>	622 ± 8 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.01 <sup>a</sup>

\* Means sharing similar superscripts within a column do not differ ( $P < 0.05$ ) as indicated by ANOVA and Tukey post-test.**Table 3**Sensitivity of *Eimeria acervulina* and *E. maxima* oocysts isolated from Algerian to Jijel province broiler farms to 4 ionophore drugs and 1 synthetic chemical as measured by intestinal lesion scores, oocysts excretion, and mortality.

Group no. (treatment)	<i>Eimeria</i> challenge	Intestinal lesion score <sup>*</sup>		Oocyst	
		Duodenum ( <i>E. acervulina</i> )	Jejunum ( <i>E. maxima</i> )	Excretion <sup>*</sup> ( $\times 10^4$ OPG/d)	Mortality <sup>*</sup> (%)
1 (Diclazuril)	+	2.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	11.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>b</sup>
2 (Lasalocid)	+	2.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	35.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>b</sup>
3 (Monensin)	+	3.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	70.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
4 (Narasin)	+	2.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>ab</sup>	20.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>b</sup>
5 (Salinomycin)	+	2.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	17.0 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>c</sup>
6 (ING)	+	3.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	65.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.6 <sup>a</sup>
7 (NNG)	–	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.5 ± 0.6 <sup>c</sup>

OPG/d, oocysts per gram faeces per day.

\* Means sharing similar superscripts within a column do not differ ( $P < 0.05$ ) as indicated by ANOVA and Tukey post-test.**Table 4**Anticoccidial sensitivity profiles (ASP) as indicated by reduction in intestinal lesion score (RILS) and anticoccidial index (ACI) of *Eimeria acervulina* and *E. maxima* oocysts isolated from Algerian-Jijel province broiler farms to 4 ionophore drugs and 1 synthetic chemical.

Anticoccidial compound	<i>E. acervulina</i>		<i>E. maxima</i>		ACI	ASP2 <sup>**</sup>
	RILS	ASP1 <sup>*</sup>	RILS	ASP1 <sup>*</sup>		
Diclazuril	44.4	RS	53.8	S	171.4	S
Lasalocid	33.3	RS	41.5	RS	148.6	PR
Monensin	4.2	R	3.1	R	113.0	R
Narasin	20.8	R	27.7	R	130.7	PR
Salinomycin	40.3	RS	40.0	RS	160.8	S

\* ASP1, anticoccidial sensitivity profile using RILS (McDougald et al., 1986) as criterion. R, resistant; RS, reduced sensitivity; S, sensitive.

\*\* ASP2, anticoccidial sensitivity profile using ACI (Chapman, 1989) as criterion. R, resistant; PR, partially resistant; S, sensitive.

lasalocid (Table 4). Partial resistance to lasalocid was corroborated by ASP2 based on the ACI (Table 4).

### 3.3. Monensin

The *Eimeria* oocysts exhibited resistance to monensin as indicated by average weight gain between days 14–22 (infection period) and days 1–22 (entire study), as well as by feed conversion ratio (FCR). No significant difference in weight gain and FCR was observed between monensin and ING controls ( $P > 0.05$ ) (Table 2). In monensin-treated broilers, oocyst output and mortality was nearly identical to ING controls, suggesting complete resistance to this ionophore (Table 3). This resistance was due to

both *E. acervulina* and *E. maxima* because the level of duodenal and jejuna lesions showed no significant difference ( $P > 0.05$ ) from those observed in ING controls (Table 3). Using RILS to compute an ASP1 indicates complete resistance of both *E. acervulina* and *E. maxima* to monensin, which was corroborated by ASP2 based on the ACI (Table 4).

### 3.4. Narasin

The *Eimeria* oocysts exhibited partial resistance to narasin as indicated by average weight gain between days 14–22 (infection period), as well as by feed conversion ratio (FCR). Although weight gain between days 1–22 (entire study) was higher than ING con-

trols, it was significantly less than NNG controls ( $P < 0.05$ ) (Table 2). In narasin-treated broilers, oocyst output was about 3-fold less compared to ING controls (Table 3). Mortality was intermediate to ING and NNG controls (Table 3) suggesting partial resistance. This resistance was due to both *E. acervulina* and *E. maxima* because the level of duodenal and jejunum lesions showed no significant difference from those observed in ING controls (Table 3). Using RILS to compute an ASP1 indicates complete resistance of both *E. acervulina* and *E. maxima* to narasin while ASP2 based on the ACI indicated partial resistance to narasin (Table 4).

### 3.5. Salinomycin

The *Eimeria* oocysts exhibited reduced sensitivity to salinomycin as indicated by average weight gain between days 14–22 (infection period) and days 1–22 (entire study), as well as by feed conversion ratio (FCR). Weight gain and FCR were intermediate between NNG and ING controls ( $P < 0.05$ ) (Table 2). Oocyst output was about 4-fold less in salinomycin-treated broilers while mortality was identical to ING controls, suggesting incomplete sensitivity to this ionophore (Table 3). This partial sensitivity was probably due to both *E. acervulina* and *E. maxima* because both duodenal and jejunum lesions were observed (Table 3). Using RILS to compute an ASP1 indicates reduced sensitivity of both *E. acervulina* and *E. maxima* to salinomycin (Table 4). ASP2 based on the ACI indicated sensitivity to salinomycin (Table 4).

## 4. Discussion

The present study provides further evidence for the appearance of monensin-resistant *Eimeria* after continuous use of this ionophore. Using anticoccidial sensitivity profile (ASP) based on reduction in lesion score (RILS) or anticoccidial index (ACI) indicated complete resistance to monensin in *E. acervulina* and *E. maxima* recovered from Algerian Jijel province poultry farms. Scoring intestinal lesions in both the upper and middle intestine was helpful in determining that both *E. acervulina* and *E. maxima* were resistant to monensin, as reflected in extremely low ASP1 for both species (*E. acervulina* 4.2, *E. maxima* 3.1). This conclusion was consistent with the overall ASP2 based on ACI.

Several authors have observed the appearance of monensin-resistant *Eimeria* after continuous usage of this ionophore in experimental (Zhu and McDougald, 1992) or field studies (Chapman, 1982; Chapman and Shirley, 1989; Peek and Landman, 2006). Of interest is the apparent cross-resistance of the *Eimeria* population to narasin (*E. acervulina* ASP1 = 20.8, *E. maxima* ASP1 = 27.7). The anticoccidial sensitivity profile based on ACI indicated partial resistance of the *Eimeria* to narasin (ASP2 = 130.7). Ionophore cross-resistance, particularly between monensin, narasin, lasalocid, and salinomycin has been noted by many authors (Chapman, 1986; Stallbaumer and Daisy, 1988; Chapman and Shirley, 1989; Zhu and McDougald, 1992; Chapman and Hacker, 1994; Peeters et al., 1994; Stephen et al., 1997; Dauschies et al., 1998; Witcombe and Smith, 2014). One author has argued that cross-resistance is specific for type of ionophore, with *Eimeria* showing multiple resistance to monoether ionophores (e.g. monensin, narasin, salinomycin) and complete sensitivity to polyether ionophores (lasalocid) (Bedrník et al., 1989). In this study, ASP1 for *E. acervulina* and *E. maxima*, and overall ASP2 showed partial resistance to the polyether ionophore lasalocid. Somewhat perplexing was the observed sensitivity based on ACI (ASP2 = 160.8) or reduced sensitivity based on RILS of *E. acervulina* (ASP1 = 40.3) and *E. maxima* (ASP1 = 40.0) to the monoether ionophore salinomycin. As pointed out by Stephen et al. (1997), conclusions about anti-coccidial resistance in *Eimeria* oocysts recovered from litter

must take into account that multiple *Eimeria* strains exist in a population. While cross-resistance has been shown in pure *Eimeria* strains isolated from the field (Zhu and McDougald, 1992; Stephen et al., 1997), it is likely that subpopulations of *Eimeria* exist that are sensitive to only a single ionophore (Stephen et al., 1997).

Our findings are consistent with previous studies showing sensitivity of *Eimeria* to synthetic chemicals when ionophores are the only drugs used in controlling coccidiosis (Peeters et al., 1994). In the present study, complete sensitivity, as indicated by ASP2 based on ACI, or partial to complete sensitivity to *E. acervulina* or *E. maxima* as indicated by ASP1 based on RILS, was observed for diclazuril. The *Eimeria* isolates used in the present study were obtained from poultry farms that had only used monensin for controlling coccidiosis. These findings support the practice of rotating coccidiosis control with synthetic chemicals, such as diclazuril or nicarbazine, to overcome ionophore resistance.

Of interest is the low *Eimeria* species diversity in the oocysts isolated from these farms. Morphometry and ITS1 PCR revealed the presence of only *E. acervulina* and *E. maxima*. It is possible that other species were present, but were indistinguishable from *E. acervulina* and/or below the detection limit of ITS1 PCR. However, most authors studying ionophore resistance have found low *Eimeria* species diversity in litter with *E. acervulina* and *E. maxima* or *E. tenella* usually present

(Dauschies et al., 1998; Peek and Landman, 2003; Bafundo et al., 2008; Jenkins et al., 2010; Györke et al., 2013). For instance, Haug et al. (2008) found that in broiler farms that exclusively used narasin to control coccidiosis, over 75% of litter samples contained only 1 or 2 *Eimeria* species, with *E. acervulina* present in all samples. Others using PCR technology have found more diverse *Eimeria* species composition, but no mention is made or it was unclear what type of coccidiosis control was employed on the farms being studied (Morgan et al., 2009; Vrba et al., 2010; Carvalho et al., 2011). These findings suggest several possibilities. One is that *E. maxima*, *E. tenella*, and particularly *E. acervulina* more readily develop anticoccidial drug resistance compared to other *Eimeria* species infecting chickens. Another is that under field conditions these *Eimeria* species have a selective advantage (e.g. resilience to drying, more rapid invasion and development at sites in the intestine invaded by other *Eimeria* species, greater fecundity) that leads to greater numbers in litter. The relative abundance of different *Eimeria* species probably has a multi-factorial basis, which at present is not completely understood.

Some inconsistencies were seen when anticoccidial sensitivity profiles were calculated based on reduction in lesion score (ASP1) compared to anticoccidial index (ASP2). For instance, complete sensitivity to salinomycin was indicated by ASP2, whereas partial sensitivity to this ionophore in both *E. acervulina* and *E. maxima* was indicated by ASP1. The latter relies solely on reduction in lesion score at specific sites in the intestine, which is an advantage for assessing the basis for drug resistance (McDougald et al., 1986). In addition to lesion score, ASP2 incorporates performance (weight gain, % survival) and intensity of parasite infection (oocyst production) (Chapman, 1989). Under the field conditions, resistance to anticoccidial compounds is generally indicated by a reduced performance (weight gain) and feed conversion efficiency (Stephen et al., 1997).

Thus, intestinal lesions alone may not provide enough information to determine the anticoccidial drug sensitivity profile of *Eimeria* present in litter. A number of authors have found a poor correlation between lesion score and performance data (reviewed in Williams and Andrews, 2001). In our study, oocysts output generally agreed with ASP1 and ASP2, except for narasin. ASP1 predicted complete resistance, while ASP2 predicted partial resistance to narasin. However, oocysts output in narasin-medicated chickens was greatly reduced compared to non-medicated *Eimeria* challenge

controls (Table 3). The production of oocysts in groups receiving diclazuril and salinomycin reflects the difficulty in completely preventing parasite development even when performance indicates complete sensitivity to an anticoccidial. Others have speculated that this incomplete efficacy of ionophores may be advantageous it allows some parasite development which is sufficient to induce protective immunity (Chapman, 1978, 1997).

## References

- Bafundo, K.W., Cervantes, H.M., Mathis, G.F., 2008. Sensitivity of *Eimeria* field isolates in the United States: responses of nicarbazin-containing anticoccidials. *Poultry Sci.* 87, 1760–1767.
- Bedrník, P., Jurkovic, P., Kucera, J., Firmanová, A., 1989. Cross resistance to the ionophorous polyether anticoccidial drugs in *Eimeria tenella* isolates from Czechoslovakia. *Poultry Sci.* 68, 89–93.
- Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Teixeira, M., Albuquerque, G.R., 2011. Molecular diagnosis of *Eimeria* species affecting naturally infected *Gallus gallus*. *Genet. Mol. Res.* 10, 996–1005.
- Chapman, H.D., 1978. The effect of monensin on the immunity arising from repeated low-level infections with *Eimeria maxima*, *E. brunetti* and *E. tenella*. *Avian Pathol.* 7, 269–277.
- Chapman, H.D., 1982. The sensitivity of field isolates of *Eimeria acervulina* type to monensin. *Vet. Parasitol.* 9, 179–183.
- Chapman, H.D., 1986. Isolates of *Eimeria tenella*: studies on resistance to ionophorous anticoccidial drugs. *Res. Vet. Sci.* 41, 281–282.
- Chapman, H.D., 1989. Sensitivity of field isolates of *Eimeria tenella* to anticoccidial drugs in the chicken. *Res. Vet. Sci.* 47, 125–128.
- Chapman, H.D., 1993. Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitol. Today* 9, 159–162.
- Chapman, H.D., 1994. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to monensins in following the use of a coccidiosis vaccine in broiler chickens. *Poultry Sci.* 73, 476–478.
- Chapman, H.D., 1997. Biochemical, genetics and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol.* 28, 221–244.
- Chapman, H.D., 1998. Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. *Int. J. Parasitol.* 28, 1141–1144.
- Chapman, H.D., Hacker, A.B., 1994. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken. *Poultry Sci.* 73, 1404–1408.
- Chapman, H.D., Shirley, M.W., 1989. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* species to monensin and lasalocid in the chicken. *Res. Vet. Sci.* 46, 114–117.
- Dauguschies, A., Gässlein, U., Rommel, M., 1998. Comparative efficacy of anticoccidials under the conditions of commercial broiler production and in battery trials. *Vet. Parasitol.* 76, 163–171.
- Györke, A., Pop, L., Cozma, V., 2013. Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. *Parasite* 20 (50), 1–8.
- Haug, A., Gjevve, A.G., Thebo, P., Mattsson, J.G., Kaldhusdal, M., 2008. Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. *Avian Pathol.* 37, 161–170.
- Jeffers, T.K., 1974. *Eimeria tenella*: incidence distribution, and anticoccidial drug resistance of isolates in major broiler-producing areas. *Avian Dis.* 18, 74–84.
- Jenkins, M.C., Miska, K., Klopp, S., 2006. Improved polymerase chain reaction technique for determining the species composition of *Eimeria* in poultry litter. *Avian Dis.* 50, 632–635.
- Jenkins, M., Klopp, S., Ritter, D., Miska, K., Fetterer, R., 2010. Comparison of *Eimeria* species distribution and salinomycin resistance in commercial broiler operations utilizing different coccidiosis control strategies. *Avian Dis.* 54, 1002–1006.
- Johnson, J., Reid, W.M., 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28, 30–36.
- Long, P.L., Reid, W.M., 1982. A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. *Univ. Georgia Coll. Agric. Res. Rep.* 404, 1–17.
- McDougald, L.R., Fuller, L., Solis, J., 1986. Drug sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms. *Avian Dis.* 30, 690–694.
- Morgan, J.A., Morris, G.M., Wlodek, B.M., Byrnes, R., Jenner, M., Constantinoiu, C.C., Anderson, G.R., Lew-Tabor, A.E., Molloy, J.B., Gasser, R.B., Jorgensen, W.K., 2009. Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. *Mol. Cell. Probes* 23, 83–89.
- Peek, H.W., Landman, W.J., 2003. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. Field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32, 391–401.
- Peek, H.W., Landman, W.J., 2006. Higher incidence of *Eimeria* spp. Field isolates sensitive for diclazuril and monensin associated with the use of live coccidiosis vaccination with paracox-5 in broiler farms. *Avian Dis.* 50, 434–439.
- Peek, H.W., Landman, W.J., 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 31, 143–161.
- Peeters, J.E., Derijcke, J., Verlinden, M., Wyffels, R., 1994. Sensitivity of avian *Eimeria* spp. To seven chemical and five ionophore anticoccidials in five Belgian integrated broiler operations. *Avian Dis.* 38, 483–493.
- Ryley, J.F., Meade, R., Hazelhurst, J., Robinson, T.E., 1976. Methods in coccidiosis research: separation of oocysts from faeces. *Parasitology* 73, 311–326.
- Stallbaumer, M., Daisy, K.J., 1988. The effects of monensin, narasin, salinomycin and nicarbazin, on field strains of chicken coccidia. *Avian Dis.* 17 (4), 793–801.
- Stephen, B., Rommel, M., Daugschies, A., Haberkorn, A., 1997. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet. Parasitol.* 69, 19–29.
- Taylor, M., Catchpole, J., Marshall, C., Norton, C., Green, J., 1995. *Eimeria* species of sheep. In: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (Eds.), *Biotechnology, Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. European Commission, pp. 25–39.
- Vrba, V., Blake, D.P., Poplstein, M., 2010. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Vet. Parasitol.* 174, 183–190.
- Williams, R.B., Andrews, S.J., 2001. The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in chickens vaccinated with a live attenuated anticoccidial vaccine. *Avian Dis.* 30, 215–220.
- Witcombe, D.M., Smith, N.C., 2014. Strategies for anti-coccidial prophylaxis. *Parasitology* 141, 1379–1389.
- Zhu, G., McDougald, L.R., 1992. Characterization in vitro and in vivo of resistance to ionophores in a strain of *Eimeria tenella*. *J. Parasitol.* 78, 1067–1073.