

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté : Science de la Nature et de la Vie
Département : Sciences Biologiques de l'Environnement
Laboratoire ou unité de recherche de rattachement : Laboratoire Associé en
Ecosystèmes Marins et Aquacoles

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Science de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biodiversité, Santé et Environnement

Présentée par
IOUKNANE-DEBBOU Nedjima

Thème

**Activité anticoccidienne des extraits de feuilles et grignons
d'olive (*Olea europea* L. var. chemlal) chez le poulet de chair**

Soutenue le : 14/07/2021

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mr. AYAD Abdelhanine	Professeur	Univ. de Bejaia	Rapporteur
Mr. Iguer-Ouada Mokrane	Professeur	Univ. de Bejaia	Examineur
Mme Zebboudj Aicha	Professeur	Univ. de Bejaia	Présidente
Mr. Dergal Nadir Boudjlal	MCA	Univ. d'Oran 1	Examineur
Mr Ouchene Nassim	MCA	Univ. de Blida	Examineur

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciements

Louanges à ALLAH, le tout puissant et le miséricordieux qui m'a donnée la volonté, la patience et le courage pour la réalisation de ce simple travail.

Mes sincères remerciements à mon promoteur le Professeur AYAD Abdelhanine.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude, mes remerciements et mon profond respect aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils apportent à mon travail et pour l'acceptation de participer en tant qu'examineurs : Mr. Iguer-Ouada Mokrane (Prof., U. de Bejaia , remerciement particulier pour ses conseils et orientations), Mr. Ouchene Nassim (MCA, U. de Blida) et Mr. Dergal Nadir Boudjlal (MCA, U. d'Oran) ,ainsi que pour Mme Zebboudj Aicha (Prof., U. de Bejaia) en tant que présidente

Je tiens aussi à remercier le directeur de Laboratoire 3BS, Mr Madani Khodir (Prof., U. de Bejaia) pour la qualité de son accueil au sein de son établissement et la disponibilité du matériel mais également pour m'avoir soutenue et encouragée. Merci pour toute l'équipe 3BS pour l'aide précieuse, l'ambiance très chaleureuse, moments de convivialité et de solidarité qu'elle a assurée durant la période de recherche sans oublier la formation acquise dans le domaine de l'extraction et les activités par Mme Gemghar Menana que je remercie très chaleureusement ainsi que Dr Dahmoune Farid qui m'a formée dans le domaine informatique .

Mes vifs remerciements vont également aux Dr Achat Sabiha, Brahmi Fatiha, Remili Hocine et Nait mouloud Mohamed, qui ont été à mes côtés pour m'orienter et m'encourager durant toutes ces années de recherche.

Un grand remerciement aux ingénieurs des laboratoires ; en particulier Inouri Ahlem, vu ses aides surtout dans les moments difficiles, encouragements et sa gentillesse), Saadi Ahmed Leila, Imadalou Nadia, Oukmanou Sonia, Boudersa Samira, Dib Salima, Djellili Kahina et Djerada Nabila.

Je tiens également à remercier les vétérinaires : Dr Hassiséne Leila, Boudraa Nourreddine, Mouhoubi Mustapha, Amari Nabil, Arezki Belharet, Samir et Tolantit Aziz sans oublier les éleveurs en particulier : AbelMouméne Hammiche, Oualid Debbou, Mourad Ait sadji , Abdelmalek khelef et Mounir Meski.

Un remerciement à toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser l'échantillonnage : en particulier :Kebbi Rosa et Touati Lounis qui ont apporté une aide précieuse sans oublier Bouchiba Sihem, Cherfi Sonia, Debbou Lydia, et Oualid, Bensaadi Habiba, Djouder Zahia, , Boubeker Sihem, Amrane Meriem, Kindi Sara, Chelouah Samia, Louknane Belkacem, et Theziri et Ait sadji Mourad.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel de la direction de la DSA, en particulier, Mme Amir, à l'ensemble du personnel d'INRAA de Bejaia et à l'équipe de laboratoire SBE (Titouah Hanane, Moussouni Lotfi, Khelouf Alaa, Benabdelhaq Amira Benberkane Amine, Derbel Hanane, sans oublier Makhloufi, Nawel).

Je remercie énormément le prof Shawki Abouhadid, Tanghort Meriem, Messai Ahmed , Chaabna Naila et Aitfella Radia, pour leur éclairage.

Finalement, mes profonds remerciements vont à mon mari et mes deux enfants (Theziri et Shamy) qui ont fait preuve de patience.

Merci à l'étudiante Sahli Imene, pour son aide et merci à Mme Ifourar Souad pour l'emprunt de l'oculaire micrométrique qui m'a aidé à réaliser la partie support de ce travail.

Dédicaces

Honneur et Gloire à Allah, Dieu Tout-Puissant

Ce travail est dédié :

À la mémoire de mes sœurs Radia et Fadéla, mon père et mes amies Chouider Salima et Brinis Karima. Que leurs âmes reposent en paix.

À mon mari Belkacem et mes deux enfants (Shamy et Theziri).

À ma mère, que Dieu te garde et te protège.

À mes sœurs : Fatiha, Nedjia et Rachida.

À mes frères Hacéne, Djillali, Hakim, Lotfi et leurs femmes sans oublier les nièces et les neveux.

Recevez ici ma profonde gratitude pour vos prières et soutiens durant toutes ces années de sacrifices et de privations consentis tout au long de l'exécution de ce travail.

Publications scientifiques et communications

Publications scientifiques

In Vitro Anticoccidial Activity of Olive Pulp (*Olea europea* L. var. Chemlal) Extract Against *Eimeria* Oocysts in Broiler Chickens.

Nedjima Debbou-Iouknane- Cristina Nerín- Meriem Amrane- Menana Ghemghar, Khodir Madani-Abdelhanine Ayad. Acta Parasitologica

Prevalence and aetiology of coccidiosis in broiler chickens in Bejaia province, Algeria

Nedjima Debbou-Iouknane- Hama Benbarek - Abdelhanine Ayad. Onderstepoort Journal of Veterinary Research.

Communications orales

Prevalence et identification des différents Eimeria dans les élevages de poulet de chair.

Nedjima Debbou-Iouknane Benbarek - Abdelhanine Ayad. Séminaire international : Diagnostic et démarche thérapeutique en médecine vétérinaire. Centre international des conférences (CIC) Alger 25-26/02/2017.

Valorisation des sous produits oléocoles dans le cadre de traitement antiparasitaire (anticoccidien) sur le poulet de chair.

Nedjima Debbou-Iouknane - Meriem Amrane –Bedjaoui Kenza- Arezki Belharet -Abdelhanine Ayad. Séminaire international : Biotechnologies du développement durable. (CIBSDD) Alger 25 /10/2017.

Communications affichées

Activité antiparasitaire in vitro d'un coproduit oléicole (Extraction par micro-onde et optimisation des polyphénols) sur le poulet de chair.

Nedjima Debbou-Iouknane-Abdelhanine Ayad. Séminaire national : Nutrition et santé publique. Ait Toudert (Ouacifs, Tizi Ouzou) 20-21/12/2017.

Activité antiparasitaire de la feuille d'olivier (*Olea europea* L) sur le poulet de chair.

Nedjima Debbou-Iouknane- Ghemghar Menana- Makhloufi Nawel- Madani Khodir Abdelhanine Ayad. 2^{ème} Séminaire national sur la Nutrition et Santé Publique. Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou 21-22/09/2018.

Valorsation des molécules bioactives extraites des coproduits oléicoles dans le traitement anticoccidien sur le poulet de chair.

Nedjima Debbou-Iouknane- Madani Khodir- Hanane Titouah- Abdelhanine Ayad.
Séminaire national : Durabilité au service de notre Alimentation. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV) à l'Université A. Mira- Bejaia le 15-16/01/2018.

Extracton et optimisation par micro-onde de la pulpe épuisée issue de l'olive Var. Chemlel et son effet destructeur sur les oocystes d'*Eimeria* infectant le poulet de chair.

Nedjima Debbou-Iouknane- Madani Khodir- Ghemghar Menana- Abdelhanine Ayad.
Séminaire international : Les Produits du Terroir : Un outil du développement de l'Agriculture de montagne.15-16/12/2018 à Chemini Bejaia.

Les productions animales en Algerie : Etat des lieux et de perspectives de développement.

M.Mokhrane Iguerouada -Nedjima Debbou-Iouknane -Abdelhanine Ayad. Séminaire national. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV) à l'Université A. Mira-Bejaia. 20-21/12/2017.

Sommaire

Introduction générale	7
1 Coccidiose intestinale du poulet de chair	11
1.1 Coccidiose intestinale	12
1.1.1 Définition	12
1.2 Importance économique	12
1.3 Etiologie	13
1.3.1 Présentation des protozoaires digestifs : Coccidies	13
1.3.2 Le parasite : Oocyste infectieux et résistant	14
1.3.3 Affinité taxonomique	15
1.3.4 Espèces coccidiennes : fiches, caractéristiques et identification . . .	16
1.3.4.1 Fiches et caractéristiques	16
1.3.4.2 Identification	18
1.3.5 Structure et forme de l'oocyste	19
1.3.5.1 Oocyste non sporulé	20
1.3.5.2 Oocyste sporulé	21
1.3.6 Cycle et morphologie des différents stades d' <i>Eimeria spp</i>	22
1.3.6.1 Développement exogène : Sporogonie	23
1.3.6.1.1 L'apport en oxygène :	24
1.3.6.1.2 Humidité :	24
1.3.6.1.3 Température :	24
1.3.6.2 Développement endogène	25
1.3.6.2.1 A-Schizogonie (Merogonie) :	26
1.3.6.2.2 Gamétogonie ou Gamégonie :	26
1.4 Pathogénéicité et signes cliniques	27
1.4.1 Action pathogène	27
1.4.2 Les conséquences de la pathogénèse	28
1.4.2.1 Lyse des cellules épithéliales parasitées	28
1.4.2.2 Interactions bactériennes	29
1.4.2.3 Perturbations nutritionnelles	29
1.4.2.4 Action toxique	30
1.4.3 Action immunogène	30
1.5 Etude clinique et lésions	31
1.5.1 Symptômes	31

SOMMAIRE

1.5.1.1	Coccidiose caecale : Lésions du caecum	32
1.5.1.2	Coccidiose subclinique : Lésions de l'intestin grêle	32
1.5.2	Lésions	33
1.6	Diagnostic	35
1.6.1	Examen clinique	35
1.6.2	Examen nécrosique	35
1.7	Spécificité du parasite	35
1.7.1	Parasite- hôte	35
1.7.2	Spécificité tissulaire et cellulaire	35
1.8	Mode d'infestation	37
1.8.1	Facteurs favorisants	37
1.8.1.1	Extrinsèques	37
1.8.1.2	Intrinsèques :	37
1.8.1.2.1	Âge :	37
1.8.1.2.2	Etat de santé :	37
1.8.1.2.3	Alimentation :	37
2	Traitements anticoccidiens et moyens de lutte	39
2.1	Prophylaxie médicale	40
2.1.1	Vaccination	40
2.1.1.1	Vaccins tolérants	40
2.1.1.2	Vaccins sensibles	40
2.1.2	Chimio- prévention	41
2.1.2.1	Anticoccidiens	41
2.1.2.2	Mode d'action des anticoccidiens	43
2.1.2.3	Toxicité des anticoccidiens	44
2.2	Chimiorésistance	44
2.3	Phytothérapie, alternative anticoccidienne	44
3	Phytobiotiques, source d'intérêt :	
	Cas des co-produits oléicoles	46
3.1	Généralités	47
3.2	Les antioxydants (phytobiotiques)	48
3.2.1	Propriétés des antioxydants	48
3.3	Mécanisme d'action et effets métaboliques	48
3.3.1	Action sur le tractus digestif	49
3.3.2	Action sur le statut oxydant	49
3.3.3	Effets métaboliques	50
3.3.4	Synergie et antagonisme des antioxydants	50
3.3.5	Toxicité des antioxydants	51

SOMMAIRE

3.3.6	Propriétés anticoccidiennes des antioxydants	51
3.3.6.1	Relation : phytoconstitués – activité anticoccidienne . . .	55
3.4	Les co-produits oléicoles (espèce <i>Olea europea</i>)	57
3.4.1	Position systématique de l'olivier	58
3.4.2	Distribution de l'olivier en Algérie	59
3.5	Variétés Chemlal en Algérie	59
3.6	Les grignons solides	59
3.6.1	Définition	60
3.6.1.1	Grignons	60
3.6.2	Feuilles	61
3.6.3	Valorisation des co-produits oléicoles	62
3.6.3.1	Feuilles	62
3.6.4	Profil phénolique	62
3.6.5	Activité antioxydante	65
3.6.6	Activité antiparasitaire	65
4	Extraction, optimisation, caractérisation	
	en teneurs phénoliques et activités antioxydantes	67
	Partie expérimentale	67
4.1	Matériels et méthodes	68
4.1.1	Produits chimiques et standards	68
4.1.2	Support végétal	68
4.1.2.1	Description du dispositif expérimental	68
4.2	Etude phytochimique	69
4.2.1	Préparation des échantillons	69
4.2.1.1	Séchage et broyage	69
4.2.2	Détermination de test d'humidité	70
4.2.2.1	Détermination de l'activité de l'eau (AW)	70
4.3	Concept expérimental	71
4.3.1	Optimisation par la méthodologie de surface de réponse	72
4.3.2	Plan Composite Central Design (CCD)	72
4.3.3	Application du plan d'expérience	72
4.3.4	Procédure de l'extraction assistée par micro-onde (MAE)	75
4.3.5	Facteurs influençant le rendement des CPT	75
4.3.5.1	Choix du solvant	76
4.3.5.2	Concentration de solvant	76
4.3.5.3	Temps de l'extraction	76
4.3.5.4	Puissance d'extraction	77
4.3.5.5	Ratio solide/liquide	77

SOMMAIRE

4.4	Analyse chromatographique des optimums des extraits par (HPLC-ESI-MS)	78
4.5	Analyse des poudres par microscopie électronique à balayage (MEB)	78
4.6	Déterminations analytiques	79
4.6.1	Teneur totale en composés phénoliques (CPT)	79
4.6.2	Flavonoïdes totaux	80
4.6.3	Tanins condensés (proanthocyanidins)	81
4.7	Détermination de l'activité antioxydante	82
4.7.1	Test DPPH	82
4.7.2	Test ABTS	84
4.7.3	Pouvoir réducteur	84
4.7.4	Test de molybdate d'ammonium	85
4.7.5	Test de la peroxydation lipidique (TBARS)	86
4.8	Analyse statistique	88
5	Résultats et discussions	89
I	Support végétal	90
5.1	Test d'humidité	91
5.2	Extraction des polyphénols par EAM	92
5.2.1	Facteurs influençant le rendement en CPT	92
5.2.1.1	Dimension des particules	92
5.2.1.2	Effets des paramètres d'extraction et surface de réponse des CPT	93
5.2.1.2.1	Influence de la concentration de l'éthanol :	93
5.2.1.2.2	Influence de la puissance :	96
5.2.1.2.3	Influence du temps d'irradiation :	97
5.2.1.2.4	Influence du rapport Liquide/Solide :	98
5.2.2	Optimisation des conditions MAE	100
5.2.2.1	Modélisation et ajustement du modèle de régression pour CPT	100
5.2.2.1.1	A-Model de régression de la pulpe :	101
5.2.2.1.2	B-Model de régression de la feuille :	103
5.2.2.1.3	C-Modèle de régression du noyau :	104
5.2.2.2	Analyse des surfaces de réponse	106
5.2.2.2.1	A-Pulpe :	106
5.2.2.2.2	B-Feuille :	108
5.2.2.2.3	C-Noyau :	109
5.2.2.3	Validation du modèle	110

SOMMAIRE

5.2.3	Le rendement en composés phénoliques totaux	112
5.2.4	Activité antioxydante	116
5.2.4.1	Effet scavenger du radical DPPH	116
5.2.4.2	Effet scavenger du radical ABTS	121
5.2.4.3	Pouvoir Antioxydant Réducteur Ferrique (FRAP)	123
5.2.4.4	Pouvoir réducteur par le test phosphomolybdénique	127
5.2.4.5	Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (TBARS)	128
5.2.5	Analyse HPLC-ESI-MS	132
5.2.6	Changements structuraux dans les tissus végétaux pendant l'EAM	134

II Support animal 137

5.3	Description du dispositif expérimental	138
5.3.1	Origines des isolats	138
5.3.2	Matériels de laboratoire	138
5.3.3	Echantillonnage	138
5.3.4	Examen coprologique	139
5.3.4.1	Examen post-mortem	139
5.3.4.2	Examen coprologique	140
5.3.4.2.1	A-Examen macroscopique	140
5.3.4.2.2	B-Diagnostic nécroscopique	141
5.3.4.2.3	C-Examen microscopique	141
5.3.4.2.4	D-Conservation des parasites	142
5.3.4.2.5	E-Méthode de flottaison (Analyse qualitative)	142
5.3.4.2.6	F-Purification et sporulation des oocystes	143
5.3.4.3	Analyse quantitative par méthode McMaster	144
5.3.4.4	Identification des espèces coccidiennes	145
5.3.4.4.1	L'oculaire micrométrique :	146
5.3.4.4.2	L'oculaire micrométrique :	146
5.3.4.4.3	Protocole d'étalonnage :	147
5.3.4.4.4	Mesures :	147
5.3.4.5	Examen histopathologique	148
5.3.4.5.1	Fixation :	148
5.3.4.5.2	Post fixation :	148
5.3.4.5.3	La mise en blocs	148
5.3.4.5.4	La microtomisation et le collage des coupes sur lame :	148
5.3.4.5.5	Séchage des lames :	149
5.3.4.5.6	Coloration à l' Hématoxyline Eosine :	149

SOMMAIRE

5.3.4.5.7	Lecture microscopique des lames :	149
5.4	Evaluation de l'activité anticoccidienne	149
5.4.1	Molécules testées	149
5.4.2	Préparation des milieux de culture	150
5.4.2.1	Solution d'HBSS agar	150
5.4.2.2	Solution tamponPBS (phosphate buffered saline)	151
5.5	Etude de l'activité anticoccidienne des extraits de plantes	152
5.5.1	Effets de LC_{50} des extraits éthanoliques et des étalons sur la dimi- nution du nombre d'oocystes	152
5.5.2	Effet du diclazuril et sulfaquinoxaline sodique sur la diminution du nombre d'oocystes	153
5.6	Analyse de l'étude histologique des intestins	154
5.7	Analyse statistique	155
6	Résultats	156
6.1	Etude du parasitisme	157
Article I :Prevalence and aetiology of coccidiosis in broiler chickens in Bejaia province ,Algeria 158		
	Introduction	158
	Materials and methods	158
	Animals and sampling	159
	Sample examination	159
	Identification of Eimeria species	159
	Histopathological examination	159
	Statistical analysis	159
	Results	159
	Discussion	160
	Conclusion	161
	Acknowledgements	162
	References	162
Article II :In Vitro Anticoccidial Activity of Olive Pulp (Olea europaea L. var.Chemlal) Extract Against Eimeria Oocysts in Broiler Chickens 164		
	Abstract	164
	Introduction	164
	References	164
	Materials and Methods	165
	Plant Materials	165
	Extraction and Optimization of Total Phenolic Compounds (TPC)	165
	Microwave-Assisted Extraction (MAE)	165

SOMMAIRE

Determination of Total Phenolic Content	165
Determination of Flavonoids Contents	165
Determination of Condensed Tannin (Proanthocyanidins) Contents	165
Materials and Methods	166
Determination of the Antioxidant Activity	166
Scavenging Activity Against the <i>ABTS</i> ⁺ Radical	166
Scavenging Activity Against the <i>DPPH</i> · Radical	166
Measurement of the Ferric Reducing Power (FRAP)	166
High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLC–ESI–MS)	
Analysis of Phenolic Compounds	166
Determination of the Anticoccidial Activity	166
Effects of the Pulp Extract and Standard Compounds	167
Effect of the Diclazuril, Sulfaquinoxaline Sodium on the Decrease of the Oocysts Number	167
Statistical Analysis	167
Results	167
Discussion	168
Conclusion	171
Compliance with ethical standards	172
References	172
Article III :In vitro anticoccidial effects of Olive Leaf (<i>Olea europaea</i> L. var. Chemlal) extract against broiler chickens <i>Eimeria</i> oocysts	175
Introduction	175
Materials and methods	175
Ethics committee approval	175
Plant materials	175
Extraction and optimization of total phenolic compounds (TPC) by micro- wave assisted extraction (MAE)	176
High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC–ESI- MS) analysis	176
Evaluation of anticoccidial activity <i>Eimeria</i> oocysts isolation and purification	176
Effects of the leaf extract and standard compounds on the decrease of oocysts number	176
Effect of the diclazuril sodium on the decrease of the oocysts number . . .	176
Statistical analysis	177
Results	177
Discussion	180
Conclusion	181
Conflict of interest	181

Acknowledgement	181
Authors' contributions	181
References	181
Discussion générale	183
Conclusion générale et perspectives	187
Bibliographie	188
A Première annexe	230
B Deuxième annexe	231
C Troisième annexe	232
D Quatrième annexe	234
E Cinquième annexe	236
F Sixième annexe	237
G Septième annexe	240
H Huitième annexe	242
I Neuvième annexe	244
Résumé	245

Table des figures

1	Schéma de la structure des oocystes matures des <i>Eimerias</i> du poulet . . .	15
2	Photomicrographies des oocystes des sept espèces d' <i>Eimeria</i>	17
3	Localisation des différentes espèces pathogènes chez le poulet	18
4	Oocyste non sporulé d' <i>E.tenella</i> isolé à partir des ceaca du poulet	20
5	A) :L'oocyste sporulé d' <i>E.tenella</i> (B) :Schéma d'un oocyste sporulé. . . .	22
6	Cycle évolutif d' <i>Eimeria tenella</i> . Deux générations de mérogonie ou plus et une seule génération de gamétogonie	22
7	Sporulation d' <i>Eimeria tenella</i>	23
8	Le temps de sporulation attribué à des espèces d' <i>Eimeria</i>	25
9	Structure du diclazuril	42
10	Structure du sulfaquinoxaline	42
11	Représentation schématique des stades d'action des anticoccidiens	43
12	Schéma de la taxonomie du genre <i>Olea</i> (<i>Oleaceae</i>) et répartition géogra- phique des taxons.	58
13	Quantité de résidus produits pour une production de 40.000 T d'huile. . . .	60
14	Schéma représentatif de la composition de l'olive. La partie la plus riche en huile est le mésocarpe ou (pulpe), et celle plus riche en cellulose brute est l'endocarpe ou (noyau)	61
15	Séchage et broyage (traditionnel) Pulpe (A) et noyau (B) d'olivier .Feuille (C) (double séchage)	70
16	Hygromètre	71
17	Procédure expérimentale à facteur unique (étude préliminaire) pour le MAE, CPT : composés phénoliques totaux F-C : Folin Ciocalteu	74
18	Appareillage d'un four micro-onde utilisé pour l'E.A.M	75
19	Photo du microscope électronique à balayage(MEB)	79
20	Protocole du dosage des polyphénols	80
21	Protocole du dosage des flavonoïdes	81
22	Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicale DPPH et l'antioxydant (AH)	83
23	Protocole du pouvoir réducteur	85
24	Protocole du test phosphomolybdénique	86
25	La réaction de la formation du chromophore entre MDA et TBA	86
26	Protocole du test TBARS	87

27	Analyse de la surface de réponse pour le rendement phénolique total (CPT) de l'extrait de pulpe en fonction des interactions.	107
28	Analyse de la surface de réponse pour le rendement phénolique total à partir de l'extrait de feuille d'olive en fonction des interactions	109
29	Analyse de la surface de réponse pour le rendement phénolique total à partir de l'extrait du noyau d'olive en fonction des interactions.	110
30	Les conditions optimales et les rendements CPT prédits de l'EAM de la Feuille(A); Pulpe (B);Noyau (C).	111
31	Rendements des CPT des extraits : EF (feuille); EP (pulpe); EN (noyau) .	112
32	CI_{50} des composés phénoliques synthétiques (<i>Oleuropéine</i> , <i>Quercetine</i> et <i>Acide gallique</i>).	118
33	Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des extraits naturels (EP; EN; EF) et des standards phénoliques (QE; AG; OLE).	124
34	Histogrammes exprimant la concentration inhibitrice (mg/ml) permettant la réduction de 50 % du fer.	126
35	Pouvoir réducteur mesuré par le test phosphomolybdénique sur les extraits (EP; EN; EF) et les standards phénoliques (QE; AG; OL)	127
36	Identification des polyphénols dans les extraits de (feuille; noyau; pulpe), par l'analyse HPLC-ESI-MS	134
37	Images au microscope électronique à balayage de la poudre du noyau d'olive avant (A) et après (B) l'extraction par EAM.	135
38	Images au microscope électronique à balayage de la poudre de pulpe d'olive avant (A) et après extraction par EAM.	136
39	Site de prospection et échantillonnage des sujets atteints de coccidiose. . .	139
40	Les différents segments intestinaux (A) : intestin grêle; (B) le caecum. . .	140
41	Examen macroscopique des intestins (grêle et caecum)	141
42	Observation des oocystes d' <i>Eimeria</i> isolés à partir du jéjunum et du caecum du poulet de chair au microscope optique G X40.	142
43	Les différents stades de sporulation des oocystes de différentes espèces d' <i>Eimeria spp.</i>	144
44	(A) micromètre oculaire; (B) Graduation de la lentille inferieur.	146
45	Lame micrométrique.	146
46	Superposition des graduations de l'oculaire et lame micrométrique	147
47	Anticoccidiens de synthèse	150
48	Observation microscopique d'une coupe histologique du jejunum du poulet de chair(X40)	154
49	Observation microscopique d'une coupe histologique du caecum infecté par les coccidies d' <i>E.tenella</i> chez le poulet de chair(GX40).	154

50	Annexe A – Ultrastructure d’Eimeria tenella	230
51	Annexe B – Classification des lésions caractéristiques de la coccidiose selon la méthode de Johnson et Reid	231
52	Annexe E – Courbe d’étalonnage des polyphénols totaux (Acide gallique). .	236
53	Annexe I – lame MALASSEZ	244

Liste des tableaux

1.1	Caractéristiques des espèces d' <i>Eimeria</i>	17
1.2	Temps de sporulation des espèces d' <i>Eimeria</i>	19
1.3	Nombre de schizogonie des espèces d' <i>Eimeria</i>	26
1.4	Signes et lésions des espèces coccidiennes les plus pathogènes du poulet . .	31
1.5	Echelle de Johnson et Reid, (1970).	34
3.1	Propriétés anticoccidiennes des plantes	56
3.2	Composition des feuilles d'olivier en composés bioactifs	63
3.3	Compostion du noyau d'olive en composés bioactifs	63
3.4	Composition de la pulpe epuisée d'olive en composés bioactifs	64
3.5	Bibliographies sur les activités antioxydantes du grignon et feuilles d'olivier.	65
3.6	Bibliographies sur l'activité antiparasitaire du grignons et feuilles d'olivier .	66
4.1	Niveaux codés et réels des quatre variables pour l'extraction assistée par micro-ondes	73
5.1	Teneur en eau et en matière sèche des poudres de feuille, pulpe et noyau. .	91
5.2	Dimensions optimisées des particules de (feuille, pulpe et noyau).	92
5.3	Résultats de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondesde l'extrait de feuille	99
5.4	Résultats de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondesde l'extrait de pulpe	99
5.5	Résultats de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondesde l'extrait de du noyau	100
5.6	Coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et analyse de l'équation de la variance (ANOVA) pour les résultats expéri- mentaux de l'extrait de pulpe (EP).	102
5.7	Coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de l'équation de la variance (ANOVA) pour les résultats expé- rimentaux de l'extrait de feuille (EF).	104
5.8	Coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de l'équation de la variance (ANOVA) pour les résultats expé- rimentaux de l'EN.	105
5.9	Activités antioxydantes des différents extraits ethanoliqes de feuille, pulpe et noyau de l'olivier et les standards Cl50(mg/ml)	117

5.10	Molécules testées	150
5.11	Composition de la solution HBSS 9g/l	151
5.12	Composition chimique de la solution tampon PBS	151
C.1	Autorisations de coccidiostatiques en tant qu'additifs pour l'alimentation animale dans la législation communautaire (2008).	232
D.1	Réactifs et produits chimiques utilisés.	234
F.1	Central-Composite Design avec les réponses expérimentales et les valeurs prédites de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT) par l'EAM de la pulpe.	237
F.2	Annexe F.2 – Central-Composite Design avec les réponses expérimentales et prédites pour le rendement total en composés phénoliques (CPT) de l'EF (Extrait de Feuille) par l'EAM.	238
F.3	Annexe F.3 – Central-Composite Design avec les réponses expérimentales et prédites pour le rendement total en composés phénoliques (CPT) du noyau par MAE.	239
G.1	Mesures (en μm) de la longueur, largeur, et de l'index (longueur/largeur) des coccidies dans la suspension parasitaire.	240
H.1	Les composés phénoliques de pulpe identifiés par HPLC–ESI-MS	242
H.2	Les composés phénoliques de feuille identifiés par HPLC–ESI-MS	242
H.3	Les composés phénoliques de noyau identifiés par HPLC–ESI-MS	243

Sigles et abréviations

ANOVA	Analysis of variance (Analyse de variance)
ADN	Acide desoxyribonucleique
ARN	Acide ribonucleique
Aw	Activity water (Activité d'eau)
CE	Equivalent en Cyanidine
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DSA	Direction des services agricoles
DW	Dry weight (Poids Sec)
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EGA	Equivalent Gramme d'Acide Gallique
IM	Inoculation intramusculaire
IP	Intra-péritonéale
IV	Intraveineuse
Jmp	John's machintoshproject
kDa	Kilo Dalton
MEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MEB	Microscopie électronique à balayage
MS	Matière Séche
Mg	Milligramme
O.I.E	Office International des Epizooties
Opg	Oocystes par gramme de fèces
PCR	Polymérase Chain Réaction
ppm	Particule pour million
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
ROS	Espèce réactive d'oxygène
SC	Sous-cutanée
SAS	Système d'analyse Statistique
EQ	Equivalent Quercétine
RSM	Response Surface Methodology
GAE	Gallic Acid Equivalent

Introduction générale

Actuellement en Algérie, l'aviculture est une activité en pleine expansion. Elle assure l'autosuffisance du pays en œufs de consommation et en viandes blanches.

Selon la Direction des Services Agricoles (DSA), une grande partie du secteur avicole est concentrée dans les provinces du nord du pays, principalement à Bejaia. C'est une production essentielle pour les ménages ruraux qui représentent près de 16% de la population algérienne (environ 12 millions de foyers). Elle est en effet créatrice d'emplois dans les campagnes.

Ces dernières années, l'autorité algérienne a adopté une politique d'amélioration du secteur de l'élevage à travers une intensification de la production avicole pour satisfaire les besoins des consommateurs et assurer leur sécurité alimentaire. Comme la production de volaille prend de l'importance, les agents pathogènes qui peuvent concilier l'efficacité de la production et le bien-être des animaux, deviennent de plus en plus importants. Cependant, cette production est souvent confrontée et sévèrement menacée par des épidémies comme la coccidiose, la grippe aviaire et d'autres maladies infectieuses (Quiroz-Castaneda et Dantăn-González, 2015) à savoir, celles de la gumboro, entérite, salmonellose, etc ... Parmi ces infections, la coccidiose constitue l'une des principales contraintes qui entrave le développement de la production avicole et cause d'énormes pertes économiques dans le monde entier (Nemattolahi et al., 2009 ; Prakashbabu et al., 2017), avec une valeur estimée annuellement de plus de 3 milliards de dollars américains US (Williams, 1999 ; Dalloul et Lillehoj, 2006). Elles sont dues à une augmentation de la mortalité de 6-10 % chez le poulet de chair (Guo et al., 2007), et près de 70 % de ce coût est dû à la coccidiose subclinique, par impact sur le gain de poids et un effet néfaste concomitant sur le ratio de conversion alimentaire (Williams, 2005 ; De Gussem, 2007).

La lutte contre ces infections dépend principalement de la chimio prophylaxie par l'utilisation de médicaments anticoccidiens, d'un vaccin vivant, et ou des ionophores en traitement préventif (McDougald, 1982 ; Blake et Tomley, 2014). Bien que cette stratégie soit rentable et fructueuse, l'utilisation intensive ou mal raisonnée conduit à l'émergence et la dissémination de l'antibiorésistance d'*Eimeria spp.* (Shirley et al., 2005 ; Afssa, 2007 ; Jenkins et al., 2010).

Les difficultés que connaissent les recherches pour la mise au point de nouvelles molécules rendent nécessaire l'application d'autres méthodes de lutte contre cette protozoose (Abbas et al., 2012).

La phytothérapie en particulier, est parmi les stratégies nouvelles, notamment l'utilisation d'extraits de plantes, ou des produits à base de plantes médicinales comme classe de facteurs de croissance en supplémentation alimentaire. La connaissance de ces additifs est encore limitée tant sur leur mode d'action que sur les aspects de leur application (Alloui, 2013). En plus, des complications peuvent être rencontrées à cause des variations diverses des origines botaniques, de transformations et de compositions des plantes et de leurs extraits. La plupart des investigations étudient les interactions des divers composés actifs et s'intéressent beaucoup plus aux effets sur les performances de production que sur les impacts physiologiques (Alloui, 2013).

Leurs propriétés thérapeutiques attirent ces dernières années de plus en plus l'attention des chercheurs. Plusieurs d'entre elles sont douées de propriétés anti-protozoaires (Efferth, 2009) et d'effets anticoccidiens sur certaines espèces sont également prouvés (Arab et al., 2006 ; Naidoo et al., 2008). C'est dans ce contexte que les phytobiotiques ou phytogéniques ont fait l'objet de recherche pour évaluer l'intérêt de les incorporer dans les aliments destinés aux animaux comme facteurs de croissance non antibiotiques comme par exemples les pro biotiques, les pré biotiques et les symbiotiques.

Les phytobiotiques (PHY) sont utilisés dans l'alimentation des animaux en remplacement des antibiotiques, facteurs de croissance interdits depuis 2006 (Diarra et al., 2007). Les travaux étudiant leurs effets sur la croissance des animaux, dont les volailles, conduisent à des résultats variables. Ces différences peuvent être en partie dues aux conditions d'élevage et aux types d'animaux qui varient fortement d'une étude à l'autre. Les mécanismes d'action des PHY restent également mal connus, mais peuvent être liés à une action sur les coccidies digestives.

Les co-produits oléicoles de l'espèce *Olea europea* L, var. Chemlal ont fait l'objet de cette étude. Dotées de substances bioactives particulièrement les biophenols et ayant des propriétés antioxydantes intéressantes (Obeid et al., 2007 ; Gonçalves et al., 2009), la feuille et la pulpe de l'olivier prouvent l'effet anticoccidien de leur principe actif qui est l'acide maslinique (2- α , 3- β -dihydroxiolean-12-en-28-oic acid) en réduisant 80,1 % d'ocystes produites par l'espèce pathogène *E.tenella* chez les poussins traités par ce composé, comparativement aux témoins non traités. Le taux de réduction est de 55,3 % et moins que chez les sujets traités à la salinomycine sodique (De Pablos et al., 2010). *Olea europea* L, est utilisée depuis des millénaires dans l'alimentation animale et humaine, non seulement pour réduire le parasitisme chez les poussins de *Gallus domesticus* infectés par *E.tenella*, mais aussi pour augmenter le poids des oiseaux traités. En outre, ce composé actif d'*Olea europea* est montré efficace pour affecter le protozoaire *Toxoplasma gondi*, éventuellement en inhibant les protéases sériques de la protéine protozoaire, un mécanisme nécessaire pour l'entrée des tachyzoites dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette activité, ainsi que les anti-inflammatoires (Aladedunye et al., 2008) et les antioxydants (Montilla et al., 2003), peuvent être responsables des propriétés anticoccidiennes. Les feuilles et grignons

d'olivier, biomasse produite en grande quantité dans les pays méditerranéens et en particulier en Algérie, ne doit pas être considérée comme un déchet encombrant, mais comme une richesse en raison de ses vertus qu'on doit valoriser tant sur le plan économique qu'écologique.

Les feuilles d'olivier ont la plus grande teneur en composés bioactifs parmi les différentes parties de l'olivier (Japon-Lujan et al., 2006) et contiennent également une grande variété de composés phénoliques qui ont de très bonnes activités biologiques, telles que, l'activité antioxydante (Castillo et al., 2010 ; Bulotta et al., 2011) ; antimicrobienne (Farag et al., 2007 ; Pereira et al., 2007) ; activité anti-VIH et hypoglycémique (Konaki et al., 2003 ; Farag et al., 2007 ; Pereira et al., 2007), effets antiprolifératifs et apoptotiques (Han et al., 2009), effet protecteur contre la leucémie humaine (Abaza et al., 2007), activité abaissant les lipides (Lee et Lee, 2010), propriétés nutritionnelles (protection contre le stress oxydatif) et organoleptiques (amertume et astringence de certains aliments) (Bondia -Pons et al., 2009). Parallèlement aux grignons utilisés en supplémentation animale diététique (Gharbi et Benarif, 2011).

La valorisation des polyphénols, extraits des grignons séchés en tant que compléments alimentaires pour l'animal, semble intéressante pour les effets bioactifs possibles sur la qualité de la viande et le bien-être de l'animal (Dal Bosco et al., 2007 ; Branciarri et al., 2016). Les maladies d'origine parasitaire notamment les protozooses, représentent l'un des obstacles les plus importants pour le développement de la filière avicole. Différentes espèces affectent le tractus digestif du poulet. Les coccidies du genre *Eimeria* sont très répandues.

Le parasitisme du poulet a fait l'objet de plusieurs travaux en Afrique, Europe et en Amérique du sud à base des plantes, huiles essentielles et très rarement les déchets agroalimentaires. C'est dans ce même ordre d'idée que nous essayons de valoriser en mettant en évidence une probable activité anticoccidienne in-vitro des biophénols issus des co-produits oléicoles sur la réduction des oocystes d'*Eimeria spp* isolés à partir des élevages de poulet de chair infectés naturellement.

Notre travail a pour objectif général, l'estimation de la prévalence et l'identification de la faune coccidienne gastro-intestinale chez le poulet de chair dans la wilaya de Bejaia. L'objectif principal se base sur l'évaluation anticoccidienne des molécules bioactives issues des extraits des co-produits oléicoles.

Les chapitres de ce travail sont consacrés respectivement à :

- Une partie bibliographique sur les généralités de la coccidiose aviaire, ses conséquences et moyens de lutte ainsi que les phytobiotiques d'intérêt contre cette parasitose intestinale.
- Une partie expérimentale présentera d'une part le matériel et les méthodes puis d'autre part les résultats et discussion.
- Une conclusion et des suggestions complèteront ce travail.

Les résultats de ces expériences ont fait l'objet de trois publications :

- Prévalence et étiologie de la coccidiose chez le poulet de chair dans la wilaya de Bejaia, Algérie.
- Activité anticoccidienne in- vitro de l'extrait de pulpe (*Olea europea* L. var. Chemlal) contre les oocystes d'*Eimeria* chez le poulet de chair.
- Activité anticoccidienne in- vitro de l'extrait de feuille (*Olea europea* L. var. Chemlal) contre les oocystes d'*Eimeria* chez le poulet de chair (soumis).

Coccidiose intestinale du poulet de chair

Chapitre I

Coccidiose intestinale du poulet de chair

1.1 Coccidiose intestinale

1.1.1 Définition

La coccidiose est une infection parasitaire, transmissible, d'allure contagieuse. Elle affecte un large spectre d'hôtes : les mammifères, rongeurs, lagomorphes, amphibiens, poissons et plusieurs oiseaux dont le poulet (Dakpogan et al., 2012), d'où la coccidiose aviaire.

Cette parasitose chez le poulet est une pathologie digestive due à la présence et à la pullulation dans les cellules épithéliales de la muqueuse de l'intestin grêle ou du cæcum (Prakashbabu et al., 2017), de diverses coccidies pathogènes du genre *Eimeria*, généralement très spécifiques (Fontaine et Cadoré, 1995 ; Mekalti, 2003) et de haute importance économique.

La coccidiose est caractérisée cliniquement par des formes variées : les formes graves se traduisent par des troubles digestifs (diarrhée hémorragique le plus souvent mortelle), mais il existe également des formes subcliniques qui se traduisent par des baisses de production dont l'incidence est plus économique que médicale (Chermette et Buisseras, 1992). Elle est dite coccidiase lorsqu'elle ne provoque pas de manifestations cliniques apparentes de la maladie contrairement à la coccidiose (Conway et McKenzie, 2007).

Selon la classification de l'Office International des Epizooties (O.I.E.), cette protozoose occupe le premier rang des maladies parasitaires des volailles (Lancaster, 1983) et se rencontre dans le monde entier et dans tout type d'élevage avicole (Boissieu et Guerin, 2008). Elle reste l'une des plus importantes maladies aviaires (Majaro, 1980), qui présente un problème important à la production des animaux en générale et des volailles en particulier (Guo et al., 2007).

1.2 Importance économique

La coccidiose du poulet est une maladie toujours d'actualité la plus importante et la plus coûteuse en aviculture (Shirley et al., 2005 ; Abbas et al., 2012).

Dans le monde entier, cette maladie est responsable de mortalité chez le poulet de chair (Buldgen et al., 1996), et engendre de considérables pertes économiques (Shirley et al., 2007).

Ceci est imputable à plusieurs facteurs dont :

- Le coût du contrôle anticoccidien (médication, vaccination et équipements utilisés).
- Un retard de croissance (El Hachimi et al., 2008) et des frais supplémentaires de médicaments (Allen et Fetterer, 2002).

- La détérioration de la qualité des carcasses (Yvoré et al., 1972a; Ahmedovet al., 2006).
- Une mauvaise conversion alimentaire (Naciri et Brossier, 2009).
- La morbidité (mauvaises performances : mauvais gain de poids, indice de consommation détérioré et chute de ponte).
- La prédisposition aux maladies opportunistes de caractère secondaire.
- La mortalité (Foster, 1949; Teeter et al., 2008; Zhang et al., 2013).
- La maladie entraîne une mortalité globale de 51,38 % dans l'industrie avicole mondiale (Cocciforum, 2007).

Des pertes économiques enregistrées dans les élevages avicoles dues à la coccidiose sont rapportées par plusieurs auteurs à travers le monde.

- Au Royaume-Uni, des chiffres culminent à 70 millions de US\$ et les pertes annuelles s'élèvent à 38,6 millions de livres, dont 98 % sont attribuables à l'élevage de poulets de chair, soit 4,5 % du revenu de l'industrie avicole (Williams, 1999).
- En France, L'estimation de la coccidioses est à l'origine de 17% du total des pertes de l'aviculture, et augmentent de plus de 2% le prix de revient total de la production avicole(Bussiéras et Chermette., 1992b).Le coût global de la coccidiose pour l'industrie avicole est estimé à plus de 2 milliards de dollars par an (Fornace et al., 2013).
- Aux États-Unis, les pertes économiques dues à la maladie sont d'environ 450 millions US, et 100 millions US\$ supplémentaires en raison du facteur médicament seulement (Maikai et al., 2007). Une récente estimation montre qu'aux États Unis, les pertes annuelles dues aux coccidioses remontent à plus de 127 millions US\$ (Chapman, 2009).
- En Chine, en 2013, les pertes dépassent 73 millions US\$ (Zhang et al., 2013).

Le coût mondial annuel dû aux coccidioses est estimé à 800 millions de dollars. Ce coût inclut les traitements prophylactiques dans la nourriture des volailles, la mortalité et la morbidité (Allen et Fetterer, 2002).

Il est important de souligner qu'il est très difficile de faire une évaluation financière exacte des pertes causées par la coccidiose chez le poulet de chair , car certaines espèces , notamment, *E.mitis* et *E. praecox* , induisent seulement de la morbidité, la mortalité dépendant de la sévérité de l'infection (Williams, 2002b).

1.3 Etiologie

1.3.1 Présentation des protozoaires digestifs : Coccidies

Ce sont des organismes unicellulaires, eucaryotes, à développement hétérotrophe, dont les éléments de dissémination sont les oocystes (Williams, 1999).

La plus grande majorité des coccidies ubiquitaires du poulet et d'autres volailles, telles que la dinde, la caille, la perdrix, le faisan et autres, appartient au genre *Eimeria* (McDougald et Steve, 2008). Selon Levine (1982), le phylum *Apicomplexa* comprend plus de 5000 espèces de protozoaires parasites (Corliss, 2001), strictement intracellulaires et est caractérisé par la présence d'un complexe apical dans le sporozoïte. La plus grande famille de ce phylum est celle des Eimeriidae, contenant environ 1400 espèces, dont plus de 70% appartiennent au genre *Eimeria spp.*

Sept espèces d'importance pathologique sont rencontrées chez le poulet : *Eimeria (acervulina, brunetti, maxima, necatrix, tenella, praecox et mitis)* (Ovington et al., 1995). Les *Eimeria spp.* ont une très grande spécificité d'hôte (Shirley et al., 2005). Ces espèces coccidiennes entériques sont difficiles à éviter en élevage avicole, sévissant principalement sur de jeunes sujets et souvent lors d'altération de l'environnement. Toutefois, elles peuvent affecter des sujets adultes lorsque les conditions de leur développement dans l'organisme sont favorisées (William, 1995).

1.3.2 Le parasite : Oocyste infectieux et résistant

L'oocyste est un stade-clé dans l'épidémiologie de la maladie puisqu'il assure la dissémination du parasite, sa résistance dans le milieu extérieur, et représente la source de contamination. L'oocyste devient infectieux (sporozoïte, mérozoïte, endozoïte) dans le milieu extérieur sous forme de spore entourée d'une coque assez résistante après excrétion et est ingéré directement par les poulets sains.

Il a une très grande résistance sur le sol surtout après deux jours de sporulation. Par exemple, les oocystes sont toujours infectants après 14 mois (*E.necatrix*) voire 2 ans (*E.tenella*) car ils sont protégés par l'enveloppe oocystale et la paroi des sporocystes (Mekalti, 2003)

Cette paroi contient 4 sporocystes et chaque sporocyste contient 2 sporozoïtes, unités infectantes du parasite, soit 8 sporozoïtes par oocyste (Fig 1) (Levine, 1963).

Ces derniers sont les éléments infestants proprement dits (Kadhim, 2014).

La résistance des oocystes à la plupart des agents chimiques et leur sensibilité à certaines conditions physiques, en particulier à la chaleur sont notées par plusieurs auteurs (Yvone et Coudert, 1972).

- En milieu humide, ils conservent leur longévité pendant plusieurs mois à des températures comprises entre 5°C et 25°C ; leur survie est beaucoup plus faible en milieu sec où ils ne résistent pas plus de 3 à 4 jours.
- La cryopréservation dans l'azote liquide permet de conserver les oocystes sporulés pendant 3 mois, mais avec un affaiblissement de leur pouvoir pathogène. De plus, ils sont sensibles aux alternances de congélation-décongélation (Williams et al., 1996).

- La chaleur tue les coccidies en 30 minutes à 60°C, et en quelques secondes à 80°C (Lister et Knott, 2000). Mais, ils sont également sensibles à la dessiccation : le soleil, qui en agissant sur l'humidité relative et par irradiation UV, détruit les oocystes en quelques heures.

La résistance aux agents chimiques à des concentrations usuelles est prouvée par plusieurs auteurs. Seules les substances liposolubles à faible poids moléculaire peuvent pénétrer les oocystes et altérer leur viabilité (Mekalti, 2003).

À titre d'exemple :

- Les produits ammoniacés à 10% (Kabay, 1996 ; Lister et Knott, 2000).
- Sulfure de carbone (Mekalti, 2003).
- Bromure de méthyle (Gordon, 1979).
- Composés phénoliques (Jang et al., 2007 ; Molan et al., 2009).
- L'ammoniac : environ 70% des oocystes de la litière sont détruits par l'ammoniac (Itavi, 1997 ; Baltazart, 2010) et les bactéries (Williams, 1995).

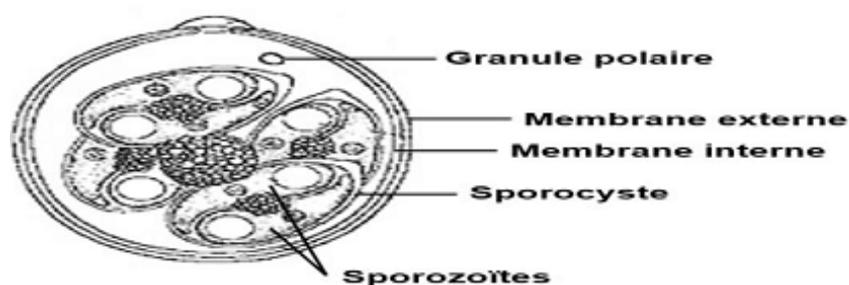


FIGURE 1 – Schéma de la structure des oocystes matures des *Eimerias* du poulet (Levine, 1963)

1.3.3 Affinité taxonomique

La classification des coccidies est encore un sujet de controverse débattu depuis plus de 50 ans, de nombreuses classifications sont proposées mais aucune n'est validée officiellement (Euzeby, 1987 ; Molinier, 2002). La position taxonomique des *Eimeria spp* citée ci-dessous est décrite et confirmée par plusieurs auteurs, notamment, (Levine, 1988 ; Kreier et al., 1987 ; Tenter et al., 2002) pour la classification de base, (Cavalier-Smith et Chao, 2004 ; Adl et al., 2005).

Domaine: Eucaryotes
Règne: Protistes
Embranchement: Protozoa et Sous-embranchement: Apicomplexa
Classe: Sporozoasida et Sous-classe: Coccidiasina
Ordre: Eucoccidiorida et Sous-ordre: Eimeriorina
Famille: Eimeriidae
Genre: Eimeria
Espèces Eimeria spp: 9sp décrites (McDougald et Reid, 1997).

1.3.4 Espèces coccidiennes : fiches, caractéristiques et identification

On spécifie chez le poulet de chair neuf espèces décrites classiquement : *Eimeria* (*acervulina*, *brunetti*, *mitis*, *maxima*, *necatrix*, *praecox* et *tenella* (McDougald et Reid, 1997 ; Répérant et al., 2003 ; Morris et al., 2007), deux espèces : *E.hagani* (Levine, 1938) et *E.mivati* (Edgar, 1964) sont d'une validité douteuse , souvent mentionnées dans la littérature, et sont en cours de réexamination (Conway et McKenzie, 2007).

Long (1973) conclue qu'*E.mivati* est l'un ou l'autre, une variété d'*E.acervulina* ou un mélange d'*E.acervulina* et *E.mitis* (Shirely,1986).

Barta et al. (1997) indiquent qu'*E.mivati* est étroitement relatée à *E. mitis* et cela peut être basé sur l'analyse des ribosomes. Cependant, (Fitz-Coy, 2005) détermine l'identité d'*E.mivati* par PCR de chacun des 13 isolats d'*Eimeria* obtenus des fermes aux Etats-Unis.

Byopadhyay et al. (2006) décrivent une nouvelle espèce, *Eimeria indiana*, en Inde. Parmi toutes ces espèces, *E.tenella* est la plus virulente (Ayaz et al., 2003). Son génome a fait l'objet de plusieurs études et est maintenant en cours d'annotation (Naciri et Brossier, 2009).

McDougald et Fitz-Coy (2008), rapportent que les 9 espèces d'*Eimeria* sont considérées toutes validées.

1.3.4.1 Fiches et caractéristiques

Les figures des oocystes matures des sept espèces d'*Eimeria* sont illustrées par (Castañón et al., 2007) (Fig 2) et leurs caractéristiques sont récapitulées dans le tableau (1.1).

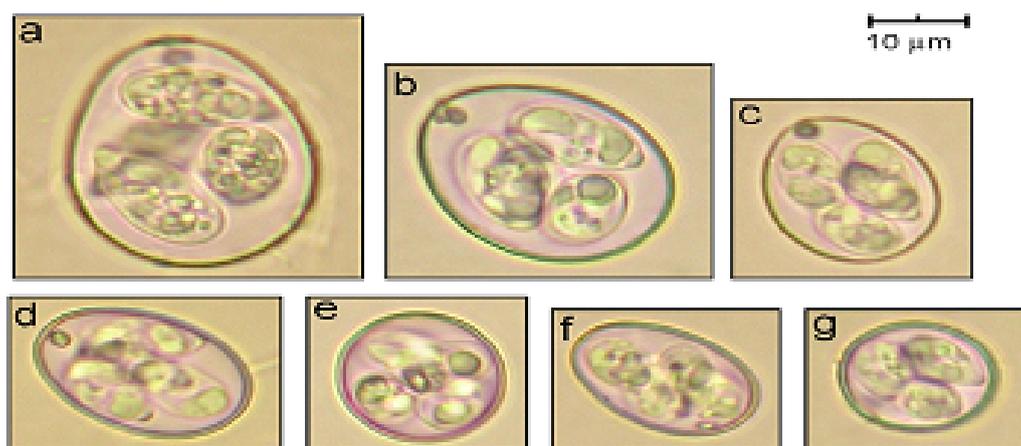


FIGURE 2 – Photomicrographies des oocystes des sept espèces d'*Eimeria*
 (a) : *maxima*; (b) : *brunetti*; (c) : *tenella*; (d) : *necatrix*; (e) : *praecox*; (f) *acervulina* et (g) : *mitis*
 (Castañón et al., 2007).

TABLE 1.1 – Caractéristiques des espèces d'*Eimeria*

Eiméra	P.pré pa- tente	Nbre de schi- zontes	Nbre de Spo- ro- zoïtes	Forme	Index	Long	Larg	Délai de spo- rula- tion	Taille max des schi- zontes μm	Auteurs
<i>acervulina</i>	4 jrs	4	17-30	ovoïde	1.25	17,7- 20,2	13,7- 16,3	17 hrs	10.3	Tyzzer, 1929
<i>brunetti</i>	120 Hrs	2-3	>100	ovoïde	1.31	20,7- 30,3,2	18,1- 24,2	18 Hrs	30.0	Levine, 1942
<i>maxima</i>	121 Hrs	1-2 (4?)	8-16	ovoïde	1.47	21,5- 42,5	16,5- 29,8	30 hrs	9.4	Tyzzer, 1929
<i>necatrix</i>	138 Hrs	2-3	130	obl- ongue- ovoïde	1.19	13,2- 22,7	11,3- 18,3	18 Hrs	65.9	Johnson, 1930
<i>tenella</i>	115 hrs	2-3	4-30	ovoïde	1,16	19,5- 26,0	16,5- 22,8	18 hrs	54,0	Railliet et Lu- cet,1981 Fan- tham, 1909
<i>mitis</i>	93 hrs	4?	24-60	sub- sph- érique	1,09	11,7- 18,7	11,0- 18,0	15 hrs	15,1	Tyzzer, 1929
<i>praecox</i>	83 hrs	3-4	?	ovoïde	1,24	19,8- 24,7	15,7- 19,8	12 hrs	20,0 μm	Johnson 1930

P : Période; Nbre : Nombre; Long : Longueur; Larg : Largeur; Index : Long / Larg .

1.3.4.2 Identification

L'identification des espèces *Eimeria* chez le poulet de chair repose sur les critères ci-dessous (Conway et McKenzie, 2007 ; Aarthi et al., 2010) (Fig 3) :

- Segment parasité de l'intestin (localisation intestinale spécifique) (McDougald, 2003 ; Conway et McKenzie, 2007) ;
- lésions macroscopiques typiques ;
- morphologie et taille des oocystes des stades intracellulaires (ovoïde, ellipsoïde, sub sphérique ou circulaire) (Castañón et al., 2007) ;
- biologie du parasite (comme la durée de sporulation, durée pré patente) (Naciri, 2000) ; et
- dimensions des schizontes ainsi que localisation de leur développement.

L'identification des espèces d'*Eimeria spp.* du poulet par morphométrie est peu spécifique en raison du chevauchement des caractéristiques morphologiques des oocystes et des signes cliniques des animaux atteints (Eckert et al., 1995 ; Carvalho et al., 2011).

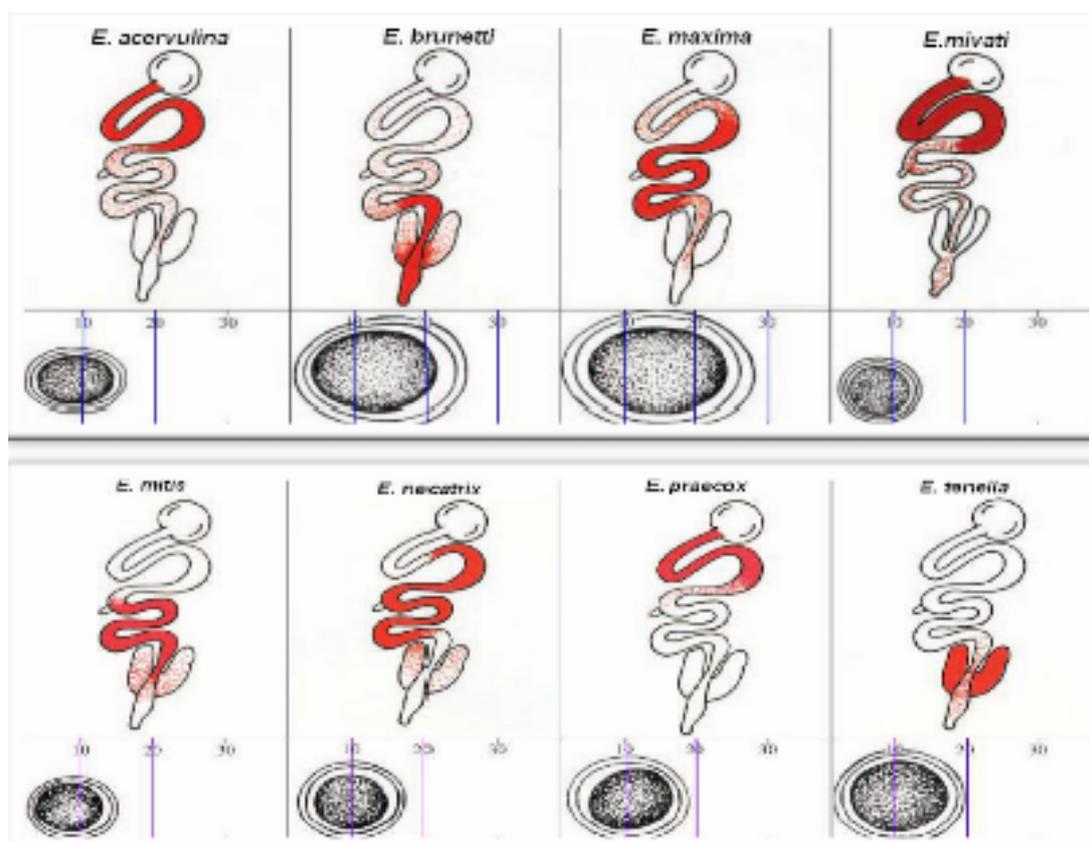


FIGURE 3 – Localisation des différentes espèces pathogènes chez le poulet (Conway et McKenzie, 2007).

Bien qu'elles soient encore nécessaires, ces méthodes sont actuellement complétées par des procédés moléculaires, qui impliquent des tests de diagnostic basés sur l'amplification de l'ADN (PCR) (Schwarz et al., 2009 ; Patra et al., 2010 ; Güven et al., 2013) et l'étude des enzymes (Bussiéras et Chermette, 1992).

Shirley (1975) est le premier à utiliser la biologie moléculaire par l'étude 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 d'espèces d'*Eimeria spp* et ce, à travers des profils caractéristiques des fragments de restrictions.

Procnier et al. (1993), utilisent 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.

Chaque espèce de coccidie sporule en un temps donné (Tab 1.2) quand les conditions sont similaires; cela peut être l'un des critères d'identification des différentes espèces d'*Eimeria*. De plus, la vitesse de sporulation semble avoir un lien avec la taille de l'oocyste; plus celle-ci augmente et plus la durée de sporulation est importante (Reid et al., 1978).

TABLE 1.2 – Temps de sporulation des espèces d'*Eimeria*

Espèces	Durée de sporulation
<i>E.tenella</i>	2 à 5 jours
<i>E.acervulina</i> , <i>E.brunetti</i> et <i>E.hagani</i>	1 à 2 jours
<i>E.necatrix</i> , <i>E.maxima</i> , <i>E.praecox</i> et <i>E.mitis</i>	2 jours
<i>E.mivati</i>	11 à 12 heures

(Reid et al.,1978)

1.3.5 Structure et forme de l'oocyste

Les oocystes sont caractérisés par une structure complexe au niveau de leur apex, dénommée complexe apical, d'où le nom « *Apicomplexa* ».

L'ultra structure de ce complexe est constitué de rhoptries, d'un conoïde, de micronèmes et d'un ou plusieurs anneaux polaires. L'ensemble de ces structures est impliqué dans le processus de l'invasion des cellules hôtes (Dubremetz et Schwartzman, 1993; Gaillard et al., 1991) (Annexe A).

Ainsi, les coccidies ciblent les cellules épithéliales de l'hôte après ingestion d'oocystes sporulés contenant quatre sporocystes qui libèreront chacun deux sporozoïtes.

Les études de (Belli et al., 2006; Mai et al., 2009) suggèrent que la structure de base de la paroi de l'oocyste est essentiellement uniforme pour les différentes espèces de parasites coccidiens et est de modèle bicouche. Selon (Ferguson et al., 2003), les oocystes sont entourés d'une ou de plusieurs membranes extérieures lâches, appelées le voile extérieur et en dessous, se trouve la paroi de l'oocyste comprenant deux couches distinctes.

Dépourvus des organites cellulaires périphériques : pseudopodes, flagelles (sauf à certains moments de leur cycle vital) et d'organites centraux (vacuole alimentaire et pulsatile), ces micro-organismes unicellulaires dont la structure est simple, assurent toutes les fonctions vitales (Scholtyseck, 1973) à savoir, le métabolisme et la reproduction. La forme de l'oocyste est en fonction de leurs stades de développement au cours du cycle (Bouhelier, 2005) :

- La forme extracellulaire statique : *l'oocyste*.
- Les formes extracellulaires mobiles : sporozoïtes, mérozoïtes et microgamètes.
- Les formes intracellulaires, dans leur vacuole parasitophore : trophozoïtes, schizontes, mérontes, microgamonte et macrogamonte.

1.3.5.1 Oocyste non sporulé

L'oocyste est habituellement exogène et libéré dans les excréments de l'hôte. De forme ovoïde et de taille de $23 \times 19 \mu\text{m}$ (cas d'*E.tenella*) (Fig 4), l'oocyste libre contient une seule cellule globuleuse indifférenciée qui occupe presque la totalité du cytoplasme, le sporonte (zygote) dont le noyau est presque invisible (Al-Quraishy et al., 2009).

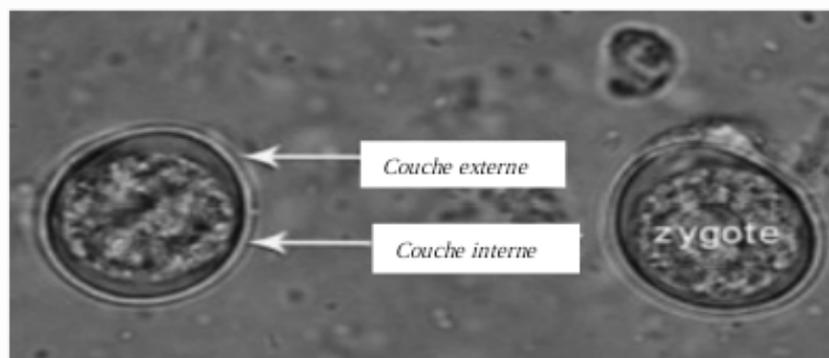


FIGURE 4 – Oocyste non sporulé d'*E.tenella* isolé à partir des ceaca du poulet (Al-Quraishy et al., 2009)

À des températures et humidités appropriées du milieu extérieur, l'oocyste non sporulé devient un oocyste infectieux par division méiotique (Canning et Anwar, 1968 ; Del Cacho et al., 2005) en quelques jours.

Les formes sporulées dont la paroi est imperméable, résistent à une variété d'agressions environnementales et chimiques (Mai et al., 2009), peuvent survivre plusieurs mois, voir des années dans l'environnement (Ryley, 1973 ; Wapplelman, 1976 ; Stotish et al., 1978). La paroi de l'oocyste se compose principalement de protéines et de lipides . Des taux de glucides de l'ordre de 1,5 % à 19% sont également signalés, ce qui est le plus souvent de façon covalente liés aux protéines (Ryley, 1973 ; Stotish et al., 1978). Le taux de protéines dépasse 90 % dont un groupe riche en cystéine qui se réticule par l'intermédiaire de ponts disulfures et un autre groupe de protéines murales riche en tyrosine.

Ces protéines, dont la taille varie de 8 à 31 kDa, peuvent fournir une matrice structurale pour l'assemblage de la paroi de l'oocyste et contribuer à sa résilience.

La réduction de groupe thiol perturbe la superstructure des protéines entraînant l'ouverture du micropyle et donc modifie le caractère d'imperméabilité de l'oocyste sporulé (Jolley et al., 1976). Le modèle bicouche de la paroi de l'oocyste isolée à partir des caeca d'*E. tenella* (Stotish et al., 1978) se présente ainsi :

- Une couche interne de 10nm d'épaisseur, de nature lipoprotéique, résistante et imperméable aux substances hydrosolubles.
- Une couche externe, lisse, de 90nm d'épaisseur, de nature glycoprotéique, assez fragile. Elle est limitée par une suture linéaire, qui n'a pas été documentée jusqu'ici, et qui semble jouer un rôle dans le processus infectieux (Mouafo et al., 2000).

Selon (Zhou et al., 2006), cette paroi oocystale est une partie importante qui fournit une barrière pour survivre dans le milieu extérieur, elle est bien répartie de un à cinq couches.

Les premières études rapportent qu'après l'ingestion des oocystes coccidiens, l'exposition au dioxyde de carbone déclenche l'excystation (Hammond, 1973). Il est suggéré que le dioxyde de carbone modifie la perméabilité et la sensibilité de l'oocyste et du sporocyste aux sucs digestifs, ce qui permet aux sporozoïtes de s'évader. L'oocyste non sporulé contient une abondante réserve glucidique, formée de grains d'amylopectine, et de grains lipidiques.

Ces substances permettent à l'oocyste d'évoluer si le milieu est favorable ou de survivre assez longtemps dans le cas contraire (Yvoré et Coudert, 1972).

1.3.5.2 Oocyste sporulé

Les oocystes sont les formes de résistance dans le milieu extérieur. Excrétés sous forme non infectieuse, ils sporulent sous l'effet de température, d'humidité ambiante et d'apport d'oxygène, pour devenir infectieux afin de protéger l'ovule. Les coccidies sont des parasites obligatoires qui ne peuvent se multiplier que dans le tube digestif des poulets. L'oocyste sporulé d'*Eimeria* contient quatre sporocystes (le sporocyste étant une seconde enveloppe de protection) contenant chacun deux sporozoïtes qui correspondent aux éléments invasifs (Khadim, 2014) (Fig 5).

Le sporocyste peut présenter :

- Un léger renflement de sa partie apicale : c'est le corps de Stieda.
- Un globule réfringent peut être présent dans la partie apicale de l'oocyste.
- Des corps résiduels peuvent être présents dans l'oocyste et/ou dans les sporocystes.
- Des granules d'amylopectine et une vacuole lipidique.

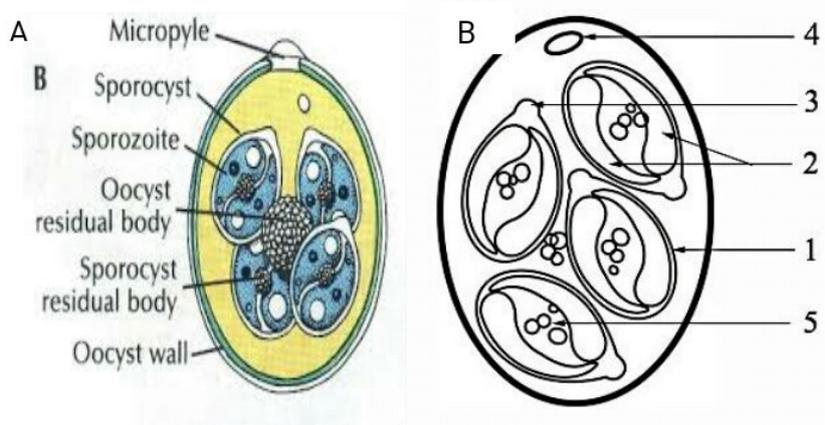


FIGURE 5 – A) :L'oocyste sporulé d'*E.tenella* (B) :Schéma d'un oocyste sporulé.
1 : Sporocyste; 2 : Sporozoïtes; 3 :Corps de Stieda; 4 :globule réfringent 5 :Corps résiduels. D'après
<http://eimeria.chez.tiscali.fr/Coccidies%20Gallus/oocyste.html>

1.3.6 Cycle et morphologie des différents stades d'*Eimeria spp*

Le cycle débute par l'élimination des oocystes non sporulés dans le milieu extérieur (la litière) avec les excréments et dure 24 à 48 heures pour la plupart des espèces *Eimeria* de poulet (Waldenstedt et al., 2001). Selon (Yun et al., 2000; Chartier et Paraud, 2012), le cycle évolutif des coccidies du genre *Eimeria* est monoxène, c'est-à-dire qu'il se déroule dans un seul hôte et s'effectue en 4-7 jours selon l'espèce chez le poulet (Fig 6).

Les *Eimerias* sont, également, très spécifiques vis-à-vis de l'hôte et des segments intestinaux (Fayer, 1982). Ils achèvent leur cycle biologique après 3 phases distinctes : la sporogonie, la mérogonie (schizogonie), et la gamétogonie (Lillehoj et Trout, 1993). Toutefois, la durée de ces phases diffère d'une espèce à l'autre (Yun et al., 2000).

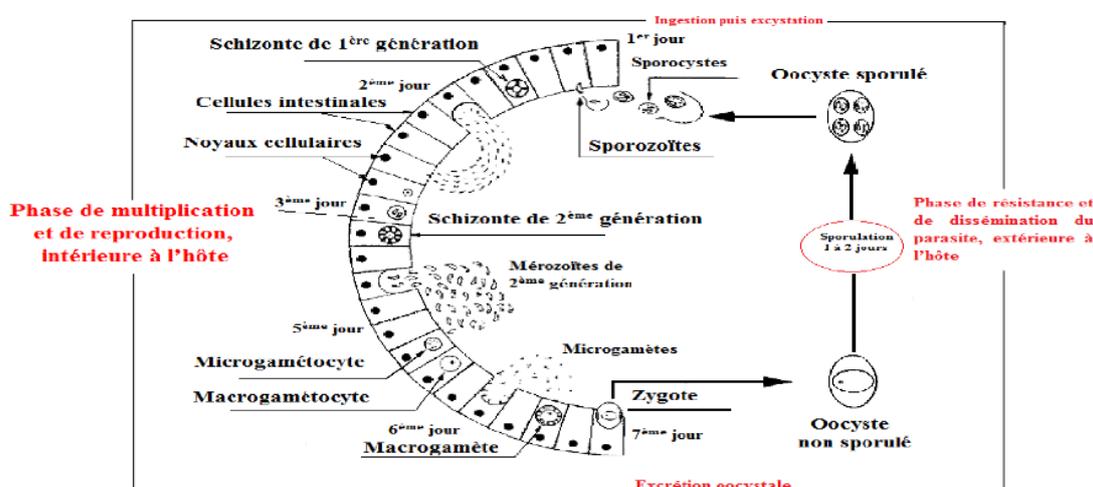


FIGURE 6 – Cycle évolutif d'*Eimeria tenella*. Deux générations de mérogonie ou plus et une seule génération de gamétogonie
(McDougald et Reid, 1997; Crevieu-Gabriel et Naciri, 2001; Trees, 2001)

1.3.6.1 Développement exogène : Sporogonie

La sporogonie est un phénomène strictement aérobie (Perard, 1924) par lequel, l'oocyste subit une série de divisions pour former des *sporozoïtes* (Euzéby, 1978). Elle assure le passage de l'oocyste non sporulé (forme non infectante) à l'oocyste sporulé (forme infectante). Elle peut être divisée en 3 phases :

- *Consommation d'oxygène* : est à peu près constante, excepté durant les dernières heures où elle augmente sensiblement.
- *Segmentation* : est une période critique où l'arrêt de l'oxygénation peut entraîner une évolution anarchique irréversible de l'oocyste.
- *Respiration* : diminue pour aboutir à la phase de repos qui suit la sporogonie (Yvone et Coudert, 1972).

La sporulation débute par une première division nucléaire réductionnelle, suivie d'une deuxième division pour former quatre cellules non différenciées : sporoblastes haploïdes (division réductionnelle par méiose), qui changent de forme pour former des sporocystes ; deux sporozoïtes se forment dans chacun des 4 sporocystes (Kadhim, 2014) et l'on obtient alors l'oocyste sporulé infestant (Naciri, 2000) (Fig 7). L'oocyste sporulé est une forme infectante de résistance ; sa survie dans le milieu extérieur est très longue (Losson, 1996). Après ingestion par un hôte adéquat, il subit le processus d'excystement (la libération des sporozoïtes).

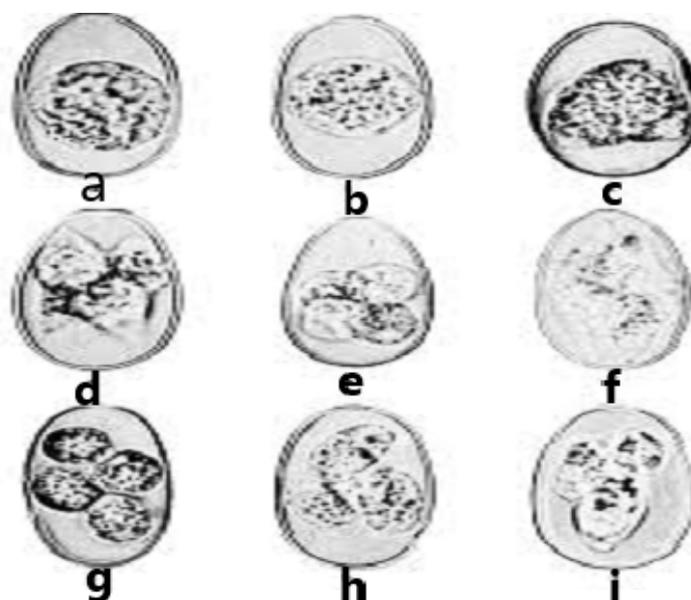


FIGURE 7 – Sporulation d'*Eimeria tenella*

a : oocyste non sporulé ; b et c : apparition du stade « début » ; d : stade pyramidal (Pellerdy, 1965) ; e : fin du stade « début » ; f : stade pyramidal ; g : stade « 4 rond » ; h : stade « 4 ovale » ; i : stade final : oocyste sporulé (Coudert et al., 1973)

La sporulation dure alors 2 à 3 jours sous réserve d'une humidité et oxygénation suffisantes (Yvoré, 1992). Dans des conditions idéales, la sporulation se produit en 24-48hs pour la plupart des espèces coccidiennes de la volaille (Edgar, 1955). Elle dépend principalement de trois facteurs fondamentaux : la température, l'humidité et l'accès à l'oxygène (Kheysin, 1972).

1.3.6.1.1 L'apport en oxygène : Le besoin en oxygène des oocystes pendant la sporogonie est variable dans le temps et décroît au fur et à mesure que l'on se rapproche du stade final (Coudert et al., 1973). La respiration est très active pendant la sporogonie et la consommation d'oxygène est très élevée.

En effet, la sporogonie ne peut pas s'accomplir dans des conditions d'anaérobiose, ce qui explique qu'elle ne se réalise pas dans le tube digestif (Bussieras et Chermette, 1992). Elle est inhibée dans les milieux en putréfaction et en fermentation ; la présence de bactéries en abondance dans l'environnement empêche la sporogonie, c'est la raison pour laquelle les antiseptiques usuels non seulement ne gênent pas la sporulation mais encore, en détruisant les bactéries qui la favorisent.

En pratique, on provoque la sporulation des oocystes en les mettant en suspension dans de l'eau formolée (1%) ou dans une solution de bichromate de potassium (2%), qui, en plus de son pouvoir antiseptique, a des propriétés oxydantes (Euzeby, 1987).

1.3.6.1.2 Humidité : L'humidité relative minimale est de 30% et l'optimale à 80% dans les parquets d'élevage intensif de la volaille. C'est à proximité des points d'abreuvement mal établis et laissant s'écouler de l'eau que la contamination est maximale. En milieu sec, les oocystes n'évoluent pas et succombent rapidement (Euzeby, 1987 ; Bussieras et Chermette, 1992). La litière du poulet est particulièrement propice (humidité, chaleur). Les poulets, en grattant, en permettent l'aération. Une litière permanente, entassée non aérée, est néfaste pour les oocystes (Horthon-Smith et Long, 1954).

1.3.6.1.3 Température : La température optimale de la sporulation pour la majorité des espèces de coccidies est comprise entre 20 et 25°C. Dans le cas d'*E.tenella*, elle est de 29°C (Yvoré et Coudert, 1972).

L'oocyste sporulé est résistant aux fortes variations de température, d'humidité et à quelques désinfectants. Cependant, la dessiccation extrême comme l'exposition directe au soleil limite la survie des oocystes et les températures inférieures à -30 °C ou supérieures à 63 °C sont létales (Chartier et Paraud, 2012).

Graat et al. (1994) étudient la sporulation des oocystes d'*E.acervulina* dans des litières sèches et moites (légèrement humide) avec différents types de combinaisons de température et d'humidité relative et ils constatent une légère différence dans les taux de sporulation.

Venkateswara et al. (2013) enregistrent des durées de sporulation complète des oocystes de diverses espèces en fonction des conditions climatiques à un intervalle de temps de 6 heures comme suit : 168, 120, 216, 192, 96 et 96 hrs pour *E.acervulina* , *E.brunetti* , *E.maxima* , *E.mitis* , *E.necatrix* et *E. tenella*, respectivement (Fig 8). La conclusion tirée sur la base d'une comparaison avec des études antérieures, est que les conditions climatiques humides retardent le temps de sporulation et que le temps sec et/ou humide est la condition idéale pour une sporulation rapide.

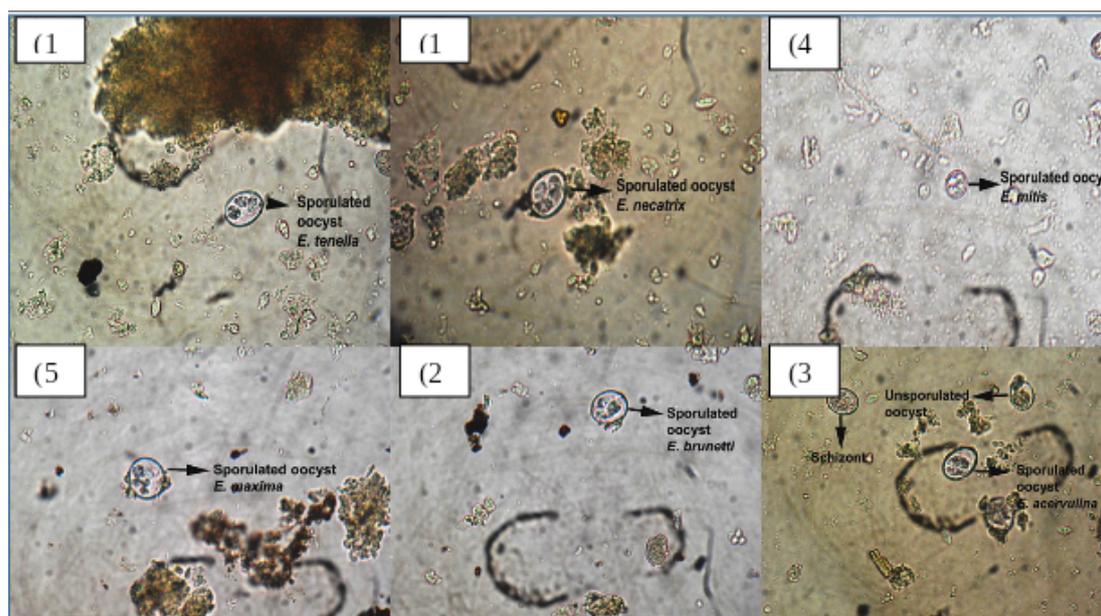


FIGURE 8 – Le temps de sporulation attribué à des espèces d'*Eimeria* (1) *E.tenella* et *E. necatrix* (96hs);(2) *E.brunetti* (120hs);(3) *E.acervulina*(168hs);(4)*E.mitis* (192) et(5) *E.maxima* (216hs) (Venkateswara et al., 2013).

1.3.6.2 Développement endogène

Les coccidies diffèrent des bactéries et des virus dans le caractère auto-limitatif de développement de la maladie qu'ils provoquent (Dakpogan et al., 2012). Ce développement endogène exprimé par la libération des sporozoites infectieux des sporocystes est l'excystation qui se déroule après ingestion de l'oocyste sporulé.

Dans le gésier, la paroi des oocystes est fragilisée par l'action mécanique pour libérer les 4 sporocystes , et au niveau du duodénum, sous l'influence des enzymes pancréatiques exocrines principalement, la chymotrypsine (Wang et al., 1975c) et les sels biliaires sur le corps de Stiedai (épaississement de la paroi cellulaire des sporocystes) , ce dernier est fragilisé en libérant les deux sporozoites (éléments invasifs) de chaque sporocyste (Crevieu-Gabriel et Naciri, 2001) qui vont ensuite envahir les cellules de la paroi intestinale (McDougald, 2003).

1.3.6.2.1 A-Schizogonie (Merogonie) : Après ingestion, les sporozoïtes envahissent l'épithélium intestinal et s'arrondissent pour former un trophozoïte suivi d'une division nucléaire pour former un méronite immature (schizonte) par lequel, commence le stade mérogonie. Un nombre variable de mérozoïtes est produit asexuellement par fission multiple de chaque mérozoïte.

Le schizonte de première génération mesure jusqu'à 54 μm de diamètre et peut contenir jusqu'à 900 mérozoïtes de première génération. Le schizonte mature se rompt dans la lumière des cryptes des glandes cæcales au 4^{ème} jour après l'infection et les mérozoïtes pénètrent d'autres cellules épithéliales pour former de jeunes schizontes de deuxième génération, colonies de la deuxième génération.

Lorsqu'un grand nombre de schizontes de deuxième génération est en cause, une hémorragie massive dans la lumière cæcale peut se manifester (Soulsby, 1982). Les mérozoïtes de deuxième génération pénètrent dans les nouvelles cellules épithéliales et initient soit la troisième génération de schizontes, soit le cycle gamétogonie, la majorité entreprenant le cycle gamétogonique (Naciri, 2000).

Le nombre de génération de schizontes varie selon l'espèce coccidienne (Tab 1.3), car il est déterminé génétiquement (Suls, 1999). La libération des mérozoïtes des schizontes matures entraîne la destruction des cellules parasitées et donc la détérioration de l'épithélium conduisant aux lésions et symptômes de la coccidiose.

À la fin du processus de mérogonie, le parasite entre dans la phase gamétogonie qui constitue la phase sexuée du cycle (Jeurissen et al., 1996 ; Conway et McKenzie, 2007).

TABLE 1.3 – Nombre de schizogonie des espèces d'*Eimeria*

Espèces	Nombre de schizogonie
<i>E. acervulina</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. mitis</i> et <i>E. praecox</i>	4
<i>E. maxima</i> et <i>E. tenella</i>	2-3
<i>E. brunetti</i>	2 – 4

(Suls,1999)

1.3.6.2.2 Gamétogonie ou Gamégonie : Les mérozoïtes de la dernière génération de mérogonie pénètrent dans d'autres cellules et entament le processus sexuel du cycle endogène, c'est la phase de gamégonie (Conway et McKenzie, 2007) qui donne naissance à un macrogamonte ; macrogamétocyte (qui donnera des macrogamètes femelles) et microgamonte (mâle).

Le microgamonte (microgamétocyte) donne naissance à plusieurs microgamètes qui, après libération, vont féconder les macrogamètes. Il va ainsi y avoir développement d'un oocyste qui sera libéré dans les fientes.

Le macrogamétocyte, unicellulaire, grossit et munit 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 au microscope électronique « le corps chevelu ». Le nombre de macrogamétocytes est toujours supérieur à celui des microgamétocytes (McDougald et Reid, 1997; Yun et al., 2000).

Certains mérozoïtes deviennent des microgamontes et subissent des divisions répétées du noyau, suivies de divisions cytoplasmiques aboutissant à la disposition des microgamètes à la périphérie du microgamonte. Les microgamètes sont fusiformes et se déplacent grâce à leurs deux ou trois flagelles.

Ce cycle possède une capacité de reproduction massive pendant les phases intracellulaires. Ce sont les phases répliquatives asexuées qui entraînent le plus de dommages au niveau des tissus intestinaux, causant différents degrés de perturbations digestives, et pouvant ainsi favoriser le développement d'autres pathogènes (McDougald, 2003).

Les mécanismes biochimiques et génétiques qui contrôlent le développement des espèces du genre *Eimeria* à l'intérieur des cellules-hôtes sont à l'heure actuelle très mal connus.

1.4 Pathogenecité et signes cliniques

Les coccidies exercent une action pathogène et une action immunogène (Eueby , 1987; Bussiéras et Chermette, 1992b; Yvore et al., 1972a).

1.4.1 Action pathogène

Trois phénomènes importants interviennent dans la pathogénie de la coccidiose duodénale, à noter :

- La destruction de l'épithélium avec perte sérique dans la lumière intestinale ;
- les troubles de l'absorption (cause directe) ;
- sous-consommation alimentaire (cause indirecte).

Le pouvoir pathogène des coccidies (William, 2001) varie selon :

- l'espèce en cause ;
- le nombre d'oocystes ingérés ;
- la compétence immunitaire de l'oiseau hôte.

Ce pouvoir dépend en grande partie de l'importante multiplication des différents stades du parasite à l'intérieur de l'hôte.

Les coccidies du poulet envahissent la muqueuse intestinale, occasionnant des dommages aux cellules épithéliales, des inflammations et une atrophie des villosités (Pout,

1967).

L'espèce la plus pathogène est *E.tenella* suivi d'*E.necatrix*, *E.brunetti* et *E.acervulina* avec la mortalité des sujets affectés à dose élevée. Selon les travaux de (William, 2001), la dose létale est de 18,200 ; 63,000 ; 16,300 oocystes pour *E.brunetti*, *E.necatrix* et *E.tenella*, respectivement (Dakpogan et al., 2012). Théoriquement, un seul oocyste d'*E.tenella* pourrait produire 2 520 000 formes invasives, après la 2ème mérogonie (Levine, 1982). Chez l'espèce *E.maxima*, un minimum de quatre générations de schizogonies est observé (McDonald et al., 1986). La mortalité peut atteindre 100% à partir d'une dose de 1000000 d'oocystes au niveau des espèces *E.tenella* et *E.necatrix*.

Les autres espèces de coccidies ne causent généralement pas de mortalité, mais réduisent significativement les performances de croissance et de ponte avec une incidence économique remarquable. Les premières observations sur le pouvoir pathogène d'*E.acervulina* ont fait état d'excréta fluides, d'une réduction temporaire du gain de poids et de la prise de nourriture et d'une diminution passagère de la production d'œufs. La mortalité ne semble apparaître que dans le cas d'une infestation très importante.

- Dickinson et Scofid (1939), obtiennent un taux de 20% de morts en inoculant 35 millions d'oocystes sporulés par animal.
- Hartwig et Féhiberg (1966), isolent une souche particulièrement virulente qui avec seulement 25000 oocystes provoque, chez des poulets âgés de 3 semaines, des symptômes graves.
- Reid et Jonhson (1970), montrent que les lésions avec *E acervulina* sont plus discrètes que celles produites par *E.tenella* mais elles sont bien visibles.

1.4.2 Les conséquences de la pathogénèse

Les conséquences de l'action pathogène chez l'animal sont multiples :

1.4.2.1 Lyse des cellules épithéliales parasitées

Le pouvoir pathogène des coccidies parasites s'exerce soit au stade des mérontes, soit au stade des gamétocytes, lors de leur multiplication dans les entérocytes par action mécanique, rupture de la membrane pour libérer les mérozoïtes. Dans les deux cas, c'est pendant la période pré- patente du processus infectieux que la muqueuse intestinale est lésée (Ruff et Reid, 1975). Les lésions épithéliales générées, conduisent à un défaut de perméabilité de barrière intestinale, d'où une fuite des protéines plasmatiques et donc, à terme, à une hypoprotéïnémie.

Les conséquences de ces changements se manifestent, entre autres, par une augmentation de la perméabilité et une réduction de la vitesse d'absorption des nutriments.

Il n'est pas nécessaire de recourir à des fortes infestations pour constater une diminution du taux des protéines sanguines (Yvoré et al., 1972a).

1.4.2.2 Interactions bactériennes

Les bactéries ont une influence sur la sévérité de la coccidiose et les coccidies favorisent l'infection bactérienne. Des poulets, infectés par voie orale par *Escherichia coli*, présentent lors d'infection par *Eimeria spp.* une excrétion oocystale plus importante et des scores lésionnels plus sévères que des poulets témoins (Hegazy et al., 1999).

Inversement, la présence de coccidies influe sur le développement des bactéries et modifie la flore : l'accumulation de tissu nécrosé et, éventuellement de sang, favorisent la prolifération bactérienne. *E. tenella* augmente la multiplication de *Clostridium perfringens* (Dykstra et Reid, 1978). Si *Clostridium perfringens* est présent au départ, il proliférera tout particulièrement vers le 7ème jour de l'infection provoquant une entérite nécrotique. La mortalité due à l'entérite nécrotique est de 53% plus importante sur des poulets inoculés avec *E. acervulina* avant l'infection à *Clostridium* (Al-Sheikhly et Al-Saieg, 1980).

Il est aussi prouvé qu'*E. tenella* aggrave une infection à *Salmonella typhimurium* (Lafont et al., 1983) ou à *Salmonella enteritidis* (Qin et al., 1995).

1.4.2.3 Perturbations nutritionnelles

Cela se traduit par une diminution de l'activité enzymatique intestinale (Ruff et Fuller, 1975). L'infection induit également à une inhibition, par un phénomène toxique, de l'amylase et de la lactase ainsi qu'une atrophie des villosités et une différenciation anormale des cellules épithéliales.

Par ailleurs, l'accumulation des parasites entraîne un épaississement de l'intestin et un ralentissement du transit intestinal, ce qui conduit à une diminution de la digestion et de l'absorption des nutriments et des pigments caroténoïdes (Adams et al., 1996).

La diminution de l'absorption est très importante. Même en l'absence de symptômes visibles, elle conduit à des perturbations nutritionnelles graves, avec des pertes de poids de 3 à 5% chez les poulets de chair (Yvone et al., 1972d). La malabsorption s'installe très tôt (4-5ème jour). Elle est plus ou moins lourde de conséquences selon le segment intéressé, mais elle entraîne toujours une augmentation de l'indice de consommation. Le déficit d'absorption est plus important que la baisse d'appétit.

Les modifications de l'absorption intestinale entraînées par les coccidioses sont également étudiées par (Turk et Stéphane, 1967). Ces auteurs montrent que l'absorption du zinc et de l'acide oléique diminue dans les mêmes proportions pendant la phase aiguë d'une Eimeriose due à *E. acervulina*. Avec *E. necatrix*, au contraire, les modifications ne sont pas les mêmes pour les deux substances.

Enfin *E.brunetti* ne semble pas modifier l'absorption de ces corps. Le lieu de la multiplication parasitaire aurait donc une importance, ce qui est prévisible. À ces troubles de l'absorption, s'ajoutent des modifications de la perméabilité intestinale.

Pout,(1967), constate une atrophie des villosités intestinales due à la coccidiose.

Il semble donc que, par les travaux de (Yvoré et al., 1972) , le pouvoir pathogène d'*E.acervulina* soit 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 perméabilité.
- indirecte, par sous-consommation d'aliment et d'eau.

1.4.2.4 Action toxique

Les coccidies exercent une action toxique locale déterminant de la nécrose et aggravant les hémorragies (Freeman, 1970 ; Euzeby, 1987).

Le phénomène de coagulation intra-vasculaire disséminée est également observé (Bussiéras et Chermette, 1992b). L'activité toxique est aussi liée à la libération d'une toxine, un polysaccharide appelé pro glycogène qui entraîne la perturbation du métabolisme des glucides. Ceci entraîne une perturbation du fonctionnement musculaire avec une asthénie musculaire intéressant non seulement les muscles locomoteurs mais également les muscles lisses du tube digestif, d'où la flaccidité intestinale signalée (Euzeby, 1987).

1.4.3 Action immunogène

L'infection par les *Eimerias* induit une immunité protectrice caractérisée par : une immunité de longue durée et une spécificité par apport à l'espèce en cause. Son degré dépend de l'espèce parasitaire. Ainsi, chez les poulets par exemple, l'immunité contre *E.tenella* ne confère pas une résistance contre *E.maxima* (McDougald, 2003).

Une fois installée, cette immunité se traduit par une diminution ou suppression des troubles, et une diminution (le plus souvent) ou suppression de la production d'oocystes. Sa persistance est limitée dans le temps, en l'absence de réinfestation pour l'entretenir (Bussiéras et Chermette, 1992b).

Des travaux en infection expérimentale montrent que l'immunité est totalement acquise et installée après trois contacts avec toutes les espèces de coccidies du poulet et même parfois en un cycle avec certaines espèces comme *E. maxima*, le cycle durant une semaine et l'immunité 3 semaines (Bostvironnois et Zadjian, 2011).

L'immunité est plus solide et durable lorsqu'elle est consécutive à des infections renouvelées que lorsqu'elle fait suite à une infection unique. Cela est confirmé par l'étude de (Palo, 1987) qui montre que les lots inoculés avec 25 000 oocystes uniquement au jour 1 de l'expérience montrent un taux de mortalité plus élevé (28,8%) que celui des lots inoculés avec 80 000 oocystes uniquement au jour 13 (5,6 %).

Dans la quasi- totalité des cas de coccidiose, les jeunes sujets sont plus sensibles et manifestent souvent des signes cliniques de la maladie, tandis que les poulets âgés sont relativement résistants (Lillehoj, 1998). Malgré d'innombrables travaux, le mécanisme exact de cette immunité reste mal connu.

1.5 Etude clinique et lésions

Les signes et les lésions des espèces coccidiennes les plus pathogènes du poulet sont récapitulés dans le tableau anatomoclinique (Tab 1.4).

TABLE 1.4 – Signes et lésions des espèces coccidiennes les plus pathogènes du poulet

Espèces	Sites	Lésions macroscopiques	MPP	TMS	Signes
<i>E. brunetti</i>	Partie postérieure de l'intestin	Coagulations nécrotiques, entérite mucoïde et hémorragique	120	18	Diarrhée sanguinolente
<i>E. necatrix</i>	Intestin	Ballonnement, spots blanchâtres, hémorragie pétéchiale, exsudation mucoïde et sanguinolente	138	18	Déshydrations
<i>E. tenella</i>	Caeca	Hémorragie dans la lumière, muqueuse épaisse et blanchâtre, noyaux de sang coagulé	115	18	Anémie
<i>E. acervulina</i>	Partie postérieure de l'intestin	Lésions rondes et blanchâtre (Infection légère), plaies coalescentes membrane intestinale épaisse (infection lourde)	97	17	Réduction de Croissance
<i>E. maxima</i>	Intestin	Membrane intestinale épaisse, exsudation mucoïde, hémorragie pétéchiale	121	30	Consommation faible d'aliment et d'eau

TMS : Temps minimal de sporulation , PPM : Période pré patente minimale. Source : Modifié de (McDougald, 2003).

1.5.1 Symptômes

Suivant les espèces de coccidies en cause, la localisation des lésions, l'âge des sujets, et le mode d'élevage, on peut distinguer deux types de coccidiose :

1.5.1.1 Coccidiose caecale : Lésions du caecum

Causée par des espèces coccidiennes très pathogènes : *E.tenella*, *E.necatrix*, *E.brunetti* et présentes en absence ou lors d'inefficacité des anticoccidiens, les signes cliniques exprimés lors de l'atteinte par ces espèces sont plus marqués :

- 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).

Due principalement à *E.tenella*, cette forme atteint les poulets jusqu'à l'âge de 2 à 3 semaines (Villate, 2001). En effet, 90% des animaux peuvent succomber à la suite d'une coccidiose due à *E.tenella* (Buldgen et al., 1996). 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).

1.5.1.2 Coccidiose subclinique : Lésions de l'intestin grêle

De nombreuses coccidies ont un tropisme pour l'intestin grêle. Selon les coccidies en cause et l'importance des infections contractées, des formes de coccidioses intestinales sont exprimées sachant que la pathogénéicité de ces parasites est très inégale (Mekalti, 2003) : Dues essentiellement à : *E.acervulina* et *E.maxima* et sont présentes chez les oiseaux ne recevant pas de coccidiostatiques ou lors de chimiorésistance, la manifestation clinique est souvent légère, caractérisée par :

- Une diminution de l'ingéré alimentaire ;
- un mauvais indice de consommation ;
- diarrhée et 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).

Cette forme de coccidiose appelée coccidiose zootechnique, est asymptomatique, mais de grande importance économique, car elle entraîne la diminution du taux de conversion alimentaire et un mauvais aspect des carcasses (décoloration) (Bussieras et Chermette, 1992).

Les conséquences du développement parasitaire induites :

- Une perturbation de la fonction digestive qui se traduit par un ralentissement du transit et des troubles de l'absorption (Yvoré, 1986).
- Hyporexie occasionnelle, de l'amaigrissement, une hypopigmentation, une diminution de la ponte mais dans la plupart des cas, seul l'indice de productivité est diminué.

- Baisse des performances de productivité (avec augmentation de l'indice de conversion).
- Effets nutritionnels sévères et ce, à travers différents stades du processus alimentaire (ingestion, digestion, absorption, transport par le sang, stockage, mobilisation et métabolisme (synthèse protéique) (Ruff, 1986).

1.5.2 Lésions

Les lésions sont en fonction du pouvoir pathogène des espèces coccidiennes en cause. Les aspects lésionnels macroscopiques et microscopiques manifestés par les espèces coccidiennes les plus dominantes, sont mentionnées ci-après :

a) Cas de l'espèce *tenella* (forme caecale) :

Anciennement appelée *Coccidium tenellum* ou *Coccidium perforum*, c'est en 1981 que les zoologistes français, Railliet et Lucet, donnent son nom à *E.tenella*. C'est l'une des espèces d'*Eimeria* les plus virulentes et la première dont le génome est séquencé et partiellement annoté (Reid et al., 2010).

Macroscopiquement, lors d'une infection par *E. tenella*, on note :

- Avant le 4^{ème} jour post-inoculation, de petits foyers d'érosion de l'épithélium caecal sont observés lors de schizontes matures de la 1^{ère} génération.
- Au 4^{ème} 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 décollée).
- Du 6^{ème} au 7^{ème} jour post-infection, le contenu caecal devient dur et sec éventuellement mêlé aux fèces.
- Au 10^{ème} jour post-inoculation, la régénération des tissus détruits est rapide, pouvant être complète.

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^{ère} génération, atteignant la maturité sont largement éparpillées entre le 2^{ème} – 3^{ème} 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, notant : saignement, perturbations des glandes caecales et destruction de la muqueuse et de la paroi musculaire (McDougald et Reid, 1997).

Histologiquement, on note une infiltration lymphoïde de la muqueuse (Euzeby, 1978). Au début du processus, on note une hypertrophie des cellules parasitées par les schizontes I puis la destruction des cellules infectées par les schizontes II, qui peuvent mesurer jusqu'à $60\mu m$, avec pertes de substance et nécrose de la paroi des capillaires .

b) Cas de l'espèce *acervulina* (forme subclinique) :

Macroscopiquement, la paroi de la partie intestinale atteinte (duodénum) manifeste un épaississement, 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).

Selon le degré des lésions macroscopiques, on peut définir une échelle du score lésionnel (Johnson et Reid, 1970) (Tab 1.5).

TABLE 1.5 – Echelle de Johnson et Reid, (1970).

Notes	Scores lésionnels
0	Absence de lésions
+1	Lésions discrètes et peu nombreuses
+2	Lésions modérées avec la présence d'un contenu intestinal aqueux
+3	Lésions étendues avec œdème de la paroi intestinale
+4	Lésions inflammatoires sévères avec tendance hémorragique.

Il est à noter que chaque espèce d'*Eimeria spp.* du poulet possède son propre barème lésionnel (Holdsworth et al., 2004) et ce, par rapport à la région intestinale inspectée) et la sévérité des lésions :

- 1) Duodénum et la partie haute du jéjunum (*E. acervulina*) ;
- 2) L'intestin moyen (autour du diverticule de Meckel) (*E. maxima* et *E. necatrix*) ;
- 3) L'iléon et le rectum (*E. brunetti*) ;
- 4) Les caeca (*E. tenella*) (Annexe B).

1.6 Diagnostic

Le diagnostic de la coccidiose est basé sur l'examen clinique (ante-mortem) et nécrosique (post-mortem).

1.6.1 Examen clinique

Le diagnostic clinique de la coccidiose est facile et est basé sur l'observation des signes cliniques. Il peut se confirmer aisément à l'examen coprologique (Belot et Panguï, 1986). Les formes aiguës de coccidiose sont de plus en plus rares actuellement. En effet, le diagnostic clinique est difficile dans les autres formes de coccidiose (Bussieras et Chermeite, 1992).

1.6.2 Examen nécrosique

Cet examen a pour but de rechercher les lésions de coccidiose sur des prélèvements (fragments d'intestin et de cæcum) par microscopie afin de détecter les oocystes ou d'autres formes intermédiaires (schizontes, gamétocystes...) (Adewole, 2012). En fonction de ces examens, les scores lésionnels enregistrés peuvent faire l'objet d'une classification selon la technique de (Johnson et Reid, 1970) qui permet d'apprécier la gravité de la maladie. Cependant, il faut signaler que le diagnostic précis de la coccidiose est très difficile (McDougald et Reid, 1991).

1.7 Spécificité du parasite

1.7.1 Parasite- hôte

Chez le poulet, cette spécificité peut être utilisée comme un moyen de diagnose entre les espèces d'*Eimeria spp.* (Johnson et Reid, 1970). Cependant, elle est plus ou moins, stricte en fonction de l'espèce parasitaire et des conditions d'inoculation (McDougald et Reid, 1997). 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 (Smith et Lee, 1986; Yun et al., 2000).

1.7.2 Spécificité tissulaire et cellulaire

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., 1973) alors que les autres espèces se développent dans les entérocytes des cryptes (Pattillo, 1959 ; Doran, 1966). Les différentes étapes du cycle peuvent se dérouler dans des types cellulaires différents. Le tropisme spécifique vers les tissus et les cellules ciblées est démontré expérimentalement, par des inoculations parentérales des différentes formes parasitaires : oocystes sporulés, sporozoïtes et mérozoïtes. L'inoculation intramusculaire (IM), intra-péritonéale (IP) et intraveineuse (IV) d'*E. nieschulzi* chez le rat (Lander, 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, 1964) aboutissent au développement du parasite au niveau de son site spécifique intestinal ou cæcal.

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 McKenzi, 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 caecums ; lors des infections lourdes, les lésions peuvent s'étendre au-dessus et au-dessous du sphincter iléo-caecocolonique (Johnson et Reid, 1970).

1.8 Mode d'infestation

La contamination par les oocystes d'*Eimeria* est généralement faible au cours des deux à trois premières semaines, augmente rapidement pour atteindre un pic entre la quatrième et sixième semaine, et diminue ensuite vers la septième à la huitième semaine (Conway et McKenzie, 2007).

1.8.1 Facteurs favorisants

1.8.1.1 Extrinsèques

Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'apparition ou la sévérité de la coccidiose dans un élevage :

- Le non-respect des normes d'élevage au sens large (bâtiments, dimensions, type de matériel, etc. . . ;
- l'absence d'hygiène, mauvaise désinfection ;
- le manque de ventilation favorise la sporogénèse ;
- très forte densité des poulets ;
- la promiscuité des jeunes poussins avec des sujets plus âgés et porteurs ; et
- le déplacement anarchique des hommes visiteurs ou personnel de fermes allant d'un élevage à un autre véhiculant litières souillées sous leurs chaussures.

1.8.1.2 Intrinsèques :

1.8.1.2.1 Âge : La coccidiose affecte très sévèrement les poussins dans les premiers jours de vie de façon aiguë (surtout la frange d'âge de 10 à 30 jours). Par contre, les sujets plus âgés manifestent plutôt une coccidiose subclinique car ayant été déjà en contact avec les coccidies, ont développé une certaine immunité.

1.8.1.2.2 Etat de santé : Les maladies intercurrentes comme : Gumboro qui aggrave l'infection coccidienne ; la maladie de Marek qui rompt l'immunité acquise et l'intoxication par l'aflatoxine aggrave les perturbations nutritionnelles déterminées par la coccidiose.

1.8.1.2.3 Alimentation : Le déséquilibre nutritionnel favorise le stress en déclinant la résistance organique des sujets affectés. La carence en vitamine A élève la réceptivité et la sensibilité tandis que l'administration de cette dernière aide à la guérison.

La vitamine B stimule le développement de certaines espèces d'*Eimeria* (Warren et Ball, 1963). Par exemple, lors d'une infection par *E.tenella*, la vitamine B entraîne une augmentation de l'excrétion d'oocystes et de la mortalité (Sherkov, 1976). Ceci s'explique par les besoins en vitamine B des coccidies pour les différentes phases de leur développement. La carence en cette vitamine pourra constituer un frein à la prolifération des coccidies.

La carence en vitamine K, par contre aggrave la coccidiose hémorragique à *E.tenella* tandis que son apport a un effet bénéfique dans la lutte contre la coccidiose. Un aliment riche en protéines, favorise le développement des coccidies. L'excès protidique élève la réceptivité en favorisant la sécrétion de trypsine nécessaire à l'ouverture des oocystes sporulés (Euzeby, 1987).

Afin de lutter contre la coccidiose, la chimio prophylaxie est basée sur l'utilisation de médicaments et de vaccins anticoccidiens (Williams, 1999) et la phytothérapie à base de plantes à travers le monde (Tipu et al., 2006 ; Christaki et al., 2012).

Traitements anticoccidiens et moyens de lutte

Chapitre II

Traitements anticoccidiens et moyens de lutte

La lutte contre la coccidiose est basée sur la prévention médicamenteuse ou vaccinale et le traitement à la suite d'un diagnostic. Bonne gestion et l'hygiène de la litière, l'utilisation des anticoccidiens dans la ration alimentaire des oiseaux et l'utilisation des vaccins sont les mesures de biosécurité mises en place pour la prévention de la coccidiose.

2.1 Prophylaxie médicale

Elle recourt à deux méthodes : la vaccination et la chimio prévention». Les interventions sont effectuées systématiquement à des périodes déterminées de l'animal (Buldgen, 1996 ; Mafwill, 2002).

2.1.1 Vaccination

Les vaccins sont une alternative aux traitements chimiques. Du fait des résistances apparues contre les anticoccidiens, les vaccins se présentent comme étant l'avenir de la prophylaxie anticoccidienne. Les variations de situations épizootiques d'une région à l'autre nécessitent des programmes de vaccination adaptée (Surdeau et Henaff, 1979). Les vaccins anticoccidiens les plus commercialisés, à travers le monde, contiennent des oocystes vivants atténués ou virulents, de souches de coccidies (Shirley et al., 2007).

2.1.1.1 Vaccins tolérants

Les vaccins tolérants aux ionophores ont pour avantage majeur de permettre l'utilisation des ionophores pendant les 3 à 4 premières semaines post vaccinales où l'immunité n'est pas encore complète et l'oiseau demeure toujours vulnérable (Chapman et al., 2005). Ils peuvent également altérer le niveau de résistance d'une certaine population de coccidies (Mathis, 2003 ; Chapman et al., 2004 ; Peek et Landman, 2006). Les anticoccidiens limitent la pression des infections coccidiennes du milieu pendant la période de développement de l'immunité (Vermeulen et al., 2001).

2.1.1.2 Vaccins sensibles

Plusieurs molécules des Apicomplexa (Micronèmes) prouvent leur utilité prophylactique contre les coccidies (Tewari et al., 2010). Des protéines micronèmes d'*E.tenella* comme antigène démontrent un effet stimulateur d'immunité considérable (Du et Wang, 2005). Des protéines associées au stage sexuel du cycle d'*E.maxima* interviennent dans la protection immunitaire des sujets expérimentalement infectés (Lee et al., 2009). Ces protéines gamétocytaires induisent une immunité intestinale protectrice qui déprime la production d'oocystes et réduit les lésions intestinales avec l'amélioration des performances de croissance.

2.1.2 Chimio- prévention

Elle se fait par l'incorporation des substances médicamenteuses dans l'aliment et l'eau de boisson, antibiotiques, anticoccidiens, vitamines, Hépatoprotecteurs afin d'aider la croissance et de prévenir l'apparition d'éventuelles pathologies (Surdeau et Henaff, 1979). Il est à noter que l'utilisation des anticoccidiens est réglementée. Pour les poulets de chair, l'administration doit être interrompue 4 jours au moins avant l'abattage. Mais l'émergence de résistance aux anticoccidiens semble limitée son intérêt.

Pour limiter les phénomènes de résistance, des programmes d'alternance d'anticoccidiens (Chapman et al., 2002- 2010) sont mis en application :

A- Le shuttle program ou programma navette :

Consiste à utiliser deux anticoccidiens pour une même bande. Un ionophore dans l'aliment démarrage et anticoccidien de synthèse dans l'aliment croissance.

B- La rotation (witching) :

Consiste à changer d'anticoccidiens après quelques bandes. Cependant, la chimio-prévention demeure une méthode de lutte efficace et la plus économique contre la coccidiose (Naciri et Nouzilly, 2001).

2.1.2.1 Anticoccidiens

Les anticoccidiens ne sont pas des médicaments mais des additifs alimentaires. Le traitement est basé sur deux groupes actifs :

A- Les coccidiocides :

Substances qui détruisent les coccidies pendant leur développement (Diclazuril, Toltrazuril, Dinitolmide et ionophores) (Manger, 1991 ; Fowler, 1995). Les sulfamides sont les plus utilisés, soit seuls, soit associés à d'autres médicaments tels que l'amprolium et les pyrimidines (Saville, 1999). Ils sont utilisés, de préférence, dans l'eau de boisson mais ils peuvent aussi être ajoutés dans l'aliment.

Bien que le traitement soit efficace, des cas de résistance et de toxicité sont souvent observés (Peek et al., 2003 ; Abbas et al., 2011a).

B- Les coccidiostatiques :

Substances chimiques qui stoppent ou inhibent la croissance des coccidies tout en permettant une infection latente après retrait des médicaments. Il en existe de deux sortes : les produits de synthèse qui agissent sur le métabolisme du parasite et antibiotiques ionophores appelés encore les polyéthers carboxyliques, 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).

Seuls diclazuril et sulfaquinoxaline de sodium sont abordés vu qu'ils sont utilisés dans cette étude.

Diclazuril De formule chimique :

2, 6-dichloro- α -(4-chlorophenyl)-4-(4, 5-dihydro-3, 5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl) benzeneacetonitrile ; (p-chlorophenyl)[2,6-dichloro-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-as-triazin-2(3H)-yl)phenyl] acetonitrile (Fig 9),cette molécule de la famille des triazinones, n'a pas d'activité antibactérienne.

Seule une activité antifongique vis-à-vis de certains champignons, *Candida albicans* et *Trichophyton mentagrophytes*, est prouvée. Les différents avis concluent à l'absence de risques de résistances croisées (Afssa 2007). L'effet ultime du *Diclazuril*, quelle que soit l'espèce coccidienne, est l'interruption du cycle biologique et la destruction du parasite.

Sulfaquinoxaline De formule chimique :

4-amino-N-2-quinoxalinylnbenzenesulfonamide ;N1-(2-quinoxalinyln) (Fig 10), cette substance possède un large spectre d'activité antibactérienne (germes Gram + et Gram -) et anticoccidienne (anti protozoaire) (Donal et al., 2014). Le principe actif : sulfadimidine est un sulfamide à action rapide dans l'organisme. Il a une action uniquement bactériostatique, bloquant l'utilisation de l'acide folique par les bactéries.

La sulfaquinoxaline présente une activité plus particulièrement orientée vers les coccidies. Il y a des travaux (Conaway et McKenzie, 2007) qui rapportent que l'alimentation qui contient 125 ppm de SFQ est très efficace dans la prévention de la coccidiose intestinale et coccidiose cécale acquises naturellement (principalement *E.tenella* et *E.necatrix*) chez des poulets de chair. L'action de la sulfaméthazine contre *E.tenella* est dirigée contre les schizontes de deuxième génération en inhibant la division nucléaire et l'activité de la formation de mérozoïtes.

Actuellement, la réglementation internationale interdit l'usage d'un grand nombre de produits chimio-thérapeutiques pour des raisons de risque de toxicité pour le consommateur ou pour l'environnement (Kosal et Anderson, 2004)(Annexe C).

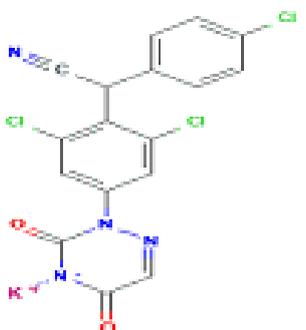


FIGURE 9 – Structure du diclazuril

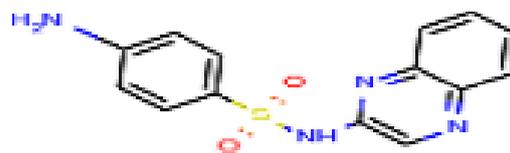


FIGURE 10 – Structure du sulfaquinoxaline

2.1.2.2 Mode d'action des anticoccidiens

Les coccidies sont sujettes à l'attaque des médicaments à des stades variés de leur développement, à l'intérieur de l'hôte. Des médicaments de principes actifs totalement différents peuvent agir sur la même étape de développement du parasite (Fig 11).

Selon (Jeffers, 1975), l'Amprolium rivalise avec l'absorption de la thiamine par le parasite, tandis que les Quinolones et les Clodipoles arrêtent les parasites par l'inhibition du métabolisme d'énergie dans le cytoplasme. D'autres principes actifs comme les Ionophores tuent les sporozoïtes. Ces derniers dans la lumière intestinale, présentent un gonflement considérable, de larges vacuoles ainsi que des trous à la surface qui laissent suggérer des dommages osmotiques létaux. Le processus de destruction continue avec les nouvelles trophozoïtes.

Les Nicarbazines, Robénidines et les Zoalenes détruisent les schizontes de première et deuxième génération et les Sulfonamides avec les médicaments dérivés font de la compétition pour l'incorporation de l'acide folique. Ils agissent sur les schizontes en développement et les phases de divisions sexuées.

Les Diclarzuriles agissent sur la première schizogonie avec *E.tenella* mais sur la dernière schizogonie avec *E.acervulina* et sur les macrogamètes en maturité chez *E.maxima* (Chapman, 1999).

L'anticoccidien détruit sélectivement les sporozoïtes intracellulaires tandis qu'il laisse relativement intacte la cellule hôte (Chapman, 1993). Il est démontré que les anticoccidiens ont un effet sur la seconde génération de mérozoïtes mais pas sur le développement des gamètes.

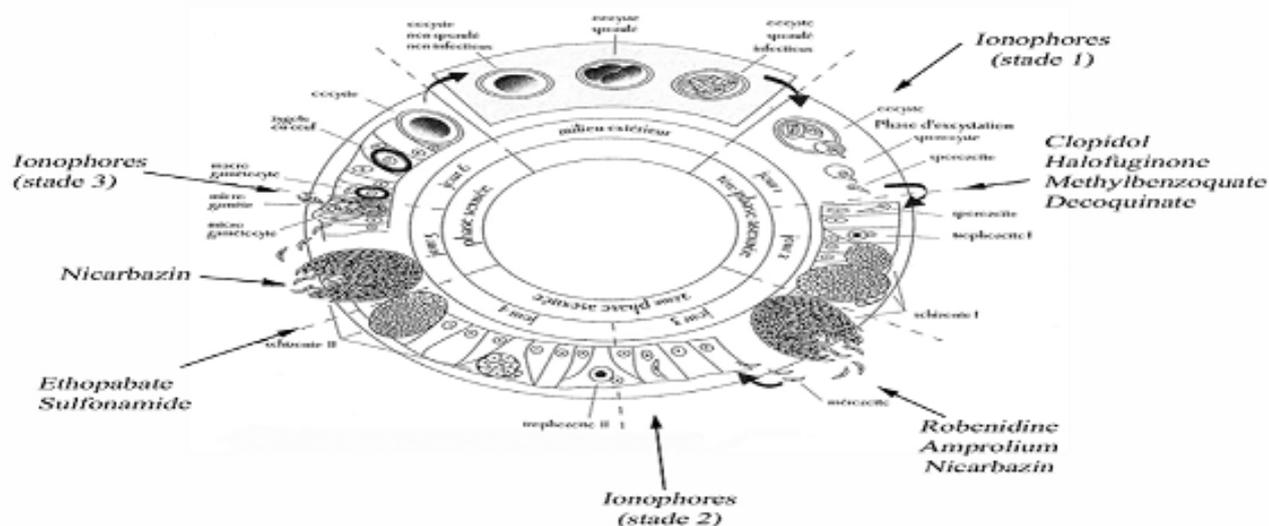


FIGURE 11 – Représentation schématique des stades d'action des anticoccidiens d'après un dessin de (Bichet, 2003) et des données de (Fowler, 1995).

2.1.2.3 Toxicité des anticoccidiens

Bien que les anticoccidiens soient efficaces contre la coccidiose, les ionophores ne sont pas sans danger pour la volaille. À des doses supérieures à celles recommandées par les fabricants, ils entraînent des intoxications importantes. Le plus souvent, ces intoxications apparaissent suite à des erreurs lors de leur administration (Zouzoua, 1990). La toxicité du "monensin" est plus fréquemment signalée, car il est le plus ancien et le plus utilisé chez la volaille. Ainsi, son utilisation, à des doses croissantes, entraîne des problèmes d'anorexie, de diarrhée, d'amaigrissement et de faiblesse musculaire. Cette toxicité se présente également sous forme d'une congestion généralisée des viscères et d'une atteinte cardiaque.

2.2 Chimiorésistance

Bien que la chimio prévention des coccidioses représente incontestablement un succès en matière de prophylaxie, les anticoccidiens n'éradiquent pas pour autant le risque parasitaire et les échecs restent assez fréquents.

Le développement d'une résistance aux anticoccidiens est depuis longtemps reconnu comme l'un des principaux facteurs ayant contribué à la diminution de l'efficacité de certains médicaments anticoccidiens utilisés dans la production commerciale de volaille.

L'utilisation intensive des médicaments anticoccidiens dans l'alimentation des animaux conduit à une large diffusion de la résistance à la propagation dans les principales régions productrices de poulets de chair du monde (Mathis et McDougald, 1984 ; Chapman, 1984a ; Chapman et Hacker, 1994 ; Mathis, 1999).

L'apparition dans les élevages de souches résistantes est plus ou moins rapide suivant la substance considérée. Plusieurs moyens sont étudiés pour pallier la chimiorésistance :

- Augmentation de la posologie (élévation de la teneur d'un aliment en anticoccidien) ;
- utilisation alternée des médicaments ; et
- association de plusieurs substances actives, et interruption de l'administration du médicament à l'encontre duquel, la résistance s'est installée.

2.3 Phytothérapie, alternative anticoccidienne

Depuis 60 ans, l'utilisation de produits chimiques anticoccidiens : coccidiocides, coccidiostats et ionophores dans l'alimentation de poulet, comme une stratégie ordinaire pour contrôler la coccidiose aviaire dans la production avicole moderne (Chapman et al., 2010 ; Blake et Tomley , 2014).

Bien que cette stratégie soit rentable et réussie, le principal problème associé à leur réaction inefficace est le développement de la résistance des espèces d'*Eimeria* à tous les produits synthétiques disponibles (Abbas, 2011a; Abbas et al., 2012; Alnassan et al., 2015).

De plus, les médicaments anticoccidiens contenus dans la viande de poulet à chair peuvent être des agents potentiellement toxiques pour la santé des consommateurs et pour l'environnement (Ogbe et al., 2008; Nogueira et al., 2009). En raison du coût élevé des nouveaux médicaments ou de vaccins, le développement des résistances aux anticoccidiens, et leurs problèmes des résidus dans les carcasses d'animaux traités, les travaux sur la phytothérapie anticoccidienne attirent de plus en plus l'attention des chercheurs à travers le monde (Tipu et al., 2006; Christaki et al., 2012). Cette situation encourage l'utilisation de remèdes à base de plantes médicinales, phytocomposés, huiles essentielles, etc... dans l'alimentation des volailles en raison de leurs effets anticoccidiens qui, par conséquent, stimulent le système immunitaire et améliorent les performances de croissance des animaux (Abbas et al., 2010). Dans certains pays, des complexes à base de plantes, tels que : Apacox®, Natustat® et Zycox® sont utilisés (Abbas et al., 2012).

De nombreux composés d'origine végétale semblent doués d'activités anticoccidiennes contre les espèces *Eimeria* affectant la volaille (Alfaro et al., 2007; Naidoo et al., 2008, Muthamilselvan et al., 2016, Udo et al., 2018).

Parmi les alternatives naturelles, l'espèce *Olea europea* semble douée d'une activité anticoccidienne par les travaux de (De Pablos et al., 2010).

Phytobiotiques, source d'intérêt :

Cas des co-produits oléicoles

Chapitre III

Phytobiotiques, source d'intérêt :

Cas des co-produits oléicoles

Dans cette partie, seuls les phytobiotiques dont l'intérêt lié à leurs activités biologiques dans le régime alimentaire de la volaille, sont abordés. Quelques connaissances scientifiques décrites en termes d'antioxydants sont nécessaires pour pouvoir discuter l'évaluation anticoccidienne des polyphenols extraits des co-produits oléicoles.

3.1 Généralités

Généralement, les phytobiotiques (phylogéniques) sont définis comme étant des parties de plantes ou leurs extraits incorporés à l'alimentation des animaux de rente afin d'améliorer la productivité de l'élevage par l'amélioration de l'activité digestive des enzymes, l'absorption des nutriments, des performances de croissance et l'élimination de pathogènes résidants dans le tube digestif des animaux (Balunas et Kinghorn , 2005 ; Athanasiadou et al., 2007) , ainsi que les qualités des produits alimentaires issus de ces animaux.

En terme de molécules bioactives, la plupart des phytobiotiques fait partie du grand groupe des métabolites secondaires (cas des polyphenols) des plantes (Bakkali et al., 2008) qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse (Judd et al., 2002), mais résultent de réactions chimiques ultérieures, comme la défense contre les prédateurs et les pathogènes. Leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon, les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (Macheix et al.,2006). Leurs composés bioactifs présentent une diversité structurelle importante et des activités biologiques différentes . De par leurs propriétés thérapeutiques notamment effets anti-infectieux : antibactériens (Ceylan et Fung, 2004), antitoxigéniques, et anti-inflammatoires (Romier et al., 2009), des activités antioxydantes (Francis et al., 2002), antivirales et antimycotiques sont rapportées par (Lopez-Bote et al.,2004). Plusieurs plantes dont les métabolites secondaires sont doués de propriétés anti protozoaires (Efferth, 2009), en particulier contre le *Plasmodium*, la *leishmaniose* et le *trypanosome* (Nikmehr et al., 2014 ; Sülsen et al., 2016 ; Ramdane et al., 2017 ; Panda et Luyten, 2018) , et les effets anticoccidiens de certaines espèces sont également prouvés (Youn et Noh , 2001 ; Arab et al., 2006 ; Naidoo et al., 2008). De plus, ce sont de bonnes molécules candidates en raison d'une toxicité relativement faible ou nulle et certains flavonoïdes limitent la résistance des protozoaires aux autres médicaments (Kerboeuf et al., 2008).

Par conséquent, l'utilisation d'antioxydants naturels peut atténuer les effets néfastes liés aux drogues de synthèse, car elles ne sont pas seulement des produits naturels, mais peuvent comprendre de nouvelles molécules auxquelles la résistance ne s'est pas encore développée (Masood et al., 2013).

Nous citons ici les grands groupes de métabolites secondaires ou polyphenols comme antioxydants qui sont largement étudiés, et qui ont aussi un intérêt biologique dans le contrôle de la coccidiose intestinale chez le poulet de chair.

3.2 Les antioxydants (phytobiotiques)

Les antioxydants sont les molécules qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive en inhibant l'oxydation et réduisant le stress oxydatif causé par l'augmentation du niveau des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des radicaux libres (Zubair et al., 2012; Atawodi et al., 2013) qui peuvent déclencher des réactions en chaîne dans la cellule, entraînant la mort ou des dommages à la cellule.

3.2.1 Propriétés des antioxydants

- Intérêt dans la conservation des aliments destinés aux animaux (Brenes et Roura, 2010).
- L'amélioration du statut oxydant qui a un impact sur leur santé et leur qualité de viande.

Les processus métaboliques conduisant à la production des radicaux libres, et donc à une dégradation du statut antioxydant, sont amplifiés en condition de stress. À titre d'exemple, des pratiques d'élevage intensif, telles qu'une densité élevée et une température excessive pour les volailles, augmentent le stress oxydatif (Sims et al., 2010).

Ainsi, ces métabolites antioxydants sont les candidats prometteurs pour le développement des phytobiotiques réduisant le stress oxydatif subi par les animaux, et donc des conséquences sur leur performance. Ces propriétés sont portées par de nombreuses familles de molécules capables de piéger les radicaux libres (Hounsoume et al., 2009), grâce :

- au groupement hydroxyle (OH) porté sur le cycle aromatique de leur structure (Aberoumand et Dokule, 2008);
- au nombre et à la position des groupements fonctionnels;
- à la nature des antioxydants.

Porter (1993) suggère que les antioxydants hydrophiles sont plus efficaces que les antioxydants lipophiles.

3.3 Mécanisme d'action et effets métaboliques

Les radicaux libres réagissent avec les acides gras polyinsaturés et initient un processus de peroxydation des lipides (Koga et Meydani, 2001; Turner et al., 2004). Dans les systèmes vivants, la peroxydation des lipides modifie l'activité enzymatique et la structure des acides aminés et cause des dommages à l'ADN et donc toxique pour la cellule (Lima et Abdalla, 2001).

Normalement, la production et l'élimination de ROS restent en équilibre dynamique, mais si la production de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) dépasse la capacité de protection du système de défense naturel antioxydant, l'équilibre établi pourrait être perturbé.

Cet équilibre défailant à l'appui des oxydants est appelé stress oxydatif et il est impliqué dans la pathogenèse de diverses infections, y compris les maladies parasitaires (Bansal et Bilaspuri, 2011).

Il est à noter que ROS est documenté pour inhiber directement la sporulation et la formation de la paroi cellulaire chez les espèces d'*Eimeria*, ce qui entraîne une interférence avec le cycle de vie d'*Eimeria* (Del Cacho et al., 2010).

Par conséquent, les composés ayant les propriétés antioxydantes et répondant aux exigences du système antioxydant de défense ou directement interfèrent avec les radicaux libres peuvent rétablir l'équilibre oxydants/ antioxydants, conduisant à l'amélioration des oiseaux en coccidiose (Masood et al., 2013).

3.3.1 Action sur le tractus digestif

Des modifications au niveau du tractus digestif suite à l'ingestion des phytobiotiques :

- Amélioration des fonctions intestinales.
- Augmentation des sécrétions enzymatiques digestives et/ou de la longueur de l'intestin a pu être observée avec le thym, et de mélanges commerciaux d'huile de thymol (El Ghousein et Al- Beitawi, 2009).
- Amélioration de la digestibilité des protéines a pu être observée suite à l'ingestion de *Forsythia suspensa*, d'huile essentielle d'origan et des extraits (Sauge thym et romarin)

Cependant, les effets sur le tractus digestif et la digestion ne peuvent pas être généralisés à tous les phytobiotiques, certaines études n'ayant mis en évidence aucun effet (Cross et al., 2007).

3.3.2 Action sur le statut oxydant

Les phytobiotiques ajoutés à l'alimentation de l'animal semblent être capables de réduire l'oxydation des lipides de la viande de volaille à 4°C ou à -20°C, bien que moins efficacement que les antioxydants synthétiques ou α -tocophérol (forme active de la vitamine E).

De plus, ces effets dépendent de la dose d'administration, les doses les importantes étant les plus efficaces généralement, à condition qu'elles soient inférieures au seuil de toxicité (Goñi et al., 2007; Luna et al., 2010).

Les phytobiotiques naturels sont des candidats prometteurs car ils sont composés de nombreuses molécules (Bakkali et al., 2008) ayant des activités différentes, incluant des propriétés immunomodulatrices (Francis et al., 2002 ; Spelman et al., 2006 ; Romier et al., 2009).

Une analyse a pu mettre en évidence les capacités immunomodulatrices de nombreux phytobiotiques (Spelma et Nichols, 2006), et celles à moduler le métabolisme nutritionnel et ainsi contribuer à la santé intestinale des volailles (Gong et al., 2005). Ainsi, il a pu être montré in vitro comme in vivo, la capacité d'ail et de curcuma à moduler la sécrétion des cytokines et à influencer indirectement l'état d'inflammation en diminuant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

3.3.3 Effets métaboliques

Les chercheurs identifient les principales composantes chimiques qui pourraient agir comme modulateur du métabolisme et de l'écosystème du tube digestif soit : les composés phénoliques, les alcaloïdes, les lectines, les polyacétylènes ou les terpènes. Une partie des composés phénoliques apportée par l'alimentation doit subir de processus de transformations bactériennes avant d'être absorbable par l'animal.

Ils sont généralement transformés en acides phénoliques ou lactones qui peuvent présenter des propriétés biologiques différentes des composés initiaux, comme une activité antioxydante plus importante (Selma et al., 2009). Il est à signaler que le microbiote des cæca de poulet est capable d'effectuer ces biotransformations (Iqbal et Zhu, 2009a ; Iqbal et Zhu, 2009b).

Ainsi, la biodisponibilité pour le poulet de certains composés phénoliques est liée à son microbiote digestif. Les effets métaboliques observés couramment sont :

- Augmentation des sécrétions digestives ;
- amélioration de la digestibilité et l'absorption des nutriments ;
- modulation de l'écosystème (microbiote) du tube digestif (effets directs) : rompre les parois cellulaires de certaines bactéries et (effets indirects) : réduire le nombre de bactéries pathogènes (ex : *salmonelles*) ;
- modulation de système immunitaire ;
- favorisation de meilleures performances de croissance chez le porc et la volaille (Gong et al., 2005).

3.3.4 Synergie et antagonisme des antioxydants

Les antioxydants sont composés de très nombreuses molécules (principes actifs) ayant des structures et des activités biologiques très différentes.

Ces molécules peuvent avoir un effet additif, voire même synergique et cela explique que les effets observés pour un extrait végétal soient généralement supérieurs à ceux observés pour ses composants pris individuellement (Chang et al., 2005).

En cas de synergie, l'association d'une molécule lipophile ciblant un composé intracellulaire et d'une molécule bloquant un transporteur, peut augmenter l'efficacité de la première en diminuant son élimination par le transporteur. De même le passage de la membrane par des phytobiotiques polaires peut être facilité par la présence d'autres composés comme les saponines (Wink, 2008).

En cas d'antagonisme, l'effet peut être observé, en particulier lors de l'utilisation conjointe de phytobiotiques issus de plusieurs plantes (Platel et Srinivasan, 2004).

3.3.5 Toxicité des antioxydants

Des problèmes d'utilisation de ces extraits de plantes dans l'alimentation animale en particulier en cas d'inter agissement avec le métabolisme, peuvent poser et provoquer des perturbations physiologiques chez l'animal. Ce sont surtout les intoxications et les allergies (Alloui, 2013). C'est pour cela que les constatations et les résultats de leur utilisation dans les régimes alimentaires de volailles vont se concentrer non seulement sur leurs actions antioxydantes, antimicrobiennes et leur effet bénéfique sur la palatabilité et les fonctions intestinales, mais aussi sur l'efficacité à promouvoir la croissance tout comme les antibiotiques, facteurs de croissance (Alloui, 2013).

3.3.6 Propriétés anticoccidiennes des antioxydants

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro oxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Pincemail et al., 2002), ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense. Il est souvent observé dans une vaste gamme de microbes et parasites (Abd El-Maksoud et al., 2014) y compris la coccidiose (Georgieva et al., 2006).

Les espèces d'oxygène réactif (ROS) réagissent spontanément en ciblant les lipides membranaires. La destruction par oxydation des acides gras insaturés provoque des dommages à la membrane cellulaire, sa fonction diminue et sa perméabilité augmente. Ces dommages entraînent une série d'événements de réactions qui ont des conséquences permanentes sur la santé du poulet, ou même la mort (Georgieva et al., 2006).

Les sporozoïtes d'*Eimeria* envahissent l'épithélium intestinal et provoquent une inflammation conduisant à l'initiation de la réponse immunitaire à la production d'oxyde nitrique (NO) et d'autres pro-oxydants puissants : l'oxygène réactif (ROS).

Ces composés ne sont pas seulement toxiques pour les oocystes sporulés mais ont aussi des effets secondaires négatifs sur l'hôte s'ils ne sont pas protégés par un système antioxydant (Pourali et al., 2014). Cependant, les antioxydants sont signalés comme étant responsables de la lutte contre les infections à *Eimeria* au cours du stress oxydatif et la peroxydation lipidique des tissus de la muqueuse intestinale (Udo et al., 2018) en :

- neutralisant les espèces réactives de l'oxygène par leur interaction avec les cellules cytoplasmiques par modification de leur perméabilité aux cations, ce qui entraîne l'altération de processus cruciaux dans les cellules coccidiennes (Sikkema et al., 1995) ;
- améliorant la croissance des poulets, sans aucune toxicité perceptible.

Cependant, (Samaha et al., 2013), constatent que le phénol à 10 % inhibe un taux de sporulation des coccidies de 48,6 %.

Un certain nombre de composés naturels comme les saponines, les tanins et les flavonoïdes sont signalés dans la littérature pour leurs effets antioxydants et anticoccidiens combinés.

Polyphénols totaux : De nombreux chercheurs mènent l'étude sur les propriétés polyphénoliques des plantes comme stratégie de rechange pour traiter la coccidiose. À titre d'exemple :

- De Pablos et al.(2010), étudient l'acide maslinique (2- α , 3- β -dihydroxiolean-12-en-28-acide oïque), que l'on trouve dans les feuilles et les fruits de l'olivier (*Olea europea* L.), comme nouveau produit coccidiostatique naturel contre *E.tenella*. Une augmentation considérable du poids est constatée chez les poussins traités à l'acide maslinique par rapport au groupe témoin. Parallèlement, l'étude histopathologique du cæcum à 120 h après le traitement montre que le taux d'infection diminue de façon significative ;
- Almeida et al.(2014), la *curcumine* améliore la résistance à la coccidiose, la réduction de l'excrétion d'oocystes, et lésions intestinales ;
- Messai et al.(2014), l'incorporation de la plante *Artemisia herba-alba* Asso, dans l'alimentation (5%) permet de prévenir la mortalité, de réduire l'excrétion d'oocystes, d'atténuer la sévérité des lésions induites et de prévenir l'effondrement des paramètres hématologiques (hématocrite, taux d'hémoglobine), et biochimiques (protéines totales, lipides totaux) chez les animaux infectés ;
- Sahraoui et al.(2015), montrent que l'additif à base de l'extrait végétal de *Yucca Schidigera* dans l'alimentation du poulet de chair réduit considérablement l'élimination des œufs de coccidies et prouve son efficacité dans la maîtrise de la coccidiose.

Flavonoïdes : Des études montrent que les flavonoïdes ont la capacité d'agir en tant qu'antioxydants puissants en éliminant les réactions oxydatives (Ruberto et al.,2007). De plus, flavonoïdes ayant des groupes hydroxyles multiples également agissent comme pro-oxydants (Miguel, 2010).

Le mécanisme d'action proposé pour les flavonoïdes est la conversion du groupe hydroxyle en pro-oxydant lorsqu'il est oxydé par ROS présent dans la membrane cellulaire interne et capable d'oxyder les lipides, et de l'ADN, ce qui peut mener à une nécrose tardive ou à une apoptose des cellules endommagées en éliminant les mutants potentiels (Bakkali et al., 2008).

Xanthohumol (XN) : un flavonoïde prénylé, obtenu à partir de houblon, a un effet contre différentes espèces d'*Eimeria* chez le poulet (Allen, 2007) en entraînant une réduction importante des scores lésionnels chez les sujets défiés avec *E. acervulina*. En outre, poulets infectés par *E. acervulina* et *E. maxima* traités avec 20ppm XN, présentent moins d'oocystes que les groupes témoins et les shizontes d'*E. tenella* montrent un effet inhibiteur.

Camellia sinensis : est une plante riche en flavonoïdes naturels et qui a des effets anticoccidiens et propriétés antioxydantes (Chen et al., 2008).

Conyzoïdes d'ageratum : *Ageratum conyzoides* est une herbacée annuelle de la famille des Astéracées qui contient des flavonoïdes, montre une réduction significative du stress oxydatif causé par *E.tenella* lorsqu'il est alimenté au rythme de 500 à 1000mg/kg de poids corporel (Nweze et Obiwulu , 2009).

Pinus radiata : est un conifère persistant de la famille des pinaceae. L'extrait aqueux de l'écorce de pin se montre efficace in vitro vis-à-vis de l'inhibition de la sporulation (Molan et al., 2003) chez trois espèces de coccidies aviaires.

Psidium guajava : est une espèce d'arbre fruitier de la famille des Myrtaceae, originaire des régions tropicales d'Amérique. L'extrait méthanolique réduit la proportion de sporulation (Cedric et al., 2017) par inhibition ou inactivation des enzymes endogènes responsables du processus de sporulation, comme dans le cas des œufs d'helminthes (Jones et al., 1994 ; Molan et al., 2003). Ces derniers suggèrent que des extraits peuvent pénétrer dans la cellule d'oocystes et provoquent une perte de composants intracellulaires.

Anthocyanidine : anthocyanidines ou anthocyanidols sont une sous-classe des flavonoïdes. L'extrait de pro-anthocyanidine s'avère efficace contre l'infection d'*E. tenella*, comme en témoignent, la pathologie intestinale, le poids corporel et la mortalité. En conséquence, cet extrait diminue la quantité d'oxyde nitrique, mais l'oxyde nitrique n'est pas éliminé et l'augmentation des superoxydes dismutases dans le plasma des poulets est notée également (Wang et al., 2008).

Yang et al. (2015), démontrent que *Bidens pilosa* (*B.pilosa*) exprime une activité anticoccidienne chez les poulets infectés par *E.tenella* par le taux de survie, diminution du nombre d'oocystes fécaux, de pathologie intestinale et gain du poids corporel.

Bien que le mécanisme d'action des principes actifs de *B. pilosa* responsables de l'action anticoccidienne soit inconnu, il est possible que ses composés actifs interviennent dans les phases initiales du cycle de vie de l'*Eimeria* car les phases peuvent être sujettes à l'attaque chimique par rapport à l'oocyste dont la paroi est très résistante aux agressions physiques et chimiques.

Cette plante est une source riche en substances phytochimiques, tels que 70 aliphatiques, 60 flavonoïdes, 25 terpénoïdes, 19 phénylpropanoïdes, 13 aromatiques, 8 porphyrines et 6 autres composés (Bartolome et al., 2013). Il est intéressant de noter qu'un polyacétylène (1-phényl-1-1,3-diyn-5-ène-5-ol-acétate de 1,3-diyn-5-ène-7-ol-acétate) et un flavonoïde (quercétine-3,3-diméthoxy-7-0-rhamnoglucopyranose) dans cette plante sont proposés comme étant des composés actifs contre le protozoaire parasite, *Plasmodium* (Dauguschies et al., 1998).

B. pilosa est utilisée dans l'alimentation des oiseaux, ce qui entraîne une augmentation significative du gain de poids corporel et une diminution de la conversion alimentaire. De plus, cette plante réduit les dommages au niveau des selles, la destruction des villus et la diminution des villus-tocryptus dans les cæca (Yang et al., 2015 ; Chang et al., 2005). En outre, elle se montre capable de moduler l'immunité de l'hôte (Chang et al., 2005), qui peut avoir un impact sur la coccidiose.

Tannins condensés : Les tanins sont potentiellement antioxydants. Sur la base de leur structure, on cite deux groupes : les tanins hydrolysables et condensés (Khanbabee et van Ree, 2001). Il est à noter que les tanins condensés inhibent le cycle de vie des coccidies. L'extrait de l'écorce du pin (*Pinus radiata*) composé d'un mélange de (85% de tanins et 8% de flavonoïdes) (Molan et al., 2009), réduit les oocystes sporulés d'*E. tenella*, *E. maxima* et *E. acervulina* chez le poulet de chair. Tannins et acide chicorique, isolés d'*E. officinalis* (Kaleem et al., 2014) et *E. purpurea* (Zhai et al., 2007), respectivement, sont signalés pour déclencher efficacement la réponse immunitaire humorale contre l'infection coccidienne chez les poulets. Le mode d'action des tanins condensés est suspecté d'être la pénétration des tanins dans la paroi de l'oocyste qui endommage le cytoplasme en inactivant les enzymes endogènes responsables du processus de sporulation, ce qui est également appuyé par l'apparition de sporocystes anormaux dans les oocystes (Molan et al., 2009).

Saponines : La *betaine*, qui est un sous-produit de l'industrie de la betterave sucrière, fait l'objet de plusieurs travaux aux Etats Unis et en Suède. Elle semble avoir un effet positif dans la lutte contre les coccidioses. Waldenstedt et al. (1999), montrent que l'addition de *betaine* à l'aliment réduit la perte de gain de poids durant une infection par différentes espèces coccidiennes aussi bien intestinale que caecale. La *betaine* (1,0 g/kg) en tant que complément alimentaire unique, n'améliore pas le poids vif par rapport au lot témoin ne recevant aucun traitement, mais elle a un effet positif en combinaison avec le narasin (70 ppm).

En protégeant contre le stress osmotique associé à la déshydratation, la *betaine* permet une activité métabolique normale des cellules. Cependant, l'action osmo-protectrice de la *betaine* sur les cellules intestinales existe aussi sur les cellules parasitaires. Le mécanisme d'inhibition est inconnu, mais peut être lié à des effets osmotiques attribués aux extraits. Schubert et al. (2005), démontrent que le calcium extracellulaire et la signalisation Ca^{2+} sont essentiels pour l'invasion des sporozoïtes d'*E.tenella* dans les cellules hôtes. Le rôle des extraits est désactiver et de désensibiliser les récepteurs du calcium (Sarkozi et al., 2007). Il est possible que les extraits contribuent à l'inhibition observée de la viabilité des sporozoïtes en perturbant l'activité de la signalisation à médiation calcique dans les sporozoïtes. Compte tenu de ces différentes interactions qui peuvent avoir lieu entre composants actifs, il est difficile de prédire l'action d'un mélange à partir des actions de ses différents constituants. De nombreuses études établissent des relations entre l'activité, la structure chimique et le mode d'action des antioxydants ainsi que le niveau d'absorption et leur biodisponibilité (Tasdemir et al., 2006 ; Kerboeuf et al., 2008). De plus, il est à noter que les antioxydants naturels qui sont liposolubles (Mahmood et al., 2008), paraissent plus efficaces car ils sont perméables et pénètrent la cellule, d'où l'altération intracellulaire des stades des parasites coccidiens.

3.3.6.1 Relation : phytoconstitués – activité anticoccidienne

Coccidiose est l'un des problèmes majeurs de l'aviculture intensive (Quiroz-Castaneda et Dant'an-Gonzalez, 2015). L'utilisation d'antioxydants, candidats potentiels comme remèdes anticoccidiens, en tant que substituts dans le contrôle de la coccidiose ;est donc prometteuse (Naidoo et al., 2008) chez les volailles.

Aujourd'hui, l'utilisation d'extraits de plantes riches en antioxydants prend une importance particulière en raison des restrictions imposées par l'utilisation de composés synthétiques contre les infections coccidiennes dues à l'émergence de résistances et aux résidus médicamenteux (Ahn et al., 2002 ; Abbas et al., 2012). Il y a 300 000 et voire plus d'espèces de plantes à fleurs qui sont recensées dans le monde entier. Jusqu'à présent, moins de 1% est utilisé pour lutter contre les maladies causées par les protozoaires . 68 plantes et composés phytochimiques, qui sont scientifiquement testés pour la suppression des espèces d'*Eimeria*, sont décrits par (Abbas et al., 2012 ; Bozkurt et al., 2013 ; Quiroz-Castaneda et al., 2015 ; Yang et al., 2015) dont 32 prouvent leurs potentiels anticoccidiens (Tab 3.1).

TABLE 3.1 – Propriétés anticoccidiennes des plantes

Muthamilselvan et al., 2016

Espèces végétales	Utilisation	Espèce <i>Eimeria</i>	Paramètres mesures	Références
<i>Sophora flavescens</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>GPC</i> ↑; <i>NO</i> ↓ . <i>DS</i> ↓ . <i>SL</i> ↓ <i>etM</i> ↓	Younet Noh., 2001
<i>Cynanchum acutum</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>GPC</i> ↑; <i>NO</i> ↓ . <i>DS</i> ↓ . <i>SL</i> ↓ <i>etM</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Quisqualis Indica</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>GPC</i> ↑ <i>etM</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Pulsatilla koreana</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>GPC</i> ↑ <i>etSL</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Ulmus macrocarpa</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>SL</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Agriades asiatica</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>GPC</i> ↑ <i>etSL</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Geoemyda japonica</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>SL</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Melia azedarach</i>	Decoction	<i>E.tenella</i>	<i>GPC</i> ↑ <i>etSL</i> ↓	Youn et Noh., 2001
<i>Piper nigrum</i> and <i>Urtica dioica</i>	Ethanoliceextract	Espèces mixtes	<i>NO</i> ↓	Rahman et al., 2015
<i>Artemisia sieberi</i>	Petroleum ethereextract	<i>E.tenella</i>	<i>NO</i> ↓ . <i>DS</i> ↓ . <i>SL</i> ↓ <i>etM</i> ↓	Kheirabadi et al., 2014
<i>Lepidium sativum</i>	Ethanoliceextract	<i>E.tenella</i>	<i>NO</i> ↓; <i>SL</i> ↓; <i>M</i> ↓ <i>etGPC</i> ↑	Adamu et Boonkaewwan., 2014
<i>Foeniculum vulgare</i>	Poudre de feuilles moulues	<i>E.tenella</i>	<i>NO</i> ↓; <i>SL</i> ↓; <i>M</i> ↓; <i>GPC</i> ↑ <i>etDS</i> ↓	Drăgan et al., 2014
<i>Meryta lucida</i>	Poudre de feuilles moulues	Especies mixtes	<i>GPC</i> ↑ <i>etNO</i> ↓	Ola-Fadunsin et Ademola., 2013
<i>Commiphora swynnertoni</i>	Extrait résineux éthanoliques	Oocystes	<i>NO</i> ↓; <i>M</i> ↓ <i>etGPC</i> ↑	Bakari et al., 2013
<i>Origanumsp</i>	L'huile essentielle	Especies mixtes	<i>NO</i> ↓; <i>SL</i> ↓; <i>M</i> ↓ <i>etGPC</i> ↑	Bozkurt et al., 2013
<i>Laurus nobilis</i>	L'huile essentielle	Especies mixtes	<i>NO</i> ↓; <i>SL</i> ; <i>M</i> ↓ <i>etGPC</i> ↑	Bozkurt et al., 2013
<i>Lavandula stoechas</i>	L'huile essentielle	Especies mixtes	<i>NO</i> ↓; <i>SL</i> ; <i>M</i> ↓ <i>etGPC</i> ↑	Bozkurt et al., 2013
<i>Musa paradisiaca</i>	Extrait methanolique	E.t	<i>NO</i> ↓; <i>etVCE</i> ↑	Anosa et Okoro., 2011
<i>Moringa stenopetala</i>	Poudre de feuilles moulues	E.t	<i>NO</i> ↓; <i>SL</i> ↓ <i>etGPC</i> ↑	Meskerem et Boonkaewwan., 2013

<i>Moringa oleifera</i>	Extrait d'acétone de feuilles	Especies mixtes	GPC ↑ et NO ↓	Ola-Fadunsin et al., Ademola, 2013
<i>Solanum nigrum</i>	Decoction	E.t	GPC ↑ et TCA ↑	Chandrakesan et al., 2009
<i>Mentha arvensis</i>	Decoction	E.t	GPC ↑ et TCA ↑	Chandrakesan et al., 2009
<i>Mangifera indica</i>	Decoction	E.t	GPC ↑ et TCA ↑	Chandrakesan et al., 2009
<i>Tulbaghia violacea</i>	Extrait d'acétone	E.t	NO ↓; SL ↓ et TCA ↑	Naidoo et al., 2008
<i>Vitis vinifera</i>	Extrait d'acétone	E.t	NO ↓; SL ↓ et TCA ↑	Naidoo et al., 2008
<i>L'Artemisia afra</i>	Extrait d'acétone	E.t	NO ↓; SL ↓ et TCA ↑	Naidoo et al., 2008
<i>Melia azedarach</i>	Jus frais	Especies mixtes	NO ↓	Owai et Gloria., 2010
<i>Galla rhois</i>	Poudre broyée	E.t		Lee et al. ,2012
<i>Quercus infectoria</i>	?	E.t, Ea et E.m	NO ↓; SL et M ↓	Gokila et Withania , 2014

Et : *E. tenella*; Ea : *E. acervulina*; E : *E. maxima*; Eb : *E. brunetti*; En : *E. necatrix*; Emi : *E. mivati*; GPC; gain de poids corporel; NO : nombre d'oocystes; CN consommation de nourriture; M : mortalité; HE : Huile essentielle; DS : diarrhée sanglant; ICA : Indice de conversion alimentaire; SL : scores lesionel; ↑ : Augmentation; ↓ : diminution; VCE :volume de cellules emballées; ? : Inconnu.

Enfin, l'utilisation de produits naturels dans l'alimentation des volailles présente l'avantage d'être bien acceptée par les consommateurs (Jez et al., 2009). Cela peut expliquer que cette alternative soit la plus utilisée au niveau international (Raper, 2008).

3.4 Les co-produits oléicoles (espèce *Olea europea*)

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile comme produit principal, des quantités énormes des déchets polluants pour l'environnement (Mansour et al., 2017) et par conséquent, ces derniers impactent la santé publique, altèrent les communautés microbiennes du sol (Paredes et al., 2012), les écosystèmes marins (Della Greca et al., 2004) et l'air par les émissions de phénol et de dioxyde de soufre (Rana et al., 2003).

Cette industrie doit être bien prise en charge, car l'obtention des huiles donne lieu à deux co-produits importants : grignons et margines qui sont moins valorisés. Malgré les propriétés bénéfiques des feuilles d'olivier pour la santé humaine et leur persistance toute l'année, elles sont considérées comme co-produits de l'industrie oléicole dans les pays méditerranéens à cause de leurs quantités énormes générées pendant l'étape de lavage des olives (Nehal et Dilmi Buras, 2017).

3.4.1 Position systématique de l'olivier

L'olivier est nommé *Olea europea* et introduit pour la première fois dans "Species plantarum", par Linné, en 1753 en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. *Olea* est le genre appartenant à la famille des *Oleaceae* comprend 30 à 60 espèces suivant l'auteur (Cronquist, 1988). Le nombre élevé d'espèces est étudié par plusieurs auteurs sur des bases à savoir morphologique, carologique, anatomique, paléontologique et biochimique et sur des bases moléculaires. L'olivier présente la classification suivante (Fig 12) :

Règne : *Plantae*
 Sous-règne : *Tracheobionta*
 Embranchement : *Spermatophytes (Phanérogames)*
 Sous Embranchement : *Angiospermes*
 Classe : *Dicotylédones (ou Thérébinthales)*
 Sous-classe : *Astéridées (ou Gamopétales)*
 Ordre : *Gentianales (ou Lingustrales)*
 Famille : *Oléacées*
 Genre : *Olea*
 Espèce : *Olea europaea*.

Classification de l' Olea Oeuropea (Breton et al., 2006).



FIGURE 12 – Schéma de la taxonomie du genre *Olea* (*Oleaceae*) et répartition géographique des taxons. (d'après Breton et al., 2006)

3.4.2 Distribution de l'olivier en Algérie

En Algérie, l'olivier compte environ 32 millions d'arbres (Mendil, 2009) répartis sur une superficie de 328,884 hectares (Faostat, 2013), soit 34,09% du verger arboricole national. L'olivier, de par ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones de montagne, s'étend sur tout le territoire national. Il se concentre notamment dans trois principales régions : la région du Centre (54%), l'essentiel du verger oléicole de cette zone (95%) est occupé par les wilayas de Bejaïa, Tizi-Ouzou et Bouira. La région de l'Est (29%), les wilayas de Guelma, Sétif, Jijel et Skikda détiennent (68%) du verger oléicole et enfin, la région Ouest (71%) du verger est occupée par les wilayas de Mascara, Sidi Bel abbés, Relizane et Tlemcen (Belkacem, 2012).

3.5 Variétés Chemlal en Algérie

Dans le monde, l'espèce *Olea europea* L. est composée de 2000 variétés ; dont près de 500 sont implantées en Italie (Boukhari, 2014). L'oléiculture algérienne est caractérisée par une large gamme de variétés. Les variétés locales : Limli, Azaradj et Bouchouk se rencontrent surtout dans la vallée de la Soummam et à elles seules représentent les trois quarts de la production oléicole nationale.

Chemlal qui se rencontre dans toute la Kabylie du littoral au sud de Mchedellah et la vallée, elle est considérée comme étant la plus dominante (Benderradji et al., 2014) et la bonne productrice d'huile de bonne qualité. Elle représente près de 40% du patrimoine oléicole national et occupe la quasi-totalité des vergers (90%), s'imposant comme variété ancestrale, de par son adaptation aux conditions naturelles de la région de Bejaia. La production moyenne annuelle de la région représente environ 25% de la production oléicole nationale (Mendil et Sebai , 2006). Cette variété est la variété qui fait l'objet de notre étude, visant à explorer ses propriétés biologiques, en particulier l'activité antiparasitaire (anticoccidienne).

3.6 Les grignons solides

En Algérie, des quantités considérables de grignons (déchets solides) d'olives sont produites annuellement. 16000 Tonnes de matières organiques et 12 000 T de matières énergétiques (équivalent à 10 000 T de Gasoil) (Moussouni, 2012). En raison de leur aspect et n'ayant pas d'intérêts majeurs connus, ces derniers font l'objet de déversement anarchique dans la nature (Djeziri et Babakhouya, 2017) (Fig 13).

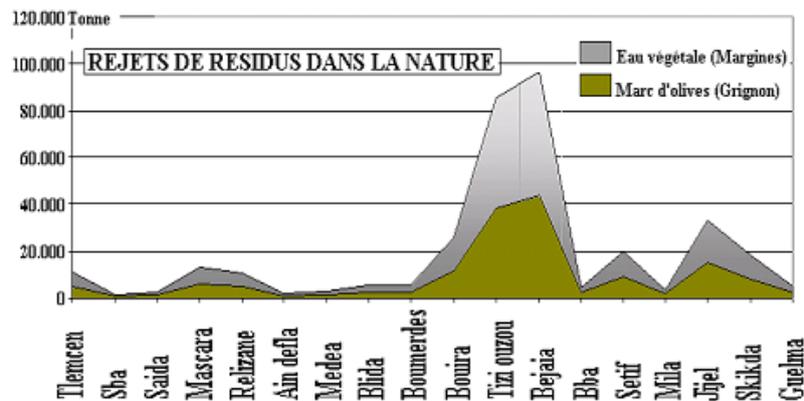


FIGURE 13 – Quantité de résidus produits pour une production de 40.000 T d’huile.
(Moussouni, 2012).

Il est important de définir les différents co-produits oléicoles car il existe une certaine confusion dans les publications qui ne permet pas d’identifier clairement de quel sous-produit s’agit-il (Alloui, 2013).

3.6.1 Définition

On distingue les principaux co-produits : grignons (les différents types), feuilles et margines. Seuls les grignons et les feuilles font l’objet de cette étude.

3.6.1.1 Grignons

Les tourteaux, plus communément appelés, grignons, sont des résidus solides essentiellement lignocellulosiques, récupérés à la suite de la première pression ou centrifugation. Ils sont composés de peaux, de résidus de pulpe (pulpe épuisée), de fragments de noyau (Djadoun, 2010) (Fig 14) et une proportion d’eau de végétation qui contient à son tour des composés hydrosolubles (Loussert et Brousse, 1978) ainsi des matières grasses, des sucres, des aminoacides, des polyphénols et des sels minéraux.

A- Grignon brut : C’est le résidu de la première extraction de l’huile par pression de l’olive entière. Ses teneurs sont relativement élevées en eau (24%) et en huile (9%) favorisant rapidement son altération à l’air libre (Sansoucy , 1984 ; Nefzaoui ,1987).

B- Grignon épuisé : C’est le résidu obtenu après déshuilage de grignon brut par solvant, l’hexane généralement (Sansoucy, 1984).

C- Grignon partiellement dénoyauté :

Il résulte de la séparation partielle de noyau et de la pulpe par tamisage ou ventilation. On a : Le « gras » si son huile n’est pas extraite par un solvant. Le « dégraissé ou épuisé » si son huile est extraite par un solvant (Sansoucy, 1984).

D-Pulpe épuisée : C'est la pâte obtenue lorsque le noyau est séparé de la pulpe, préalablement à l'extraction de l'huile (pulpe épuisée) (Fig 14). Elle est riche en eau (60%) et est de conservation très difficile (Sansoucy , 1984).

Les essais montrent que des ensilages comportant 70% de fientes ayant été accumulés pendant moins de 21 jours et 30% de grignons tamisés épuisés, se conservaient de façon excellente selon (FAO, 1984).

L'estimation des quantités de ces co-produits peut varier selon le procédé de triage. En adoptant la valeur moyenne de 35% pour le pourcentage de grignons bruts, par rapport aux olives traitées, on peut estimer la production mondiale de grignons à environ 2.900.000 tonnes (Loussert et Brousse, 1978).

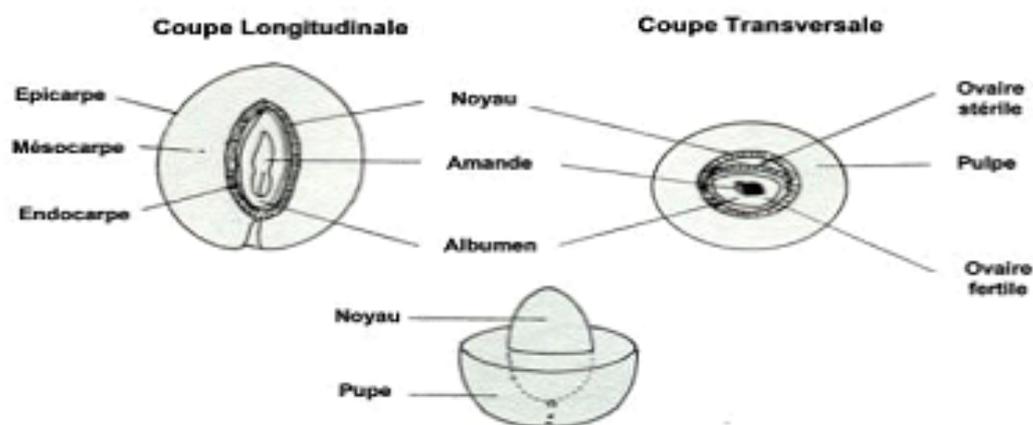


FIGURE 14 – Schéma représentatif de la composition de l'olive. La partie la plus riche en huile est le mésocarpe ou (pulpe), et celle plus riche en cellulose brute est l'endocarpe ou (noyau)
(Nefzaoui, 1984) (Loussert et Brousse, 1978)

3.6.2 Feuilles

Les feuilles d'olivier, disponibles toute l'année, sont un des co-produits de l'oléiculture ; elles s'accumulent lors de la taille des oliviers (environ 25 kg de co-produits rameaux et feuilles par arbre et par an) et se retrouvent en grande quantité dans les industries oléicoles après avoir été séparées des fruits avant transformation (environ 10% du poids de l'olive (Herrero et al., 2011 ; Ferreira et al., 2007).

Ce ne sont pas les résidus de la taille mais de feuilles recueillies après le lavage et le nettoyage à l'entrée de l'huilerie. Leur quantité est estimée à environ 5 à 6 Kg par arbre et par an (Nefzaoui, 1987).

3.6.3 Valorisation des co-produits oléicoles

Notons que cette biomasse (co-produits) considérée comme une agro-ressource, devient utilisable dans diverses applications : pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique et alimentaire : (De Pablos et al., 2010 ; Sayehban et al., 2016) suivant les pays et le contexte (Tomati et Goli , 2006), a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques par intérêt économique et thérapeutique car ce sont des substances à valeur ajoutée très prometteuse puisqu'elles contiennent une grande quantité de composés bio- phénoliques (Vega-Galvez et al., 2010 ; Yu et al., 2009). L'utilisation du grignon solide (noyau et pulpe) se résume dans :

- Production de l'huile résiduelle de grignons par extraction chimique ;
- combustible pour le chauffage (Chouchene, 2012), charbon actif d'adsorption ; production de furfural et abrasif ;
- cosmétique dû aux qualités d'exfoliation du noyau ; bio-absorbant de métaux lourds ; épandage comme amendement sur les terres agricoles (Michailidies et al., 2011) ;
- production d'un biogaz (méthane) à 57 - 65% par fermentation anaérobie des lisiers de vaches (source d'énergie pour le chauffage de l'eau (direct) et production de l'électricité à usage domestique (indirect) (Manios, 2004) ;
- supplémentation animale diététique (Gharbi et Benarif, 2011).

3.6.3.1 Feuilles

Historiquement, les feuilles d'olivier sont totalement orientées vers l'alimentation animale. Toutefois, elles sont aussi utilisées en phytothérapie traditionnelle pour le traitement de certaines maladies telles que la malaria et l'hypertension. L'olivier a une longue histoire de valeurs médicinales et nutritionnelles. Au fil des siècles, des extraits de feuilles d'olivier sont utilisés pour promouvoir la santé et la préservation. À titre d'exemple, les anciens Egyptiens utilisent les feuilles pour momifier les pharaons. De même, elles sont appréciées comme un remède populaire célèbre pour traiter la fièvre et certaines maladies tropicales comme le paludisme (Soler-Rivas et al., 2000).

3.6.4 Profil phénolique

Les composés phénoliques des feuilles et grignons de l'olivier sont nombreux et de nature diverse.

Ils sont regroupés en fonction des principales caractéristiques moléculaires comme les phénols et acides simples, les lignanes, les sécoiridoïdes et les flavonoïdes (Tsimidou et Papoti , 2010) (Tab[3.2] ; [3.3] ; [3.4]).

TABLE 3.2 – Composition des feuilles d'olivier en composés bioactifs

Composés phénoliques	Constituants chimiques	Auteurs
Acides phénoliques	Verbascoside acide caféique acide p-couramique acide cinameique	El, et Karakaya, 2009; Abbaza et al., 2015; Benavente-Garcia et al.2000; Briante et al.2004; Mourtzinos etal.2007; Altiok et al.2008; Mourtzinos et al.2007
Flavonoides glycosides	lutéoline 7-rutinoside,lutéoline 4'-glucoside,apigénine 7- glucoside,apigénine 7-rutinoside lutéoline 7-O-glucosid luteolin-7-glucoside lutéoline	Boudet, 2007 Savournin et al.,2001; Abbaza et al., 2015; El et Karakaya, 2009; Pereira et al., 2007; Zaidi et al., 2009; El et Karakaya, 2009
Flavones	diosmetin-7-glucoside, diosmetin -7-O-glucoside diosmetin	El et Karakaya,2009; Moudach et al., 2016; Taamalli et al., 2019
Flavonols flavan-3-ols	rutine, quercetin catéchine	El et Karakaya, 2009;Taamalli et al., 2019;
Secoïridoïdes	Oleuropéineligstroside, le dimethyloleuropeine et l'oleoside	Pereira et al., 2007; Jemai et al., 2009; Kontogianni et Gerathanassis,2012; Briante et al. 2002; Moudach et al., 2016 ; Paiva-Martins, Pinto M (2008); Konto giann et Gerathanassis, 2012; Abbaza et al., 2015; Pereira et al. 2007;Taamalli et al., 2019
Tritéropènes	acide oléanolique, acide masilinique, acide ursolique	Moudach et al., 2016; Taamalli et al., 2019
Lignanes	acide hydroxy- oléanolique syringaresinol; pinoresinol; acetoxypinoresinol	Taamalli et al., 2019

TABLE 3.3 – Compostion du noyau d'olive en composés bioactifs

Classes chimiques	Constituants chimiques	Auteurs
Acides phénoliques	acides cafeiques, vanillique, féruliques, galliques, protocatéchiques et phydroxybenzoïques Verbascoside Acide p-coumarique Acide élénolique	Cioff et al., 2011; Obied et al.,2005; Bianco et al., 2003; Lesage-Meessen et al., 2001; Mulinacci et al., 2001; Bianco et al., 2003

Alcools phénols	Hydroxytyrosol Tyrosol	Fernandez-Bolanos et al., 2002 ; Allouche et al., 2004
Phénols simples	Catéchol	Fiorentino et al., 2003
Flavonoïdes	Rutine Luteoline-7-O-glucoside diosmetin -7-O-glucoside	Romero et al., 2002 ; Pereira et al., 2007 ; Moudach et al., 2016 ; Artajo et al., 2006 ; Artajo et al., 2007
Tritéropénes	Acide p-coumarique	Bianco et al., 2003
Secoïridoïdes	Oleuropein Nüzhenide Salidroside Nuzhénide oléoside Oleuropein aglycone Acide élenolique	Mulinacc et al., 2001 ; Obied et al., 2005 ; Ryan et al., 2002 ; Cioff et al., 2011 ; Ryan et al., 2001 ; Ammar et al., 2017
Lignanes	Pinpsol et l'acetoxy-pinénorésinol	Rubio et al., 2012 ; Servilli et al., 2007

TABLE 3.4 – Composition de la pulpe épuisée d'olive en composés bioactifs

Classes phénoliques	Constituants phénoliques	Auteurs
Acides phénoliques	Verbascoside, acid vanillique et caffeique	Ryan et al., 2002 ; Talhaoui et al., 2016
Flavonoïdes Flavanol	Luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-glucoside luteolin, luteolin-7-rutinoside et apigenin-7-glucoside Luteolin, Apigenin rutinoside, Luteolin glucoside Diosmetin, diosmetin-7-glucoside, et rutine	Morellò et al. 2005 ; Artajo et al., 2006 ; Artajo et al., 2007 ; Cardozo et al., 20013 ; Sayehban et al., 2016 ; Talhaoui et al., 2016 ; Ryan et al., 2002 ; Talhaoui et al., 2016
Phénols simples	Tyrosol, hydroxytyrosol et vanillin	Ryan et al., 2002 ; Talhaoui et al., 2016 ; Servili et al., 2004
Secoïridoïdes Lignanes	Oleuropéine Oleoside 3,4-DHPEA-EDA et 3,4-DHPEA-EA Ligstroside aglycone Acetoxy-pinorésinol ; Pinorésinol	Cardoso et al., 2005 Morello et al. 2005 ; Alagna et al., 2012 ; Servili et al., 2004 ; Soler-Rivas et al., 2000 ; Obied et al., 2007 ; Oliveras López et al., 2008 ; Goulas et al., 2012 ; Talhaoui et al., 2016

3.6.5 Activité antioxydante

Plusieurs auteurs étudient l'activité antioxydante des deux organes (feuilles et grignons). Tab(3.5) regroupe quelques études. Le grignon d'olive est considéré comme une riche source de composés phénoliques présentant un large éventail d'activités biologiques. En fait, trois aspects antioxydants sont étudiés dans les grignons d'olives ; capacité antioxydante (Shahidi et Naczk, 2004), activités anti-radicalaires et des activités de piégeage des radicaux (Lesage-Meessen et al., 2001 ; Naczk et Shahidi, 2004).

De plus, la plupart des composés phénoliques, y compris l'hydroxytyrosol glucoside, qui peuvent avoir des activités biologiques, ne sont pas dégradés lors de l'extraction de l'huile d'olive, ce qui est suggéré par (Cardoso et al., 2005), que le grignon d'olive issu du système à deux phases peut être une bonne source de ces composés, tout comme la pulpe d'olive.

TABLE 3.5 – Bibliographies sur les activités antioxydantes du grignon et feuilles d'olivier.

Extraits	Bibliographies
Feuilles	Briante et al., 2002 ; Amro et al., 2002 ; Karakaya, 2004 ; Ferreira et al., 2007 ; Altiok et al., 2008 ; Bouaziz et al., 2008 ; Jemai et al., 2009 ; Lee et al., 2009 ; Kiritsakis et al., 2010 ; Castillo, et al., 2010 ; Bulotta et al., 2011 ; Hayes et al., 2011 ; Azizollahi Aliabadi et al., 2012 ; Brahmi et al., 2012 ; Ioanna Lafka et al., 2013 ; Peralbo-Molina et Luque de Castro, 2013 ; Nashwa et al., 2014 ; Marcos et al., 2014 ; Yuan et al., 2015 ; Licciardello et al. 2015 ; Xie et al., 2015 ; Sheikh et Gabr 2016 ; Moudach et al., 2016
Pulpes	Amro et al., 2002 ; Ryan et al., 2002 ; Ranalli et al., 2004 ; Shahidi et Naczk, 2004 ; Cardoso et al., 2005 ; Peschel et al., 2006
Noyaux	Amro et al., 2002 ; Cardoso et al., 2005 ; Li et al., 2007 ; Suárez et al., 2009 ; Lee et al. 2009 ; Hayes et al., 2011 ; Lafka, et al., 2011 ; Marcos et al., 2014 ; Licciardello et al. 2015

3.6.6 Activité antiparasitaire

Selon la littérature, presque pas d'études sur l'activité antiparasitaire des extraits de grignons et feuilles de l'olivier en général, et les coccidies en particulier.

Les modifications de l'absorption intestinale entraînées par les coccidioses sont étudiées par (Turk et Stephen, 1967).

Ces derniers montrent que l'absorption du zinc et de l'acide oléique diminue dans les mêmes proportions pendant la phase aiguë d'une Eimeriose due à *E. acervulina*.

Avec *Eimeria necatrix*, au contraire, les modifications ne sont pas les mêmes pour les deux substances. Enfin *Eimeria brunetti* ne semble pas modifier l'absorption de ces corps. Le lieu de la multiplication parasitaire aurait donc une importance, ce qui est prévisible. À ces troubles de l'absorption, s'ajoutent des modifications de la perméabilité intestinale. Le pouvoir pathogène d'*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 ;
- indirecte, par sous-consommation d'aliment et d'eau.

L'action directe est due à une destruction de l'épithélium entraînant une perte sérique et des troubles de l'absorption. La valeur des extraits de plantes dotés d'un potentiel antioxydant pour lutter contre *Eimeria* a fait l'objet d'une enquête en raison de l'association de l'infection à infection coccidienne avec la peroxydation lipidique de l'ostéoporose muqueuse intestinale (Naidoo et al., 2008). Parmi les antioxydants naturels, ceux qui sont liposolubles semblent être plus efficaces parce qu'ils pénètrent dans la cellule et affectent les stades intracellulaires de l'infection du parasite coccidien. Les plantes sont signalées comme étant les excellentes sources d'antioxydants (Abbas et al., 2012 ; Zubair et al., 2012 ; Atawodi et al., 2013).

Les substances phytochimiques récemment identifient plusieurs types de flavonoïdes comme anti protozoaires, principes actifs des extraits de plantes (Gherida, 2005). De plus, de nombreuses études établissent des relations entre l'activité, la structure chimique et le mode d'action des flavonoïdes ainsi que le niveau d'absorption et leur biodisponibilité (Kerboeuf et al., 2008 ; Tasdemir et al., 2006).

TABLE 3.6 – Bibliographies sur l'activité antiparasitaire du grignons et feuilles d'olivier

Extraits	Bibliographies	Parasite
Feuilles	De pablo et al., 2010 ; Bahmani et al., 2014 ;	<i>Limnatis nilotica</i> <i>E. tenella</i>

**Extraction, optimisation,
caractérisation
en teneurs phénoliques et activités
antioxydantes**

Partie expérimentale

Chapitre IV

**Extraction, optimisation, caractérisation
en teneurs phénoliques et activités antioxydantes**

Les molécules d'intérêt peuvent être récupérées en ayant recours à l'extraction liquide-solide. La méthodologie de surface de réponse (MSR) contribuera à une meilleure compréhension de l'effet et de l'interaction des paramètres opératoires permettant une optimisation de l'opération : une maximisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des co-produits et une minimisation du temps et de la consommation de solvant.

4.1 Matériels et méthodes

Ce chapitre présente le matériel et les méthodes adoptées au support végétal (feuille, pulpe et noyau) de l'espèce *Olae europea* L var, Chemlal.

4.1.1 Produits chimiques et standards

Tous les produits chimiques et standards utilisés au cours de cette étude sont mentionnés en (Annexe C).

4.1.2 Support végétal

Le grignon utilisé au cours de ce travail, est d'origine de Sidi-Aich (Bejaia) mais récupéré d'une huilerie située à Bouira. Cette huilerie fonctionne avec un système traditionnel. Quant aux feuilles, elles sont de la même provenance et de la même variété.

4.1.2.1 Description du dispositif expérimental

Ce dispositif schématise la conduite expérimentale du support végétal :

- L'extraction des composés phénoliques par la méthode EAMS (Extraction Assistée par Micro-ondes avec Solvant). Le solvant utilisé est l'éthanol à 99% de pureté. Quantification des teneurs de ces composés par HPLC-ESI-MS et analyse des poudres par MEB.
- Les dosages effectués des molécules bioactives (polyphenols flavonoïdes et tanins) sont exprimés en mg GAE/g MS, mg QE/g MS et mg CE g/ MS, respectivement.
- Évaluation du pouvoir antioxydant par des méthodes spectrophotométriques complémentaires :
 - Méthode du piégeage du radical libre DPPH (1,1 -diphenyl-2-picrylhydrazil) (Willian-Brand et al., 1995) est la plus simple à réaliser in vitro. Le DPPH est largement employé pour évaluer le balayage de divers produits naturels et considéré comme un composé modèle pour les radicaux libres produits dans la peroxydation lipidique.

- Méthode qui consiste à la réduction du radical-cation coloré (acide 2' 2 azobis 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) connu sous le nom d'*ABTS*^{·+} (Re et al., 1999).
- Méthode de réduction de fer (Oyaizu, 1986) est une technique indicatrice de la présence des effets réductifs de l'anion hexacyanoférate (III) [Fe(CN)₆]³⁻ à l'anion hexacyanoférate (II) [Fe(CN)₆]⁴⁻.
- Molybdate d'ammonium repose sur la réduction des molybdates en molybdène en présence des extraits en donnant une coloration verte détectable par l'UV à une longueur d'onde de 695nm (Prieto et al., 1999).
- TBARS, le test de l'acide 2-thiobarbiturique repose sur la formation d'un complexe de couleur rose résultant de la réaction entre une molécule de malonaldéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique. Le complexe formé absorbe à 532-535 nm (Devassagayam et al., 2003).

Enfin, traitement et analyse statistique des résultats obtenus.

4.2 Etude phytochimique

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable et valorisation significative.

4.2.1 Préparation des échantillons

Pour la facilité et l'efficacité de l'extraction des composés biochimiques à partir des co-produits oléicoles (feuilles, pulpe et noyau), deux opérations sont effectuées : séchage et broyage.

4.2.1.1 Séchage et broyage

Les feuilles et les noyaux sont bien lavés à l'eau distillée pour enlever toutes les impuretés, par contre la pulpe épuisée sous forme pâteuse n'a pas subi de lavage. Le séchage du grignon (pulpe et noyaux) est effectué à l'air libre et à l'ombre, à une température ambiante tout en respectant l'épaisseur de la couche qui ne doit pas dépasser 1cm pour une bonne circulation de l'air, la qualité des plateaux d'étalement et l'endroit afin d'éviter qu'ils soient contaminés par la poussière ou par le sol (Fig 15). Il est à noter qu'il faut retourner les échantillons afin d'accélérer le séchage (FAO, 2002). Concernant la feuille, le séchage est effectué en deux étapes, d'abord un pré-séchage à l'air libre pour éliminer l'excès d'eau, puis séchage à l'étuve à une température de 35°C afin de protéger la teneur en principes actifs de l'oxydation légère.

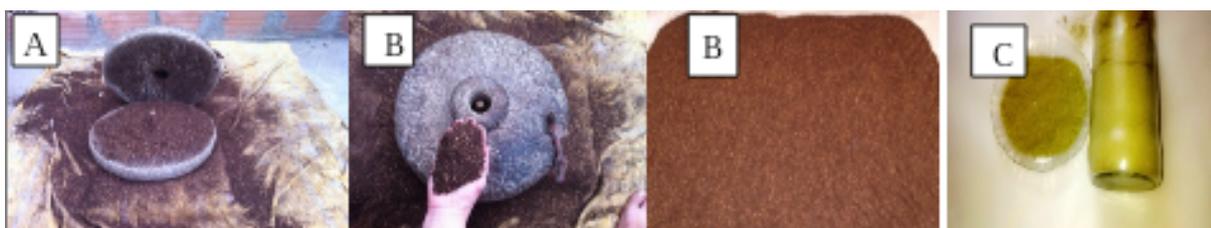


FIGURE 15 – Séchage et broyage (traditionnel) Pulpe (A) et noyau (B) d'olivier .Feuille (C) (double séchage)

4.2.2 Détermination de test d'humidité

La teneur en eau est déterminée par la méthode décrite par (Doymaz et al., 2004). Une prise d'essai de 1 g de poudre de (noyau, pulpe et feuilles) est séchée séparément dans une étuve ventilée (Mettler type-ONE 7, Schutzart DIN EN 60529-IP 20. Germany) à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en eau (H%) est exprimée selon l'équation suivante :

$$H\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100 \quad (4.1)$$

H(%) :Taux d'humidité en pourcentage.

m1 : masse de la prise d'essai avant la dessiccation (g).

m2 : masse de la prise d'essai après la dessiccation (g).

$$MS = 100 - H\% \quad (4.2)$$

MS : Matière Sèche.

Après confirmation de test d'humidité, les échantillons séchés sont broyés à l'aide d'un broyeur traditionnel (Fig 15) et tamisés avec un système de tamisage électrique à porosité descendante (Retsch AS200), $\phi \leq 500\mu\text{m}$, $\phi \leq 250\mu\text{m}$ et $\phi \leq 125\mu\text{m}$ et seule la fraction optimisée est retenue. Chaque poudre est conservée dans des flacons opaques hermétiques à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

4.2.2.1 Détermination de l'activité de l'eau (AW)

L'activité de l'eau de la poudre est mesurée à 21,5 ; 23,4 et 25,5°C pour la pulpe, feuille et noyau, respectivement avec un hygromètre à capteur de type capacitif (HygroPalmAW1, Rotronic) (Fig 16). Un poids de 2 à 4 g d'échantillon est placé dans une petite coupelle dans l'appareil. Après la stabilisation des mesures, l'activité de l'eau de l'échantillon est lue.



FIGURE 16 – Hygromètre

4.3 Concept expérimental

La technologie d'Extraction Assistée par Micro-ondes, appelée EAM (microwave assisted extraction), s'applique dans les mêmes secteurs que les méthodes classiques. Appliquée à l'extraction de produits naturels, cette technologie innovatrice et écologiquement rationnelle favorise le développement durable dans la bio-économie (Aimesther, 2008).

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt « y » et des variables « xi ». Avec les plans d'expériences, on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences (Goupy, 2006).

La conception composite centrale (CCD) se prête bien au déroulement séquentiel d'une étude. La première partie de l'étude est un plan factoriel complet ou fractionnaire complété par des points centraux. Pour vérifier la validité d'un modèle PDAI (termes du premier degré et termes d'interactions), il faut que les tests de validation soient positifs (la réponse mesurée au centre du domaine est statistiquement égale à la réponse calculée au même point), donc l'étude s'achève le plus souvent, mais s'ils sont négatifs, on entreprend des essais supplémentaires pour établir un modèle du second degré.

Les essais supplémentaires sont représentés par des points d'expériences situés sur les axes de coordonnées et par de nouveaux points centraux. Les points situés sur les axes des coordonnées sont appelés les points en étoile (Goopy et ghrighton, 2005).

4.3.1 Optimisation par la méthodologie de surface de réponse

Développés dans les années 30 par (Fisher, 1935), les plans d'expériences sont une démarche rigoureuse basée sur la statistique qui conçoit un plan avec le minimum d'essais possibles.

La méthodologie de surface de réponse (MSR) permet d'augmenter le nombre de facteurs à étudier, modélisant les réponses, quantifiant les interactions qui ont lieu entre les paramètres opératoires et assurant une prédiction et une optimisation des réponses.

Cette méthodologie est une combinaison de plan d'expérience statistique, de modélisation empirique et de techniques d'optimisation mathématiques employées pour améliorer la performance des processus et des produits (Myers et Montgomery, 2001). Elle vise à proposer des formulations analytiques explicites des résultats d'un système dans le but de réaliser des calculs de fiabilité.

4.3.2 Plan Composite Central Design (CCD)

La grandeur mesurée suite à une expérience donnée est appelée réponse, alors que le paramètre opératoire utilisé est connu sous le nom de facteur ou variable. Pour étudier un facteur donné, on délimite son domaine de variation entre deux valeurs codées -1 et +1 qu'on nomme niveaux bas et haut, respectivement. Un plan factoriel, nommé aussi plan complet est créé lorsqu'au moins un essai de chaque combinaison des deux niveaux de facteurs est réalisé. Le plan composite centré (CCD) ou « Box-Wilson design » est conçu par (Box et Wilson, 1951). Les variables indépendantes sont donc codées aux cinq niveaux cités : $-\alpha$, -1, 0, +1 et $+\alpha$. Le nombre d'essais à réaliser est égal à $2n$ (pour le plan factoriel complet) + $2n$ points étoiles (pour les points axiaux) + points au centre (répétitions au niveau (0,0,0) (n est le nombre de facteurs).

4.3.3 Application du plan d'expérience

L'optimisation de la méthode d'extraction est réalisée en employant le plan de CCD de trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de quatre variables indépendantes : % solvant, le temps, la puissance et le ratio (solide /liquide) qui sont désignés par X_1 , X_2 , X_3 et X_4 , respectivement. Les études préliminaires effectuées selon le dispositif illustré (Fig 17), permettent d'évaluer et de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'extraction des composés phénoliques. Ces derniers sont illustrés dans le tableau (4.1). Cette étape est réalisée en fixant tous les paramètres et n'en fait varier qu'un seul. L'effet de chaque paramètre est évalué individuellement par la détermination de la teneur en polyphénols totaux. Les valeurs constantes des quatre paramètres sont mentionnées dans le tableau (4.1).

À la fin de l'étude préliminaire et en se basant sur les résultats obtenus, les paramètres ou les variables sont codées comme suit : -1, 0 et +1 selon (Eq 4.3)

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X} \quad (4.3)$$

Où x_i : valeur codée du paramètre X

X_i : valeur brute pour la variable

X_0 : valeur brute pour la variable X au point central

ΔX : valeur de changement d'échelon de X X_0 .

Les valeurs réelles et codées pour l'EAM sont indiquées dans le tableau (4.1).

TABLE 4.1 – Niveaux codés et réels des quatre variables pour l'extraction assistée par micro-ondes .

Variable		Valeurs codées et réelles								
		-1			0			+1		
		EN	EP	EN	EF	EP	EN	EF	EP	EN
EtOH(%)	X_1	20	40	20	40	60	50	60	80	80
Temps (sec ;min)	X_2	45	60	60	60	120	90	75	180	120
Puissance (w)	X_3	700	300	300	800	500	600	900	700	900
Ratio (g/ml)	X_4	10	30	20	20	40	30	30	50	40

EtOH : Ethanol, EF : Extrait de feuille, EP : Extrait de pulpe, EN : Extrait du noyau.

Sur la base des résultats expérimentaux à facteur unique, les principaux facteurs d'influence sont sélectionnés (Fig17). Par l'utilisation des trois valeurs précédemment citées pour chaque variable et en se basant sur l'approche de conception composite centrale (CCD), un plan de 30 combinaisons de facteurs dont six essais au niveau du point central est conçu. L'analyse de régression des données pour ajuster une équation polynomiale du deuxième ordre (modèle quadratique : modélisation) est effectuée selon l'équation générale suivante (Eq 4.4) qui est ensuite utilisée pour prédire les conditions optimales du processus d'extraction.

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k \beta_{ij} X_i X_j + E \quad (4.4)$$

Où y : représente la grandeur d'intérêt (la réponse : rendement en CPT) ; β_0 est le coefficient constant ; β_i β_{ii} et β_{ij} sont les coefficients des limites linéaires, quadratiques et interactives, respectivement ; X_i X_j sont les variables indépendantes codées et E : l'erreur expérimentale. Ces paramètres sont étudiés de manière à optimiser une réponse : Le taux des polyphénols totaux.

Le logiciel utilise ce modèle quadratique pour construire des surfaces de réponse. L'adéquation du modèle est déterminée en évaluant le manque d'ajustement, le coefficient d'ajustement de (R^2) et la valeur d'essai de Fisher (valeur F) obtenus à partir de l'analyse (ANOVA) générée par le logiciel. Signification statistique du modèle et les paramètres du modèle sont déterminés au niveau de probabilité de 5 % ($p = 0,05$). Afin de visualiser la réponse et les niveaux expérimentaux de chaque facteur et de déduire les conditions optimales, les coefficients de régression sont utilisés et les équations polynomiales sont présentées sous forme de courbes de surface. Pour vérifier l'adéquation du modèle, des expériences supplémentaires sont réalisées dans les conditions optimales prévues et les résultats expérimentaux obtenus sont comparés aux résultats prédits.

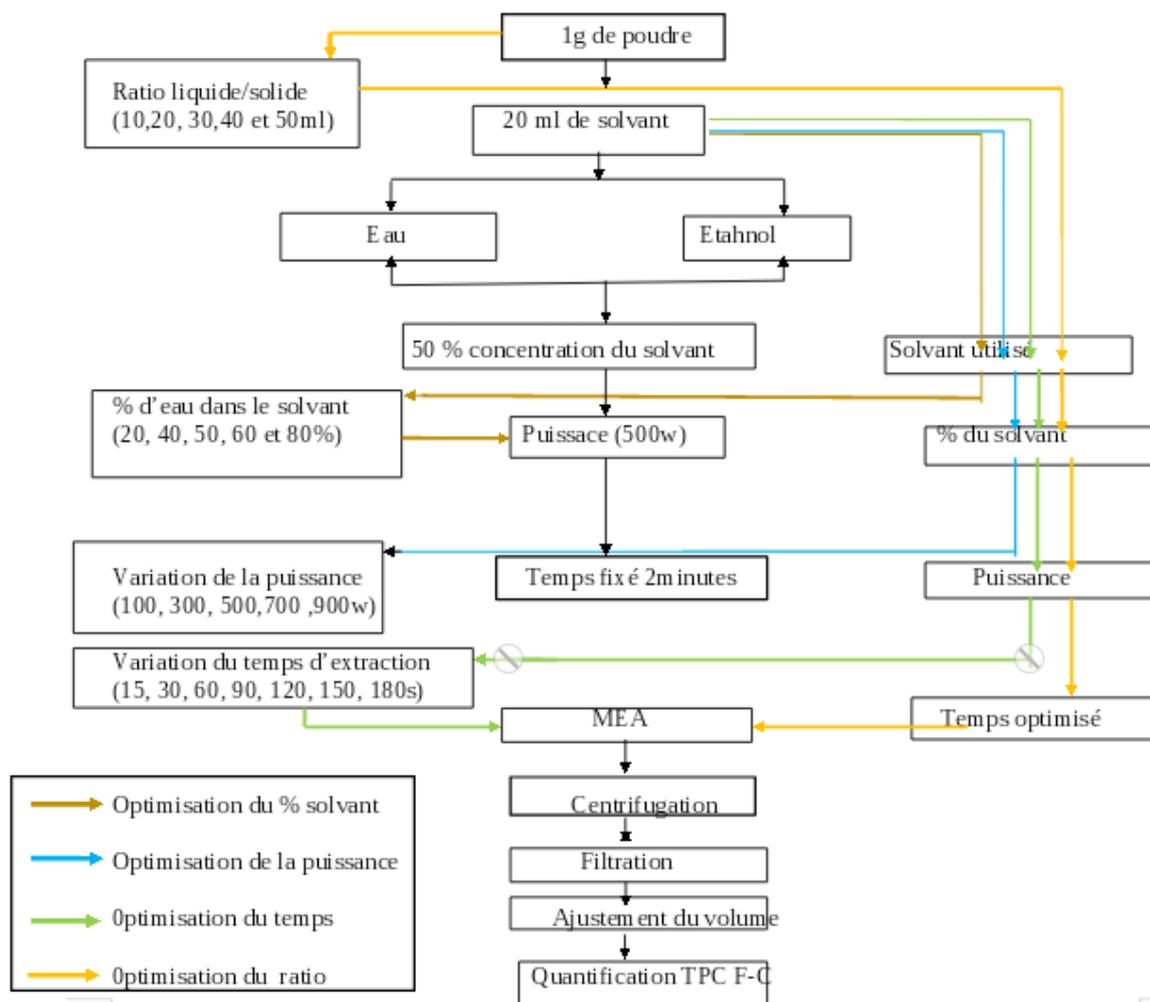


FIGURE 17 – Procédure expérimentale à facteur unique (étude préliminaire) pour le MAE, CPT : composés phénoliques totaux F-C : Folin Ciocalteu (Dahmoune et al., 2014)

4.3.4 Procédure de l'extraction assistée par micro-onde (MAE)

Un four à micro-ondes domestique (Samsung Modèle NN-S674MF, Kuala Lumpur, Malaisie) avec des dimensions : cavité de 22,5 cm * 37,5 cm * 38,6 cm et une fréquence de fonctionnement de 2450 kHz est emprunté pour l'extraction des composés phénoliques. L'appareil est équipé d'un système de commande numérique pour temps d'irradiation et puissance micro-ondes (réglable de 100 à 900 W). Le four est modifié afin de condenser dans l'échantillon les vapeurs générées lors de l'extraction pour obtenir un volume d'échantillon constant (Fig 18). Pour l'extraction, un gramme (1g) de l'échantillon en poudre est placé dans une fiole jaugée volumétrique de 250 mL contenant le solvant d'extraction (20mL). Le mélange est irradié sous variation du pourcentage d'éthanol dans le mélange, du temps d'irradiation, de la puissance micro-onde et du rapport solvant/solide. Après extraction, chaque échantillon est laissé refroidi dans un bain d'eau froide puis centrifugé à 10 000 tr/min, et enfin filtré à travers le papier Whatman (N°1 et N°3) avec l'entonnoir de Büchner. Les extraits sont stockés dans des flacons ombrés à 4°C jusqu'à leur utilisation : détermination des CPT et analyse de l'activité antioxydante dans les conditions optimales.



FIGURE 18 – Appareillage d'un four micro-onde utilisé pour l'E.A.M
(Photo de 3BS-Lab)

30 essais pour chaque extrait sont réalisés avant d'obtenir l'optimum, puis nous avons procédé à l'extraction dans les conditions optimales obtenues (Hayat et al., 2009).

4.3.5 Facteurs influençant le rendement des CPT

Comme toute autre technique d'extraction de composés bioactifs, l'EAM est fondée sur la connaissance des paramètres affectant la nature et la cinétique du transfert de masse du solide au solvant. Les paramètres les plus étudiés sont : le temps d'extraction, la puissance des micro-ondes, la concentration du solvant et le type de solvant (Li et al., 2012).

La cinétique d'extraction des polyphénols à partir d'un matériel végétal est présentée dans de nombreuses études (Silva et al., 2006 ; Spingo et al., 2007). Ce processus est divisé en deux phases (Herodez et al., 2003), une phase rapide qui est expliquée par le fait que les solutés sont présents sur des sites superficiels de la matière première, et une phase lente correspondant à la diffusion moléculaire des solutés à partir des sites internes à travers des pores (Herodez et al., 2003 ; Spingo et al., 2007).

Par conséquent, de nombreux paramètres ont une influence sur la cinétique d'extraction : le coefficient de diffusion des constituants solubles des surfaces, le coefficient de diffusion des constituants des sites profonds, le coefficient de partage de soluté (entre le solvant et le solide), la surface totale mise en contact avec le solvant, le volume de solvant et les dimensions et la géométrie des particules solides (Spingo et al., 2007).

4.3.5.1 Choix du solvant

Un choix correct du solvant est fondamental pour obtenir un processus d'extraction optimal des antioxydants. Lors du choix du solvant, il faut tenir compte des propriétés d'absorption des micro-ondes du solvant, l'interaction du solvant avec la matrice et la solubilité de l'analyte dans la matrice solvant.

Les solvants polaires et non polaires peuvent être utilisés dans l'extraction par micro-ondes (Upadhyay et al., 2012) et les solvants organiques sont les plus utilisés (Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003). Si la molécule de solvant n'est pas capable d'absorber l'énergie des micro-ondes, il n'y aura pas de chauffage et donc aucune extraction efficace (Eskilsson et Björklund, 2000).

Dans notre étude, le choix de l'éthanol comme solvant est basé sur sa faible toxicité afin de réduire son impact sur les coccidies (parasites protozoaires) qui sont la pièce maîtresse de l'étude.

4.3.5.2 Concentration de solvant

Les concentrations de l'éthanol utilisées (0,20, 40, 50, 60,80 et 100 % (v/v)). La meilleure concentration de solvant est choisie en se basant sur le rendement le plus élevé en polyphénols mg EAG/g de la matière sèche. Seul l'intervalle de (20, 40, 50, 60 et 80% (v/v)), est étudié

4.3.5.3 Temps de l'extraction

Le temps d'extraction est un autre paramètre principal dans la procédure d'extraction des composés phénoliques, il peut varier de quelques minutes à 24 heures (Lee et al., 2005) selon la méthode utilisée. La durée du chauffage est un autre facteur important qui influence le processus d'extraction de l'EAM.

Généralement, la quantité d'analyte extraite peut être augmentée avec une augmentation du temps d'extraction, mais il y a un risque associé de dégradation des composants thermolabiles (Mandal et al., 2007).

Souvent, 15 à 20 minutes suffisent, mais même 40 et 43 secondes sont démontrées pour avoir donné d'excellents rendements (Hayat et al., 2009; Afoakwah et al., 2012). Des périodes de temps variables sont nécessaires pour l'extraction de différentes matrices.

Ainsi, l'impact du temps d'extraction (15; 30; 45; 60; 75; 90; 120 minutes) pour l'EF; (30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 secondes) pour l'EP; (30; 60; 90; 120; 150; 180 minutes) pour l'EN sur les polyphénols est étudié. L'extraction est accomplie en appliquant la meilleure concentration du solvant et la meilleure puissance. Le meilleur temps d'extraction est choisi sur la contenance la plus élevée de l'extrait en polyphénols exprimés en mgEAG/g de matière sèche.

4.3.5.4 Puissance d'extraction

En général, le rendement d'extraction augmente proportionnellement à l'augmentation de la puissance des micro-ondes (Nemes et Orsat, 2011; Li et al., 2012), jusqu'à une limite avant que l'augmentation ne devienne insignifiante ou en baisse en raison de la dégradation des composés sensibles à la chaleur (Xiao et al., 2012). L'énergie micro-ondes fournit un chauffage localisé dans l'échantillon et agit comme une force motrice pour que MAE détruise la matrice de la plante afin que l'analyte puisse se diffuser et se dissolver dans le solvant (Chan et al., 2011). Dans cette étape, les deux paramètres précédents : % solvant et le temps d'extraction sont fixés tout en variant la puissance (100, 300, 500, 700, 800 et 900w). La meilleure puissance est choisie sur la base de la valeur la plus élevée en polyphénols totaux mg GAE/g de la matière sèche.

4.3.5.5 Ratio solide/liquide

Le volume du solvant nécessaire pour un seul échantillon est souvent de l'ordre de 10 à 30 ml. Dans certains cas, le volume peut être un paramètre important pour une extraction efficace. Il doit être suffisant pour assurer l'immersion complète de l'échantillon, en particulier en présence d'une matrice qui va gonfler pendant le processus d'extraction (Eskilsson et Björklund, 2000).

Ainsi, nous avons procédé à la détermination du ratio (liquide/Solide), en fixant le solide (1g de la poudre de (feuille, pulpe et noyau) et en variant le liquide (éthanol-eau) 10, 20, 30, 40 et 50 ml. Les autres paramètres déterminés précédemment (concentration de l'éthanol, temps et puissance sont fixés). Le meilleur ratio d'extraction est choisi sur la base de la valeur la plus élevée en polyphénols totaux mg EAG/g de la matière sèche.

4.4 Analyse chromatographique des optimums des extraits par (HPLC-ESI-MS)

L'identification des composés phénoliques des extraits de feuille, pulpe et noyau d'olivier est obtenue par chromatographie en phase liquide à très haute performance et spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray (UPLC-ESI-MS). L'équipement est un spectromètre de masse Xevo G2 composé d'un anhexapole, d'une cellule de collision et d'un analyseur de temps de vol (QTOF) fourni par Waters (Milford, MA, USA).

La sonde d'électrospray est utilisée en mode positif (ESI+) et négatif (ESI-) ainsi qu'en mode analyseur de sensibilité. La plage de masse considérée est de 10 à 1 000 Da. La tension corona est de 2,5 kV pour (ESI+) et de 0,5 kV pour (ESI-). La tension du cône d'échantillonnage est optimisée entre 20 et 50 V.

Enfin, 30 V est choisi pour le dépistage parce que plus de pics sont détectés. Les autres paramètres MS sont les suivants : la température à la source est de 150 °C, la température du gaz de désolvatation de 450 °C et le débit du gaz de désolvatation de 650 Lh-1. Le mode MSE est sélectionné pour l'acquisition et l'énergie de la rampe de collision de 5 à 40 V est utilisée.

Le logiciel MassLynx v.4.1 (Waters, Milford MA, USA) est utilisé pour analyser les échantillons et ChromaLynx (Waters, Milford MA, USA) est utilisé pour déconvoluer le spectre. Les données quantitatives pour les composés phénoliques des extraits de feuille, pulpe et noyau d'olive sont obtenues par des courbes d'étalonnage établies à partir d'étalons connus.

4.5 Analyse des poudres par microscopie électronique à balayage (MEB)

Avant l'analyse par la MEB, les poudres (non extraites et résiduelles après chaque extraction par EAM effectuée dans des conditions optimales) sont récupérées et séchées dans une étuve jusqu'à l'obtention d'une masse constante à 60°C.

La MEB détermine la caractérisation morphologique de la microstructure (Mustafa et Turner, 2011) de la poudre afin d'évaluer l'effet de la méthode d'extraction sur la taille des pores de la paroi végétale ; à cette fin, des images avant et après le processus d'extraction sont visualisées.

Les particules des poudres séchées sont fixées sur le support spécifique du film de carbone, puis recouvertes d'or pendant 10 min au moyen d'un dispositif d'induction par pulvérisation.

Les caractères de forme et de surface sont observés en utilisant un détecteur d'électrons secondaires gazeux (GSED) avec mode environnement (ESEM) (figure 19).



FIGURE 19 – Photo du microscope électronique à balayage(MEB)

4.6 Déterminations analytiques

4.6.1 Teneur totale en composés phénoliques (CPT)

Le dosage des composés phénoliques totaux est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Georgé et al., 2005). Le réactif Folin-Ciocalteu est un agent oxydant constitué d'hétéropolyphospho tungstate molybdate. Il oxyde les phénolates, réduisant les acides hétéropolyliques en un Mo-W bleu. L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage repose sur une réaction de réduction, en milieu alcalin, d'une solution jaune de complexes polymériques ioniques formés à partir d'acides phosphotungstiques ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdiques ($H_3PMO^{12}O_{40}$) en un complexe bleu de molybdo-tungstènes (W_8O_{23}) par les phénols présents dans l'extrait à doser (Boizot et Charpentier, 2006) (figure 20).

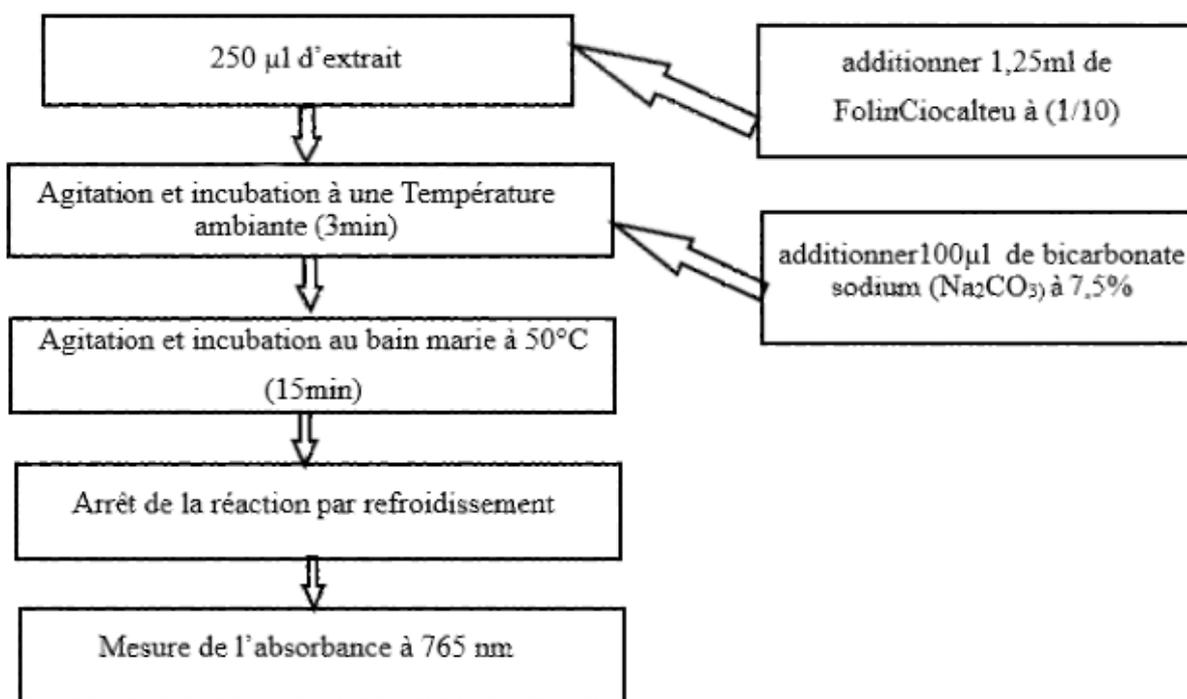


FIGURE 20 – Protocole du dosage des polyphénols
(Georgé et al., 2005)

La coloration bleue du complexe tungstomolybdique réduit du mélange réactionnel est alors proportionnelle à la concentration en polyphénols des solutions testées. Une gamme étalon est réalisée en utilisant l'acide gallique, à des concentrations de 20 -100 µg/ml dans l'éthanol ($R^2=0,998$). La teneur en phénols totaux est exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/gms) (Annexe D).

4.6.2 Flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux est effectué par une méthode colorimétrique selon (Quettier-Deleu et al., 2000). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH), libre en position cinq (C_5), susceptible de donner en présence du chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre, par chélation de l'ion aluminium (Al^{3+}), dont sa concentration est proportionnelle à la quantité de composés présents dans les extraits (Djeridane et al., 2006).

1 ml de la solution de chlorure d'aluminium à 2% est ajouté à 1 ml d'extrait. Après incubation de ce mélange pendant 10 min et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 415 nm (figure 21).

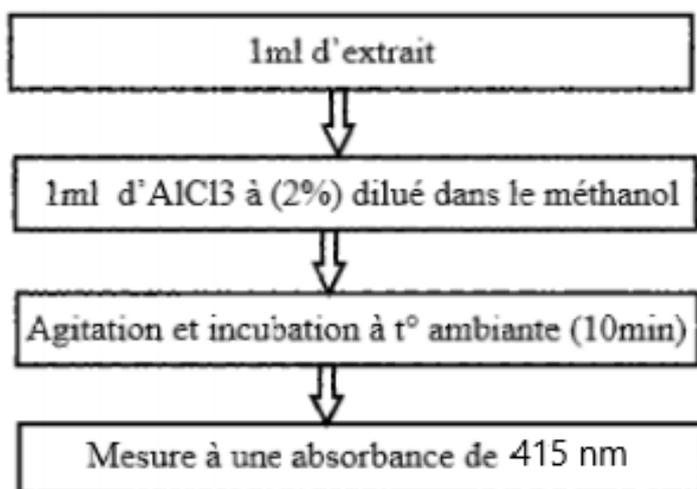


FIGURE 21 – Protocole du dosage des flavonoïdes
(Quettier-Deleu et al., 2000)

Une gamme étalon est réalisée en utilisant la quercétine, à des concentrations de l'ordre de mg/ml dans le méthanol ($R^2=0,993$). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligrammes (mg) d'équivalents quercétine par gramme (g) de matière sèche (mg EQ/g MS). Le blanc est préparé en parallèle, présenté par le solvant d'extraction en suivant les mêmes conditions expérimentales.

4.6.3 Tanins condensés (proanthocyanidins)

La méthode basée sur le dosage butanol/HCl est suivie avec de légères modifications (Vermerris et Nicholson, 2006). 250 μ l d'extrait sont mélangés à 2,5 ml d'une solution d'acide de sulfate ferreux [77 mg de sulfate d'ammonium ferrique : $Fe^2(SO_4)_3$ dissous dans 500 ml de (3 : 2 n-butanol : HCl)]. Après mélange et incubation à 95°C pendant 50 minutes, l'absorbance à 550 nm est mesurée par rapport à un blanc. Les tanins condensés sont calculés en fonction de la formule suivante (Eq 4.5)

$$CTC = \frac{(A_{550nm} * FD * MW)}{\epsilon L} \quad (4.5)$$

Où DF : Facteur de dilution

MW : Poids moléculaire de la cyanidine (287 g/mol)

ϵ : Coefficient d'extinction moléculaire (34700 l/mol/cm)

L : L'épaisseur de la cellule du spectrophotomètre (1cm)

A : L'absorbance de l'échantillon à une $\lambda = 550$ nm.

Les tanins condensés sont exprimés en mg d'équivalents cyanure (CE) par g de matière sèche (MS).

4.7 Détermination de l'activité antioxydante

Il ressort clairement de l'analyse documentaire qu'une seule méthode ne suffit pas pour caractériser les effets *in vitro* et *in vivo* de l'activité antioxydante, et ne peut donner une prédiction complète de l'efficacité de cette dernière. Il existe de nombreuses méthodes qui diffèrent sur le plan de leurs principes d'analyse et de leurs conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant total. Pour cette raison, l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouri et al., 2009). Pour cela, nous avons choisi la méthode DPPH, ABTS, FRAP, Molybdate d'ammonium et Peroxydation lipidique (TBARS) pour la facilité de mise en œuvre et pour l'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits afin de généraliser les résultats.

4.7.1 Test DPPH

La méthode DPPH est introduite il y a près de 50 ans par (Molyneux, 2004) et est largement utilisée pour tester la capacité des composés à agir comme radicaux libres ou donneurs d'hydrogène, et pour évaluer la capacité antioxydante.

Le composé chimique 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation : structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams et al., 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure 22) (Popovici et al., 2009). Du point de vue méthodologique, le test au radical libre $DPPH\cdot$ est recommandé pour des composés contenant des groupes SH-, NH- et OH- . Il se réalise à température ambiante, ce qui élimine tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (1,1-Diphényle-2-picrylhydrazyl de couleur violette). En présence de molécules dites antioxydantes, le DPPH est transformé en sa forme réduite (diphényle picrylhydrazine : de couleur jaune), après saturation de ses couches électroniques par un antioxydant, ce qui conduit à une diminution de l'absorbance (Mansouri et al., 2005). La décoloration du DPPH est directement proportionnelle à la capacité des molécules bioactives à le réduire.

Le paramètre CI_{50} est introduit par (Brand-Williams et al., 1995) et est employé par plusieurs chercheurs, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% de l'activité de DPPH (Brand-Williams et al., 1995 ; Ložienne et al., 2007 ; Chew et al., 2009).

La solution DPPH est préparée par solubilisation de 4mg du standard dans 100ml de méthanol selon l'analyse décrite par (Brand-Williams et al., 1995). Différentes concentrations sont préparées (mg/ ml) et testées pour déterminer la quantité en CPT qui réduit de 50% la concentration initiale du DPPH (CI_{50}).

Brièvement, 2 mL de la solution diluée de DPPH (Absorbance de $0,8 \pm 0,02$) sont ajoutés à 50 μl d'extrait. Après incubation de 30 min et à l'obscurité, la variation de l'absorbance est déterminée à 517 nm.

La décoloration est par rapport au contrôle négatif qui contient uniquement la solution DPPH et le contrôle positif est représenté par des standards ou étalons (Acide gallique ; Quercétine ; Oleuropéine) comme antioxydants synthétiques, testés à différentes concentrations (mg/ml) et pratiqués dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons serviront à la quantification de l'activité antioxydante. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) d'inhibition du radical DPPH et calculés selon l'équation (Eq 4.6) suivante

$$\%d'inhibition\ du\ DPPH = \frac{Abs\ contrôle - Abs\ échantillon}{Abs\ contrôle} * 100 \quad (4.6)$$

Où : Abs contrôle est l'absorbance de mélange du radical DPPH à $t = 0$ min ; Abs échantillon est l'absorbance du radical DPPH en présence de l'extrait à $t = 30$ min.

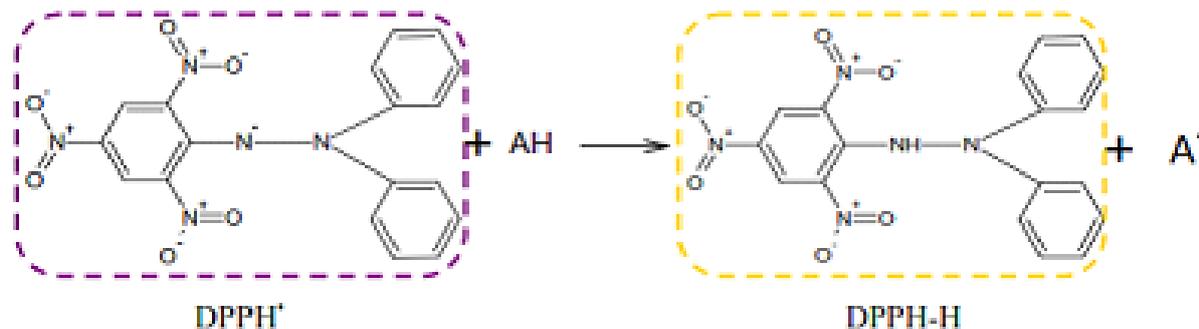


FIGURE 22 – Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicale DPPH et l'antioxydant (AH) (Molyneux, 2004)

Valeur CI_{50} est obtenue par analyse de régression linéaire de la courbe dose-réponse entre % d'inhibition et les concentrations de l'extrait. Plus CI_{50} faible, plus l'activité anti radicalaire (antioxydante) est élevée.

4.7.2 Test ABTS

La méthode est basée sur l'aptitude des molécules antioxydantes d'étancher la longue durée de vie du radical cation $ABTS^{\cdot+}$ (Kumaraswamy et Satish, 2008). L'obtention du radical cation $ABTS^{\cdot+}$ résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine ou horseradish peroxydase) en présence de H_2O_2 ou d'un oxydant (oxyde de manganèse ou persulfate de potassium) (; Re et al., 1999 ; Benavente-Garcia et al., 2000). Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) à température ambiante pour former le radical cationique $ABTS^{\cdot+}$ (2^e-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) de coloration bleu-vert. Ce dernier est formé par arrachement d'un électron (e^-) à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de standard comme trolox (ou antioxydant) donneur de H), l'atome d'azote concerné piège un H , conduisant à $ABTS^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution qui se traduit par son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques par un antioxydant (Re et al., 1999).

Deux (2) volumes de l'étalon (ABTS) à 7mM sont mélangés à 1volume de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) à 2,45 mM préparés dans l'éthanol et laissés à l'obscurité à une température ambiante pendant 12 à 16 h avant l'utilisation ; cette solution est ensuite été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ et équilibrée à 30 °C. 1ml ($ABTS^{\cdot+}$) est additionné à 10 μ l d'extrait puis vortexé ; et après 6 minutes de réaction, l'absorbance à 734 nm est déterminée. Pour chaque essai, l'éthanol est utilisé comme blanc et la $CI50$ (mg/ml) est déterminée par la courbe de régression. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation (Eq 4.7) :

$$AOX\% = (A_{control} - A_{extrait}) / A_{control} * 100 \quad (4.7)$$

Où

$A_{control}$: l'absorbance du témoin (solution $ABTS^{\cdot+}$ sans échantillon à analyser) $A_{extrait}$: l'absorbance de l'échantillon à analyser à $t = 6$ min. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

4.7.3 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits est évalué selon la méthode décrite par (Oyaizu, 1986) (figure 23). La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en une couleur bleu-vert du fer ferreux (Fe^{2+}).

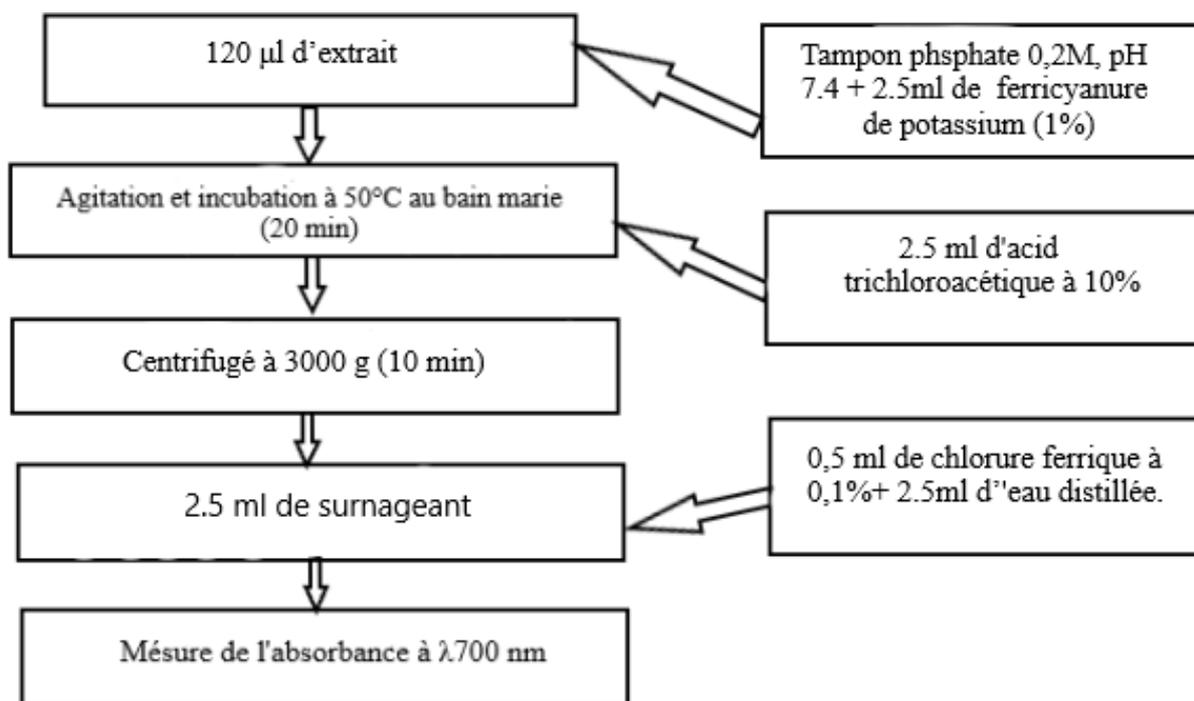


FIGURE 23 – Protocole du pouvoir réducteur (Oyaizu,1986)

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide gallique; quercétine et oleuropéine sont utilisés comme contrôles positifs. Toutes les opérations sont réalisées en trois répétitions

La concentration CI_{50} qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique, est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

4.7.4 Test de molybdate d'ammonium

Le test du pouvoir réducteur phosphomolybdate est un essai direct employé principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Il est basé sur la réduction des molybdates (VI) en molybdène (V) en présence des extraits à tester, conduisant à la formation d'un complexe phosphate/Mo (V) de coloration verte détectable par l'UV à une longueur d'onde de 695nm à pH acide selon la méthode de (Prieto et al., 1999) (Fig 24).

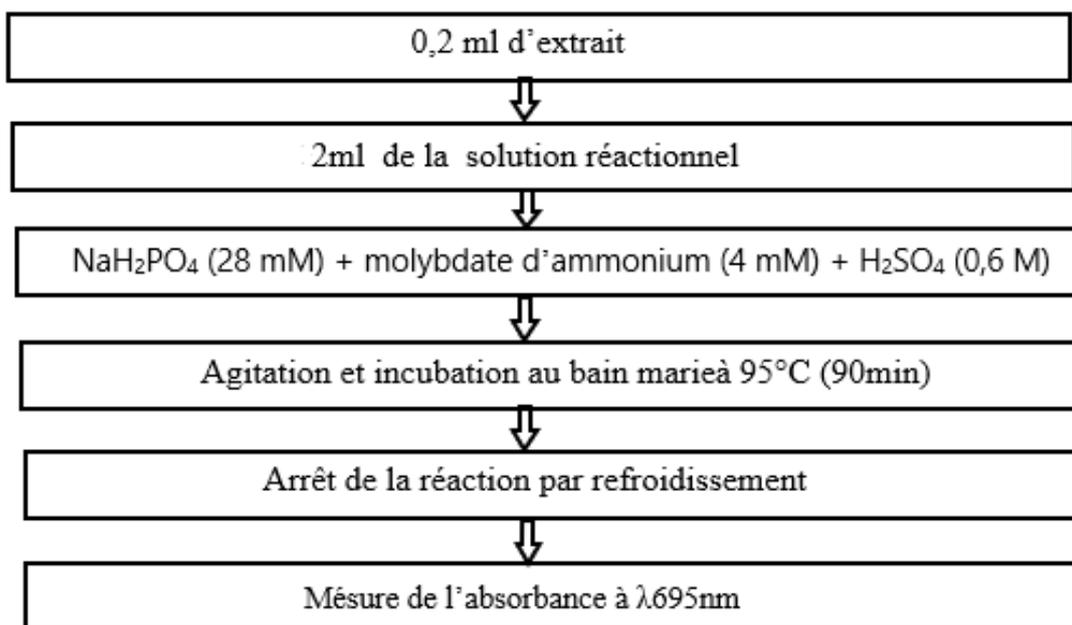


FIGURE 24 – Protocole du test phosphomolybdénique (Prieto et al.,1999)

Le blanc est le solvant d'extraction (Ethanol) à 0,2 ml. La capacité antioxydante est exprimée en DO et en équivalents de l'acide gallique en mg/ml d'extrait. CI_{50} est déduite à partir de la courbe de régression du contrôle positif à différentes concentrations.

4.7.5 Test de la peroxydation lipidique (TBARS)

Le MDA est un indice de la peroxydation lipidique globale. La méthode est basée sur la détection spectrophotométrique du complexe entre le MDA et l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) (Fig 25). Le complexe MDA-TBA présente un maximum d'absorption à 532 nm (Devassagayam et al., 2003). Deux molécules de TBA se fixent sur une molécule de MDA, à 95- 100°C en milieu acide pour donner un complexe de couleur rose.

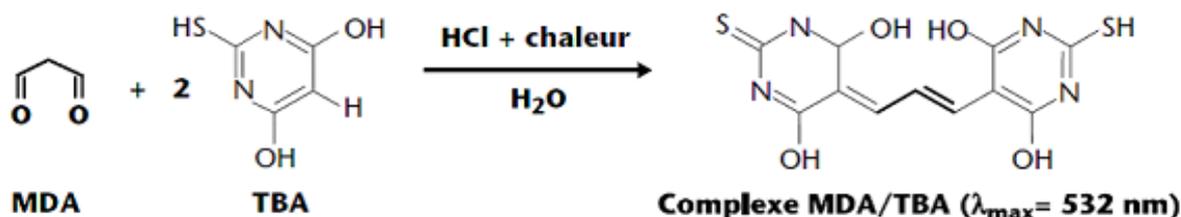


FIGURE 25 – La réaction de la formation du chromophore entre MDA et TBA
 MDA : malondialdehyde; TBA : acide 2-thiobarbiturique (Laguerre et al., 2007)

La méthode de (Choi et al., 2002) utilisant une induction de la peroxydation lipidique par le couple acide ascorbique/sulfate de fer (réaction de Fenton) est adaptée pour cet essai.

-À 600 μl d'extraits (EN ; EP ; EF), sont ajoutés respectivement -300 μl de solution tampon Tris-HCl (pH 7,5 ; 20 mM), -500 μl d'acide linoléique (20 mM) et -100 μl de sulfate de fer (4 mM). La peroxydation débute après addition de 100 μl d'acide ascorbique (5 mM). Le mélange réactionnel obtenu est incubé au bain marie à 37°C pendant 60 minutes. Après cette étape, 2 ml de TCA (10 %) sont ajoutés dans tous les tubes. Ensuite, à 1 ml d'aliquote recueilli dans chacun des mélanges réactionnels préparés auparavant, est ajouté 1 ml de TBA (1 %). Les mélanges réactionnels obtenus sont placés dans un bain bouillant à 95° -100°C pendant 20 minutes. L'acide gallique (AG), quercétine (QE) et l'oleuropéine (OLE) sont utilisés comme molécules de référence. Un essai blanc est réalisé en remplaçant l'extrait par le solvant d'extraction. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 532 nm et le pourcentage d'inhibition des extraits (EF ; EP ; EN) est déterminé selon l'équation suivante :

$$Inhibition(\%) = (1 - (DO_{ext}/DO_{blanc}) * 100 \quad (4.8)$$

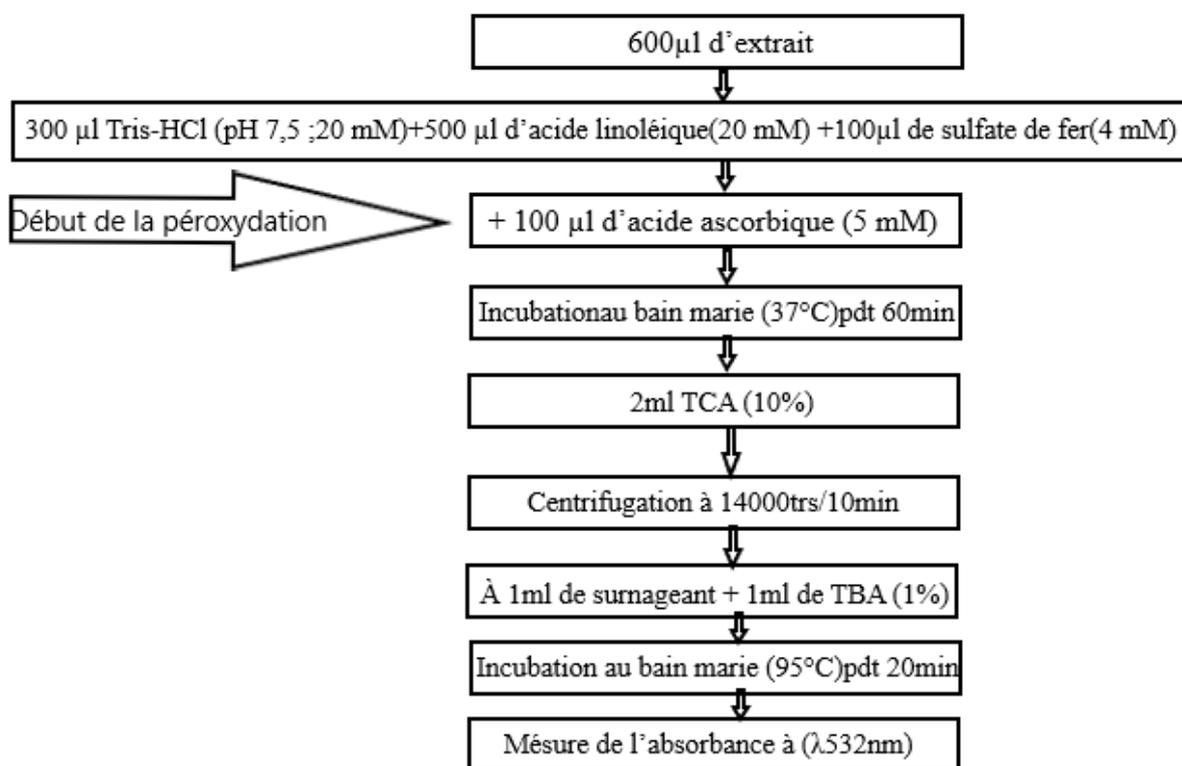


FIGURE 26 – Protocole du test TBARS

(Choi et al., 2002)

4.8 Analyse statistique

Toutes les expériences sont réalisées en triplet et les résultats présentés sont des moyennes \pm déviation standard (DS). L'analyse de la variance (ANOVA) avec le test All pairs, Tukey, HSD sont utilisés pour évaluer l'influence de chaque facteur sur le rendement en polyphénols dans l'étude préliminaire avec un niveau de confiance de 95%.

Les données obtenues à partir du CCD sont analysées statistiquement en utilisant ANOVA afin de tester la signification et l'adéquation du modèle. $p < 0,05$ et $p < 0,01$ sont pris comme des niveaux significatifs et hautement significatifs, respectivement. Pour structurer le plan CCD et analyser tous les résultats, le logiciel JMP (Version 7.0, SAS, USA) est utilisé.

Résultats et discussions

Résultats et discussions

Première partie

Support végétal

Plusieurs études portent sur l'extraction des composés phénoliques de ces co-produits dans le but de chercher une augmentation du rendement mais sans tenir compte de l'impact sur leurs activités biologiques qui peuvent se dégrader suite aux conditions drastiques (température, pression, temps d'extraction. . .) de l'opération de l'extraction. Pour pouvoir proposer une valorisation optimale d'un agro-produit, il faudrait tout d'abord identifier sa composition chimique, estimer sa teneur en composés d'intérêt et évaluer son statut antioxydant

5.1 Test d'humidité

Les teneurs en eau (en % d'humidité) et en matières sèches pour les poudres de feuilles, pulpes et noyaux sont représentées dans le tableau (5.1)

TABLE 5.1 – Teneur en eau et en matière sèche des poudres de feuille, pulpe et noyau.

	Feuille	Pulpe	Noyau
Taux d'humidité (%)	25,84	63,193	66
Teneur en matière sèche (%)g/gms	3,58	4,057	6,494

g : gramme ; gms : gramme de matière sèche

Le taux élevé d'humidité est une source de dégradation des antioxydants par le phénomène d'oxydation (Ribéreau-Gayon et Gautheret, 1968).

L'humidité favorise les activités enzymatiques (polyphenols-oxydase et glucosidases en provoquant des changements irréversibles sur les antioxydants (Veillet, 2010), et par conséquent, une décomposition ou polymérisation. De plus, elle favorise le développement des micro-organismes et les moisissures qui entraînent la dégradation rapide du matériel végétal lors de sa conservation (Johns, 1999). Dans cette perspective et dans le but de limiter ces réactions, et de préserver l'état des antioxydants, le séchage à l'abri de la lumière et les conditions liées sont entrepris. Les résultats montrent que les poudres de feuilles, pulpes et noyaux sont riches en eau ($25,843 \pm 0,011$; $63,193 \pm 0,304$; 20 ; $66 \pm 0,218\%$ en base d'humidité et $3,580 \pm 0,266$; $4,057 \pm 0,0597$; $6,494 \pm 0,468\%$ g eau/g de matière sèche), respectivement. Ce faible taux d'humidité résiduel permet de mieux conserver les propriétés antioxydantes des composés phénoliques des trois poudres. Lumaret et al. (2004), montrent que l'eau représente 50% du poids de pulpe, ce qui est confirmé par l'humidité initiale de notre échantillon (pulpe). Concernant le noyau, (Zaidi et al., 2009), trouvent un taux de 10% supérieur à celui de notre échantillon. Cette différence peut-être liée aux conditions et mode de séchage.

5.2 Extraction des polyphenols par EAM

Tout d'abord, il convient de mentionner que les procédés d'extraction assistés par la température, comme l'ELP et l'EAM, ont une extraction plus courte que les technologies conventionnelles l'ESF ; il s'agit principalement de l'augmentation de la solubilité des analytes dans les milieux d'extraction lorsque la tension superficielle et la viscosité du solvant diminuent, ce qui, à la fin, améliore l'efficacité de l'extraction (Taamalli et al., 2012). En effet, la polarité des solvants entraîne une augmentation de la perméabilité de la paroi cellulaire et leur faible viscosité augmente la diffusion du solvant (Tsiaka et al., 2015). Un plus grand nombre de composés phénoliques, principalement de nature polaire, se trouve dans les extraits obtenus à l'aide de EAM (Taamalli et al., 2012). En général, l'EAM améliore la capacité d'extraction des solvants car le champ électromagnétique provoque un réchauffement rapide du solvant dont le taux dépend du facteur de dissipation (Zhang et al., 2013). L'efficacité de l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) d'un composé est influencée par de multiples paramètres tels que le diamètre de la particule, la puissance, temps d'irradiation, la concentration d'EtOH, et le rapport (Ratio) liquide/solide ; et leurs effets peuvent être soit indépendants ou interactifs (Liyanapathirana et al., 2006).

5.2.1 Facteurs influençant le rendement en CPT

5.2.1.1 Dimension des particules

Ce paramètre influence considérablement la teneur des polyphenols totaux. Trois dimensions granulométriques sont choisies ($\phi \leq 500\mu m$; $\phi \leq 250\mu m$; $\phi \leq 125\mu m$). Généralement, il est admis que la forme broyée de la matière végétale présentera une plus grande surface de contact avec le solvant (Bonnaillie et al., 2012). Le tableau (5.2) est l'illustration parfaite de cette influence

TABLE 5.2 – Dimensions optimisées des particules de (feuille, pulpe et noyau).

Matière végétale	Dimension de la particule ($\phi\mu m$)	Rendement des CPT (mg EAG/g de MS)
Feuille	≤ 125	$2,050 \pm 0,057$
	≤ 250	$1,987 \pm 0,068$
	≤ 500	$1,034 \pm 0,022$
Pulpe	≤ 125	$1,103 \pm 0,005$
	≤ 250	$1,223 \pm 0,025$
	≤ 500	$0,665 \pm 0,013$
Noyau	≤ 250	$0,729 \pm 0,024$
	≤ 125	$0,552 \pm 0,022$
	≤ 500	$0,374 \pm 0,045$

CPT : composés phénoliques totaux ; ϕ : diameter de la particule ; mg : milligramme ; EAG/g : équivalent d'acide gallique par gramme ; MS : matière sèche

L'analyse statistique des trois poudres révèle une différence significative entre les teneurs en polyphénols, obtenues à partir des granulométries ($\phi \leq 125$; $\phi \leq 250$; $\phi \leq 500$). La teneur la plus élevée ($2,050 \pm 0,057$ mg EAG/g de ms) est enregistrée avec le diamètre ($\phi \leq 125 \mu m$) pour la feuille. Quant à la pulpe et au noyau, le diamètre $\phi \leq 250 \mu m$ donne une extraction maximale avec des teneurs respectives de $1,223 \pm 0,025$ et $0,729 \pm 0,024$ mg EAG/g de MS. Il s'avère de ce qui précède qu'avec les fines particules, les composés chimiques sont plus facilement transférés de la matière végétale vers le solvant d'extraction. Cela s'explique par la création d'une surface importante de contact entre le solvant et les particules de la matrice végétale (Silva et al., 2007) et aussi l'éclatement d'un grand nombre de pores, sans pour autant que celles-ci soit trop fines, afin d'éviter le phénomène de colmatage, et faciliter ainsi le contact avec le solvant (Kossah et al., 2010; Virginie et al., 2015).

5.2.1.2 Effets des paramètres d'extraction et surface de réponse des CPT

L'analyse de la variance de régression des coefficients consiste ainsi à analyser l'influence des variables respectives (X_1 ; X_2 ; X_3 ; X_4 : concentration du solvant, temps d'irradiation, puissance et ratio) à $p < 0,05$ sur l'extraction des substances bioactives (Uma et al., 2010). Ces dernières sont plus significatives à des valeurs supérieures de F-ratio (probabilité du manque d'ajustement) et les plus faibles de P du facteur correspondant (Zhong et al., 2010; Liu et al., 2010).

Les P-value sont utilisés comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre et les valeurs de Lack of fit (F) sont conçues pour la validité du modèle à une valeur supérieure à 0,05. Les résultats sont illustrés dans les tableaux ([5.5]-[5.6]- [5.7]).

5.2.1.2.1 Influence de la concentration de l'éthanol : Le pourcentage d'éthanol dans l'eau comme solvant d'extraction peut avoir une incidence sur l'efficacité d'extraction (Wu et al., 2011). C'est pourquoi l'éthanol aqueux à différents pourcentages est testé dans cette étude.

Les tableaux (Annexe :D; E; F) présentent les résultats des expériences à un seul facteur réalisés pour les essais préliminaires de l'optimisation des extraits de (feuille, pulpe et noyau) de l'olivier par l'EAM et ils montrent que le rendement des CPT n'augmente de façon significative que lorsque la concentration d'éthanol passe de 20 à 60% pour l'EF, de 40 à 60% pour l'EP dans le milieu réactionnel et de 20 à 60% pour l'EN. Le maximum des CPT est enregistré avec une concentration d'éthanol de 60% pour l'EF et l'EN et 40 et/ou 50% pour l'EP (statistiquement, pas de différence entre les concentrations d'éthanol à 40 et à 50%). Cependant, le rendement des CPT commence à baisser avec une augmentation de la proportion d'éthanol jusqu'à 80% dans le milieu d'extraction concernant l'EN, l'EF et l'EP ($p < 0,05$).

Cela laisse à dire que ces proportions d'éthanol facilitent l'accès aux cellules qui est expliqué par la teneur en composé phénoliques. Un effet similaire est signalé pour l'extraction de composés phénoliques à partir d'autres sources végétales (Spigno et al., 2007 ; Li et al., 2012).

À des concentrations plus élevées, les rendements sont réduits et statistiquement faibles. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'avec l'augmentation de la concentration d'éthanol, la polarité des solvants phénoliques diminue ainsi que le mouvement moléculaire, ce qui a conduit, à une légère dissolution des composés par l'abaissement de la diffusion et la diminution de la solubilité (Yang et al., 2009). Les solvants polaires (méthanol, éthanol et eau) bénéficient d'une bonne capacité d'absorption de l'énergie des micro-ondes en raison de leur constante diélectrique élevée (Zhang et al., 2008). L'eau présente le diélectrique le plus élevé. L'eau et une faible concentration d'éthanol peuvent facilement accéder aux cellules, mais une concentration élevée d'éthanol peut causer la dénaturation des protéines, empêchant la dissolution des polyphénols et influençant ainsi le taux d'extraction (Zheng et Wang, 2006).

L'éthanol est un solvant faiblement polaire, tandis que l'eau est un solvant polaire puissant, et ils peuvent être mélangés ensemble dans n'importe quelle proportion (Zheng et Wang, 2006). Ce mélange (solvant-eau distillée) semble très efficace pour l'extraction des polyphénols, car l'eau en combinaison avec le solvant contribue à la création d'une moyenne modérément polaire qui assure à la fois, l'extraction des composés phénoliques et la préservation de leur activité antioxydante (Chirinos et al., 2007). De plus (Herrero et al., 2011) signalent que le contenu phénolique et le pouvoir antioxydant les plus élevés sont obtenus avec l'éthanol.

Les molécules phénoliques sont également polaires, de sorte que leur rendement augmente avec l'augmentation de la concentration de la teneur en eau (Zhang et al., 2008). Lorsque la teneur en eau du solvant dépasse environ 45%, la récupération des CPT est réduite. Cela peut être attribué à la différence des propriétés diélectriques du solvant par rapport au chauffage par micro-ondes, car le solvant joue un rôle important dans l'extraction par micro-ondes, en facilitant la distribution de la chaleur dans la matrice. Dans cette étude, l'éthanol (40 % pour l'EP ; 60% pour l'EN et l'EF) absorbe relativement bien l'énergie des micro-ondes et demeure un bon solvant d'extraction.

Le résultat concernant la concentration de l'extrait de feuille (EF) qui marque le maximum de récupération des CPT (47,67mg EAG/gms) à 60%, cela n'est pas conforme aux enquêtes effectuées par (Cacace et Mazza, 2003), qui supposent que la solubilité des composés phénoliques dans les feuilles d'olivier peut être plus élevée à 40 qu'à 50 % d'éthanol, étant donné que de nombreux phénols de la feuille sont des glycosides.

Similaire à (Japón-Luján et al., 2006) qui montrent que l'extraction assistée par les ultrasons des biophenols des feuilles d'olivier avec des solutions eau/éthanol culmine à 59% d'éthanol ; (Mylonaki et al., 2008) notent le maximum des CPT ($250,2 \pm 76,8$ mg d'équivalent d'acide gallique par g de l'extrait sec) avec 60% d'éthanol, bien que l'extraction assistée par micro-ondes de l'extrait de feuille d'olivier soit facilitée par 80% d'éthanol (Japón-Luján et al., 2006).

Ce comportement s'observe dans l'extraction de plusieurs classes de polyphenols provenant de divers tissus végétaux avec le mélange eau/éthanol, comme les anthocyanines et autres composés phénoliques à savoir : le cassis (Cacace et Mazza, 2003), l'orge (Madhujith et Shahidi, 2006), les feuilles d'*Inga edulis* (Silva et al., 2007) et les lignanes des graines de lin (Zhang et al., 2007).

Ainsi, la solubilité des polyphenols pourrait être modifiée par des changements de concentration d'éthanol, affectant les propriétés du solvant (c-à-d. la densité, constante diélectrique, etc. . .) (Cacace et Mazza, 2003). Cependant, (Taamalli et al., 2012), récupèrent le maximum des CPT à 80% avec le mélange (eau-méthanol). Cette différence dans l'expression des résultats peut être due à la méthode d'extraction utilisée, type de solvant et les proportions liées à ce dernier.

Concernant l'EN, la récupération maximale (9, 29 mg EAG/gms) des CPT est enregistrée en utilisant 60 % d'éthanol, quantité supérieure à celles notées par (Mojerlou et Elhamirad, 2018 ; Alu'datt et al., 2010) qui est de 4,04mg/g avec 30% (eau-méthanol) et de 4,4mg/g avec 25% (eau-méthanol), respectivement. Cette différence de rendement des CPT peut être liée au choix du solvant.

Apparemment, une faible quantité d'eau dans le solvant d'extraction peut pénétrer facilement dans les cellules et faciliter un meilleur chauffage de la matrice. Ce facteur augmente le transfert massique des principes actifs dans le solvant d'extraction . Le taux d'absorption de l'énergie des micro-ondes par l'eau est plus élevé que la dispersion de cette énergie dans la chaleur.

Enfin, l'efficacité de chauffage de l'éthanol est supérieure à celle de l'eau en raison d'un facteur de dissipation élevé. Ainsi, les solvants à haute constante diélectrique et un facteur de dissipation élevé facilitent la distribution de la chaleur dans l'ensemble de l'édifice et augmentent le rendement d'extraction (Jain et al., 2009).

Quant à l'EP, le rendement élevé de (21,07mgEAG/gms) est noté à la concentration d'éthanol de 40%. Selon (Aouidi et al., 2012), les teneurs en phénols totaux des extraits de pulpe d'olive sont de l'ordre de 31 à 59 mg/g ms quelque soit le solvant d'extraction utilisé. Sur la base de ces résultats, les concentrations d'éthanol à 40% (EP) et à 60 % (EN. EF) sont choisies pour l'analyse de la détermination de la puissance et le temps d'irradiation pour les essais RSM.

5.2.1.2.2 Influence de la puissance : Les effets de la puissance des micro-ondes sur la récupération des CPT des extraits de pulpe (EP), de feuilles (EF) et de noyau (EN) d'olivier sont étudiés à des niveaux allant de 100 à 900 W avec des concentrations respectives d'éthanol (40;60;60%), un temps d'irradiation de 2 minutes et un rapport liquide/solide de 20 :1 (ml/g).

En fonction des résultats obtenus, l'extraction des composés phénoliques est considérablement influencée par la puissance des micro-ondes. Une augmentation significative de la teneur en CPT (mg EAG/gms) est observée à des pas de puissance de 700 à 800W pour l'EF, de 300 à 700W pour l'EP ; de 300 à 500W pour l'EN. Cependant, la récupération est considérablement réduite à 900 W pour l'extrait de feuille et celui de la pulpe et à 700W pour l'extrait du noyau avec des quantités respectives (42,07 ; 22,42 ; 6,31mgEAG/gms) (tableaux [5.3]-[5.4] [5.5]).

La réduction de la teneur en CPT de plus de 500 et à 900W peut être due à la dégradation thermique des substances phytochimiques à des niveaux de puissance des micro-ondes plus élevés. Ceci peut être expliqué par la chaleur générée par les micro-ondes, chauffant les cellules de la plante qui peut être trop forte pour décomposer les substances phytochimiques qui ne sont récupérées à des niveaux de puissance supérieurs et par conséquent, influence la solubilité de ces dernières et augmente la vitesse de diffusion avec un transfert de masse accrue.

Cependant, il convient de noter que l'augmentation de la température au-delà de certaines valeurs peut favoriser le risque de dégradation thermique et la décomposition possible des composés phénoliques non récupérés (Chan et al., 2009).

Ces observations révèlent que l'extraction à des niveaux de puissance plus élevés, qui avoisinent 900 W, n'assurent pas une meilleure récupération des composés phénoliques que ceux extraits à la puissance moyenne. Dans une étude similaire sur l'effet de l'extraction des composés phénoliques totaux du noyau d'olivier par EAU (Extraction Assistée par Ultrasons) réalisée par (Mojerlou et Elhamirad, 2018), il est rapporté qu'à une puissance de 200W, le taux maximal des CPT est noté. Ce qui s'oppose à nos résultats. Cela revient à mettre en cause probable la méthode d'extraction.

Contrairement à l'étude sur les pelures de mandarines (co-produits) réalisée par (Ahmad et Langrish, 2012), qui rapportent que le rendement et les quantités d'acides phénoliques totaux extraits par micro-ondes, diminuent avec la puissance accrue des micro-ondes (900 W).

En se basant sur nos observations, des niveaux de puissance de 700 à 900W pour l'EF, de 300 à 700W pour l'EP ; de 300 à 900W pour l'EN sont choisis comme niveau inférieur, moyen et supérieur, respectivement, pour les appliquer à l'optimisation RSM.

5.2.1.2.3 Influence du temps d'irradiation : Généralement, en augmentant le temps d'extraction, la quantité d'analytes extraits est élevée, bien qu'il existe un risque de dégradation des composés extraits (Talli et al., 2010).

Dans cette étude, la récupération des CPT est examinée à différentes périodes d'extraction (30–210 sec) pour l'extrait de pulpe (30-180 min) pour l'extrait du noyau (15-120 min) pour l'extrait de feuille avec trois autres facteurs fixes : (40 ; 60 ; 60%) concentration d'éthanol (v/v), une puissance micro-ondes de 500 ; 700W, respectivement, et un rapport liquide/solide de 20 ml/g qui sont présentés dans les tableaux [5.3]-[5.4] [5.5]. Les résultats indiquent que l'augmentation du temps d'extraction entraîne l'augmentation des teneurs en phénols totaux. En effet, la hausse en rendement des CPT (46,62mgEAG/gms) est notée à 60 min pour l'EF, à 120s pour l'EP avec une teneur de 19,48mgEAG/gms et à 90 min pour l'EN (7,05mgEAG/gms), au-delà de ces temps, la réduction des taux en CPT est enregistrée, tableaux [5.3]-[5.4] [5.5]. En effet, une exposition prolongée des rayonnements électromagnétiques pendant le processus d'extraction au micro-onde peut mener à la dégradation thermique des constituants bioactifs (Khizar et al., 2010). Nos observations ne concordent pas avec ceux publiés par d'autres chercheurs qui rapportent de meilleurs rendements d'antioxydants phénoliques de l'extrait du noyau en 3 min (Mojerlou et Elhamirad, 2018) et en 30s à partir de la peau des arachides (coproduit), obtenus en utilisant des micro-ondes pour l'extraction (Ballard et al., 2010).

À l'opposition, d'autres auteurs montrent une relation positive entre le temps d'extraction et le contenu phénolique total extrait à partir du grignon d'olive, éventuellement à cause de l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques sur une durée plus longue (Alu'datt et al., 2010).

Cette augmentation peut être attribuée à l'augmentation de l'énergie cinétique du solvant et son pouvoir pénétrant (Vinatoru, 2001). Cette constatation est en accord avec les résultats précédents concernant l'EAU des CPT provenant de mélasse de betterave sucrière (Chen et al., 2015), d'Aroniamelanocarpa (Ramic et al., 2015), et de myrtille (He et al., 2016).

De ce fait, plusieurs études rapportent que le rendement d'extraction change avec l'augmentation ou la diminution du temps d'extraction (Wang et Weller, 2006). En ce qui concerne le temps d'extraction des CPT de l'extrait de feuille (EF), l'EAM n'exige que 60 minutes pour donner le rendement le plus élevé, ce qui contrarie le résultat noté par (Taamalli et al., 2012) qui enregistrent le rendement le plus élevé de l'ordre de 16,7% en 6min, alors que le rendement de l'extrait de feuille d'olivier obtenu par la méthode conventionnelle, ne dépasse pas 10%. On peut conclure que la liaison (méthode d'extraction – temps), semble avoir une efficacité sur la libération des composés bioactifs.

Il est apporté par (Michiels et al., 2012), que le temps de contact solvant – matrice végétale, peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et donc influencer l'efficacité de l'extraction. Un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques (Santos-Buelga et al., 2012). Néanmoins, plusieurs chercheurs attirent l'attention sur la possibilité de l'oxydation des composés phénoliques si le temps d'extraction est long, ce qui peut mener à l'inverse des résultats escomptés (teneurs très basses) (Nazck et Shahidi, 2004 - 2006 ; Chirinos et al., 2007). Il ressort de ces résultats, que l'intervalle de temps optimal se situe entre 45-75 min (EF) ; 60-180 s (EP) ; 60-120 min (EN) pour l'application du RSM.

5.2.1.2.4 Influence du rapport Liquide/Solide : Le rapport liquide/solide est un paramètre important qui influence la récupération des composés phénoliques. Il est important de maximiser le rendement d'extraction tout en minimisant la consommation de solvant (Spigno et De Faveri, 2009).

Dans la présente étude, le taux de récupération des CPT des extraits augmente avec l'élévation des concentrations de rapport liquide/solide pendant l'extraction. Il est observé que la teneur des CPT est maximisée à un rapport liquide/solide de 30/1 ; 40/1 ; 40/1 (ml/g) pour l'EF, l'EP et l'EN, respectivement (tableaux : [5.3]-[5.4]-[5.5]). Au-delà de ces rapports, les taux diminuent. Dans une étude similaire réalisée par (Mojerlou et Elhamirad, 2018) sur le noyau d'olive, avec un ratio de 3,6%, la teneur maximale des CPT est notée.

Ces résultats sont compatibles avec le principe du transfert de la matière, où la force de transmission durant ce transfert est le gradient de la concentration de soluté et le liquide. Cette force devient importante lorsque le rapport liquide/solide utilisé est plus élevé (Alfarsi et Lee, 2008). Des résultats similaires sur l'effet du rapport liquide/solide sur l'extraction des polyphénols sont rapportés sur les noyaux de dattes par (Alfarsi et Lee, 2008).

Concernant le rapport Solide/Liquide de 50 :1 ml/ g qui est marqué par la diminution des teneurs en CPT pour les trois extraits (EF ; EP ; EN), nous pouvons dire que ce résultat peut être dû à l'intervention d'un autre paramètre (n'étant pas pris en considération dans cette étude, ou peut-être dû à l'augmentation de l'eau dans le système de solvant d'extraction (alcool/eau), qui fait extraire en quantité importante des composés non phénoliques comme les glucides, les protéines susceptibles de polymériser avec les composés phénoliques, ce qui conduit à la formation des complexes qui ne sont pas détectés par le test utilisé.

Ces résultats concordent avec ceux de (Yolmeh et al., 2014) qui rapportent que le rendement d'extraction des pigments d'annatto est réduit à des rapports solides/solvants élevés. Les rapports liquide/solide de 30 :1 ; 40 : 1 (ml/g) pour l'EF, l'EP et l'EN, respectivement sont choisis pour la conception de l'optimisation du RSM.

TABLE 5.3 – Résultats de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondesde l'extrait de feuille

Concentration		Temps d'irradiation		Puissance de microondes		Ratio (Liquide/Solide)	
(%)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(min)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(W)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(ml/g)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})
0%	23,30±4,94 ^c	15	23,07±6,41 ^c	100	21,7±4,85 ^c	10	28,75±3,51 ^{ab}
20%	28,55±5,47 ^b	30	24,95±4,00 ^c	100	29,30±3,82 ^{bc}	20	37,22±6,47 ^{ab}
40%	37,40±1,02 ^a	45	27,42±7,14 ^{ab}	500	29,82±5,26 ^{bc}	30	41,22±5,93 ^a
60%	47,67±4,05 ^a	60	46,62±3,24 ^a	700	39,8±6,37 ^{ab}	40	30,85±3,34 ^{ab}
80%	39,45±6,73 ^{ab}	75	39,92±6,29 ^{ab}	800	44,90±3,03 ^a	50	25,57±4,36 ^b
100%	21,45±2,66 ^c	90	30,27±7,03 ^{bc}	900	42,07±6,18 ^{ab}		
		120	33,57±4,39 ^{bc}				

Les résultats sont indiqués en tant que moyennes ± D.S. Les mêmes lettres dans la même colonne se réfèrent à des moyennes non statistiquement différentes selon l'ANOVA et le test de tukey. CPT, rendement total en polyhpénols rapporté à la matière sèche (ms) de l'extrait de feuille d'olivier ; mgEAG : milligramme ; EAG : Equivalent d'Acide Gallique.

TABLE 5.4 – Résultats de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondesde l'extrait de pulpe

Concentration		Temps d'irradiation		Puissance de microondes		Ratio (Liquide/Solide)	
(%)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(s)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(W)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(ml/g)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})
0%	12±0,32 ^b	30	11,39±0,30 ^f	100	17±0,80 ^d	10	19,49±0,06 ^c
20%	13,13±0,09 ^b	60	13,65±0,45 ^d	300	20,25±0,13 ^c	20	20,58±0,15 ^b
40%	21,07±0,26 ^a	90	16,74±0,60 ^b	500	21,70±0,60 ^{bc}	30	25,30±0,14 ^a
60%	21,08±0,03 ^a	120	19,48±0,16 ^a	700	32,46±0,86 ^a	40	15,23±0,24 ^d
80%	19,75±0,07 ^a	150	14,81±0,19 ^c	900	22,42±0,67 ^b	50	13,50±0,04 ^e
100%	9,10±0,35 ^c	180	12,63±0,33 ^e				

Les résultats sont indiqués en tant que moyennes ± D.S. Les mêmes lettres dans la même colonne se réfèrent à des moyennes non statistiquement différentes selon l'ANOVA et le test de tukey. CPT, rendement total en polyhpénols rapporté à la matière sèche (ms) de l'extrait de pulpe d'olivier ; mgEAG : milligramme ; EAG : Equivalent d'Acide Gallique.

TABLE 5.5 – Résultats de l'étude préliminaire de l'extraction assistée par micro-ondes de l'extrait de du noyau

Concentration		Temps d'irradiation		Puissance de microondes		Ratio (Liquide/Solide)	
(%)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(min)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(W)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})	(ml/g)	TPC yield (mg_{GAE}/g_{dw})
0%	$5,58 \pm 0,89^b$	30	$5,68 \pm 0,22^c$	100	$5,53 \pm 0,23^c$	10	$5,05 \pm 0,32^c$
20%	$6,85 \pm 0,26^{ab}$	60	$6,30 \pm 0,13^b$	300	$7,07 \pm 0,17^e$	20	$6,31 \pm 0,09^{bc}$
40%	$7,46 \pm 1,91^{ab}$	90	$7,05 \pm 0,15^a$	500	$9,74 \pm 0,04^a$	30	$6,66 \pm 0,78^b$
60%	$9,29 \pm 0,14^a$	120	$5,69 \pm 0,06^c$	700	$6,31 \pm 0,28^{bd}$	40	$8,82 \pm 0,88^a$
80%	$7,97 \pm 0,57^{ab}$	150	$5,66 \pm 0,34^c$	900	$8,01 \pm 0,03^b$	50	$5,78 \pm 0,12^{bc}$
100%	$5,84 \pm 0,45^b$	180	$6,9 \pm 0,10^a$				

Les résultats sont indiqués en tant que moyennes \pm D.S. Les mêmes lettres dans la même colonne se réfèrent à des moyennes non statistiquement différentes selon l'ANOVA et le test de tukey. CPT, rendement total en polyphénols rapporté à la matière sèche (ms) de l'extrait du noyau d'olivier ; mgEAG : milligramme ; EAG : Equivalent d'Acide Gallique.

Par conséquent, l'utilisation de l'extraction assistée par micro-ondes est un processus par lequel, l'énergie micro-ondes accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales (Inoue et al., 2010). Au cours de l'extraction, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles préconisées par la rotation dipolaire des molécules. Une quantité considérable de la pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, ce qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique.

En conclusion, ces résultats mènent à dire que la concentration du solvant et quelques facteurs sont importants comme le ratio et puissance. Ce constat est démontré par plusieurs études (Uma et al., 2010). Cela est vraisemblablement dû à la polarité du système (eau/éthanol) qui varie en fonction des propriétés (concentration de l'éthanol ; constante diélectrique).

5.2.2 Optimisation des conditions MAE

5.2.2.1 Modélisation et ajustement du modèle de régression pour CPT

Les plans d'expérience et les données de réponse correspondantes aux polyphenols totaux de l'extrait de feuille, pulpe et noyau, sont présentés dans les tableaux (Annexe :F1 ; F2 ; F3). Les données expérimentales sont ajustées à la régression polynomiale et le modèle prédictif adressé aux données peut être exprimé, en termes de valeurs codées, en négligeant les termes non significatifs ($p > 0,05$), dont les équations (5.1 ; 5.2 ; 5.3) décrivent la relation entre le rendement en polyphenols et les facteurs sélectionnés pour l'EAM à la feuille, pulpe et noyau, respectivement.

5.2.2.1.1 A-Model de régression de la pulpe : Les coefficients de régression des termes d'interception, linéaire, quadratique et d'interaction du modèle sont calculés à l'aide de la technique des moyennes carrées et sont présentés dans le tableau (5.6). Il est démontré que les paramètres linéaires : concentration d'éthanol (X_1), temps d'irradiation (X_2), puissance (X_3), rapport (solvant liquide /solide) (X_4) sont très significatifs tableau(5.6).

Prob > F (<0,00 01* ;0,0008* ;0,0233 ;* 0,0003*) ainsi que les termes quadratiques(X_1^2) de la variable :concentration de l'éthanol ont les effets négatifs les plus significatifs au niveau P < 0,01 sur la récupération des CPT, alors que tous les paramètres d'interaction (X_1X_2 ; X_1X_3 ; X_1X_4 ; X_3X_4) sont significatifs également (p<0,01).

Les coefficients positifs et négatifs des facteurs montrent l'évolution de la réponse par rapport à ces variables.

L'équation prédictive finale (Eq 5.1) est obtenue comme suit :

$$\begin{aligned} R(CPT) = & 17,143 + 1,722X_1 + 1,329X_2 + 0,802X_3 + 1,472X_4 \\ & +1,412X_1X_2 + 1,553X_1X_3 + 0,809X_1X_4 \\ & +1,008X_3X_4 + 2,125X_1^2 \end{aligned} \quad (5.1)$$

L'analyse de la variance (ANOVA) des résultats expérimentaux présentée dans le tableau (5.6) montre que le modèle est significatif à une valeur F de 10,36. Le coefficient de détermination (R^2) est de 0,91, ce qui implique que les variations de 91% de l'échantillon pour l'efficacité de l'EAM des polyphenols de l'EP sont attribuées aux variables indépendantes, et seulement 9% des variations totales ne peuvent être expliquées par le modèle. Cependant, une valeur élevée de R^2 n'indique pas toujours que la modèle de régression est solide (Karazhiyan et al., 2011).

Pour un bon modèle statistique, le coefficient de détermination R_{adj}^2 doit être proche de R^2 (Tabaraki et Nateghi, 2011).

Dans notre modèle, R_{adj}^2 est de 0,81, presque proche de R^2 (0,91). Le coefficient de régression des données expérimentales et le coefficient ajusté sont raisonnablement proches de 1, ce qui indique un degré élevé de corrélation entre les valeurs observées et prévues (Annexe F).

En même temps, une faible valeur de coefficient de variation (CV) indique une valeur élevée de degré de précision et une grande fiabilité des valeurs expérimentales.

Comme il est indiqué dans le tableau (5.6), le "Lack of Fit F-value"(manque d'ajustement) de 1,23 implique qu'il n'est pas significatif par rapport à l'erreur pure (p>0,05) et la valeur du CV qui est de l'ordre de 6,04%, d'où la validité du modèle.

Selon (Chen et al., 2012), un CV supérieur à 10 % indique que la variation de la valeur moyenne est élevée et ne permet pas d'élaborer de façon satisfaisante un modèle de réponse adéquate (signal adéquat pour le modèle). Les résultats indiquent que le modèle peut bien fonctionner pour la prédiction de l'extrait de pulpe (EP).

Généralement en ANOVA, grande valeur F et petite valeur P montrent un effet plus significatif des paramètres sur la réponse (Ghorbannezhad et al., 2016).

TABLE 5.6 – Coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et analyse de l'équation de la variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux de l'extrait de pulpe (EP).

Paramètres	Coefficients estimés	Erreur standard	DF	Somme des carrés	Valeur-F	Prob > F
Model Intercept	17,1430	0,4187	14	263,54	10,3609	<0.00 01
B0	17,1430	0,4187			10,3609	<0.00 01
Linéaire						
X ₁	-1,7722	0,3177	1	56,53388	31,1132	<0.00 01*
X ₂	1,3290	0,3177	1	31,7953	17,4984	0,0008*
X ₃	0,8023	0,3177	1	11,5867	6,3767	0,0233*
X ₄	-1,4725	0,3177	1	39,0329	21,4816	0,0003*
Quadratique						
X ₁ ²	-2,1256	0,8374	1	11,7072	6,4430	0,0227
X ₂ ²	0,7701	0,8374	1	1,5366	0,8457	0,3723
X ₃ ²	0, 5710	0,8374	1	0,8449	0,4650	0,5057
X ₄ ²	-0,8270	0,8374	1	1,7723	0,9754	0,3390
Interaction						
X ₁ X ₂	1,2142	0,3369	1	23,5921	12,8938	0,0026
X ₁ X ₃	0,8690	0,3369	1	38, 6383	21,2644	0,003
X ₁ X ₄	1,5539	0,3369	1	12,08363	6,6502	0,0210
X ₃ X ₄	1,0088	0,3369	1	16,2845	8,9621	0,0091
Manque d'ajustement			10		1,2386	0,4302
Erreur pure			5			
Résiduel			15			
R ²	0,910					
R ² ajusté	0,818					
C.V. %**	0,604					
RMSE*	1,384					
Cor Total				29		290,822

5.2.2.1.2 B-Model de régression de la feuille : Les données expérimentales sont ajustées à la régression polynomiale et le modèle prédictif adressé aux données peut être exprimé, en termes de valeurs codées, en négligeant les termes non significatifs ($p > 0,05$), dans l'équation (5.2) :

$$R(CPT) = 31,29 + 1,63X_3 + 1,36X_4 + 1,72X_1X_2 + 4,66X_1X_3 + 2,51X_2X_4 + 1,97X_3X_4 + 4,35X_2^2 \quad (5.2)$$

Les rendements des CPT obtenus dans les essais du CCD sont présentés dans le tableau (Annexe F). Les coefficients de régression et l'analyse du modèle de régression sont résumés dans le tableau (5.7) avec indication que le modèle représenté adéquatement la relation réelle entre les paramètres choisis (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005).

L'équation (5.2) montre que les termes linéaires : la concentration (X_1) et le temps d'irradiation (X_2) n'influencent pas le rendement d'extraction. Cependant, leur effet apparaît lorsque ces facteurs interfèrent avec la variable temps (X_1X_2), puissance (X_1X_3) et ratio (X_2X_4).

Il est également constaté que les termes quadratiques (X_2^2) de la variable temps sont les effets négatifs les plus importants sur la récupération des CPT avec $P = 0,0178^*$ hautement significatifs (Tab 5.7), ce qui est en accord avec les essais préliminaires.

Selon une étude documentée sur l'EAM à l'échelle analytique, (Ballard et al., 2010) constatent que les interactions entre les puissances micro-ondes, le temps d'extraction et la proportion d'éthanol ne sont pas significatives, mais la tendance s'est inversée avec l'effet linéaire et quadratique. L'interaction entre la concentration d'éthanol et la puissance (X_1X_3) est très significative statistiquement ($P = 0,0001^*$) ainsi que celle de la puissance et le ratio (X_3X_4).

L'analyse de variance (ANOVA) du rendement d'extraction des composés phénoliques montre que les données expérimentales ont un coefficient de détermination $R^2 = 0,8742$, $R_{adj}^2 = 0,76$, et un coefficient de variation (CV%) de 5,98% (Tab 5.7). R^2 étant une valeur indicatrice du degré d'influence des facteurs sur la réponse, un manque d'ajustement de 10,53 non significatif ($P > 0,05$), et la valeur-F de 7,44 renforcent la fiabilité du modèle. Le coefficient de détermination (R^2) est de 0,87, implique que les variations d'échantillon de 87,42% pour l'efficacité de l'EAM des polyphénols de l'extrait de feuilles (EF) sont attribuées aux variables indépendantes, et seulement 12,58% \cong 13% des variations totales ne peuvent être expliquées par le modèle.

Cependant, dans un bon modèle statistique, R_{adj}^2 doit être comparable à R^2 (Tabaraki et Nateghi, 2011). Comme le montre le tableau (5.7), la différence entre les valeurs de R^2 et R_{adj}^2 pour le modèle n'est pas assez importante

TABLE 5.7 – Coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de l'équation de la variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux de l'extrait de feuille (EF).

Paramètres	Coefficients estimés	Erreur standard	DF	Somme des carrés	Valeur-F	Prob > F
Model Intercepta	31,2950	0,8184	14	723,8371	7,4473	<0.0001
B0	31,2950	0,8184		723,8371	7,4473	<0.0001
Linéaire						
X ₁	-0,8702	0,6210	1	13,6314	1,9634	0,1815
X ₂	-0,0242	0,6210	1	0,01113	0,0016	0,9686
X ₃	-1,6390	0,6210	1	48,3554	6,9652	0,0186
X ₄	-1,3609	0,6210	1	33,3404	4,8024	0,0446
Quadratique						
X ₁ ²	3,8960	1,6369	1	21,7296	3,1300	0,0972
X ₂ ²	-4,3539	1,6369	1	49,1164	7,0748	0,0178
X ₃ ²	-0,8539	1,6369	1	1,8895	0,2227	0,6095
X ₄ ²	1,3960	1,6369	1	5,0492	0,7273	0,4072
Interaction						
X ₁ X ₂	1,7238	0,8587	1	47,5439	6,8384	0,0186
X ₁ X ₃	-4,6685	0,8587	1	348,7322	50,2319	<0.0001
X ₂ X ₄	-2,5154	0,8587	1	101,2413	9,0100	0,0089
X ₃ X ₄	-1,9772	0,8587	1	62,5516	14,5830	0,0017
Manque d'ajustement			10	99,4190	10,5371	0,0090
Erreur pure			5	4,7175		
Résiduel			15	104,1366		
R ²	0,874					
R ² ajusté	0,756					
C.V.%**	0,598					
RMSE*	2,6349					
Cor Total			29	829,973		

5.2.2.1.3 C-Modèle de régression du noyau : L'approche de régression multiple par la méthode des moyennes carrées est utilisée pour étudier la relation entre la variable indépendante et la réponse. Le modèle mathématique final est exprimé par l'équation (Eq 5.3) et qui représente le rendement des CPT(R) de l'extrait du noyau en fonction de (X_1) concentration d'éthanol, (X_2) temps d'irradiation, (X_3) puissance des micro-ondes et (X_4) le ratio (Liquide/Solide).

$$R(CPT) = 7,07 + 0,23X_1X_3 + 0,40X_1X_4 + 0,55X_3X_4 + 0,82X_2^2 + 1,49X_3^2 \quad (5.3)$$

Les valeurs P de 0,05 et 0,01 sont utilisées comme outil pour vérifier la signification ou la très haute signification de chaque coefficient, ce qui peut à son tour indiquer le modèle des effets de synergie entre les variables indépendantes.

Le tableau (5.8) indique la signification de chaque coefficient mesuré à l'aide de la valeur p et F. Une valeur p plus faible et une valeur F plus grande signifient que les variables correspondantes sont plus significatives. La valeur p du modèle est inférieure à 0,0001, ce qui indique que le modèle est significatif et qu'il peut être utilisé pour optimiser les variables d'extraction.

TABLE 5.8 – Coefficients de régression estimés pour le modèle polynomial quadratique et l'analyse de l'équation de la variance (ANOVA) pour les résultats expérimentaux de l'EN.

Paramètres	Coefficients estimés	Erreur standard	DF	Somme des carrés	Valeur-F	Prob > F
Model Intercept	7,5934	0,1984	14	58,6769	10,2702	<0.0001
B0	7,5934	0,1984		58,6769	10,2702	<0.0001
Linéaire						
X_1	-0,1263	0,15057	1	0,2872	0,7039	0,4146
X_2	0,4386	0,15057	1	3,4633	8,4868	0,0107
X_3	0,4397	0,15057	1	3,4808	8,5298	0,0105
X_4	-0,0085	0,15057	1	0,0013	0,0032	0,9553
Quadratique						
X_1^2	-0,4545	0,3968	1	0,5353	1,3118	0,2700
X_2^2	1,4135	0,3968	1	5,1766	12,6853	0,002
X_3^2	-1,5198	0,3968	1	5,9846	14,6653	0,0016
X_4^2	-0,0753	0,3968	1	0,0147	0,0361	0,8519
Interaction						
X_1X_2	0,7207	0,1597	1	8,3112	20,3664	0,0004
X_1X_3	-0,9623	0,1597	1	14,8192	36,3143	<0.0001
X_2X_2	1,4153	0,3968	1	5,1766	12,6853	0,0028
X_2X_3	0,7358	0,1597	1	8,6640	21,2310	0,0003
X_2X_4	-0,4989	0,1597		3,9794	9,7516	0,0070
X_3X_3	-1,5198	0,1597		5,9846	14,6653	0,0016
Manque d'ajustement			10	58, 6769	2,0177	0,2277
Erreur pure			5	6,1212		
Résiduel			15	64,7982		
R^2	0,89					
R^2 ajusté	0,817					
C.V. %**	0,638					
RMSE*	0,3993					
Cor Total			29	64,7892		

Tel qu'indiqué dans le tableau (5.8), les paramètres linéaires (X_1 ; X_2 ; X_3 ; X_4) n'influencent pas la récupération des CPT ($P > 0,05$) mais en tant que substances quadratiques, (X_2^2 ; X_3^2); et effets interactifs (X_1X_3 ; X_1X_4 ; X_3X_4), la réponse sur les CPT est significative. P-Value de lack of-fit est insignifiant ($P > 0,05$ et le coefficient de variation (CV) de 4,03% supérieur à 10 %), ce qui confirme l'exactitude du modèle. Le coefficient de détermination (R^2) est de 0,89, implique que les variations d'échantillon de 89 % pour l'efficacité de l'EAM des polyphenols de l'extrait du noyau (EN) sont attribuées aux variables indépendantes, et seulement 11% des variations totales ne peuvent être expliquées par le modèle.

5.2.2.2 Analyse des surfaces de réponse

La combinaison des paramètres optimaux permet de prédire et de vérifier l'amélioration de l'efficacité des caractéristiques de performance avec les paramètres optimaux sélectionnés. Pour étudier les effets interactifs des paramètres opérationnels et déterminer les niveaux optimaux de variables, les profils de surface tridimensionnelle sont tracés selon les équations (Eqs : 5.1 ; 5.2 ; 5.3). Les effets des variables indépendantes et de leurs interactions mutuelles sur le rendement des CPT antioxydants peuvent être visualisés sur les diagrammes de surface des réponses illustrées (figures : 27 ; 28 ; 29). Les graphiques montrent clairement les effets de certains paramètres tels que le solvant (l'éthanol), puissance et temps d'irradiation sur le rendement des CPT, comme l'observent également d'autres auteurs qui étudient et optimisent le rendement par RSM d'antioxydants phénoliques provenant de différentes matières végétales (Rodrigues et al., 2008 ; Morelli et Prado, 2012)

5.2.2.2.1 A-Pulpe : Sur la base des coefficients de régression, nous pouvons constater selon l'équation (5.1) que les termes linéaires : pourcentage d'éthanol (X_1), le temps (X_2), puissance (X_3) et ratio (X_4) influencent le rendement d'extraction. Cependant, le profil de surface de réponse montre une forte interaction entre (X_1X_2); (X_1X_3); (X_1X_4); (X_3X_4).

Le taux de récupération des CPT de l'EP augmente avec l'augmentation de la concentration d'éthanol de 20 à 40% et une puissance d'extraction de 300 à 500 W et à presque atteint un pic à 40% de la concentration d'éthanol testée. Au-delà, la concentration supplémentaire d'éthanol et la puissance d'extraction ont des effets négatifs. Ceci concorde avec les résultats de la littérature (Spigno et al., 2007), qui lient l'élévation de la teneur en CPT à l'augmentation de la concentration d'éthanol jusqu'à 50 % (v/v) et ensuite diminue pour les concentrations plus élevées. Contrairement, à (Jerman et al., 2010) qui récupèrent le maximum des CPT à un faible pourcentage de méthanol (25%) pour la pulpe épuisée. Cette différence de rendement est probablement liée au type de solvant utilisé.

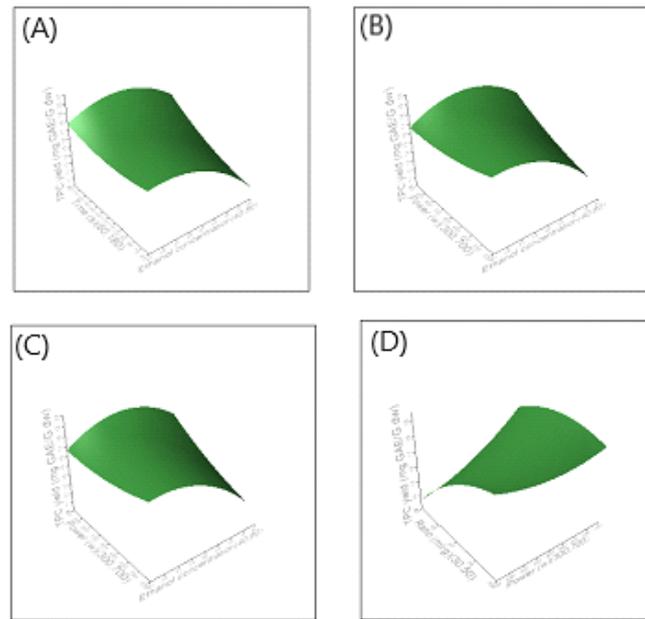


FIGURE 27 – Analyse de la surface de réponse pour le rendement phénolique total (CPT) de l'extrait de pulpe en fonction des interactions.

(A) : pourcentage d'éthanol et temps; (B) : pourcentage d'éthanol et puissance; (C) : pourcentage d'éthanol et ratio; (D) : puissance et ratio.

Nous pouvons observer à partir de la figure (27 A) que le rendement en polyphenols a augmenté avec l'augmentation du temps d'irradiation jusqu'à 3 min puis diminue avec un temps plus long. Ce résultat est en accord avec ceux de (Hiranvarachat et al., 2013; Hiranvarachat et Devahastin, 2014), qui obtiennent une récupération plus importante des caroténoïdes à partir de la pelure des carottes (co-produit) à 3,5 min par l'EAM. Cependant, pour les temps courts, le solvant ne peut pas être suffisamment chauffé et cela peut entraîner un rendement incomplet en caroténoïdes. Au-delà de 3,9 min la stabilité des caroténoïdes peut être affectée et leur récupération peut être diminuée (Tsiaka et al., 2015).

Le graphique (27 B) montre que le maximum des CPT est atteint avec une puissance opérationnelle modérée de 300W pour l'EP. Un chauffage généré par micro-ondes augmente la température du solvant au-delà de son point d'ébullition en quelques minutes, améliorant ainsi l'efficacité de l'extraction et donnant de meilleurs rendements (Kyriakopoulou et al., 2015). Néanmoins, pour la valeur de puissance de l'EAM moyenne, la récupération des CPT est importante car les puissances élevées et extrêmes conduisent à réduire la teneur des substances bioactives thermosensibles par l'augmentation de l'effet de l'énergie micro-onde dans le milieu d'extraction par la conduction ionique et la rotation dipolaire qui se traduisent par l'élévation de la température du milieu (dégradation thermique) ou par dégradation oxydative dans l'extrait (Shao et al., 2011; Hiranvarachat et al., 2013).

Contrairement aux études antérieures qui montrent que la puissance a un effet non significatif

Le graphique (27 C) illustre l'effet interactif du pourcentage d'éthanol et rapport liquide/solide. Le (D) montre l'effet interactif entre la puissance micro-ondes (X_3) et le ratio (X_4) dont l'influence est significative sur le rapport acquis des CPT ($p < 0,01$). Les effets quadratiques de ces paramètres ($X_3 ; X_4$) sont insignifiants ($p > 0,05$). Les graphiques suggèrent que l'extraction a un effet quadratique et linéaire ($p < 0,01$) sur le rendement des CPT tableau (5.8).

5.2.2.2.2 B-Feuille : Nous pouvons observer à partir de la figure (28 E) que le rendement en polyphénols augmente avec l'augmentation du temps d'irradiation jusqu'à 58 min puis diminue avec un temps plus long. Au-delà de 58min, la stabilité des antioxydants peut être affectée et leur récupération peut être diminuée (Tsiaka et al., 2015).

Les effets linéaires (X_3) et (X_4) sont significatifs statistiquement ainsi que leurs effets interactifs (X_3X_4) (H). De même, l'interaction de ces variables (X_1X_2) (E); (X_1X_3) (F); (X_2X_4) (G) impacte fortement le rendement des CPT d'où une haute signification ($p < 0,01$). Le paramètre linéaire (X_2) n'influence pas la récupération des CPT ($P > 0,05$) mais en tant que substance quadratique, (X_2^2) et effets interactifs (X_2X_4), la réponse sur les CPT est positive.

Une augmentation de la teneur en CPT est observée avec l'augmentation de la concentration de solvant de 20-60 % et un temps d'irradiation de 45-75 min (X_1X_2) (E), mais la tendance est renversée lorsque le rapport atteint une certaine valeur. En effet, à un temps de 90-120 min et un pourcentage solvant de 80-100%, une diminution remarquable de la quantité de composé extrait est constatée, ce qui est démontré dans l'étude préliminaire lors de l'étude de la cinétique d'extraction sous l'effet d'irradiation microonde. Une longue exposition aux radiations micro-ondes entraîne une dégradation de certains constituants thermolabiles (Kormin et al., 2010).

Une irradiation plus longue et une puissance micro-ondes plus élevée permettent d'obtenir une température continuellement plus élevée dans le système d'extraction. Cette combinaison de température et de temps peut augmenter la solubilité des composés phénoliques et diminuer la viscosité du solvant d'extraction, accélérant ainsi la libération et la dissolution de ces composés. Ainsi, la solubilité des polyphénols est étroitement liée au degré de polymérisation en raison de l'augmentation du nombre de groupement hydroxyle (Savova et al., 2007).

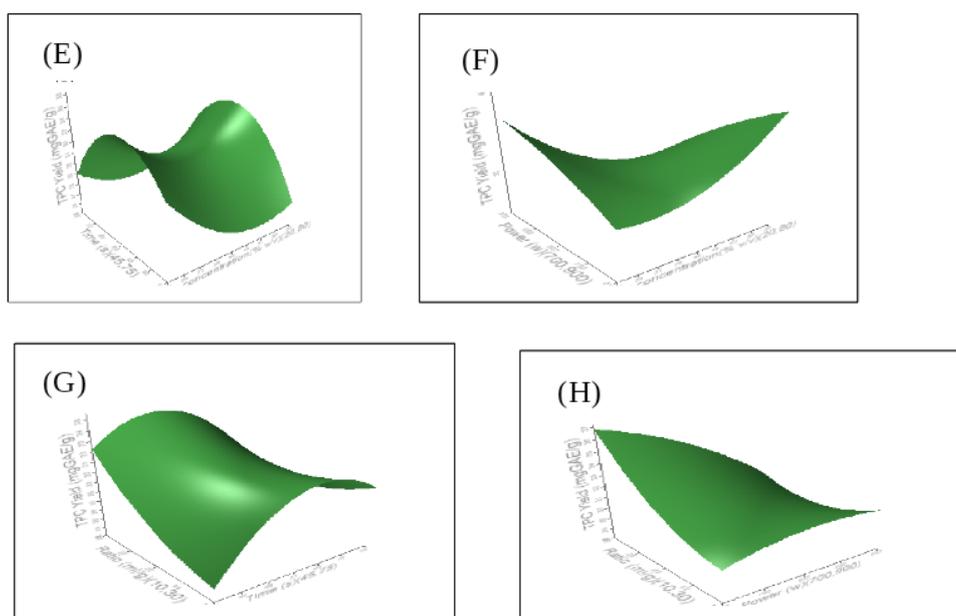


FIGURE 28 – Analyse de la surface de réponse pour le rendement phénolique total à partir de l'extrait de feuille d'olive en fonction des interactions
 E : pourcentage d'éthanol et temps; F : pourcentage d'éthanol et puissance; G : temps et ratio; H : puissance et ratio.

5.2.2.2.3 C-Noyau : À partir de l'analyse ANOVA, la surface de réponse (figure 29), représentant les différents effets de manière standardisée, est configurée afin de déterminer quels sont les facteurs influençant significativement, par ordre d'importance pour chaque variable (effets linéaires; interaction entre facteurs; effets quadratiques).

Il peut être remarqué selon la figure (29 K), une forte interaction par ordre d'importance entre les facteurs (ratio et puissance avec $p < 0,0001$), suivi d'effet entre : pourcentage d'éthanol (J) et ratio $p = 0,009$ et enfin pourcentage d'éthanol et puissance (I) avec une probabilité $p = 0,0330$.

Une augmentation de la teneur en CPT est observée avec l'augmentation de la concentration de solvant de 20 à 80% et le ratio liquide/solide environ de 20 à 40 ml/g. La stabilité de la teneur en CPT est observée dans tout le domaine de la variation du facteur ratio, lorsqu'il atteint une certaine valeur (40 ml/g). D'après (Prasad et al., 2011), l'extraction des composés phénoliques dépend en grande partie de la polarité du solvant et des composés. Un solvant pur peut ne pas être efficace pour l'isolement des composés bioactifs. Par conséquent, une combinaison alcool-eau est plus efficace.

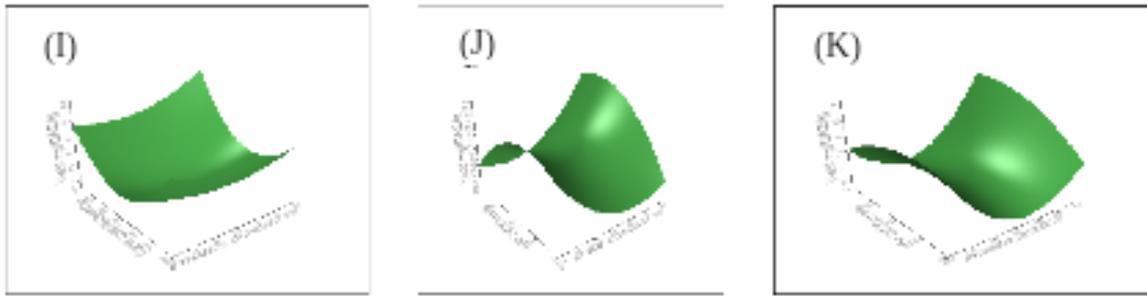


FIGURE 29 – Analyse de la surface de réponse pour le rendement phénolique total à partir de l'extrait du noyau d'olive en fonction des interactions.
 (I) : pourcentage d'éthanol et puissance; (J) pourcentage d'éthanol et ratio; (K) : ratio et puissance.

5.2.2.3 Validation du modèle

La précision et la pertinence des équations du modèle pour l'EAM peuvent être validées par la comparaison des valeurs expérimentales et prédites du rendement d'extraction dans les conditions optimisées. La figure (30 : A ; B ; C) indique les conditions optimisées de l'extraction des CPT pour les trois extraits (EF ; EP ; EN) qui sont : le pourcentage d'éthanol (v/v), le temps d'irradiation, la puissance MW et le rapport solvant/solide de ml/g.

EF : % (v/v) = 60 ; Tps= 58min ; P=700w ; R =1/ 30 ml/g.

EP : % (v/v) = 45, 97 ; Tps= 3min ; P= 300 ; R =1/30 ml/g.

EN : % (v/v) = 80 ; Tps= 87 min ; P= 900 ; R =1/40 ml/g

À l'application de ces conditions, les rendements prévus des polyphenols totaux sont de 44,001 ; 22,302 ; 9,892 mgEAG/gms pour la feuille, pulpe et noyau d'olivier, respectivement. Cependant, les rendements expérimentaux obtenus sont respectivement de 41,83 ; 25,87 ; 8,07mgEAG/gms. La différence n'est pas prononcée entre les rendements des polyphenols prévus et expérimentaux, ce qui confirme la validation et l'adéquation des modèles utilisés. Un nouvel ensemble d'expériences est conçu et réalisé avec les conditions optimales sélectionnées de l'étude pour prédire et vérifier l'exactitude des modèles mathématiques. Les résultats sont présentés dans la figure (30), la forte corrélation entre les valeurs réelles (expérimentales) et les valeurs prédites confirment l'efficacité des modèles de surface d'intervention pour refléter les résultats prévus de l'optimisation.

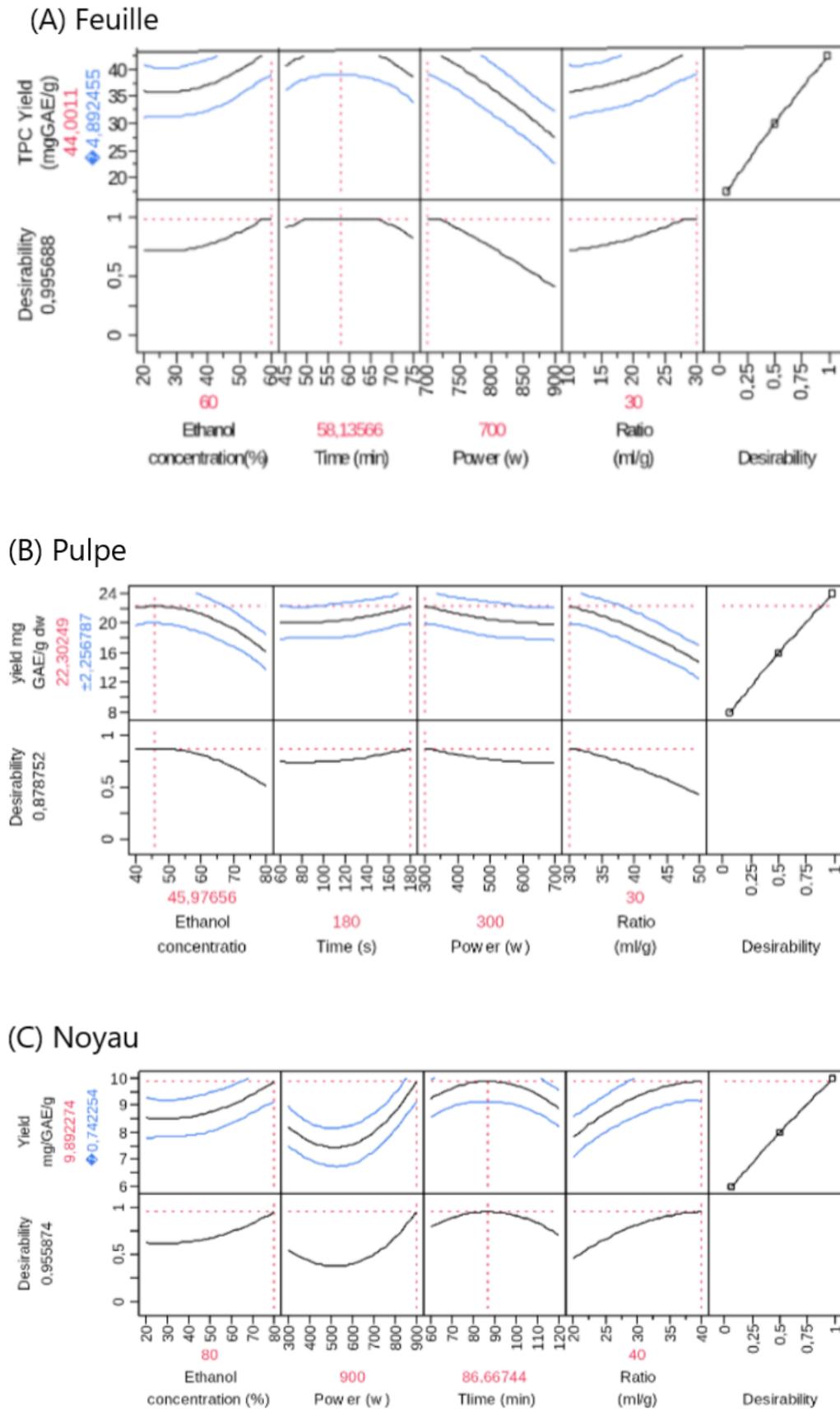


FIGURE 30 – Les conditions optimales et les rendements CPT prédits de l'EAM de la Feuille(A) ; Pulpe (B) ;Noyau (C).

5.2.3 Le rendement en composés phénoliques totaux

Le choix d'une méthode d'extraction dépend principalement des avantages et des inconvénients des procédés tels que le rendement d'extraction, le coût de production, le respect de l'environnement et la sécurité (Li et al., 2010). La concentration des CPT des extraits de (feuille, pulpe et noyau) est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique (AG) comme standard. Les teneurs sont : $44,001 \pm 4,892$; $22,3024 \pm 2,2567$ et $9,892 \pm 0,742$ mg GAE/g de MS, respectivement (figure 31). Cependant, cette méthode n'est pas très spécifique car elle ne donne pas d'indication sur la nature des composés phénoliques présents dans l'extrait .

En outre, certaines substances, telles que la vit C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés phénoliques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosphomolybdique, interférer et conduire à une surestimation de la teneur en CP (Obied et al., 2005). En fait cette méthode évalue la qualité réductrice d'un ensemble de composés en plus des CP. De plus, les résultats de Folin sont influencés par l'état oxydatif de l'acide folique par conséquent, des valeurs plus faibles peuvent suggérer qu'un échauffement intense a causé la dégradation de l'échantillon en composés bioactifs.

Les résultats de cette étude montrent la richesse de la feuille de l'*Olea europea* L. en certains principes bioactifs par rapport aux grignons (pulpe et noyau) et l'huile (Caponio et al., 2001 ; Lalas et al., 2011), également en composés phénoliques majeurs (Benavente Garcia et al., 2000 ; Japon-Lujan et al., 2006 ; Altiok et al., 2008).

En comparaison avec la littérature, nos résultats convergent avec les suggestions de ces auteurs, vu les taux en CPT enregistrés pour les trois matrices (feuille, pulpe et noyau). Dans cette étude, l'extrait de feuille donne un rendement de 44,001 mg/g ms ce qui coïncide avec des taux de (44,3 mg/gms et $42,447 \pm 0,17$ mg EAT/g) enregistrés par (Rafiee et al., 2012), de deux variétés respectivement. Certaines sources de référence comme (Mylonaki et al., 2008) assurent que la teneur en matière extraite peut dépasser les 25% de matière sèche.

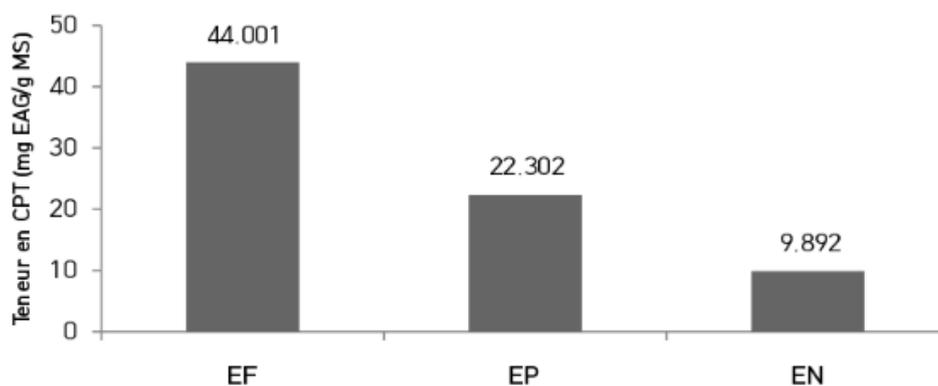


FIGURE 31 – Rendements des CPT des extraits : EF (feuille) ; EP (pulpe) ; EN (noyau)

D'après (Altiok et al., 2008), la variation en tenures phénoliques est à l'origine de la variété et la zone d'étude. Brahimi et al. (2013), réalisent des dosages quantitatifs de l'extrait méthanolique des feuilles de l'olivier de deux variétés : Chemleli et Nebjmel en Tunisie et ils montrent que la teneur en polyphénols des feuilles de Chemleli est de 219,85 en octobre à 464,27 mg/100 g en janvier et est plus riche que la variété de Nebjmel (197,60 octobre à 270,53 mg/100g en janvier). Ces résultats sont inférieurs à ceux de notre étude. Cette variation de la teneur en polyphénols semble être liée à la période de prélèvement, aux conditions climatiques (température, exposition au soleil, la sécheresse et la salinité...etc.), au cultivar, degré de maturation (Aouidi et al., 2012), à l'état physiologique et l'âge de la plante (Deleonardis et al., 2008), au régime d'irrigation et facteur génétique (Morelló et al., 2005). Ben Salah et al. (2012) trouvent des teneurs en CP (73,05 à 144,19 mgEAG /g MS), dans les feuilles supérieures à nos valeurs. La variété Chemleli a une teneur de (99,71 mgEAG /g MS). Vu que le même solvant (l'éthanol) est utilisé dans notre étude, cette variabilité en teneurs peut être expliquée par la méthode d'extraction, le pourcentage du solvant.

En utilisant la même méthode d'extraction EAM, (Taamalli et al.,2012), notent un taux élevé en CP avec 36 composés identifiés sous les conditions suivantes : méthanol/eau à 80% pendant 6 min. Quant à (japón-Luján et al., 2006), l'optimisation maximale est obtenue avec de l'éthanol à 80% durant une période de 8 min et une puissance de microonde de 200w.

De même, (Xie et al., 2015) obtiennent par l'extraction ultrason une teneur de 245,2 mg EAG/gms à partir de l'extrait de feuille d'olivier sous les conditions suivantes : 75% d'éthanol, température 50 °C, puissance ultrasonique de 600 W, temps d'extraction de 3 min et rapport liquide/solide de 30 :1 (v/w), quant à (Goldschmidt Lins et al., 2018), enregistrent un taux élevé de 131.7 ± 9.4 mg EAG/gms avec le mélange méthanol/eau (80 :20, v/v en utilisant l'extracteur Soxhlet. Comparativement à nos résultats avec ces conditions (60% éthanol ; 700W ; 58,13 min ; ratio 30), la teneur en CP est inférieure à celle trouvée par ces auteurs. Cette différence de rendement peut être due probablement à la différence de polarité entre les solvants utilisés (Naczki et Shahid, 2006). La polarité du solvant détermine la quantité, la qualité des composés phénoliques extraits et de la classe des phénols dans le matériel végétal.

Des études antérieures rapportent que les extraits de tourteaux d'olives ont une teneur élevée en composés phénoliques qui varie de 2,4 à 46,0 mg/g de poids sec (Obied et al., 2005 ; Aludatt et al., 2010). Pulpe, sa teneur totale en composés phénoliques (CPT) dans un état frais est de 4226.23 mg GA/ 100g, ce qui est supérieure aux valeurs rapportées par les travaux réalisés sur les résidus de la pulpe (Cabral de Oliveira et al., 2009 ; Aludatt et al., 2010). L'influence de la température de séchage sur les CPT des déchets d'olives déshydratés peut être observée.

Une étude réalisée sur les variétés de l'olivier de la Grèce et Portugal montre que les teneurs en polyphénols varient de 82- 171mg /100g de pulpe d'olives (Boskou et al., 2006), et de 165,76 mg/Kg de poids frais d'olives (Malheiro et al., 2013), respectivement. Comparativement à nos résultats qui marquent un taux élevé de 22,25mg/gEAG de MS dans la pulpe épuisée, (Nadour et al., 2012 ; Nadour, 2015) enregistrent des teneurs faibles en CPT de $1,633 \pm 0.16$ mg EAG /100 g et 16,43mg EAG/g de matière sèche, respectives dans les conditions suivantes (méthanol/eau 80 :20 (v/v) et un temps de 30 min à une température ambiante). Parallèlement, (Hajimahmoodi et al., 2008) enregistrent des teneurs respectives de 888 et 2,997 mg EAG/100 g. À noter que la teneur totale en CP de la pulpe d'olive varie selon les conditions et méthode d'extraction choisies (Lee et al., 2003), les paramètres agronomiques (cultivar, climat, techniques,...), et la maturation des fruits (Vinha et al., 2005 ; Gomez-rico et al., 2008). Selon (Sousa et al., 2008), le taux varie selon les solvants d'extraction utilisés. Il est de 3,48, 4,86, 5,90 et 15,48mg EAG/g en utilisant les solvants suivants respectivement : eau à température ambiante, le méthanol à ébullition, le méthanol à température ambiante et l'eau à ébullition. Par ailleurs, (Mcdonald et al., 2001), rapportent que la teneur totale en CP de la poudre d'olive varie entre 200 à 590 mg EAG/100g dans les différentes fractions chromatographiques. En outre, l'utilisation aqueuse du méthanol destiné à l'extraction présente une bonne sélectivité pour les composés phénoliques par rapport à d'autres composés hydrosolubles, principalement les sucres, dans le résidu solide du tourteau d'olive (Obied et al., 2005). Plusieurs études rapportent que les hauts rendements sont habituellement obtenus avec de l'éthanol et le méthanol et leurs mélanges avec l'eau. D'après, (Falleh et al., 2008 ; Chew et al., 2009), le méthanol est le solvant de choix pour l'extraction des CPT à partir des fruits, végétaux et huiles. Grâce à sa polarité et sa capacité à réduire l'activité des polyphénol-oxydases, ce solvant prouve son efficacité d'extraire les CP simples (Ryan et al., 2001 ; Abad-Garcia et al., 2007). Selon (Aouidi et al., 2012), les teneurs en phénols totaux varient de 28 à 59 mg/g de matière sèche selon l'organe concerné (feuilles, pulpes), aussi selon le degré de maturité et le solvant d'extraction utilisé (méthanol ou éthanol). 90% du contenu phénolique total est extrait sous forme de phénol libre en utilisant une combinaison d'extractions de méthanol à 23 et 60°C

Quant au noyau, avec les conditions optimisées par l'EAM (80%, puissance 900w, 86,66min et ratio 40ml/g) témoigne d'une quantité élevée de 9,892 mg EAG /g de matière sèche par rapport à celle obtenue par (Alu'datt et al., 2010), qui est de 4,37 mg/g à 70 °C avec du méthanol/eau pendant 1h et (Mojerlo et Elhamirad, 2018), qui trouvent 4,04 mg/g de CPT et 68,9% de (AA : Activité Antioxydante) sous les conditions optimales de l'EAU (Extraction Assistée par Ultrasons :température d'extraction de 56 °C, un temps d'extraction de 3 minutes, un temps d'utilisation de 0,6 s et un rapport solide sur solvant de 3,6%). Cette variabilité de rendement peut être liée à la méthode d'extraction utilisée.

Dans le cas d'EAU, la teneur est moindre, cette diminution peut être due à l'absence de temps suffisant pour faire éclater les bulles créées par les ondes ultrasonores (Yolmeh et Najafzadeh, 2014). Les résultats de cette étude, corroborent avec ceux établis par (Elbir et al., 2014) qui trouvent des teneurs en polyphénols respectives de 2,55 et 8,25mg EAG/g de poudre de noyaux de deux variétés différentes d'olives « Haouzia et Picholine». Des études antérieures montrent que les extraits de noyaux d'olives ont un contenu phénolique élevé qui varie de 2,4 à 46,0 mg/g de poids sec (Obieid et al., 2005; Aludatt et al., 2010). La quantité de (20 et 43 mg/g) incluse dans cette gamme de teneur est notée par (Les-Meesen et al., 2001) à partir de l'extrait du noyau. Plusieurs études confirment cette variation, par l'influence de la variété du fruit et la saison de récolte sur la teneur en polyphénols (Crisosto et al., 2010). La synthèse de ces différents résultats des teneurs en polyphénols présente une variation, due à l'influence de divers facteurs cités précédemment. En effet, l'importance de ces facteurs est démontrée par plusieurs auteurs (Chan et al., 2009; Uma et al., 2010).

Les résultats de la composition phytochimique des extraits de (feuille, pulpe et noyau) montrent une richesse en composés bioactifs dont les teneurs en flavonoïdes totaux sont de $18,771 \pm 0,252$; $3,173 \pm 0,092$; $0,222 \pm 0,004$ mg EQ/g de matière sèche et les tanins condensés avec des valeurs de $0,142 \pm 0,013$; $0,029 \pm 0,002$; $0,021 \pm 0,03$ mg EC/g de matière sèche, respectivement. Comparativement à nos résultats, (Goldschmidt Lins et al., 2018) trouvent une teneur en flavonoïdes de $19,4 \pm 1,3$ mg EQ/g MS, presque égale à la quantité de notre matrice qui détient une valeur de 18,771 mg EQ/g de matière sèche, et ils signalent que la teneur en flavonoïdes dans les feuilles de l'olivier varie selon la méthode d'extraction et la concentration du solvant utilisé. Des teneurs plus élevées sont enregistrées par (Sheikh et Gabr, 2016; Ben Salah et al., 2012) avec des valeurs respectives (25,51; 56,75 à 125,64 mg catéchine /g MS, la variété Chemlal a une teneur de 82,74 mg catéchine/g MS). Celik et al. (2015), également trouvent des teneurs supérieures ($262,2 \mu\text{g}/\text{mg}$) ainsi que (Lee et al., 2009), avec une valeur de 58 mg/g. Parallèlement, les résultats rapportés par (Brahmi, 2013) qui réalisent des dosages quantitatifs de l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier de deux variétés chemlali et nebjmel en Tunisie, montrent que les teneurs en flavonoïdes de la variété chemlali sont de 464,27; 377,06 mg CEQ/100g supérieures à celle de nebjmel de l'ordre de (147,96 mg CEQ/100g). Contrairement à (Abaza et al., 2011) qui notent des teneurs inférieures (3,42 mg/g MS). Quant au noyau, la teneur en flavonoïdes détient une valeur de $0,222 \pm 0,004$ mg EQ/g MS, proche de celles enregistrées par (Zaidi et al., 2009; Hannachi et al., 2013) avec des teneurs respectives de l'ordre de 0,24 et 0,17 mg EQ/g dans 1g de poudre de noyaux d'olives. La présence de telles substances est en effet rapportée par de nombreux auteurs, à propos de l'olive et du grignon d'olive (Nefzaoui, 1984; Ranalli et al., 2004).

Les résultats obtenus par le dosage des tanins notent des valeurs respectives de l'ordre de $0,142 \pm 0,013$; $0,029 \pm 0,002$; $0,021 \pm 0,03$ mgEC/g de MS pour feuille, pulpe et noyau), faibles par ceux notés par (Mebirouk-Boudechiche et al., 2014) qui trouvent que la teneur en tanins hydrolysables dans les feuilles de l'olivier est proche de 22.02mg/g, et pour (Dekdouk et al., 2015), la teneur est très élevée (86.86 mg/g). Contrairement à (Bouderba et al., 2012) qui signalent l'absence des tanins dans la feuille.

L'écart trouvé entre les résultats obtenus et les données des différents auteurs sont tout à fait justifiés. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes varient qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs : les conditions d'extraction ainsi que les origines des échantillons et la saison de collecte qui régissent ces variations (Ranalli et al., 2006). Les différences peuvent aussi être attribuées à l'origine géographique ou aux facteurs climatiques et environnementaux ... etc. (Ebrahimi et al., 2008). Le patrimoine génétique, et le stade de développement de la plante (Miliauskas et al., 2004) ; la méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux et flavonoïdes (Lee et al., 2003).

5.2.4 Activité antioxydante

De nombreuses études sont publiées sur les effets antioxydants des extraits de feuilles d'olivier et de tourteaux en raison de leur composition phénolique, notamment l'oleuropéine, la lutéoline et l'hydroxytyrosol (Marcos et al., 2014; Licciardello et al., 2015).

Selon (Almela et al., 2006; Obeid et al., 2007), la quantification et l'identification des polyphénols des extraits végétaux sont considérées comme la première étape vers l'évaluation de la capacité antioxydante. Cela est en accord avec (Suárez et al., 2009), qui enregistrent une quantité totale de dérivés de l'oleuropéine dans l'extrait de grignon solide importante (203 mg/g). Pour ces raisons, ce dernier peut également montrer une bonne activité, malgré sa faible concentration en hydroxytyrosol. De nombreuses analyses telles que, l'activité antioxydante totale, les tests DPPH et ABTS, la chélation des métaux, le potentiel réducteur, le système linoléate de -carotène et la méthode à l'acide linoléique sont les plus utilisées pour déterminer l'activité antioxydante des extraits végétaux (Ksouri et al., 2007).

5.2.4.1 Effet scavenger du radical DPPH

La méthode DPPH reçoit la plus grande attention en raison de sa rapidité, sensibilité, commodité et de sa reproductibilité (Nur Alam et al., 2013). Ce test est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008). Il permet d'estimer plus précisément la concentration du radical inhibé par les molécules actives (Maisuthisakul et al., 2007).

L'inhibition du DPPH radicalaire est évaluée par la méthode de (Brand-Williams et al., 1995). Les résultats montrent que l'effet scavenger des extraits de (feuille, pulpe et noyau) sur le radical DPPH est très significatif ($p < 0,05$, en les comparant avec les contrôles) et d'une manière dose-dépendante. La CI_{50} exprime la concentration capable de piéger 50% du radical DPPH dans le milieu réactionnel, paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Pour mieux caractériser le pouvoir anti radicalaire, le paramètre CI_{50} de toutes les substances testées est calculé et présenté dans le tableau (5.9).

TABLE 5.9 – Activités antioxydantes des différents extraits ethanologiques de feuille, pulpe et noyau de l'olivier et les standards CI_{50} (mg/ml)

Composés Standards	DPPH	ABTS	FRAP	PM	LL
AG	0,296±0,022		26,22±0,2	42,1 ±1,04	3,40 ±0,29
Q	0,10±0,013	0,12±0,034	27,90±1,52	44,79±2,49	2,59±0,20
OL	0,23±0,010	0,28±0,038	55,00±9,68	57,85±3,59	3,16 ±0,55
EF	0,172±0,019	0,312±0,01	72,55±10,85	96,97±1,33	0,08±0,02
EP	0,51±0,055	0,54±0,05	26,81±1,81	84,54=7,12	0,60±0,01
EN	0,757±0,009	1,792±0,261	239,53±50,96	194,71±6,67	1,56±1,97

La détermination de la valeur absolue de la capacité antioxydante des extraits est difficile parce qu'elle dépend de la concentration du radical, de sa dégradation durant l'analyse et la possibilité d'interférence avec d'autres composants du milieu. Pour ces raisons, CI_{50} est calculé, une mesure quantitative directe de l'activité anti-oxydante, un antioxydant est plus efficace lorsqu'il présente une faible valeur de la CI_{50} (Brand-Williams et al.,1995 ; Atoui et al., 2005 ;Hebi et Eddouks.,2016).

D'après les résultats illustrés dans le tableau (5.9),que ce soit pour le radical DPPH ou ABTS*, les CI_{50} obtenues pour les standards sont largement inférieures à celles des extraits et donc une activité antioxydante très élevée ($p < 0,05$), à l'exception de l'EF qui présente une activité presque similaire, à celle de la QE et supérieure légèrement à celle de l'OLE et de l'AG.L'effet inhibiteur des deux extraits testés (EP ; EN) est moins important que l'effet inhibiteur puissant des standards, cela peut être dû essentiellement à la pureté de ces derniers. Des résultats similaires rapportés par d'autres auteurs (Kekuda et al., 2010 ;Priya et Aparna, 2012 ; Gautham et Onkarappa, 2013). La richesse de l'EF en composés bioactifs de différentes classes phénoliques, peut être à l'origine de cette puissante activité qui est proche de celle du standard (QE).

La CI_{50} est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante, ce qui permet de mettre en relief l'activité plus importante de la QE par rapport aux standards (OLE ; AG) et aux extraits de (pulpe et noyau). Ainsi les profils d'activité anti-radicalaire obtenus (figure 32) notent que la QE et l'OLE avec des CI_{50} de l'ordre de (0,102±0,0130 ; 0,230±0,010 mg/ml) détiennent l'activité antioxydante la plus efficace suivis de l'AG avec une concentration inhibitrice à 50% de 0,296±0,02 mg/ml.

La neutralisation des radicaux libres s'accroît en augmentant la concentration des CP. La quercétine (QE) montre globalement la plus haute activité qui peut s'expliquer par le fait que son cycle aromatique porte trois groupements hydroxyles, l'activité anti-oxydante augmentant avec le degré d'hydroxylation (Bukhari et al.,2009 ; Hayez et al.,2011).

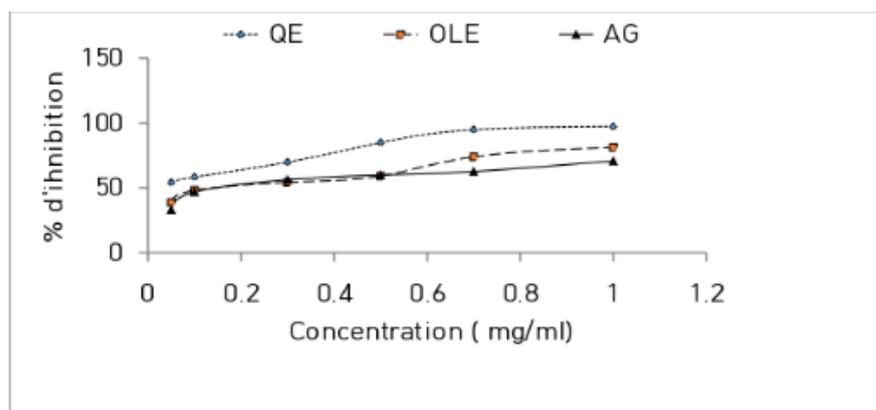


FIGURE 32 – CI_{50} des composés phénoliques synthétiques (*Oleuropéine*, *Quercétine* et *Acide gallique*).

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$) qui représente l'aspect significatif ($p < 0.05$).

L'extrait de feuille (EF) peut posséder une très forte capacité de piégeage des radicaux DPPH à des concentrations relativement faibles. Cependant, sa capacité antioxydante est proche de celle de la QE, mais significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle des extraits de pulpe et noyau (EP ;EN). Étant donné que l'EF possède une teneur en composés phénoliques supérieure à celle de l'EP et l'EN, il montre une capacité de piégeage radicalaire de DPPH plus forte (Barhé et Tchouya, 2015). Cette différence des trois extraits peut être associée à des flavonoïdes et le contenu phénolique (Nabavi et al., 2013).

L'activité antioxydante ne peut être attribuée seulement aux polyphénols mais à d'autres composés présents (tanins, saponines, phénanthrènes) dont leur teneur et leur activité antioxydante au niveau des végétaux est non négligeable (Mota et al., 1985). Une étude réalisée par (Abaza, et al., 2011) montre la relation entre des niveaux élevés des flavonoïdes et l'activité antioxydante importante des extraits de feuilles d'olivier .En outre, il existe probablement des interactions synergiques entre les composés phénoliques d'EF qui contribuent à son excellente activité antioxydante. Les composés phénoliques de l'EF sont les antioxydants dominants qui piègent les radicaux libres, et les espèces réactives de l'oxygène sont abondantes et largement réparties dans le règne végétal (Xie et al., 2015).

L'EF peut donc être utilisé comme antioxydant naturel en raison de sa teneur élevée en composés bio phénoliques donneurs d'hydrogène (Chung et al., 2006).

Il est ainsi possible de classer les CI_{50} de nos extraits et des standards pour les deux tests DPPH et ABTS*comme suit : $CI_{50}QE \cong CI_{50} EF > CI_{50} OLE > CI_{50} AG > CI_{50} EP > CI_{50} EN$.

Les résultats obtenus avec ces extraits montrent que la quantité et la qualité des CPT est corrélée fortement avec la capacité antioxydante d'où les valeurs attribuées aux coefficients de détermination sont de l'ordre de ($R^2= 0,794$) pour la feuille, ($R^2=0,95$) pour la pulpe et ($R^2=0,80$) pour le noyau.

Cependant, (Loziene et al., 2007; Miniotti et Georgiou, 2010) démontrent que cette corrélation est significative avec la capacité antioxydante évaluée généralement par le test de DPPH ($r = 0,89$) et le test de l'ABTS ($r = 0,69$). Plusieurs auteurs montrent la corrélation entre ces deux facteurs (Moyer et al., 2002; Wang et al., 2009). De plus, (Rajeshwar et al., 2005) rapportent que les composés phénoliques peuvent contribuer directement à l'activité antioxydative. Les travaux de (Sheikh et Gabr, 2016) confirment la corrélation entre la présence d'Oleuropéine et l'activité antioxydante exprimée en CE50 pour les deux organes d'études, feuille et pulpe.

L'acide gallique (AG) est utilisé comme référence, en raison de son utilisation comme modèle dans les tests antioxydants. Plusieurs études montrent une activité anti radicalaire envers plusieurs radicaux tels : l'anion superoxide, les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet et les radicaux peroxydes qui protègent les cellules des dommages induits par les UV ou les irradiations ionisantes (Sawa et al., 1999). Selon (Hseu et al., 2008), l'activité anti radicalaire en utilisant des concentrations de 25 à 100 μ g/ml diminue selon l'ordre suivant vitamine C > acide gallique > Trolox. Le Trolox étant la référence la plus utilisée pour l'étude de l'activité antioxydante de diverses substances biologiques (Benavente-Garcia et al., 2000; Silva et al., 2006).

La quercétine (QE) est démontrée comme un excellent antioxydant in vitro (Selvaraj et al., 2006; Perron et Brumaghim, 2009; Jomova et Valko, 2011). Ce flavonoïde est le plus puissant piégeur des ROS, dont O_2 , et des RNS comme le NO et ONOO-. Ses capacités antioxydantes sont attribuées à la présence des groupes de catéchol dans l'anneau B et le groupe OH en position 3 de l'anneau AC. De plus, (Bukhari et al., 2009) trouvent que l'activité antioxydante des flavonoïdes dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyles dans leur structure. Les activités antioxydantes des composés sont évaluées en utilisant le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), méthode de piégeage des radicaux libres.

Feuille et pulpe d'olivier possèdent un pouvoir antioxydant non négligeable (Benavente-Garcia et al., 2000). Brand-William et al., (1995) signalent que parmi les acides phénoliques les plus actifs dans l'activité antioxydante, l'acide gallique et caféique, les deux sont présents dans les extraits de feuilles et pulpe d'olivier, ils appartiennent aux deux groupes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques, et selon (Cuvelier et al., 1991), les acides hydroxycinnamiques ont une activité anti radicalaire plus efficace que les acides hydroxybenzoïques.

Popovici et al. (2009) également signalent l'effet antioxydant de l'acide gallique. Oleuropéine est le composant majoritaire dans les extraits de feuilles et de pulpes de l'olivier qui est doté d'effet anti radicalaire (Altiok et al., 2008; Ben Salah et al., 2012; Quirantes-Piné et al., 2013; Nashwa et al., 2014).

Du côté de (Hayes et al., 2011), l'activité antioxydante des composés hydroxyles phénoliques dans l'extrait des feuilles de l'olivier peut être due à la présence des groupements hydroxyles dans leur structure comme l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et l'acide lutéoline-7-O-glucoside. Dans notre étude, la caractérisation des extraits de (feuille, pulpe et noyau) a confirmé la présence de l'oleuropéine, de l'acide lutéoline-7-O-glucoside dans l'extrait de feuille (EF). En plus de l'oleuropéine, l'extrait de pulpe et noyau (EP; EN) contiennent l'hydroxytyrosol(3,4-DHPEA-EA). Ce dernier est fréquemment détecté dans la pulpe et a fait l'objet de nombreuses études, notamment en ce qui concerne son activité antioxydante et ses propriétés bénéfiques pour la santé, qui sont beaucoup plus élevées pour l'hydroxytyrosol que pour le tyrosol (Obied et al., 2005; Ryan et Robards, 1998). Plusieurs chercheurs (Ranalli et al., 2004; Ortega-García et al., 2008; Castillo et al., 2010; Bulotta et al., 2011; Marcos et al., 2014; Licciardello et al., 2015), indiquent que les mélanges de différents composés phénoliques dans les extraits de feuilles d'olivier ont une teneur plus élevée en antioxydants que les composés individuels pour des raisons de synergie qui se produisent entre eux (Ramos et al., 2013). Des phénomènes similaires peuvent se produire dans le grignon d'olive. Jiménez-Escrig et al. (2001) montrent que l'activité anti radicalaire augmente avec le nombre des doubles liaisons et la présence des groupements fonctionnels comme dans la classe des xanthophylles.

Les résultats de cette étude donnent un % d'inhibition de l'extrait de feuille (EF) de $71,05 \pm 0,19$ moins important que celui enregistré par (Moudach et al., 2016), qui est de $95,4 \pm 0,3\%$ et une concentration (CI_{50}) de l'ordre de 0,172 mg/ml plus importante que celle notée par (Yuan et al., 2015), à des valeurs de 37,6 mg/ml et 0,33mg/ml notées par (Xie et al., 2015) et moins efficace de celles enregistrées par (Cioffi et al., 2006) avec des CI_{50} de 41,82 μ g/ml, 7,90 μ g/ml en utilisant l'eau/éthanol (30/70) (v/v) comme solvant d'extraction sur une variété Chemlali en Tunisie par (Bensallah et al., 2012) et par (Hayes et al., 2011), une concentration inhibitrice (CI_{50}) de 1,57 μ g/ml. Il est démontré que la capacité de piégeage radicalaire s'est avérée plus élevée dans les feuilles fraîches (avec une CE_{50} d'environ 40 μ g/ml) que dans les feuilles séchées ($CE_{50} > 50$ μ g/ml) (Bahloul et al., 2009). Hayes et al. (2011) déterminent une valeur CI_{50} de 28,6 μ g/ml. D'autres recherches, (Bouaziz et al., 2008) obtiennent une valeur CI_{50} de 1,5 μ g/ml. pour les extraits de feuilles d'olivier par le même test.

Les phénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc dans leurs extraits (Polzonetti et al., 2004).

Quant au noyau, témoigne d'une activité antioxydante modérée avec une CI_{50} de $0,757 \pm 0,009$ mg/ml. L'étude statistique significative ($P < 0,05$) indique l'existence d'une corrélation linéaire modérée entre le pourcentage d'inhibition du radical $DPPH\cdot$, et la teneur en composés phénoliques de l'extrait du noyau (EN). D'après (Hannachi et al., 2013), le noyau d'olive possède une capacité anti radicalaire de 12,14 mM TEAC et (Mojerlou et Elhamirad, 2018), cernent un taux d'inhibition de 68,9% dans les conditions optimales citées précédemment, supérieur à celui noté par notre variété Chemlal avec un taux de 40,18%. De même pour (Alu'datt et al., 2010) qui notent une inhibition maximale de 73% à une température d'extraction élevée (60°C). Des résultats sont signalés pour le maximum du contenu phénolique et de l'activité antioxydante par rapport à l'augmentation du temps d'extraction (Shahidi et Naczki, 2004). À l'opposition (Wongkittipong et al., 2004), démontrent que le temps d'extraction plus long augmente le contenu phénolique total mais réduit l'activité antioxydante. La variabilité des résultats de l'activité antioxydante des extraits de l'olivier peuvent s'expliquer par la différence de la composition phénolique de ces derniers. En effet, la capacité de réduction des radicaux libres est largement influencée par la composition phénolique de l'échantillon (Cheung et al., 2003; Hseu et al., 2008). Plusieurs études démontrent que le pouvoir anti radicalaire est influencé par la méthode d'extraction, le solvant (nature et concentration), la température et le temps d'extraction (Stanisavljević et al., 2009; Lim et al., 2011)

5.2.4.2 Effet scavenger du radical ABTS

L'ABTS «2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acide)» est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons. Le radical $ABTS\cdot^+$, en contact avec un donneur de H. conduit à l' $ABTS^+$ et à la décoloration de la solution à 734 nm (Lien et al., 1999). La méthode est basée sur l'aptitude des molécules antioxydantes d'étancher la longue durée de vie du radical cation $ABTS\cdot^+$ (Kumaraswamy et Satish, 2008). L'obtention du radical cation $ABTS\cdot^+$ résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de pe-roxydation (peroxydase metmyoglobine ou horseradish peroxydase) en présence de H_2O_2 ou d'un oxydant (oxyde de manganèse ou persulfate de potassium) (Miller et Rice-Evans, 1999; Re et al., 1999; Benavente-Garcia et al., 2000; Arnao et al., 2001).

Cependant, dans cette étude, des valeurs intéressantes sont trouvées pour le piégeage des radicaux libres par l'EF; l'EP; l'EN, comparables à ceux des standards (AG; QE; OLE.). Le radical cation $ABTS\cdot^+$ est inhibé de façon significative à toutes les concentrations testées, et de manière dose dépendante par les extraits. La capacité d'inhibition du radical $ABTS\cdot^+$ notée par les trois extraits (EF; EN; EP), après six minutes d'incubation est de 71,05; 41,25; 23,54% respectifs.

Notons que l'étude statistique ($p < 0,05$) indique l'existence d'une bonne corrélation linéaire avec un R^2 de 0,85 ; 0,94 entre le pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{\cdot+}$ et la teneur des CP de l'EF et de l'EP. Contrairement à l'EN qui détient une faible corrélation. La corrélation linéaire entre la teneur phénolique totale et l'activité antioxydante du noyau d'olive est démontrée par (Alu'datt et al., 2010) ($R^2 = 0,746$).

Par ailleurs, aux mêmes concentrations testées, les PI (Pourcentage d'Inhibition) obtenus par le test du DPPH sont légèrement supérieurs à ceux de la méthode à l'ABTS. Ceci peut s'expliquer par la présence de substances qui présentent des bandes d'absorption à la même longueur d'onde que le radical $DPPH^{\cdot}$ entraînant ainsi une augmentation de l'absorbance (Sarr et al., 2015).

Le pouvoir antioxydant des feuilles d'olivier est principalement attribué à la présence de composés phénoliques (Goulas et Papouti, 2010 ; Xie et al., 2015). Plusieurs de ces composés sont évalués individuellement et les effets antioxydants sont liés aux caractéristiques des groupes fonctionnels, à leur quantité et à leur position hydroxyle (Hayes et al., 2011) (dans leurs structures par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels) (Hayes et al., 2011), leur conférant des propriétés redox (Goulas et Papouti, 2010). D'après (Manian et al., 2008), les composés phénoliques de poids moléculaire élevé, ont plus de capacité à capter les radicaux libres ($ABTS^+$) et que leur efficacité dépend, du nombre de noyaux aromatiques et de la nature de substitution des groupements hydroxyles (OH).

L'effet antioxydant d'extraits éthanoliques des feuilles est étudié par plusieurs auteurs qui suggèrent qu'il peut être dû à la présence de groupes hydroxyles dans la structure des phénols (Govindan et Muthukrishnan, 2013). L'élimination du radical ABTS à 50% a note des CI (mg/ml) (Tab 5.9) moins élevées que celles du radical DPPH. Des facteurs comme la stéréo sélectivité des radicaux ou de la solubilité de l'extrait dans différents systèmes d'analyse est signalée comme ayant une incidence sur la capacité des extraits pour réagir et éteindre les différents radicaux (Zheng et Wang, 2001). Quant à (Wang et al., 1998), constatent que certains composés qui ont une activité de piégeage des ABTS ne présentent pas une activité de piégeage des DPPH. Ce qui n'est pas observé dans cette étude.

D'après (Hannachi et al., 2013), le noyau d'olive possède une capacité anti radicalaire de 0,64 mM TEAC. Les résultats de ce test a expose un effet inhibiteur des radicaux libres ($ABTS^+$) par les antioxydants de l'EN, et cela peut être du à la présence des phénols simples comme (l'acide p-coumarique identifié par HPLC-ESI-MS), qui porte un substituant d'acide propénoïque qui confère à la fraction une délocalisation de protons plus élevée, facilitant une activité de balayage supérieure à celle observée avec les phénols simples (Morello et al., 2005).

En fait, l'efficacité supérieure de l'EF indique son excellente capacité à éliminer $ABTS^{\cdot+}$ est en accord avec les résultats présentés par (Wiseman et al., 1997).

Les composés phénoliques présents dans l'EF ont peut-être eu un effet synergique plus important que ceux des autres échantillons.

De plus, les substitutions d'hydroxyle dans les composés phénoliques des feuille d'olivier (c-à-d les flavonoïdes, les oleuropéosides et les acides organiques) ont une forte capacité de donner des hydrogènes actifs qui sont probablement responsables du mécanisme de réaction (Xie et al., 2015). Mojerlou et Elhamirad (2018), établissent la relation entre l'activité antioxydante et la méthode d'extraction. Les polyphénols extraits par micro-ondes dont la teneur est élevée, montrent une activité antioxydante remarquable en utilisant les tests (ABTS; DPPH.).

Ceci peut s'expliquer par la décomposition des cellules végétales en peu de temps grâce à la technologie électromagnétique après exposition au chauffage par micro-ondes.

L'EAM a remarquablement des avantages considérables tels, qu'un temps d'extraction plus court, un rendement d'extraction plus élevé et consommation de solvant réduite à celle des solvants utilisés dans les méthodes conventionnelles (Dahmoune et al., 2013). Egalement, (Gallo et al., 2010), démontrent que l'activité anti oxydante de certains extraits obtenus par EAM est supérieure à celle obtenue par EAU (Extraction Assistée par Ultrasons et EC (Extraction Conventionnelle).

Selon (Hayes et al., 2011), la structure des composés phénoliques est un facteur déterminant de leur piégeage des radicaux libres qui sont des pathogènes dans de nombreuses maladies. Certains de ces composés sont capables de chélater le fer, et donc de réduire son excès.

Pour cela, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits par la technique de réduction du fer FRAP.

5.2.4.3 Pouvoir Antioxydant Réducteur Ferrique (FRAP)

En général, une absorbance élevée du mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur important (Manmohan et al., 2011). Les activités antioxydantes des composés naturels sont susceptibles d'être mutuellement corrélées avec leur pouvoir réducteur, peut-être en raison de leur capacité à produire de l'hydrogène (Xiang et Ning, 2008).

Les composés qui sont doués d'une capacité réductrice indiquent qu'ils sont des donateurs d'électron et peuvent réduire les intermédiaires oxydés des processus de peroxydation des lipides, de sorte qu'ils puissent agir en tant qu'antioxydant (Chanda et Dave, 2009). Les réducteurs présents induisent à la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanide en Fe^{2+} . Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante (Ebrahimzadeh et al., 2008).

La quantité de Fe^{2+} formée est estimée à une longueur d'onde de 700 nm. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'augmentation du pouvoir réducteur (Ozsoy et al., 2008; Ribeiro et al., 2008).

Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène pour la respiration et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et les cellules (Bourgou et al., 2008). La figure (30) montre les DO lues lors de ce test réducteur du ferrocyanure de potassium par les extraits phénoliques de la feuille, pulpe et noyau et les standards (QE; AG; OL) pris comme étalons, à un intervalle de concentration allant de 0,05 à 1mg/ml.

Une relation dose- dépendante est observée dans tous les échantillons à l'exception de l'EN. Les résultats obtenus montrent que tous les composés ont un pouvoir réducteur croissant proportionnellement à leurs concentrations. Les CI_{50} respectives de l'EP, l'EF, et l'EN, sont de l'ordre de; $26,81 \pm 1,90$; $72,55 \pm 10,58$; $239,53 \pm 50,96$ mg/ml, alors que celles des standards, l'AG; QE; OLE; sont plus significatives avec des valeurs de $26,22 \pm 0,2$; $27,90 \pm 1,51$; $55,00 \pm 9,68$ mg/ml, respectivement (figure 33) à des concentrations égales. Le pouvoir réducteur des échantillons suggère qu'il a contribué de manière significative à l'effet antioxydant observé.

Visiblement la QE et l'AG réduisent plus rapidement et plus efficacement le ferrocyanure de potassium, suivi de l'oleuropéine à une concentration de 1mg/ml. Cependant, l'OLE possède un pouvoir réducteur qui est relativement faible. Le FRAP augmente dans l'ordre suivant : $AG > QE > EP > OLE > EF > EN$. La différence d'analyse statistique est significative ($p < 0,05$). L'EP a expose un pouvoir réducteur hautement élevé que celui de l'EF et de l'EN. Des différences sont constatées entre les extraits naturels et les standards, probablement en raison des mécanismes d'action des différents composés phénoliques. Toutefois, la tendance de l'activité réductrice est similaire entre l'EP, la QE et l'AG. L'EF et l'EP, ont des teneurs plus élevées en CPT par rapport à l'EN. Cela indique qu'ils peuvent donner des électrons aux radicaux libres réactifs plus efficacement, en les transformant en composants stables et terminant réaction de la chaîne des radicaux libres. Néanmoins, (Cyboran et al., 2014) suggèrent que l'activité antioxydante phénolique dépend non seulement du pourcentage de polyphénols dans l'extrait mais aussi de leur espèce.

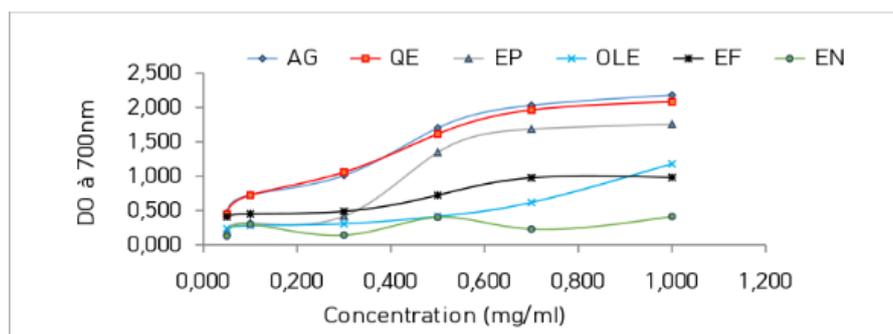


FIGURE 33 – Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des extraits naturels (EP; EN; EF) et des standards phénoliques (QE; AG; OLE). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=3$) des substances testées.

L'activité d'analyse du FRAP de l'EF est vérifiée dans des études antérieures (Bouaziz et al., 2005; Abaza et al., 2011; Hayes et al., 2011; Orak et al., 2012). Nos résultats concordent avec ceux de (Bensallah et al., 2012) qui révèlent que l'extrait éthanolique des feuilles de différentes variétés d'olivier montre une activité pour la réduction du fer, selon l'ordre suivant : l'extrait des feuilles de Chemlali suivi de Gerboua et Sévillane et avec ceux de (Xie et al., 2015).

Ces derniers auteurs notent des valeurs respectives des standards de l'ordre de 2,17; 3,50; 6,87 mg/ml, hautement efficaces que celles notées par la capacité réductrice dans notre étude mais dans le même ordre de priorité, avec des valeurs CI_{50} de l'ordre de 26,22; 27,90; 55,00 mg/ml pour l'AG; QE; OLE, respectivement (figure 34). Une étude sur l'AG utilisé comme témoin présente une CI_{50} de $7,65 \pm 0,43 \mu\text{gml}_1$ hautement efficace (Nadour, 2015). Quant aux extraits de feuilles (EF) et celui de la pulpe (EP), détiennent des CI_{50} de l'ordre de 5,24 et 65,56 mg/ml, respectivement, notées par (Xie et al., 2015), plus réductrices que les CI_{50} notées dans notre étude avec des valeurs respectives de 72,03 et 26,81mg/ml.

L'analyse du FRAP de l'EF est vérifiée dans des études antérieures. L'étude sur l'EF méthanolique montre une FRAP de 301 mg TE/g (Hayes et al., 2011). D'autres études obtiennent un TEAC de 379,3 mg TE/g de matière sèche (Hayez et al., 2011) et une FRAP de 281,8 mg/ml notée par (Goldschmidt Lins et al., 2018) moins efficaces que celles enregistrées dans notre étude avec une CI de 72,55mg/ml.

La pulpe d'olive détient une capacité de réduction du chlorure ferrique de 22,93mg/ml ($R^2 = 0,88$) à une valeur efficace proche de 24mg d'équivalent de vitamine E par g d'extrait enregistrée par (Nadour, 2015), similaire à celle notée par notre variété Chemlal avec une CI_{50} de 26,81mg/ml et est moins efficace de celle enregistrée par (Nadour et al., 2012) avec une concentration de $50,55 \pm 3,33 \mu\text{gml}_1$.

En effet, la réduction du fer par l'EP (pulpe) de la variété alcaparras montre un pouvoir réducteur de 360 μgml_1 (Sousa, et al., 2008) qui est plus élevé que celui enregistré par notre variété Chemlal. L'activité antioxydante de la pulpe dépend principalement de profil phénolique, qui varie selon la variété d'olive et le degré de maturité qui influence également le potentiel antioxydant. Au cours de la maturation, certains changements se produisent dans la composition des fruits en polyphénols.

Par exemple, la quantité d'oleuropéine diminue, tandis que celle de l'hydroxytyrosol augmente dans la pulpe d'olive mûre (Morello et al., 2005) Cela peut avoir un impact direct sur la réduction du pouvoir (Ferreira et al., 2007).

Thaipong et al. (2006), démontrent l'activité antioxydante de l'extrait de pulpe par comparaison des différents tests d'estimation de pouvoir antioxydant et ils prouvent que le FRAP montre une corrélation significative avec la quantité des CPT. Dans le même contexte, (Akinmoldun et al., 2007), démontrent une corrélation positive entre les polyphénols, le pouvoir réducteur et la capacité antioxydante mesurée par le test DPPH.

L'extrait de feuilles (EF) et celui de pulpe (EP) contiennent des formes plus complexes en composés phénoliques (oleuropéine est le constituant majeur). En revanche, le pouvoir réducteur de ces extraits peut être à l'origine des flavonoïdes qui sont considérés comme les principaux donneurs d'électrons (Lee et al., 2007).

Dans notre étude, la caractérisation par CLHP-ESI-MS des deux extraits (EF et EP), révèle un profil phénolique dont les composés majeurs sont des flavonoïdes. Des nombres plus élevés d'électrons donneurs dans le composé stabilisent le produit radicalaire et renforcent l'activité antioxydante, selon le principe de la plus faible énergie (Cao et al., 1997). Quant à l'EN (noyau), il présente une activité moins importante avec une CI_{50} de $239,53 \pm 50,96$ mg/ml par rapport à l'EF et l'EP. La teneur en polyphénols de l'EN montre une corrélation négative d'où $R^2 = 0,379$ avec la capacité réductrice. Cette différence de corrélation peut être attribuée à la nature des composés polyphénols qui sont responsables de l'activité antioxydante.

Il est important, par ailleurs de signaler que (Chimi et al., 1991) démontrent que les composés polyphénols se dégradent avec le temps qui a pour conséquence une diminution de leur activité antioxydante et que leur vitesse de dégradation est positivement corrélée à leur efficacité antioxydante négative.

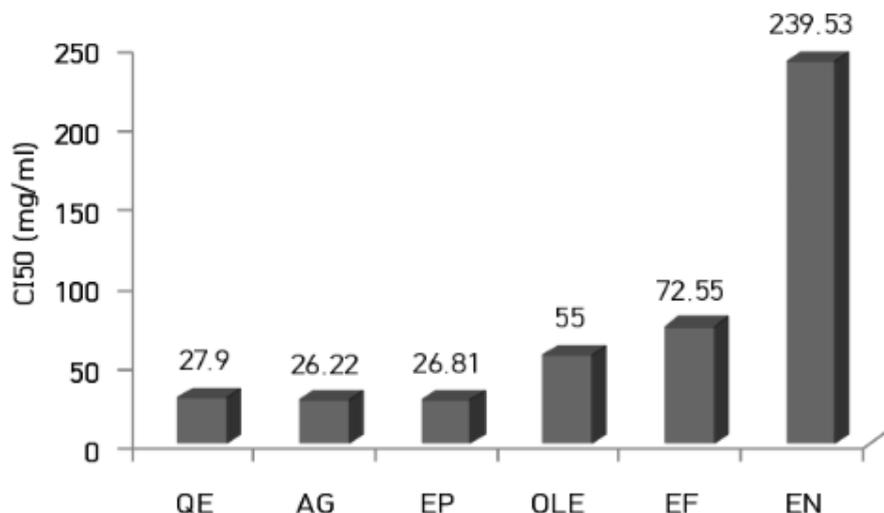


FIGURE 34 – Histogrammes exprimant la concentration inhibitrice (mg/ml) permettant la réduction de 50 % du fer.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3) des substances testées.

Les activités antioxydantes des composés phénoliques sont différentes en raison de leurs structures différentes ; par conséquent, il y a un grand degré de variation entre les différents composés phénoliques dans leur efficacité en tant qu'antioxydant (Hayes et al., 2011). L'EP et l'AG sont de bons donneurs d'électrons en convertissant le Fe^{3+} en Fe^{2+} .

En conclusion, les CPT de la feuille, pulpe et noyau peuvent être qualifiés de donateurs d'électrons capables de neutraliser les RL (Radicaux Libres) à des différences de potentialité. Cela peut avoir un effet dans la conversion des RL en produits plus stables et terminant ainsi les réactions en chaîne initiées par les RL. Le pouvoir antioxydant d'un extrait végétal dépend de sa pureté, de sa nature, sa structure chimique et la bioactivité de ses constituants (Hayes et al., 2011 ; Xie et al., 2015).

5.2.4.4 Pouvoir réducteur par le test phosphomolybdénique

Le test phosphomolybdate (PPM) est basé sur la réduction, en milieu acide, de l'ion MO^{+6} en ion MO^{+5} par des substances réductrices présentes dans l'extrait végétal qui forment avec le phosphate- MO^{+5} des complexes de couleur verdâtre (Prieto et al., 1999) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'extrait (Prasad et al., 2009).

Les résultats sont donnés en DO à 695 nm en fonction de la concentration (Fig 35) et ils sont significativement différents ($p < 0,05$). nous constatons qu'il y a une proportionnalité entre la capacité des substances testées à réduire le molybdène et leur concentrations, cela peut être expliqué par la présence probable de composés antioxydants (Kaur et al., 2008).

L'AG montre une capacité plus élevée à réduire le molybdène, avec une DO de $1,17 \pm 0,03$ à 1mg/ml. La CI_{50} marque une valeur potentiellement intéressante de 42,07 mg/ml, contrairement aux standards (QE et OLE) avec des faibles DO de $0,947 \pm 0,016$; $1,13 \pm 0,014$ et CI_{50} de l'ordre de 45,40 ; 57,85mg/ml, respectivement. Quant aux extraits, les concentrations inhibitrices à 50% sont notées avec des valeurs respectives de $97,03 \pm 1,22$; $84,54 \pm 7,12$; $194,56 \pm 6,65$ mg/ml pour l'EF ; l'EP ; l'EN (Tab 5.9).

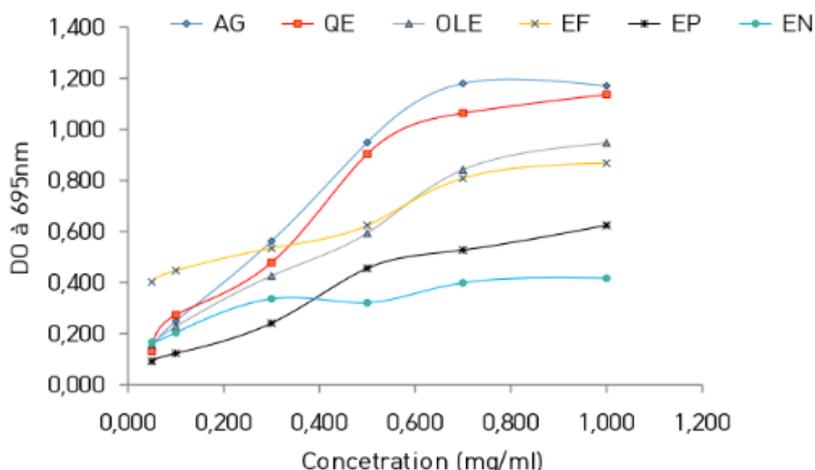


FIGURE 35 – Pouvoir réducteur mesuré par le test phosphomolybdénique sur les extraits (EP ; EN ; EF) et les standards phénoliques (QE ; AG ; OL) Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

Les extraits phénoliques présentent un effet réducteur modéré de l'ion molybdène avec une DO de $0,868 \pm 0,04$ (EF) ; $0,624 \pm 0,05$ (EP) ; $0,417 \pm 0,006$ (EN) à 1mg/ml. Le faible potentiel de molybdate manifesté par ces extraits peut probablement être à l'origine de la polarité du solvant utilisé. En effet, il est démontré que les composés extraits par des solvants très polaires exercent un effet scavenger plus important que ceux extraits par des solvants faiblement polaires (Turkmen et al., 2006). Ce qui peut être expliqué par la faible polarité du solvant (Ethanol) utilisé dans notre étude.

À partir des résultats de la mesure du pouvoir réducteur par les deux méthodes utilisées, les extraits de feuille et de pulpe (EF et EP) montrent une activité réductrice intéressante par rapport à l'EN. L'activité antioxydante est la capacité d'un composé à empêcher la dégradation oxydante des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques). Selon (Antolovich et al., 2002), un certain nombre de facteurs déterminent l'activité antioxydante dont la réactivité comme donneur d'hydrogène ou d'électron. Le pouvoir réducteur est défini comme étant la capacité à donner un hydrogène et/ ou un électron. La capacité réductrice d'un composé dépend généralement de la présence de groupements réducteurs au niveau de sa structure (Pin-Der-Duh, 1998 ; Senevirathne et al., 2006). Le pouvoir relativement faible des CPO obtenu par le test phosphomolybdénique peut s'expliquer par les conditions acides de la réaction. Dans ces conditions, selon (Apak et al., 2008), la capacité réductrice peut être inhibée à cause de la protonation des CP, tandis que dans des conditions plus basiques, la dissociation des protons des CP (convertis en phénolates) augmente la capacité réductrice d'un échantillon. Il se peut que les propriétés antioxydantes des extraits de feuille, pulpe et noyau ne puissent pas être simplement attribuées aux CPT, au lieu de cela, ils représentent en fait l'intégration d'une pléthore d'interactions entre les différents composés phénoliques

5.2.4.5 Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (TBARS)

Le test TBA est un test facile à réaliser et rapide pour l'évaluation de la peroxydation lipidique. Ce test se base sur le développement de pigment rose résultant de la réaction de TBA avec les produits secondaires résultant de la dégradation des acides gras, en particulier avec le MDA (Laguerre et al., 2007).

Patton et Kurt (1951), rapportent que le MDA est le principal réactant avec le TBA. Ceci est confirmé par les travaux de (Moon et Shibamoto, 2009). Plusieurs auteurs suggèrent que le composé coloré formé est le résultat de la condensation entre deux molécules de TBA avec une molécule de MDA sous l'effet conjoint de la température et de l'acidité du milieu. Ce complexe présente le maximum d'absorption à 530 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des produits secondaires de l'oxydation. Frankel et al. (1993), rapportent que les alcools, les aldéhydes saturés, les aldéhydes insaturés α et β et les composés époxy sont les produits secondaires majeurs de l'oxydation qui sont plus stables et sont générés par la décomposition des peroxydes.

Le TBA peut donner une réaction positive avec ces produits. La formation du complexe TBA-MDA est initiée par une attaque nucléophile impliquant le carbone 5 de TBA sur le carbone 1 de MDA suivie d'une déshydratation.

Par conséquent, ce test devient l'un des tests le plus utilisé pour étudier l'oxydation des lipides et tester les activités antioxydantes de divers produits naturels. Dans les systèmes biologiques, la peroxydation des lipides génère un certain nombre de produits de dégradation tels que le MDA à l'origine de la destruction des membranes cellulaires et des lésions cellulaires. Le MDA, l'un des principaux produits de la peroxydation des lipides, est largement étudié et mesuré comme indice de peroxydation des lipides et comme marqueur du stress oxydatif (Niranjan et Krishnakantha, 2000).

L'oxydation lipidique des différents échantillons est évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Ces substances sont des composés de faible masse moléculaire formés suite à la décomposition de certains produits primaires et secondaires de peroxydation lipidique.

Les résultats de test au TBA obtenus sont consignés dans le tableau (5.9) en fonction des concentrations inhibitrices à 50%. nous constatons qu'il y'a une relation de proportionnalité entre le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique et les concentrations des CP testés. Les extraits phénoliques (EF ; EP ; EN) présentent l'activité la plus importante contre la peroxydation lipidique avec des CI_{50} respectives de (0,08 ; 0,60 ; 1,56mg/ml). L'AG présente, dans ce cas, l'effet protecteur le moins élevé avec une CI_{50} 3,40mg/ml par rapport à la QE (2,59 mg/ml).

L'absorbance des TBARS des extraits phénoliques diminue dans l'ordre suivant : EN>EF>EP.

Plusieurs travaux rapportent le rôle des CP de l'olive dans la prévention de la peroxydation lipidique. Les sécoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés) représentent une des classes principales de CP responsables de l'activité antioxydante des olives et de l'huile d'olive (Franconi et al., 2006).

Il est démontré par (Kiritsakis et al., 2010; Malheiro et al., 2012), que les feuilles d'olivier inhibent l'oxydation des lipides. D'autre part, les propriétés de piégeage radicalaire des composés phénoliques présents dans la pulpe d'olive sont mieux corrélées avec l'inhibition de l'oxydation des liposomes qu'avec l'oxydation des lipides (Morello et al., 2005).

Les effets antioxydants de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol contre l'attaque par les radicaux oxygénés à partir de la phase aqueuse sont montrés par (Saija et al., 1998) dans les biomembranes qui consistent en l'acide linoléique dispersé dans le dipalmitoylphosphatidylcholine. D'autres résultats prouvent l'activité de la fraction phénolique de l'olive in vivo en protégeant les particules des LDL de l'oxydation (Visioli et al., 1995) et inhibant la production des isoprostanes et autres marqueurs de la peroxydation lipidique produits pendant l'oxydation des LDL (Salami et al., 1995; Visioli et al., 2000).

Parallèlement, (Dejong et al., 2009) utilisent l'extrait des margines, du thé et du vin pour limiter l'oxydation lipidique et la formation de TBARS dans les viandes bovines et porcines cuites. Ces auteurs montrent l'implication des composés phénoliques, par leurs propriétés antioxydantes, dans le processus du contrôle de l'oxydation lipidique dans les viandes.

Pour les phénols individuels testés, l'ordre de l'activité contre l'oxydation des lipides est le suivant : QE>OL=AG. L'effet antioxydant d'un composé donné dépend largement de sa structure chimique et le milieu dans le quel se retrouve. Par contre, cet effet avec les extraits dépend de la composition en constituants phénoliques de chaque extrait, de degré de pureté, et de la présence d'autres composés synergiques ou inhibiteurs.

Cependant, les résultats obtenus avec les extraits phénoliques sont intéressants que ceux obtenus avec les antioxydants individuels : QE ; OLE ; AG (Tab 5.9). L'absorbance faible peut s'expliquer par la présence d'une certaine quantité de produits secondaires de l'oxydation issus de la décomposition des hydro peroxydes.

QE se montre plus active et cela peut être dû à son effet de retarder les lésions cellulaires causées par la voie d'oxydation en piégeant les radicaux libres, en offrant une protection contre la peroxydation des lipides et en chélatant les ions métalliques (Peters, 1995). Les travaux de (Kumar et al., 2003) supportent les suggestions de ces auteurs. Il est donc possible que la quercétine puisse agir à la fois comme pro-oxydant et antioxydant. Ce phénomène paradoxal peut expliquer la raison pour laquelle la quercétine accélère les dommages oxydatifs cellulaires et/ou agit comme un mutagène, au lieu d'un antimutagène, dans diverses études in vitro (Kawanishi et al., 2005).

Les résultats de (Jamshidzadeh et Rezaeian Mehrabadi , 2010) montrent qu'une administration préalable et concomitante de vitamine C et de quercétine, en association avec un agent oxydant, peut réduire significativement les dommages peroxydants des érythrocytes chez les sujets déficients en G6PD (Glucose-6-PhosphatDehydrogenase). L'effet antiperoxydant de la quercétine montre que 75 mM de cette dernière inhibe la formation de 56 %TBARS (de la 177 à 100 ng MDA/gHb dans G6PD déficient échantillons).

Les extraits (EF ; EP) étudiés exercent un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique statistiquement significatif ($p < 0,05$) par rapport aux contrôles négatifs (QE ; AG ; OLE). Cette capacité de modifier la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres est liée non seulement aux caractéristiques structurales des agents antioxydants mais aussi à leur capacité de pénétrer dans les bicouches lipidiques et d'interagir avec. Il est démontré que la structure et la lipophile des polyphénols sont des facteurs importants dont découle la propriété antioxydante, probablement affectant la profondeur de l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane et al., 2010).

Les travaux de (Goldschmidt Lins et al., 2018) indiquent que l'EF a un effet protecteur très important sur la peroxydation des lipides.

Ainsi, les résultats démontrent que l'EF inhibe efficacement les dommages oxydatifs induits par les radicaux peroxyyles dans les érythrocytes humains. Des études montrent l'effet antioxydant de l'EF sur l'hémolyse induite par les radicaux peroxyyles chez les patients atteints des érythrocytes de mouton (Ferreira et al., 2007). Ces auteurs vérifient une relation entre l'effet anti hémolytique des extraits et leur activité radicalaire, mesurée par la DPPH et suggèrent que le mécanisme d'action dans les deux cas est lié au contenu phénol total. Dans cette étude, la caractérisation des extraits, notamment celle de pulpe et de noyau a identifié la présence de la molécule (oleuropéine aglycone) avec des quantités considérables de 43978,824 et 7372,820 $\mu\text{g/g}$, respectivement et de l'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EA) avec des teneurs respectives de 11053,496 et 6330,331 $\mu\text{g/g}$.

Ces dernières, d'après (Jemai et al., 2009) réduisent le processus de peroxydation des lipides et améliorent le système de défense antioxydant dans un modèle athérogène expérimental et ils suggèrent que l'activité du phénol utilisé peut être attribuée au groupe 3,4-dihydroxyphényl éthanol présent dans les trois molécules (oleuropéine; hydroxytyrosol; oleuropéine aglycone). Ces effets mettent en évidence les co-produits de l'olivier comme source d'antioxydants capables de réduire la fréquence des maladies cardiovasculaires.

La composition des extraits (EF; EP; EN) est notamment riche en flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes préviennent des dommages oxydatifs causés dans les érythrocytes, et cette protection peut être due à la chélation du fer dans la cellule. L'une des cibles biologiques les plus vulnérables lors d'un stress oxydatif est l'endommagement des AGPI, d'où une peroxydation lipidique qui va affecter la perméabilité membranaire (Demiral et Turkan, 2005; Valko et al., 2006).

En raison de leurs propriétés chimiques, les composés phénoliques inhibent l'oxydation des lipides (Turner et al., 2004), et présentent des activités physiologiques (Visioli F, Galli 1998). Il est démontré par (Gordon et al., 2001) que les composés phénoliques hydrophiles totaux et les formes oléosidiques de 3,4-DHPEA sont corrélées ($r=0,97$) avec la stabilité à l'oxydation de l'huile d'olive vierge.

Tous ces résultats décrits par la littérature concordent avec ceux retrouvés et indiquent que les EP et EF présentent des effets protecteurs contre la peroxydation lipidique. Le site de production des RL ainsi que la localisation et l'orientation des antioxydants dans la bicouche phospholipidique, sont des facteurs devant être pris en considération pour la compréhension de l'efficacité d'un antioxydant au niveau membranaire (Saija et al., 1995; Paiva-Martins et al., 2003).

Des différences sont constatées entre les substances testées en fonction des activités antioxydantes (DPPH, ABTS, FRAP, TBARS, et Molybdène), probablement en raison de la différence de quantité et de qualité par des composés phénoliques et de leurs mécanismes d'action.

La concentration, l'accessibilité des groupes actifs à l'oxydant et la stabilité du produit influencent les propriétés antioxydantes de l'extrait végétal naturel (Guo et al., 2007).

En conclusion, les substances phénoliques et les flavonoïdes attribuent aux plantes un pouvoir protecteur contre le stress oxydatif. Cependant cet effet protecteur peut être influencé par plusieurs facteurs tels que, les teneurs de ces composés chimiques dans les plantes qui varient essentiellement selon leur origine (Ebrahimzadeh et al., 2008), la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003) et la durée de conservation (Ozguven et al., 1996).

5.2.5 Analyse HPLC–ESI-MS

L'identification individuelle des polyphénols à partir des extraits (EF ;EP ;EN) obtenus par la méthode EAM est réalisée sur la base du temps de rétention des composés phénoliques et des spectres d'absorption visibles qui sont comparés à ceux des étalons. Les tableaux (Annexe 8 ; H1 ; H2 ; H3) dressent la liste des composés identifiés avec les concentrations attribuées et les figures (36 : A ;B ;C) illustrent les profils phénoliques par des chromatogrammes en fonction du temps de rétention.

Dans le présent travail, la caractérisation HPLC–ESI-MS des extraits de (feuille, pulpe et noyau) d'olivier est réalisée avec de l'éthanol aqueux à 60%, 45,97% et à 80%, respectivement. Un total respectif de 12, 11 et 9 composés phénoliques est enregistré.

L'oleuropéine, cette molécule indiquée par plusieurs chercheurs qui étudient les composés phénoliques des feuilles de l'olivier (Benavente- Garcia et al., 2000 ; Bouaziz et al., 2004 ; Briante et al., 2004 ; Japon-Lujan et al., 2006 ; Mourtzinis et al., 2007 ; Malik et al., 2008 ; Hayes et al., 2009 ; Ben Salah et al., 2012 ; Moudach et al., 2016), est identifiée dans les extraits de (feuille, pulpe et noyau) dont la teneur diffère selon la variété d'étude et les conditions de culture.

Selon (De Leonardis et al., 2008), la composition phénolique des feuilles est similaire à celle des olives. L'oleuropéine et autres sécoiridoïdes sont les principaux composés, mais les formes simples dont le HT (Hydroxytyrosol) sont présents mais en faible quantité. La concentration de l'oleuropéine dans les feuilles est significativement plus élevée que dans le fruit ou dans l'huile (Scheffler et al., 2008).

Cependant, 3,4-DHPEA-EA est trouvé dans la pulpe et le noyau. Pereira et al. (2007), désignent l'OLE ($26476 \pm 1760 \mu\text{g/g}$) et LUT-7-O-G ($4209 \pm 98 \mu\text{g/g}$) comme étant les composés phénoliques les plus abondants dans l'extrait lyophilisé de feuilles d'olivier.

Apparemment, le niveau le plus élevé de lutéoline-7 - glucoside est observé dans les feuilles matures (Nasir et al., 2008) d'olivier, cela peut être attribué soit à la méthode d'extraction, soit à l'origine de l'échantillon.

De plus, la polarité du solvant peut influencer la quantité totale de composés phénoliques déterminée par HPLC-ESI-MS. La concentration d'oleuropéine aglycone est importante dans la pulpe avec une teneur de (43978,824 $\mu\text{g/g}$) que dans le noyau (7372,820 $\mu\text{g/g}$).

Comme nous pouvons le voir, l'éthanol (60%) (V/V) montre la plus forte capacité d'extraire à la fois OLE et LUT-7-O-G dans les feuilles d'olivier. Ce résultat corrobore avec celui de (Moudach et al., 2016), l'éthanol (70%) (V/V) montre la plus forte capacité d'extraire l'OLE et le LUT-7-O-G dans les feuilles d'olivier et le grignon avec la même variété (Chemlal).

Il est à signaler que le profil qualitatif des phénols du fruit (pulpe fraîche) diffère légèrement de celui des pâtes (pulpe épuisée) et des déchets, tout en étant significativement différent de celui de l'huile, ce qui suggère que les phénols ne sont pas seulement transférés, mais aussi transformés pendant le traitement de l'huile, d'après les résultats de (JermanKlen et MozetičVodopivec, 2012). Ceci confirme la similarité de quelques composés (deacetoxyoleuropein-aglycon ; acide ferulique glucoside ; 3,4-DHPEA-EA ; oleuropéine aglycone) trouvés dans la pulpe et le noyau de notre variété. Pour (Servili et al., 2004), les sécoiridoïdes phénoliques contiennent de l'hydroxytyrosol dans leurs structures moléculaires (3,4- DHPEA-DEDA et oleuropéine aglycone). Contrairement à (Artajo et al., 2007), aucun de ces sécoiridoïdes n'est confirmé dans aucune des matrices dérivées de l'olive. De même, les flavonoïdes comme (apigenin 7-o-glucoside ; quercetin-3-O-rutinoside), sont présents dans la pulpe et la feuille. Ceci est conforme aux rapports de (Artajo et al., 2006 ; Artajo et al., 2007). Lutéolin-7-O-glucoside, la rutine et le verbascoside ne sont présents que dans la pulpe.

Quant au noyau, (Suárez et al., 2009 ; Alu'datt et al., 2010 ; Mojerlou et Elhamirad, 2018), signalent des substances similaires de composés phénoliques à savoir (acide protocatechuique ; acide ferulique ; p- acide coumarique).

Les principaux composés phénoliques présents dans le noyau d'olive sont l'hydroxytyrosol (Fernandez-Bolanos et al., 2002), l'oleuropéine (Mulinacci et al., 2001), le tyrosol (Al-louche et al., 2004), l'acide caféique (Lesage-Meessen et al., 2001), l'acide p-coumarique, l'acide vanillique (Bianco et al., 2003), le verbascoside, l'acide élénolique (Mulinacci et al., 2001), le catéchol (Fiorentino et al., 2003) et la rutine (Romero et al., 2002). Dans cette étude, le composé majeur du noyau est l'acide ferulique glucoside avec une teneur de 28670,544 $\mu\text{g/}$ Annexe H.

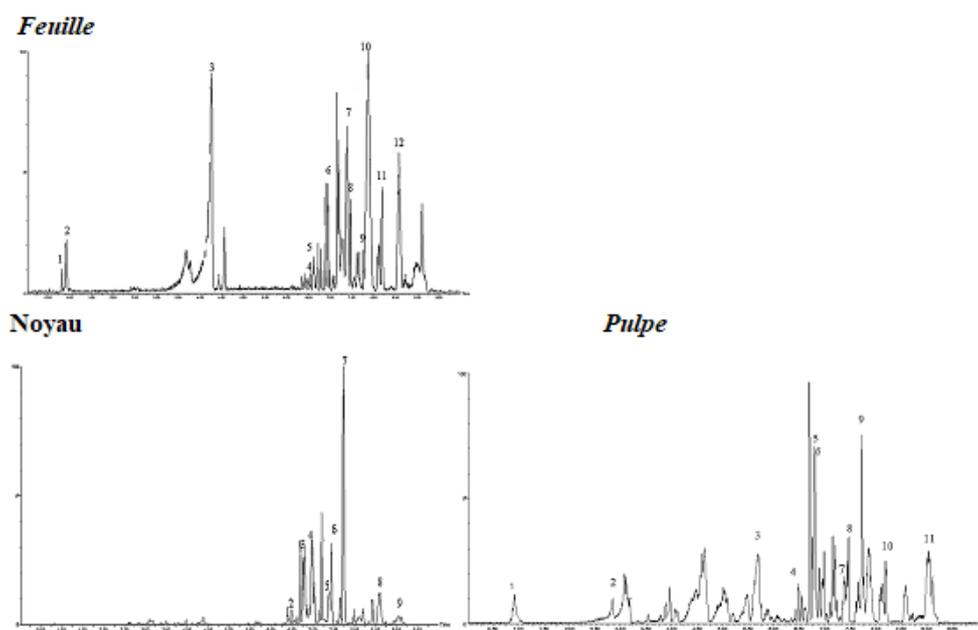


FIGURE 36 – Identification des polyphénols dans les extraits de (feuille ; noyau ; pulpe), par l'analyse HPLC-ESI-MS

En conclusion, le profil phénolique varie selon l'origine (He et Xia., 2007) et la répartition des polyphénols dépend de leur solubilité ainsi que de la technologie utilisée, produisant différents types de produits à différentes conditions de temps/température de malaxage (Rodis et al., 2002).

5.2.6 Changements structuraux dans les tissus végétaux pendant l'EAM

Enfin, le matériel végétal traité par l'EAM, est examiné par le Microscope Electronique à Balayage (MEB) afin d'observer l'effet d'extraction sur la structure physique de la poudre fine à l'échelle cellulaire. Les critères les plus importants sont la structure intercellulaire des matrices végétales et la dimension des vacuoles dans la paroi végétale. Comme le montrent les figures (37 ; 38), la structure intercellulaire est détruite après l'irradiation des micro-ondes. Des changements fracturaires évidents dans la morphologie de la surface après 180 s ; 58,13 min ; 86,66 min pour la pulpe, feuille et le noyau, respectivement, alors qu'aucune fracture prononcée n'est constatée. Les microphotographies des surfaces des poudres brutes de la pulpe et le noyau sont recouvertes par les graisses, les cires ou encore des polysaccharides tels que les lignines, hémicelluloses ou pectines et donc beaucoup plus rugueuse (Banat et Fares, 2015 ; Koutsomitopoulou et al., 2014) .

Alors qu'après l'irradiation, la surface est trouvée en grande partie détruite, ce qui suggère que l'irradiation par micro-ondes joue un rôle important dans la désintégration des cellules végétales murs.

De plus, ce phénomène suggère que l'action des micro-ondes affecte la structure physique de la cellule en raison du mouvement moléculaire et de la rotation des liquides avec un dipôle permanent, ce qui permet un chauffage rapide du solvant éthanol/eau. Le chauffage par micro-ondes cause des dommages cellulaires plus importants, ce qui a favorisé la libération rapide des solutés dans les solvants et renforce l'effet de chauffage principal bien connu des micro-ondes.

La figure (37), les poudres présentent une surface irrégulière avec des pores de différentes dimensions. La porosité des poudres est considérée comme un indice de réactivité des poudres en solution (Djantou Njatou , 2006).

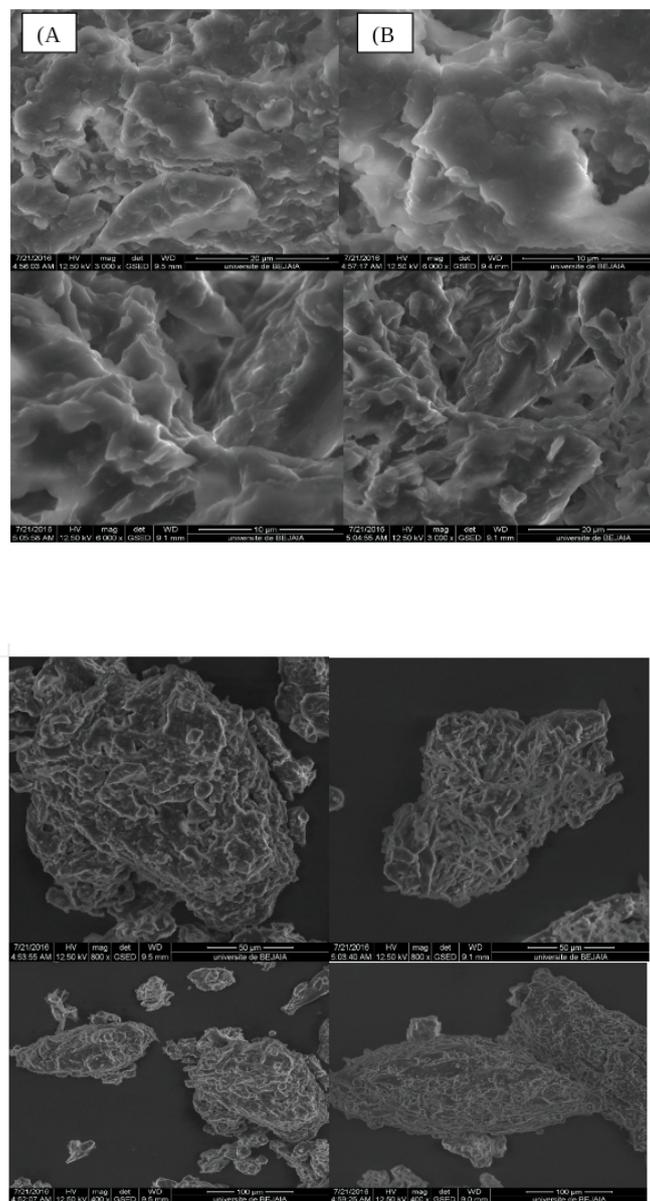


FIGURE 37 – Images au microscope électronique à balayage de la poudre du noyau d'olive avant (A) et après (B) l'extraction par EAM.

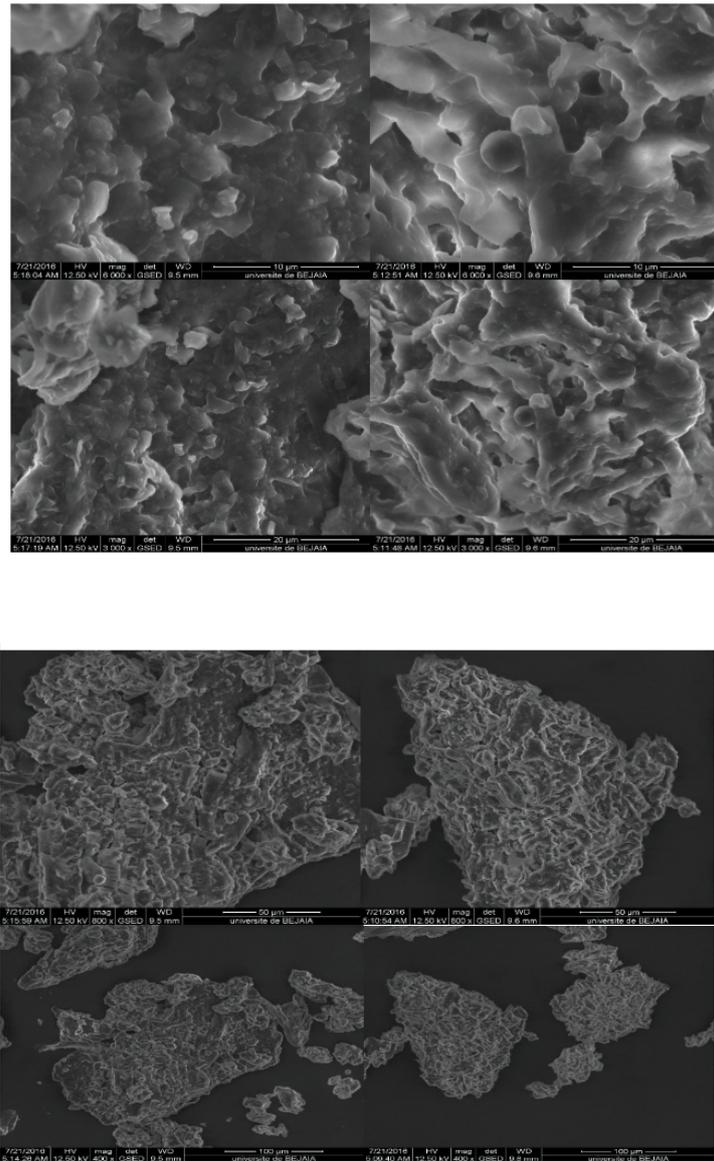


FIGURE 38 – Images au microscope électronique à balayage de la poudre de pulpe d'olive avant (A) et après extraction par EAM.

L'observation de grignons d'olive (pulpe et noyau) révèle des particules compactes individualisées avec une large distribution de taille allant d'environ de 50 à 100 μm . En effet, la forme des particules n'est pas uniforme et semble englober principalement deux populations, dont la première présente une forme granulaire avec une faible granulométrie (inférieure ou égale 50 μm), tandis que la seconde comprend des particules elliptiques. Nous pouvons constater que le traitement chimique favorise un bon mouillage et la surface de la poudre est complètement différente de la poudre avant l'extraction (non traitée).

Deuxième partie

Support animal

5.3 Description du dispositif expérimental

L'étude de l'étiologie et de la prévalence de la coccidiose chez le poulet de chair est dans le but d'évaluer la sensibilité et/ou la résistance des espèces d'*Eimeria spp.* d'un pool d'isolats, prélevé dans les différentes régions de Bejaia à des molécules bioactives extraites des co-produits oléicoles (feuille ; pulpe ; noyau).

5.3.1 Origines des isolats

Il est important de noter que les sites d'élevages qui ont fait l'objet de l'étude sont désignés aléatoirement. La suspension parasitaire est isolée à partir d'un pool d'isolats d'*Eimeria spp.*(de terrain) et du contenu intestinal ,prélevée sur 19 cas positifs (des 35 élevages) de poulet de chair infecté naturellement, de taille variant entre 1000 et 2000 sujets et répartis sur différentes régions de la wilaya de Bejaia.

5.3.2 Matériels de laboratoire

Nous avons utilisé le matériel courant de laboratoire :

- Des tubes à essai, - une centrifugeuse, - une balance ordinaire,
- des béchers gradués : 100ml, - des passoires, - compresses de gaze,
- un microscopique optique de marque NIKON, - des lames porte-objet, - des lamelles,
- un compte-goutte, - des spatules, - des boîtes de pétri portant les coordonnées de chaque échantillon,
- des baguettes de verre, - une trousse d'autopsie, - des plateaux,
- une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl à 35-40%),
- un mortier et un pilon,
- des gants, des flacons de dimension identique et des sachets en plastique.

5.3.3 Echantillonnage

Les prélèvements sont réalisés suivant la disponibilité des cas infectés. L'étude est menée de mois février au mois décembre 2016. Les sites d'élevages ne sont pas tous prospectés et certains échantillons sont procurés selon le diagnostic des vétérinaires sur la base d'une mortalité anormale associée à la boiterie, diarrhée, diminution de l'ingestion d'aliments et de poids corporel, comme le montre la figure (39).



FIGURE 39 – Site de prospection et échantillonnage des sujets atteints de coccidiose.

Renseignements sur l'âge des oiseaux, l'histoire de la diarrhée et d'autres caractéristiques du poulet sont recueillies auprès des éleveurs. L'âge des oiseaux sélectionnés est compris entre 1 et 50 jours. Les échantillons de la litière et du contenu intestinal (grêle et le caecum) sont prélevés au hasard (147 et 109, respectivement). Les matières fécales des litières sont recueillies auprès de différents endroits dans des enclos pour assurer la répétabilité. Ainsi que des autopsies de suspects sujets d'âge différent (5-48 jours) sont effectués afin de récupérer les différentes parties du tube digestif qui sont emballées dans des sacs plastiques sans aucune protection hygiénique. Tous les échantillons sont conservés à +4 °C jusqu'à l'analyse.

La validation du questionnaire et l'uniformisation de la conduite de la pratique sont nécessaires pour déterminer les conditions de travail. Lors des visites des exploitations, une fiche est établie qui comprend (historique, bâtiment, équipement, qualité de l'eau et des aliments, origine des animaux, méthode de prophylaxie, pathologie fréquente...).

5.3.4 Examen coprologique

Nécropsie et parasitologie sont effectuées à l'aide de méthodes standardisées au laboratoire Associé en Ecosystèmes Marin et Aquacole, Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

5.3.4.1 Examen post-mortem

Le tractus gastro-intestinal des oiseaux sacrifiés est examiné macroscopiquement à l'aide d'une loupe à la recherche des lésions pathologiques. Les différents segments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et du gros intestin (caecum et colo rectum) (figure 40) sont séparés et coupés selon le fragment à étudier.

Les premières moitiés des segments intestinaux sont placées dans des sacs en polyéthylène, étiquetées et immédiatement apportées au laboratoire pour un frottis intestinal, tandis que les autres moitiés sont placées dans des bouteilles contenant 10% de formol, puis apportées au laboratoire d'histopathologie du Département de Médecine, Université A. Mira, Bejaia, pour l'examen histopathologique.

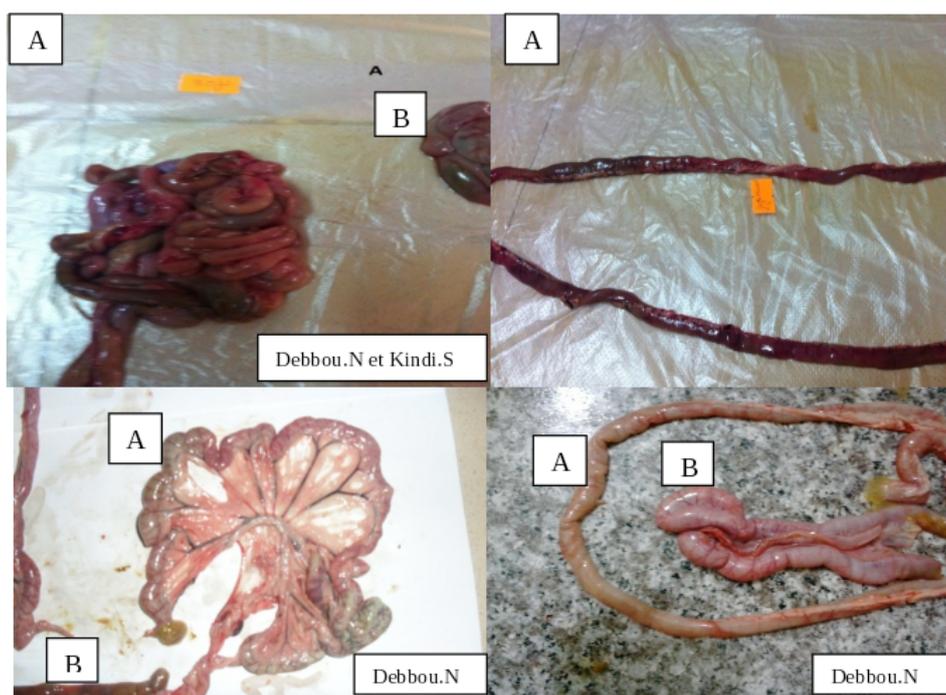


FIGURE 40 – Les différents segments intestinaux (A) : intestin grêle ; (B) le caecum.

5.3.4.2 Examen coprologique

5.3.4.2.1 A-Examen macroscopique Sur 109 intestins collectés, 78 cas positifs sont sélectionnés. Une incision de la cavité abdominale est pratiquée pour récupérer les viscères afin d'identifier et d'observer macroscopiquement les différents segments intestinaux. La loupe est utilisée pour examiner les deux faces (interne et externe) des intestins, puis le rinçage de ces derniers est effectué à l'eau courante du robinet pour éliminer les traces de sang.

Après l'examen des surfaces intestinales (intestin grêle et caecum) ; à l'aide d'une lame de scalpel (Lobago et al., 2005) (figure 41), les intestins sont ouverts à différents endroits (c.à.d. duodénum, moyen intestin au-dessus et au-dessous du diverticule du meckel, intestin inférieur et caeca) ; la matière fécale est récupérée par grattage profond à différents niveaux des intestins à plusieurs endroits afin d'amasser le maximum (Conway et McKenzie., 2007).

5.3.4.2.2 B-Diagnostic nécroscopique L'examen des raclures intestinales des segments (intestin grêle et les ceaca) confirment la présence de la parasitose en question par les lésions caractéristiques de la coccidiose. Le score des lésions (SL) est estimé en fonction de l'échelle de (Johnson et Reid., 1970). La gravité de la lésion est évaluée comme l'un des cinq rangs compris entre 0 (aucune lésion grossière) et 4 (lésion grossière la plus sévère) sur diverses parties de l'intestin. La couleur épithéliale, l'accumulation du liquide et l'aspect général (épaisseur de la paroi intestinale; gonflement; érosion et dilatation des muqueuses; présence ou absence des pétéchies ainsi que leur couleur; etc) sont pris en compte pour évaluer la gravité de l'infection (figure 41).



FIGURE 41 – Examen macroscopique des intestins (grêle et ceacum)

5.3.4.2.3 C-Examen microscopique Les raclats de chaque segment intestinal et les matières fécales des litières sont immergés dans de l'eau distillée séparément et homogénéisés à l'aide d'un pilon. Toutes les préparations issues du contenu intestinal sont filtrées à l'aide d'une (voire deux) compresse (s) de gaze pour éliminer les débris importants (Bowman., 1999). La suspension retirée de chaque endroit, à la surface et en profondeur des segments intestinaux, est placée entre la lame et lamelle pour être observée au microscope optique au Gx40 (Bowman., 1999) afin de confirmer la présence ou l'absence des oocystes (figure 42). Les matières fécales issues des litières sont traitées également de la sorte.

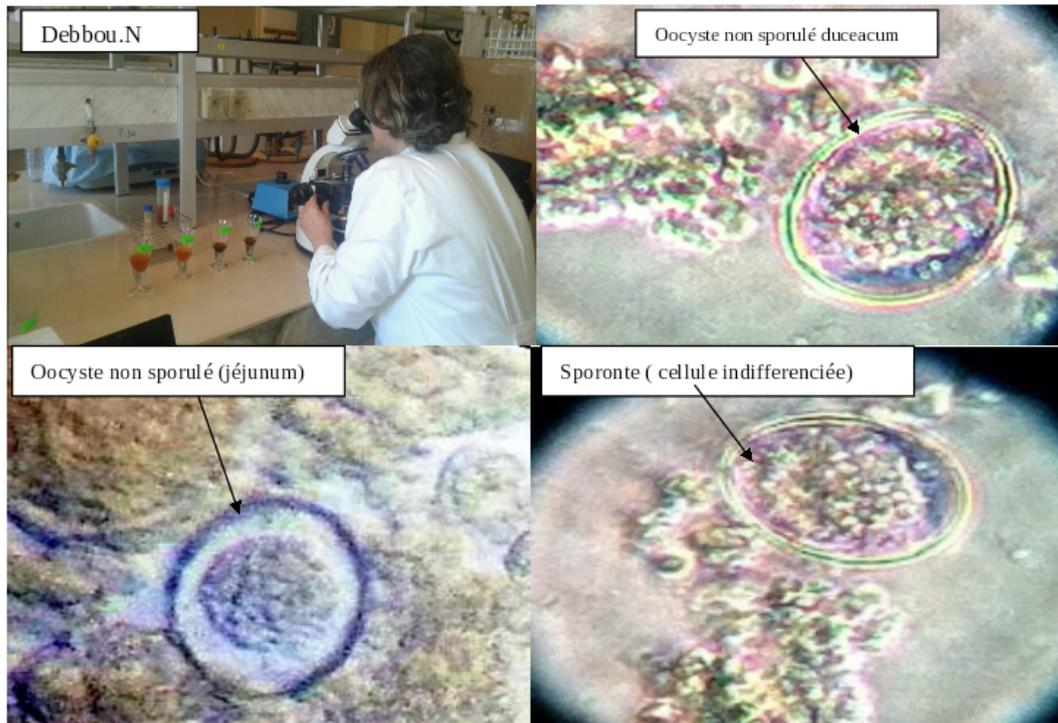


FIGURE 42 – Observation des oocystes d'*Eimeria* isolés à partir du jéjunum et du caecum du poulet de chair au microscope optique G X40.

5.3.4.2.4 D-Conservation des parasites Après avoir confirmé la présence des parasites coccidiens d'*Eimeria spp.* le contenu de chaque segment intestinal est pesé et émersé dans du bichromate de potassium à 2,5% comme solution de conservation à un ratio de 10ml/ 2g de matière fécale.

Les préparations sont homogénéisées sur agitateur magnétique et conservées à une température de 4-10°C pour des analyses ultérieures (Conway and McKenzie., 2007).

5.3.4.2.5 E-Méthode de flottaison (Analyse qualitative) Il s'agit de la méthode coproscopique qualitative la plus utilisée. Son principe consiste en la concentration des éléments parasitaires, confinés dans une petite quantité de fèces mélangée à un liquide dense (de densité supérieure à celle de la plupart des éléments parasitaires) (Euzéby., 1981), afin que sous l'action de la pesanteur ou de la centrifugation, les débris sédimentent (Hendrix, 1998) dans le culot, tandis que les éléments parasitaires remontent à la surface du liquide où ils sont recueillis puis identifiés. Cette méthode est appliquée sur les échantillons (contenu intestinal et la litière) tout en appliquant la méthode de (Soulsby, 1986).

Protocole

- Les échantillons sont soigneusement mélangés à l'eau propre puis homogénéisés manuellement ;
- trituration de 5g débris (litière) et 2g (contenu intestinal) dans (175;70-75) ml d'eau qui sont laissés sédimenter toute la nuit pour éliminer les gros débris (cas de litière). Le lendemain matin, le surnageant est éliminé, puis centrifugé à 3200 tours/ 15min ;
- le culot est récupéré et additionné à un volume de 35 ml de solution saturée de NaCl (35 à 40%), puis agité et centrifugé ;
- la préparation est laissée quelques minutes avant le comptage (2 à 3 min ;10 à 15 min sont nécessaires) pour la montée des oocystes), récupération de surnageant et addition de 35ml d'eau distillée puis centrifugation (lavage des oocystes et élimination du NaCl) ;
- après toutes ces étapes, une partie des oocystes obtenus est conservée dans de bichromate de potassium (2,5%) à +4°C pour la mise en sporulation selon deux méthodes : Bain- marie, méthode décrite par (Wegenbach et Burns., 1969) et à l'air libre, méthode de (Al-Quraishy et al., 2009) et l'autre partie pour le dénombrement.

La quantité appropriée de filtrat est transférée à l'aide d'une pipette pasteur à une lame McMaster pour le comptage des oocystes d'*Eimeria* (Conway et McKenzie 2007 ; Haug et al. 2008), Le nombre d'oocystes dans chaque zone lignée, multiplié par le facteur de dilution, représente le nombre par gramme de l'échantillon initial prélevé.

5.3.4.2.6 F-Purification et sporulation des oocystes La suspension parasitaire d'oocystes est isolée par flottation et purifiée par l'addition d'un antibactérien neutre (PenicillinV, Stréptomycine) et d'un antifongique (Fluconazole) (Yvore et Coudret., 1972 ; Remmal et al., 2011) pour prévenir l'évolution bactérienne et celle des champignons. Des oocystes sont incubés à 29°C dans un bain-marie agitateur (Wegenbach et Burns., 1969) pendant 72 heures mais sans l'ajout de l'antibactérien et l'antifongique afin d'éviter toute dénaturation et à l'air libre (Al-Quraishy et al., 2009 ; Carvalho e al., 2011) pour une période donnée. La lecture au microscope se fait d'un temps à l'autre afin de vérifier le taux de sporulation selon les deux méthodes. Le taux de sporulation est plus important en utilisant la méthode à l'air libre avec un pourcentage de (90,81%) et une période de trois (3) semaines et deux (2) jours qu'avec la méthode au bain marie (figure 43).

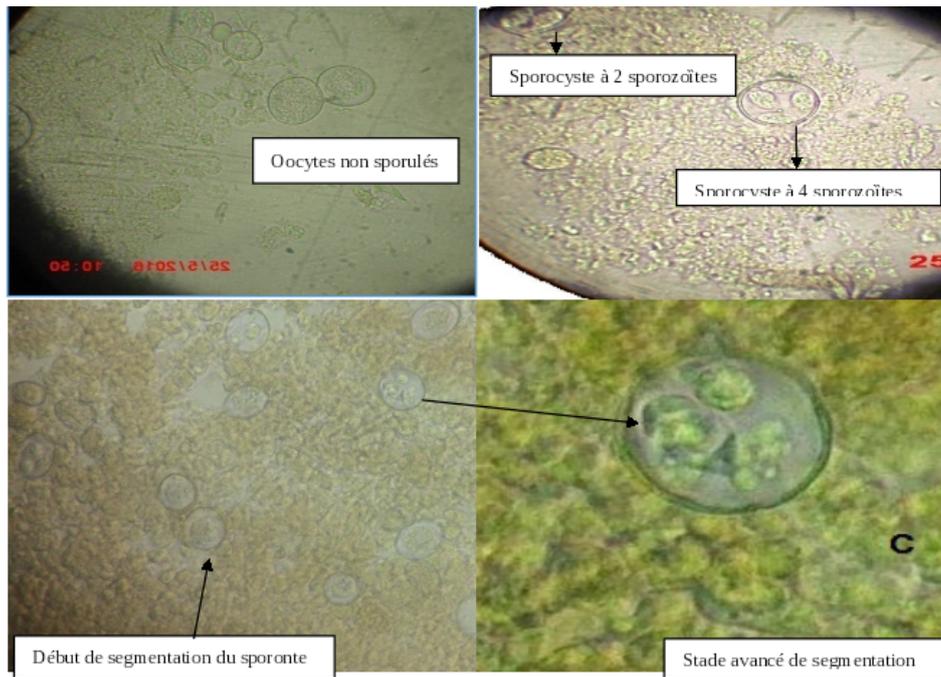


FIGURE 43 – Les différents stades de sporulation des oocystes de différentes espèces d'*Eimeria spp.*

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). À l'issue de l'incubation des oocystes, le taux de sporulation est vérifié par le décompte des oocystes sporulés en procédant à trois lectures aux grossissements (Gx 40).

5.3.4.3 Analyse quantitative par méthode McMaster

Cette méthode est facilement réalisable et elle est utilisée pour estimer le niveau d'infestation sur la base d'un comptage d'œufs par gramme de fèces (OPG) (Conway et McKenzie., 2007 ; Haug et al., 2008). La méthode de MacMaster implique de réaliser une dilution, sachant que la lame est composée de deux compartiments de 0,15mL de volume chacun. Ainsi, pour réaliser le comptage, 5 et 2 grammes de fèces sont dilués au 1/15e dans une solution salée, chlorure de sodium (NaCl) à saturation. Les matières fécales sont alors homogénéisées dans le volume adéquat de solution puis filtrées pour éliminer les débris de grandes tailles. nous remplissons ensuite les deux compartiments de la lame de MacMaster. La lecture se fait 2 à 3 min ; 10 à 15min après que la lame soit préparée pour permettre aux œufs d'adhérer au plafond du compartiment. Il est à noter de ne pas interpréter une lame préparée depuis plusieurs dizaines de minutes car il apparaît que les œufs de certains parasites résistent mal à la pression osmotique exercée par la solution salée. La lecture de la lame se fait au grossissement (Gx10) et doit concerner les cellules des 2 compartiments.

Un grossissement (Gx40 et Gx100) plus important peut être utilisé pour une identification plus précise des éléments parasitaires. Dans cette étude, le (Gx10) est emprunté pour détecter la présence parasitaire et le Gx40 pour la précision. Si la différence entre le nombre d'œufs comptés dans chaque compartiment excède 20 %, cela signifie que l'homogénéisation n'est pas correctement réalisée et il est préférable de recommencer le protocole. Le nombre total d'œufs comptés par parasite doit être multiplié par un coefficient (qui dépend de la masse de matière fécale examinée et du volume de liquide dense utilisé) pour obtenir un nombre d'œufs par gramme de fèces selon l'équation (5.4).

OPG=nombre d'oocystes dans les 2 chambres x 50.

$$X = \frac{N \cdot 100}{0,15 \cdot 2} \quad (5.4)$$

X : Nombre d'oocystes / ml de la suspension étudiée.

N : Nombre d'oocystes calculés dans les deux compartiments de la cellule McMaster. 100 : Dilution de la suspension mère dans la solution saturée de NaCl.

0.15 : Volume de chaque réseau.

Remarque sur le calcul : Sachant que les fèces sont diluées au 1/15_e et qu'un compartiment est égal à 0,15mL, le nombre d'œufs dans un compartiment équivaut au nombre d'œufs présents dans 1/100_e de gramme de fèces. On multiplie donc le nombre obtenu pour un compartiment par 100 ou bien la moyenne obtenue pour les deux compartiments par 50 pour obtenir le nombre d'œufs par gramme (opg) (Taylor et al., 1995).

NB : Si la charge d'oocystes est très importante, on doit procéder à 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).

Le taux de sporulation est calculé selon l'équation (5.5) :

$$X = \frac{(N \text{ oocystes sporulés} \times 100) / N \text{ oocystes calculés}}{\text{des 2 quadrillages}} \quad (5.5)$$

-N oocystes sporulés (total du quadrillage1 + total du quadrillage2) - N non sporulés des 2 quadrillages N oocystes calculés.

5.3.4.4 Identification des espèces coccidiennes

L'identification des espèces d'*Eimeria* chez le poulet de chair est effectuée sur la base de certains critères tels que : la taille, la forme, la présence ou absence de micropyle et le temps de sporulation (Carvalho et al., 2011 ; Long et Reid 1982 ; Soulsby, 1982). La localisation intestinale (McDougald , 2003) et l'apparence des caractéristiques macroscopiques des lésions (Johnson et Reid, 1970) sont également prises en compte dans cette étude. La méthode traditionnelle, la morpho-métrique où on mesure la longueur, largeur et l'index (longueur / largeur) et faire la comparaison avec les tailles décrites par (Reid et al., 1978) est mise en œuvre . Au moins 100 oocystes sont examinés au magnification x 40 (Waldenstedt et al., 2001) pour valider l'identification .

Cette méthode nécessite les outils suivants :

5.3.4.4.1 L'oculaire micrométrique : Le micromètre oculaire est un disque en verre de grossissement commercial ($\times 10$) sur lequel est gravée une échelle comprenant 100 divisions (graduations), de valeur arbitraire, c'est à dire les divisions du micromètre oculaire sont équidistantes mais leur écartement n'est pas connu (figure 44.A). C'est un oculaire classique dont la lentille inférieure comporte un segment gradué. Ce dernier est gradué de 0 à 10 unités arbitraires (UA) et entre chaque repère d'UA (0, 1, 2, ...) se succèdent des graduations espacées de 0,1 UA (figure 44.B). On utilisera donc ces graduations pour déterminer les dimensions réelles d'un objet.

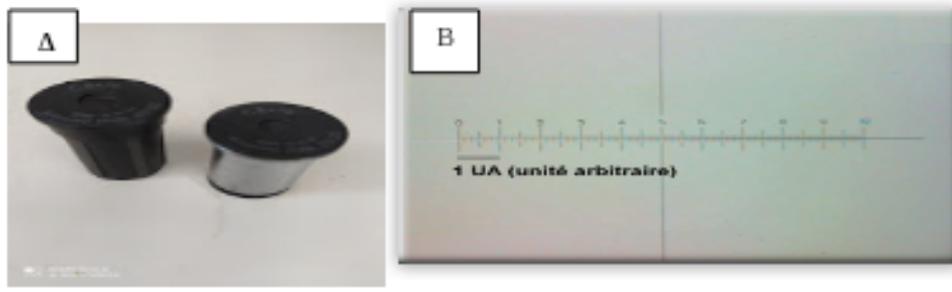


FIGURE 44 – (A) micromètre oculaire ; (B) Graduation de la lentille inférieure.

L'échelle du micromètre oculaire inconnue est calibrée avec un micromètre objectif selon (OMS., 1997).

5.3.4.4.2 L'oculaire micrométrique : Appelée encore micromètre objet, est une lame en verre gravée et étalonnée qui donne la référence des dimensions. Divisée en fractions de 0.1 mm, elle même subdivisée en fractions de 0.01 mm, elle permet d'étalonner l'oculaire micrométrique avant d'effectuer les mesures sur des objets (figure 45). À l'œil nu, on ne distingue presque rien sur la plaque, l'échelle est placée dans le cercle de la lame étalon.

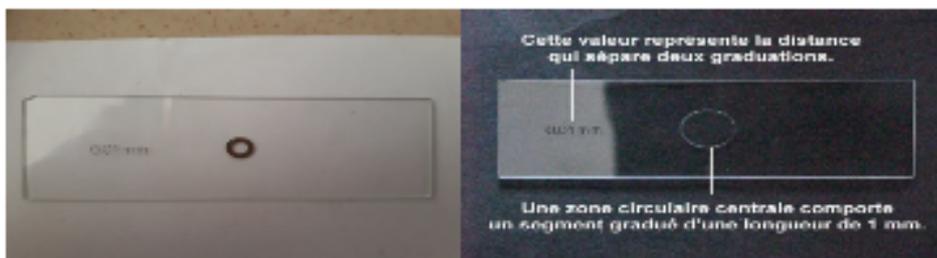


FIGURE 45 – lame micrométrique.

Le cercle centrale est un segment gradué de 1mm, et chaque espace de 0,1UA et entre deux graduations $0,01\text{mm} = 10\mu\text{m}$, $100\text{graduations} = 1\text{mm} = 1000\mu\text{m}$.

5.3.4.4.3 Protocole d'étalonnage : Etalonner l'oculaire micrométrique, consiste à répondre à la question : « En utilisant l'objectif (x)... du microscope, à quelle taille réelle correspond une unité arbitraire de l'oculaire micrométrique ? » L'étalonnage doit être réalisé pour chaque objectif du microscope. Il peut être effectué à la première séance de microscopie. Les résultats restent valables pour les séances ultérieures sur le même modèle de microscope. La figure (46) illustre l'étalonnage de l'oculaire micrométrique.

- Mettre en place la lame micrométrique et l'oculaire micrométrique.
- Mettre en place l'objectif choisi pour effectuer l'étalonnage.
- Effectuer la mise au point sur les graduations de la lame.
- Aligner et orienter les deux graduations de sorte que leurs origines se correspondent.
- Méthode : déplacer la lame micrométrique à l'aide du chariot du microscope et tourner l'oculaire micrométrique.
- La lecture des deux graduations superposées permet d'établir la correspondance entre une longueur en unités arbitraires de l'oculaire et une taille réelle en μm

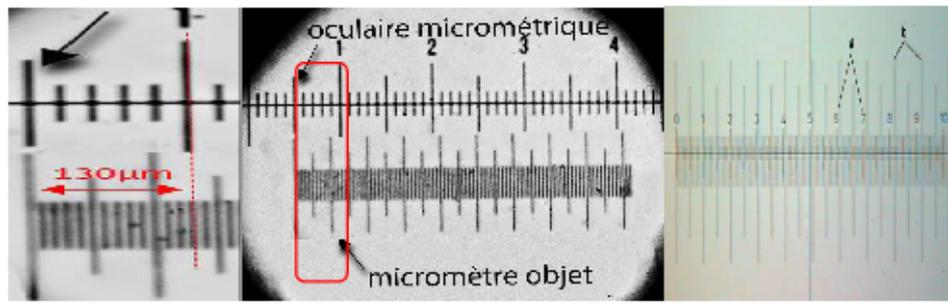


FIGURE 46 – Superposition des graduations de l'oculaire et lame micrométrique
 a : graduations de l'oculaire ; b : graduations de la lame (Gx10).
 On a 5UA correspondent à 130m ; 1UA correspond à 26 μm

5.3.4.4.4 Mesures :

- Choisir l'objectif approprié pour l'observation et la mesure. La précision de la mesure sera d'autant plus grande qu'elle se fera avec un objectif de plus fort grossissement.
- Effectuer la mise au point sur l'objet à mesurer.
- Déplacer la lame à l'aide du chariot guide-objet et orienter l'oculaire de sorte que le bord de l'objet à mesurer coïncide avec la graduation 0 UA.
- Mesurer l'objet en UA.
- À l'aide des données fournies par l'étalonnage, convertir la taille mesurée en UA en taille réelle (μm).

À titre d'exemple

Lame présente 9,6 sous unités ; $960\mu m$; 1 EPU $9,6\mu m$. Dans ce travail, la superposition de la lame et l'oculaire a donné l'unité réelle, c'est-à-dire 60 divisions = 0,96 mm, 10 divisions = 0,16mm et donc, 1 division de l'oculaire = $0,96/60 = 0,016mm = 16\mu m$. L'opération est répétée trois fois sous l'objectif (G) x40.

5.3.4.5 Examen histopathologique

Les tissus des différents segments intestinaux sont conservés dans du formol à 10% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Le traitement est réalisé selon ces étapes :

5.3.4.5.1 Fixation : Cette fixation a pour but d'éliminer le risque de rétraction et de distorsion afin de prévenir la protection contre les attaques bactériennes. On peut résumer que la fixation a trois buts principaux : coaguler, précipiter et insolubiliser les fragments intestinaux. Les fragments (caecum et intestins grêle) lavés à l'eau abondante, coupés puis immergés dans du formol à 10% pendant 5 jours (Didi et Villate, 2001) pour éviter l'apparition des altérations cadavériques. Le choix du formol comme meilleur fixateur est lié à sa capacité de fixer des grandes pièces sans dissection et à sa pénétration rapide dans les tissus.

5.3.4.5.2 Post fixation : Enlever les pièces fixées et les mettre sous l'eau de robinet pendant au moins trois heures puis faire des coupes de 3 à 6 fragments selon la taille de 1,5 cm et les placer dans des cassettes d'inclusion en plastique, en mentionnant au dessus la partie correspondante de l'intestin. Selon (Luna., 1968), les cassettes sont mises dans le liquide de Bouin puis placées dans l'automate. À ce niveau-là, des passages successifs dans des bains d'alcool à différentes concentrations sont effectués comme suit : -Ethanol 80% (4 heures)- Ethanol 95% (2 heures)- Ethanol 100% (1,5 heures)-Ethanol 100% (1,5 heures)-Xylène (1 heure)-Xylène (1 heure) -Paraffine (6 heures) -Paraffine (7 heures). Le but de ce passage dans l'automate est la déshydratation (passages dans des alcools, de degrés différents) ; éclaircissement (xylène) et l'imprégnation (infiltration) dans la paraffine. La durée des passages des fragments dans l'automate est de 24 heures.

5.3.4.5.3 La mise en blocs L'inclusion à la paraffine est effectuée au sein d'une étuve réglée à 55° ; les pièces sont mises dans des moules en inox puis la paraffine chauffée est versée sur ces dernières qui sont étiquetées, après le refroidissement complet, le démoulage est effectué, et les pièces sont mises en bloc et gardées au froid indéfiniment.

5.3.4.5.4 La microtomisation et le collage des coupes sur lame : Ils permettent d'obtenir des coupes dont l'épaisseur est de 5 à 7μ et de les mettre sur un support de verre transparent.

La procédure suivie est celle décrite par (Darboux, 1994) qui comporte les étapes suivantes :

- L'équarrissage par l'enlèvement à l'aide d'un couteau de l'excédent de paraffine.
- Le montage du bloc sur son support ; le bloc doit rester parallèle au couteau.
- Le dégrossissage au microtome permet d'éliminer la paraffine qui se trouve en avant du prélèvement pour obtenir une coupe entière du tissu à colorer.
- La coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à couper devant le rasoir ou couteau du microtome.
- Le collage des coupes sur une lame de verre ; sur chaque lame de verre porte-objet est gravé le numéro d'identification du bloc.

L'établissement de la coupe se fait sur une platine chauffante. La goutte d'eau gélatineuse déposée sur la lame maintient la coupe sur la lame.

5.3.4.5.5 Séchage des lames : Il se fait à l'étuve à 60°C pendant 24h, les coupes se trouvent alors recouvertes d'une fine pellicule de paraffine qui les met à l'abri de l'air et se conservent indéfiniment.

5.3.4.5.6 Coloration à l'Hématoxyline Eosine : Pour la coloration, la méthode de (Luna, 1968) est appliquée : -Xylène (2 minutes) - Ethanol 100 % (1 minute) -Ethanol 100 % (1 minute)- · Ethanol 95 % (1 minute)- Eau du robinet (10 minutes)- Hématoxyline (15 minutes)- Eau de robinet (lavage)- Acide Alcohol : 3 à 5 dips- Eau du robinet brièvement- Eau ammoniacal (ammoniac waters) : 3 à 5dips- Eau de robinet (10 à 20 minutes)- Eosine (15seconde à 2 minutes)- Ethanol 95 % (2 minutes)- Ethanol 100 % (2 minutes)- Ethanol 100% (2 minutes)-Xylène (2 minutes)- Xylène (2 minutes).

5.3.4.5.7 Lecture microscopique des lames : La lecture des lames est effectuée au microscope optique de marque (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). La figure (48 ; 49) illustrent l'état histopathologique des segments intestinaux (grêle et ceaca).

5.4 Evaluation de l'activité anticoccidienne

5.4.1 Molécules testées

Les anticoccidiens de synthèse (figure 47) utilisés dans l'expérimentation sont le Sulfaquinoxaline sodique triméthoprime, et Algicox (*Diclazuril*) qui sont testés à des concentrations recommandées. Les molécules bioactives issues des extraits naturels des co-produits oléicoles sont la pièce maîtresse de cette étude en les comparant aux polyphenols de synthèse (Quercetine et Oleuropéine).

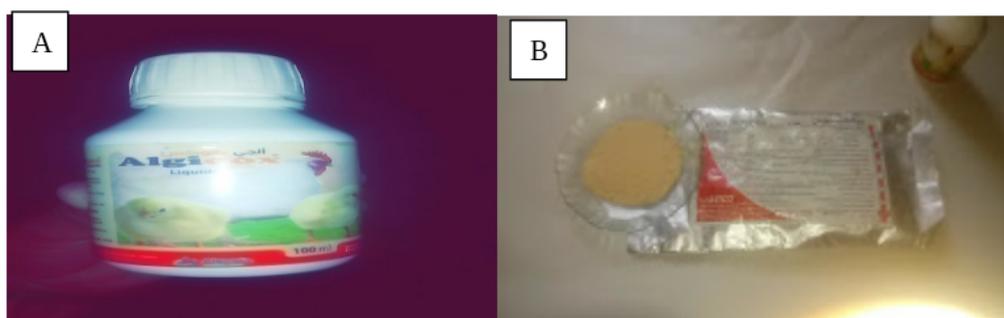


FIGURE 47 – Anticoccidiens de synthèse
A (Algicox, *Diclazuril*) ; B (Sulfaquinoxaline sodique).

Quercetine : Est un flavonoïde qui a fait l'objet de plusieurs études portant sur les effets antiparasitaires, en particulier les protozoaires. In vitro, les études de l'activité antiprotozoaire des flavonoïdes se sont concentrées sur les parasites les plus pathogènes, tels que *Plasmodium* (*P. falciparum*), *Trypanosoma* (*T. brucei*, *T. brucei gambiense* et *T. cruzi*), *Leishmania* (*L. donovani*), *Cryptosporidium* (*C. parvum*) et *Toxoplasma* (*T. gondii*) (Kerboeuf et al., 2008).

TABLE 5.10 – Molécules testées

Molécules de synthèse	Extraits de molécules (co-produits oléicoles)
<i>Diclazuril</i> (10mg/ml)	Grignon solide (noyau)
Sulfaquinoxaline sodique (0,8g/l)	Grignon pâteux (pulpe)
Standards phénoliques : Oleuropéine et Quercetine	Feuille

5.4.2 Préparation des milieux de culture

Tous les milieux de culture sont préparés au laboratoire, fraîchement pendant la réalisation des tests in vitro, dans des conditions de stérilisation adéquates.

5.4.2.1 Solution d'HBSS agar

Le milieu HBSS (Hank's Balanced Solution without sodium bicarbonate and phenol-red) est préparé dans 1000 ml d'eau distillée tout en respectant les proportions des constituants utilisés qui figurent dans le tableau (5.11).

TABLE 5.11 – Composition de la solution HBSS 9g/l

Soluté	Formule chimique	Concentration (g/l)
Chlorure de calcium (anhydre)	$CaCl_2$	0,1396
Sulfate de magnésium	$MgSO_4$	0,09767
Chlorure de potassium	KCl	0,4
Potassium phosphate monobasique (anhydre)	KH_2PO_4	0,06
Chlorure de sodium	NaCl	8,0
Sodium phosphate dibasique	Na_2HPO_4	0,04788
D-glucose	$C_6H_{12}O_6$	1,0

La solution est portée à l'agitation magnétique jusqu'à la solubilisation totale. Des substrats neutres contenant un inhibiteur (streptomycine 1 mg/ml et pénicilline V 100 UI) (Yvone et Coudret, 1972 ; Remmal, 2011 ; Alnassan et al., 2015) sont ajoutés pour prévenir toute évolution bactérienne et du Fluconazol, 17 mg/ml est utilisé comme antifongique.

La solution de l'agar à 0,2 % est préparée en parallèle et stérilisée à l'autoclave à une température de 120°C pendant 30 minutes. Les deux solutions d'HBSS et agar à volume égale (100ml) sont mélangées vigoureusement sur agitateur magnétique dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination.

Pénicilline V :antibiotique biologique, produit par un micro-organisme qui, à faible concentration, a le pouvoir d'inhiber la croissance de certaines bactéries (effet bactériostatique) ou de détruire (effet bactéricide) (Allion, 2010) ou d'autres micro-organismes. Les pénicillines se fixent sur plusieurs protéines et peuvent détruire les bactéries en activant leurs propres enzymes auto lytiques.

5.4.2.2 Solution tampon PBS (phosphate buffered saline)

Une solution d'un litre (1l) de PBS est préparée à partir des proportions (concentrations (g/l) résumées dans le tableau (5.12).

TABLE 5.12 – Composition chimique de la solution tampon PBS

Solution	Molarité	Concentration (g/l)
NaCl	137mM	8,01
KCl	2,7 mM	0,2
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$		1,13
KH_2PO_4	1,76 mM	0,2
$CaCl_2$	7mM	0,139

(Remmal et al., 2011)

À 100 ml de PBS, 100UI/ml de pénicilline, 1mg/ml de streptomycine et 17mg/ml du Fluconazol sont additionnés . Le pH est ajusté à 7,4 et la solution est ensuite stérilisée par filtration à travers des membranes de 0,2 μm de diamètre.

5.5 Etude de l'activité anticoccidienne des extraits de plantes

L'effet des extraits hydroethanoliques de feuille, pulpe et noyau sur les espèces coccidiennes, est évalué selon la méthode décrite par (Remmal et al., 2011). Les différents extraits sont dissouts dans le mélange eau/éthanol suivant la méthode d'extraction. Les anticoccidiens synthétiques (Sulfaquinoxaline sodique et Diclazuril) et les standards phénoliques (Quercetine et Oleuropéine) sont dissouts dans de l'eau distillée.

5.5.1 Effets de LC_{50} des extraits éthanoliques et des étalons sur la diminution du nombre d'oocystes

L'action lytique des extraits de (feuille, pulpe et noyau) et étalons (quercetine et oleuropéine) est étudiée en mesurant l'absorbance à 273nm du contenu cellulaire libéré par les oocystes lysés. Ce test est évalué par une incubation à différentes périodes (1; 2; 4; 6; 8; 24hrs) pour l'extrait de pulpe. Par par contre, la cinétique de destruction de l'extrait de feuille et noyau, est réalisée d'un écart de 3hs à température ambiante. Dans des épindhoffs stérilisés d'une contenance de 1 ml, on a préparé un mélange de :

- 100 μ l de la suspension parasitaire lavée contenant (1,7 -3,89 - 4,16) x 10⁶ oocystes/ml;
- 700 μ l de PBS (phosphate buffer saline) à pH 7,4; et
- 200 μ l de chaque extrait (feuille, pulpe et noyau) à des concentrations optimales : 44,001, 22,302 et 9,892 mgEAG/gms, respectivement.

Après incubation, les épindhoffs sont centrifugés à 3200 tours pendant 5 minutes (trs/min). Les surnageants récupérés (500 μ l) sont utilisés pour la lecture des absorbances à 273nm au spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Shimadzu, model : UV 100 Japan). Le blanc correcteur est composé de tous les constituants excepté la suspension parasitaire.

Enfin, les culots qui résultent de la centrifugation sont utilisés pour le dénombrement des oocystes à l'aide de la cellule type Malassez. Les étalons (quercetine et oleuropéine) sont testés parallèlement, dans les mêmes conditions à des concentrations identiques. Quant au solvant d'extraction (Ethanol), son impact sur les oocystes est pris en considération dans les mêmes conditions d'évaluation, avec des concentrations des optimums citées précédemment, 70% et à 99,9% (à sa pureté).

Ensuite, le pourcentage de destruction des oocystes sporulés est enregistré. La valeur de la concentration qui inhibe à 50% les oocystes coccidiens CI_{50} est déduite de la courbe de régression. Le nombre d'oocystes est compté 3 fois dans un volume de cellule de 1 l concernant les optimums et deux fois pour les dilutions des optimums et les anticoccidiens de synthèse (Sulfaquinoxaline et Algicox).

Les résultats sont exprimés en variation de l'absorbance à 273nm et du nombre d'oocystes en fonction des concentrations subtilisées de chaque substance testée.

5.5.2 Effet du diclazuril et sulfaquinoxaline sodique sur la diminution du nombre d'oocystes

Diclazuril® (Algicox10 mg/ml) et Coccidiopan® (Sulfaquinoxaline sodique) sont testés en deux exemplaires selon la méthode des microplaques décrite par (Remmal et al., 2011). Une microplaque de 96 puits estensemencée avec le milieu de culture HBSS-Agar à raison de :

- 140l du milieu de culture par puit ,
- 40µl de chaque concentration testée (0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 et 1mg/ml) ; et
- 20l de la suspension parasitaire contenant entre (2,32 -) x10⁶oocystes/ml).

L'opération est produite deux fois. Parallèlement, les différentes concentrations calculées à partir de l'optimum de chaque extrait, sont évaluées dans les mêmes conditions. La plaque recouverte est placée à une température ambiante pendant 24h. L'ensemble est sous l'agitation manuelle à des espaces de temps variable.

À la fin de l'incubation, le nombre des oocystes de chaque puit est déterminé à l'aide d'une cellule type Malassez (deux comptages). Les résultats sont exprimés en variation du nombre d'oocystes en fonction de la concentration de chaque extrait. CI_{50} est déterminée pour chaque extrait et standard. C'est la concentration de chaque extrait qui a pour effet de diminuer ou de détruire 50% du nombre initial des oocystes présents dans le témoin (Remmal et al., 2011). Le nombre d'oocystes est compté 2 fois dans un volume de cellule de 1 µl, ce qui revient à diviser la charge oocystale ($X.10^6 / 10^2$) pour avoir $X.10^4$ dans les deux méthodes (microplaque et épindhoffs).

Dans cette partie, le dénombrement des oocystes présents dans l'échantillon initial (le témoin), mais également ceux testés avec les extraits de (feuille, pulpe et noyau), ainsi que ceux testés avec les standards et les anticoccidiens de synthèse au cours de cette étude, est réalisé à laide de la lame hématocytomètre de type Malassez (Conway and McKenzie, 2007).

Méthode hémocytométrique :

La méthode de l'hémocytomètre permet de distinguer des oocystes sporulés et d'effectuer des mesures précises des oocystes au moment du comptage (Conway et McKenzie, 2007).

Préparation des échantillons à compter à l'aide de la méthode hémocytométrique est la même que celle utilisée pour la méthode McMaster.

Les particularités du comptage est la seule étape qui diffère (Conway et Mcenzie., 2007). C'est une lame microscopique en verre épaisse contient deux chambres séparées et quadrillées à un volume connu. La cellule comporte 100 rectangles, 25 rectangles sont divisés en 20 petits carrés, la chambre a un volume totale de $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}$ (annexe I).

Pour effectuer un dénombrement, il faut faire adhérer la lamelle aux plateaux latéraux, la suspension après homogénéisation est introduite par capillarité en plaçant la pointe de la pipette inclinée près de la lamelle. Laisser reposer la suspension quelques minutes pour permettre aux bulles d'air de s'échapper et aux oocystes de remonter à la surface du liquide d'enrichissement.

Vérifier la répartition homogène des oocystes au grossissement GX 10 et GX 40, ensuite, faire le comptage dans les quatre rectangles des angles plus un rectangle au centre pour chaque chambre. Une fois le comptage est fait, le nombre moyen des oocystes présent est multiplié par 100 et par le facteur de dilution pour trouver le nombre des oocystes par $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}$. Si le liquide s'échappe de la zone dans les deux abreuvoirs, la diapositive ne doit pas être comptée, mais nettoyée et remplie à nouveau.

5.6 Analyse de l'étude histologique des intestins

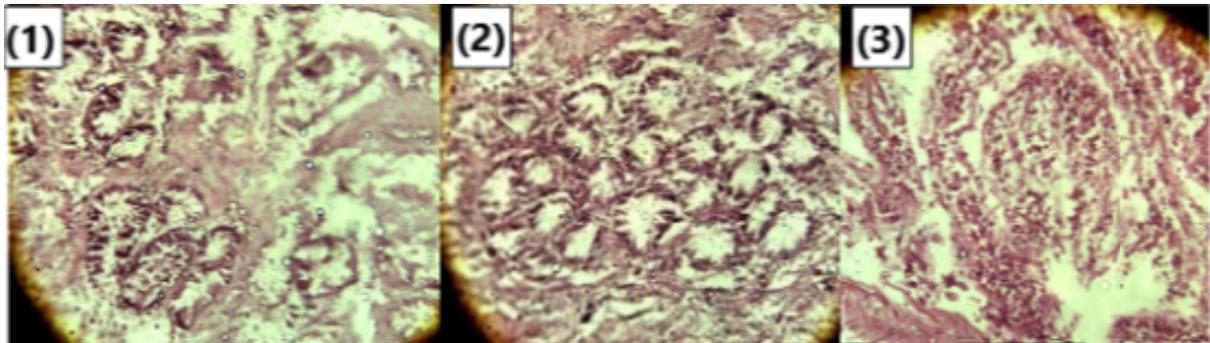


FIGURE 48 – Observation microscopique d'une coupe histologique du jejunum du poulet de chair(X40)

(1) : presence des coccidies d'*Eimeria spp.* au niveau de la lumiere intestinale, (2) : des coccidies au niveau du mucus epithelial (3) : perte de la muqueuse intestinale



FIGURE 49 – Observation microscopique d'une coupe histologique du caecum infecté par les coccidies d'*E. tenella* chez le poulet de chair(GX40).

L'examen sous microscope optique des coupes histologiques des segments intestinaux (ceacum et grêle) prélevés d'individus symptomatiques, révèle un nombre très élevé de coccidies dans la lumière et le mucus épithélial de ces derniers.

5.7 Analyse statistique

Les données sont analysées dans un premier temps par Microsoft Office Excel 2007 pour obtenir la prévalence des oocystes coccidiens. Une analyse statistique est réalisée à l'aide de JMP®.Software, version 7.0 (SAS Institute Inc, 2007).

Le test t est utilisé pour comparer la prévalence d'Eimeria spp. La coccidiose est analysée en fonction de l'âge (1-10 jours; 11-20 jours; 21-30 jours; 31-40; 41-50 jours) en tant que facteur de variation et l'évaluation de l'activité antioxydante et anticoccidienne des extraits (à de différentes périodes) par le même test et leurs concentrations inhibitrices CI_{50} sont définies et calculées par la courbe de régression. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SE. L'analyse statistique est effectuée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA). Les valeurs sont statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$.

Résultats

Résultats

Dans cette partie, nous abordons l'étude du parasitisme interne, la prévalence des espèces d'Eimeria (globale et par espèce) et l'identification de ces dernières qui règnent dans les différentes localités de la wilaya de Bejaia. L'évaluation de l'activité anticoccidienne des extraits naturels, des standards phénoliques et des anticoccidiens de synthèse a fait la pièce maîtresse de cette étude.

6.1 Etude du parasitisme

Pathologie (lésions et scores lésionnels)

L'étude est basée sur quelques critères .Le score lésionnel établi par l'échelle décrite par (Johnson et Reid., 1970),qui est une notation permettant de classer numériquement les lésions macroscopiques causées par les coccidies.

De façon générale, l'état des différentes parties intestinales qui ont fait l'objet de l'étude est visiblement détérioré par l'infection parasitaire.

Intestin grêle : hypertrophie de l'intestin (intestin ballonné), mucus parfois abondant de consistance variable (du mou au semi solide) selon le cas et de couleur qui vire du jaunâtre au verdâtre et les pétéchies d'une grosseur variable et de couleur plus au moins différente.

Caecum : paroi épaissie et parfois très dilatée avec une couleur rouge-brun, des hémorragies et des caillots de sang envahissent la lumière caecale.(Résultats figurent dans l'article 1)

Prevalence and aetiology of coccidiosis in broiler chickens in Bejaia province, Algeria



Authors:

Nedjima Debbou-louknane¹
Hama Benbarek²
Abdelhanine Ayad¹ 

Affiliations:

¹Department of Environment
Biological Sciences,
University Abderrahmane
Mira Bejaia, Algeria

²Department of Agricultural
Sciences, University Mustapha
Stambouli, Mascara, Algeria

Corresponding author:

Abdelhanine Ayad,
hanine06@gmail.com

Dates:

Received: 01 Dec. 2017

Accepted: 08 Aug. 2018

Published: 18 Sept. 2018

How to cite this article:

Debbou-louknane, N.,
Benbarek, H. & Ayad, A., 2018,
'Prevalence and aetiology of
coccidiosis in broiler chickens
in Bejaia province, Algeria',
*Onderstepoort Journal of
Veterinary Research* 85(1),
a1590. [https://doi.org/
10.4102/ojvr.v85i1.1590](https://doi.org/10.4102/ojvr.v85i1.1590)

Copyright:

© 2018. The Authors.
Licensee: AOSIS. This work
is licensed under the
Creative Commons
Attribution License.

The prevalence of coccidiosis was determined and *Eimeria* species were identified in farms at different locations in the Bejaia region, Algeria. The study was conducted from February to December 2016. Unvaccinated birds were selected randomly. Samples from litter and faeces were collected randomly (147 and 109, respectively). Necropsy and parasitological examinations were carried out using standard methods. Of the samples examined, 93 out of the 147 litter samples and 78 out of the 109 intestinal content samples were infected with *Eimeria* oocysts (63.26% and 71.55%, respectively). Mixed infections with *Eimeria* spp. were observed in some of the positive farms, with an overall prevalence of 54.28%. Five species of *Eimeria* (viz. *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti* and *E. mitis*) were identified with different indices. *Eimeria acervulina* followed by *E. tenella* were the predominant species infecting chickens at the farms visited (32.05% and 26.92%, respectively). The significant highest rate of *Eimeria* spp. was *E. Acervulina* ($p < 0.05$). This study demonstrated that coccidiosis is an omnipresent parasitic intestinal disease. It could strongly decrease production performance in broiler chickens.

Introduction

In Algeria, the poultry sector represents a significant portion of the agricultural economy, with 9.84% of animal production (Rachid 2011). In addition, poultry breeding produces annually an average of 340 000 tons of white meat and over 4.8 billion eggs (Alloui & Bennoune 2013). According to the Provincial Direction of Agricultural Services, a large part of the poultry sector is concentrated in the northern provinces of the country, mainly in Bejaia. It is one of the best sources of high biological value animal protein. In the last years, the Algerian authority has adopted a policy to improve the livestock production sector through intensification of poultry production to satisfy consumer need and ensure food security.

Avian coccidiosis is defined as an enteric parasitic pathology caused by the protozoa *Eimeria* spp. It affects the epithelial cells of birds between the ages of 3 and 18 weeks (Nematollahi, Moghaddam & Farshbaf Pourabad 2009; Toulah 2007). Coccidiosis is one of the major causes of poor performance and productivity loss in poultry and other farm animals (Bachaya et al. 2012; Lin, Decuypere & Johan 2006; Mujahid, Akiba & Toyomizu 2007). This disease is endemic in most tropical and subtropical regions. It is favoured by ecological and management conditions (Obasi, Ifut & Offong 2006).

Coccidiosis is recognised as the parasitic disease with the greatest economic impact on poultry industries worldwide (Allen & Fetterer 2002). It causes important production losses and costs treatment or prevention (Shirley, Smith & Tomley 2005). According to Chapman (2009), coccidiosis may cause the US (United States) chicken industry about \$127 million annually. Because of these huge economic losses, coccidiosis has become a major problem in poultry farms worldwide. It is pertinent to continually evaluate the prevalence and the management of this pathology. In Algeria, this disease is poorly documented (Triki-Yamani & Bachir Pacha 2010; Triki-Yamani et al. 2014). That is why it is difficult to assess its magnitude and impact on production costs. The objective of this investigation was to determine the prevalence of coccidiosis and to diagnose the *Eimeria* spp. on farms at different locations in Bejaia province, Algeria. The ultimate goal was to constitute a scientific basis for this disease in the country.

Materials and methods

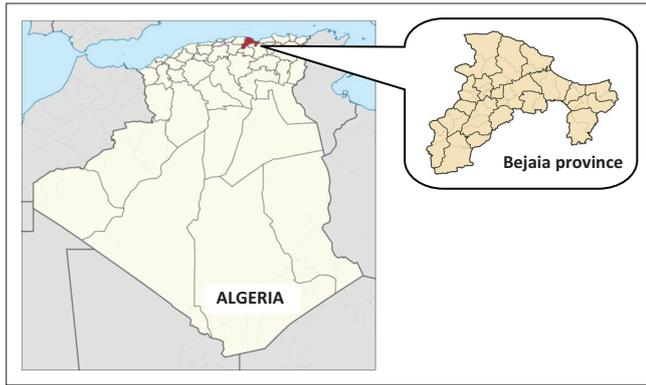
Study area

The study was carried out in different localities of Bejaia province, Algeria (36°43'N, 5°04'W) (Figure 1). It has an area of 326 826 km² with a poultry population of 3 291 050. The annual winter

Read online:



Scan this QR
code with your
smart phone or
mobile device
to read online.



Source: https://fr.wikipedia.org/wiki/Communes_de_la_wilaya_de_B%C3%A9ja%C3%AFA

FIGURE 1: Map of the study area, Bejaia (Algeria).

rainfall in the region averages 680 mm. The mean maximum summer temperature reaches 25.3 °C (August) and the mean minimum winter temperature falls to 13.4 °C (March). The monthly rainfall and mean temperature during the period of the present study are presented in Table 1.

Animals and sampling

The study was conducted from February to December 2016. Thirty-five poultry farms were visited. Each farm has an average capacity of 2000 broiler chickens. The flocks were visited on the basis of abnormal mortality associated with lameness, diarrhoea, decreased feed intake and low body weight. Information regarding the age of birds, history of diarrhoea and other chicken characteristics was collected from farmers. The bird age selected was from 1 to 50 days old. Unvaccinated birds were selected randomly. Samples from litter and faeces were collected randomly (147 and 109, respectively). The faecal samples from the farms visited during the study period were collected from different locations in the pens to ensure repeatability. All samples were kept at +4 °C until analysis. Necropsy and parasitological examinations were carried out using standard methods at the Laboratory of Animal Biology, University of Bejaia.

Sample examination

All the intestines and caeca were examined carefully for the presence of *Eimeria* oocysts and external lesions. The intestines were cut open using a scalpel blade (Lobago, Worku & Wossene 2005) and the gut contents were microscopically examined by flotation technique (Soulsby 1986). The positive samples were kept in a 2.5% aqueous solution of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) for sporulation as described by Al-Quraishy, Abdel-Baki and Dkhil (2009). Counting of oocysts was done using the McMaster counting technique and expressed as per gram of faeces (OPG [oocysts per gram]) (Conway & McKenzie 2007; Haug et al. 2008). The lesion score was based on lesion severity from 0 to 4 on various intestinal parts (Johnson & Reid 1970).

Identification of *Eimeria* species

The identification of *Eimeria* species in chickens was done on the basis of criteria such as size, shape, presence or

TABLE 1: Annual rainfall and temperature data of the Bejaia area (Algeria) during 2016.

Month	Temperature (°C)			Rainfall (mm)
	Mean	Min	Max	
January	14.1	9.0	19.2	101
February	14.7	9.5	19.8	113
March	13.4	8.4	18.3	196
April	16.2	11.8	20.6	48
May	18.6	14.1	23.2	61
June	21.9	17.4	26.4	13
July	25.0	20.6	29.3	0
August	25.3	20.7	29.8	0
September	23.9	19.1	28.8	39
October	23.2	18.2	28.2	20
November	18.0	13.1	22.8	45
December	14.6	10.2	19.1	45

Source: <https://www.infoclimat.fr/climatologie/annee/2016/bejaia/valeurs/60402.html>
Min, minimum; Max, maximum; mm, millimetre.

absence of micropyle and its sporulation time (Carvalho et al. 2011; Long & Reid 1982; Soulsby 1982). The intestine localisation (McDougald 2003) and the gross appearance and characteristics of intestinal lesions (Johnson & Reid 1970) were also considered for this study.

Histopathological examination

The tissue samples were collected in 10% buffer formalin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The processing consisted of serial dehydration, clearing and impregnation with wax. Tissue sections 5 μ m thick were cut with a microtome and were fixed on slides. A staining procedure was carried out using haematoxylin and eosin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The slides were examined with an optical microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) (Luna 1968).

Statistical analysis

The data were collected and analysed initially in Microsoft Office Excel 2007 to obtain the prevalence of coccidian oocysts. A statistical analysis was performed by using JMP® Software, version 7.0 (SAS Institute Inc, 2007). The *t*-test was used to compare the prevalence of *Eimeria* spp. The coccidiosis prevalence was analysed using age (1–10 days, 11–20 days, 21–30 days, 31–40 days and 41–50 days) as a factor of variation. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA). The values were statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Nineteen farms out of 35 visited were infected by *Eimeria* spp. In all, 93 out of 147 litter samples and 78 out of 109 intestinal content samples were infected with *Eimeria* oocysts (63.26% and 71.55%, respectively). Mixed infections with *Eimeria* spp. were observed in some of the positive farms, with an overall prevalence of 54.28%.

Species of *Eimeria* parasites found after examination of the samples are listed in Figure 2. Five species of *Eimeria* (viz. *E. aceroulina*, *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti* and *E. mitis*)

were identified with different indices. *Eimeria acervulina* followed by *E. tenella* were the predominant species infecting chickens on the farms visited (32.05% and 26.92%, respectively). The significant highest rate of *Eimeria* spp. was *E. acervulina* ($p < 0.05$). The morphometric index values of the oocysts isolated are presented in Table 3.

A significant difference between the age of the chicken and the incidence of the coccidiosis ($p < 0.05$) was observed. Higher prevalence of coccidiosis was recorded in chickens in the age group 31–40 days (24.8%), followed by 21–30 days and 41–50 days (13.8% and 13.3%, respectively) and lower prevalence in the age group 11–20 days (8.3%), followed by 1–10 days (4.6%) (Figure 3).

Out of the 78 chickens scarified by cervical dislocation, post-mortem examination revealed a lesion of coccidiosis. We observed ballooning and petechiae on different intestinal portions. Hypertrophy of the intestine was seen in some portion of the intestines. Moreover, the caecal portion was found to be haemorrhagic. The mean OPG, sites and lesion scores of coccidiosis cases are shown in Table 2. The McMaster

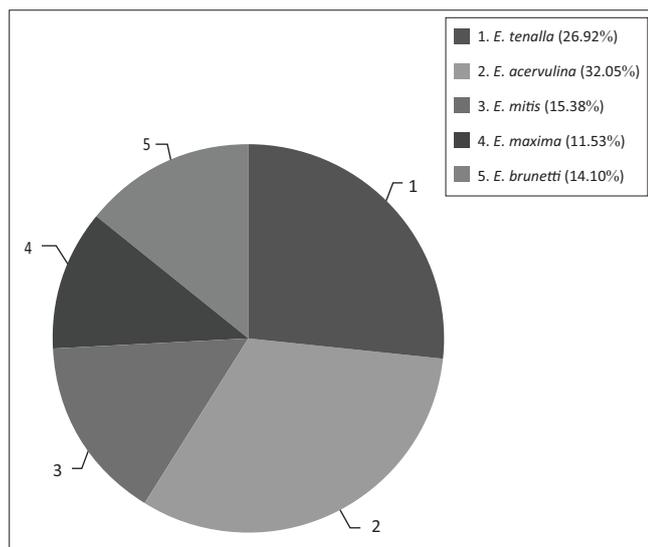


FIGURE 2: Prevalence of various *Eimeria* spp. at broiler chicken farms in the Bejaia area.

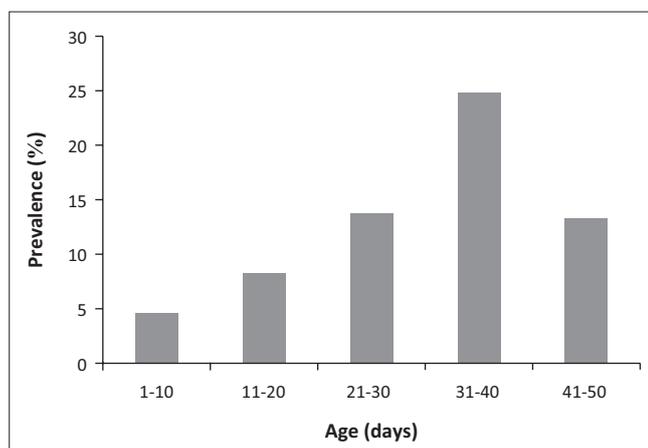


FIGURE 3: Prevalence of coccidiosis by age groups.

counting technique was used in this study to determine the oocyst burden in the samples. The OPG values recorded in the positive litter and intestinal content samples examined were found highest infested by *Eimeria* oocysts in some cases.

Microscopic lesions result in epithelial necrosis and atrophy of the intestinal villi. Complete destruction of the epithelium and villi associated with haemorrhage were also observed. Histopathological examination revealed various changes in the tissue sections of both the caeca and the small intestine compared to those of the non-affected birds. These changes included a loss of epithelial tissue and congestion of the blood vessels.

Discussion

The present study was conducted to evaluate the coccidiosis rate and to identify the species causing the parasitic disease in broiler chickens in Bejaia province. The results obtained revealed that the breeding broilers were infested by a variety of *Eimeria* species. The overall prevalence of coccidiosis was 54.28% (19 out of 35). In another survey conducted in the Blida area of northern Algeria, a similar prevalence of coccidiosis (55%) was reported (Triki-Yamani & Bachir Pacha 2010). This rate is low compared to investigations in Ethiopia (71.7%) (Dinka & Tolossa 2012), Saudi Arabia (80%) (Al-Quraishy et al. 2009) and Nigeria (87.4%) (Lawal et al. 2016). However, it is higher than the 11.4% and 14.0% reported respectively by Grema et al. (2014) and Adamu et al. (2009) in Nigeria. Moreover, Nematollahi et al. (2009) and Mwale and Masika (2011), Adang and Isah (2016), and Muazu et al. (2008) recorded a rate almost similar to the results of the present study in the north-west of Iran (55.9%), in South Africa (41.4%) and in Nigeria (42.7% and 52.9%), respectively. The variation in previous investigations might be attributed to different factors such as sampling periods, geographic area and climatic conditions (Lawal et al. 2016). The high prevalence

TABLE 2: The mean oocysts per gram, sites and lesion score of *Eimeria* spp. at broiler chicken farms in Bejaia province.

Species	Intestinal site	Lesion score	Mean OPG (\pm SD) of positive samples ($\times 10^3$ oocysts/g)
<i>E. acervulina</i>	Duodenum and Jejunum	2–3	17.68 \pm 2.70
<i>E. tenella</i>	Caecum	1–3	8.36 \pm 1.86
<i>E. maxima</i>	Small intestine	1–2	1.88 \pm 2.78
<i>E. brunetti</i>	Ileum and colon	1	12.10 \pm 3.61
<i>E. mitis</i>	Small intestine	-	5.16 \pm 1.52

OPG, oocysts per gram; SD, standard deviation.

TABLE 3: Biometric characteristics of oocysts of different species of the genus *Eimeria* isolated in Bejaia province.

Species	Oocyst						Morphometric index
	Length			Width			
	\pm SD μ m	Min	Max	\pm SD μ m	Min	Max	
<i>E. acervulina</i>	18.4 \pm 3.94	15.7	20.3	14.5 \pm 2.4	11.2	18.9	1.27
<i>E. tenella</i>	22.7 \pm 2.4	20.5	25.3	18.9 \pm 2.9	17.1	22.3	1.20
<i>E. maxima</i>	30.4 \pm 3.5	27.9	34.5	22.8 \pm 3.9	18.6	26.4	1.33
<i>E. brunetti</i>	23.4 \pm 2.8	20.6	26.3	18.8 \pm 2.4	16.9	21.6	1.24
<i>E. mitis</i>	18.2 \pm 2.5	16.4	21.1	15.7 \pm 3.6	11.6	17.8	1.15

Min, minimum; Max, maximum; SD, standard deviation.

value observed in the present work could originate from poor management practices in broiler breeding such as leaking water, accumulated faeces, poor hygiene, low ventilation and a high population density (Guinebert & Penaud 2005).

Based on the shape, measurements, number of oocysts and the site of infection, five species (i.e. *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. maxima* and *E. mitis*) were identified. *Eimeria acervulina* and *E. tenella* were the most prevalent species, with rates of 32.05% and 26.92%, respectively. Recently, *Eimeria* oocysts were isolated from poultry farms in north-east Algeria. The suspension contained *E. acervulina* and *E. maxima* as detected using morphometry and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods (Djemai, Mekroud & Jenkins 2016). Similar findings of high prevalence of coccidiosis in chickens have been reported by various researchers (Amare, Mengistu & Nazir 2012a; Adang & Isah 2016; Adhikari, Gupta & Pant 2008; Agishi, Luga & Rabo 2016; Gadelhaq, Rafa & Aboelhadid 2014; Gharekhani, Dehkordi & Mohammadali 2014; Hadipour et al. 2011; Kaboudi, Umar & Munir 2016; Kumar et al. 2015; Sharma et al. 2015). Our results support reports from the literature in various countries that the identified species of *Eimeria* are widespread in broiler chickens.

Highly pathogenic species of *Eimeria* are responsible for the death of the chicken through haemorrhagic lesions that lead to blood loss and electrolyte balance (Adhikari et al. 2008; McDougald 2008; Williams et al. 2009). According to McDougald and Fitz-Coy (2008), *E. acervulina* is the most frequently encountered subclinical coccidiosis agent in commercial poultry. The two *Eimeria* species (viz. *E. acervulina* and *E. tenella*) observed in the present study have the highest reproductive potential (Williams et al. 2009). This considerable rate of *Eimeria* oocysts indicates that the failure to control the parasitic disease using chemoprophylaxis might be because of misuse of coccidiostat, which could induce the development of long-term resistance to anti-coccidial drugs (Hadipour et al. 2011; Zhang et al. 2013). The existence of genetic variation in resistance to coccidiosis infection among breeds and strains was also reported (Ashenafi et al. 2004).

The age of the chickens is considered as a major factor in the prevalence of coccidiosis infection. *Eimeria* spp. can cause infection in all ages (Badran & Lukesouna 2006; Sharma et al. 2015). Higher prevalence of coccidiosis at the age of 32–46 days might be associated with the presence of another immunosuppressive disease, such as Gumboro (Hachimi et al. 2008; Lanckriert et al. 2010; McDougald & Steve 2008). However, the results of this study showed that the age group of chickens 32–46 days was more alarming than the age group of 5–28 days. Many investigations have reported that younger chicks are more susceptible to natural infections than older ones (Ahmed et al. 2003; Al-Quraishy et al. 2009; Amare, Worku & Negussie et al. 2012b). Bachaya et al. (2012) observed that the prevalence of infection increased among younger chicks (60%) compared with older chickens (37%). Note that three steps are necessary for coccidian infestation in

the litter of the farms, including a growth phase (21–28 days), an infestation peak (28–35 days) and a disintegration phase over 35 days.

Coccidiosis affects the host in several ways, depending on the tissue preference of the parasite involved and the number of oocysts ingested in the initial infection (Conway & McKenzie 2007; Smith & Sherman 2009). In this study, the infection intensity, measured as the total number of oocysts per gram of litter (14.96%) and intestinal contents (32.05%), had a high infection level ($> 15 \times 10^3$ oocysts). This is in agreement with a previous literature report (Lunden et al. 2000). De Gussem (2007) reported that the OPG count in faeces or litter has a poor relation to the impact of the parasite on the performance of a flock. The high number of OPG could be related to the resistance of *Eimeria* species in chicken. Intensive breeding is an additional factor that favours propagation of the coccidiosis disease (Badran & Lukešová 2006). Therefore, coccidiosis severity is positively correlated with the charge of ingested oocysts. The pathogenicity of coccidia depends on the species involved, the number of oocysts ingested and the host's immune competence (Dakpogan et al. 2012).

Avian coccidiosis is classified into intestinal and caecal forms. These intestinal pathologies are the cause of the reduction in the absorption function of the mucosa affecting the small intestine by *Eimeria* species. In case of severe infections, caecal coccidians, namely *E. tenella* or *E. necatrix*, cause massive haemorrhages and anaemia (Conway & McKenzie 2007; Zhou et al. 2006). In the current study, the microscopic examinations of the affected caeca and small intestines showed severe tissue damage, which resulted in a histological lesion characterised by the disappearance of the surface epithelium and necrosis of the villi in some samples. Histopathology changes were indicative of the inflammation reaction brought on by parasitic infection with the *Eimeria* species, which has irritating effects on the intestines. Moreover, we noticed atrophy of the enterocytes lining the intestinal villi of the mucosa because of the presence of *Eimeria* spp. on site (Yakhchali & Tehrani 2007). Adamu and colleagues (2013) recorded a change in the histopathology of broilers caused by *E. tenella* and *E. brunetti*. The findings of this study are similar to those reported by Adamu et al. (2013) and Kawahara et al. (2014), who also recorded irregularity of the intestinal architecture affected by coccidiosis in chickens. The protozoan parasites of the genus *Eimeria* multiply in the intestinal tract and cause tissue damage, which results in mortality, interruption of digestive processes or nutrient absorption, reduction of weight gain and increased susceptibility to other disease agents (Yegani & Korver 2008).

Conclusion

This is a first report on the prevalence of *Eimeria* species in broiler farms in Bejaia province, Algeria based on conventional methods. Our findings showed that five pathogenic *Eimeria* species in chickens occurred in Bejaia

province, with *E. tenella* and *E. acervulina* being the most abundant. This study demonstrated that the coccidiosis is an omnipresent parasitic intestinal disease. It could strongly decrease the production performance in broiler chickens. Coccidiosis may be an important factor in the economic losses of the poultry farms in this region.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge all veterinary colleagues (Province of Bejaia) for their assistance during sampling at the poultry farm and for their hospitality in veterinary practice. The authors thank Dr C. Harrats (University of Mostaganem, Algeria) for the English correction.

Competing interests

The authors declare that they have no financial or personal relationships that may have inappropriately influenced them in writing this article.

Authors' contributions

N.D.I. carried out the experimental work and wrote the manuscript. H.B. reviewed the manuscript. A.A. designed and supervised the experimental study and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Adamu, A.Y., Ahmed, A.B., Abubakar, M.B. & Lawal, M.D.A., 2009, 'Retrospective study (2004–2008) of poultry diseases diagnosed in veterinary teaching hospital (VTH), Usmanu Danfodiyo University Sokoto (UDUS) and Sokoto Veterinary Centre (SVC), Sokoto State, Nigeria', *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 1(1), 15–17.
- Adamu, M., Chaiwat, B., Nirat, Montakan, G. & Vongpakorn, M., 2013, 'Hematological, biochemical and histopathological changes caused by coccidiosis in chickens', *Kasetsart Journal Natural Science* 47, 238–246.
- Adang, L.K. & Isah, Z., 2016, 'Prevalence of Eimeria species in local breed chickens in Gombe metropolis, Gombe State, Nigeria', *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 10(6), 2667–2676.
- Adhikari, A., Gupta, R.G. & Pant, R., 2008, 'Prevalence and identification of coccidian parasite (*Eimeria* spp) in layer chicken of Ratnanagar municipality, Chitwan district, Nepal', *Journal of Natural History Museum* 23, 45–50. <https://doi.org/10.3126/jnhm.v23i0.1838>
- Agishi, G., Luga I.I. & Rabo, J.S., 2016, 'Prevalence of coccidiosis and *Eimeria* species in layers and broilers at slaughter houses in Makurdi, Benue State', *International Journal of Engineering and Science* 5(2), 8–11.
- Ahmed, N.E., Negm Eldin, M.M., El Akabawy, L.M. & El-Medawy, R.S., 2003, 'Incidences of some protozoan parasites in birds', *Kafr El-Sheikh Veterinary Medicine Journal* 1(1), 235–251.
- Allen, P.C. & Fetter, 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(1), 58–65. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.58-65.2002>
- Alloui, N. & Bennoune, O., 2013, 'Poultry production in Algeria: Current situation and future prospects', *World's Poultry Science Journal* 69(3), 613–620. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000615>
- Al-Quraishy, S., Abdel-Baki, A.S. & Dkhil, M.A., 2009, '*Eimeria tenella* infection among broiler chicks *Gallus domesticus* in Riyadh city Saudi Arabia', *Journal of King Saud University Science* 21(3), 191193. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2009.10.006>
- Amare, A., Mengistu, A. & Nazir, Sh., 2012a, 'Prevalence and aetiology of poultry coccidiosis and associated risk factors in White Leghorn Grower Chickens at Kombolcha Poultry Farm, Ethiopia', *World's Poultry Research Journal* 2(3), 54–59.
- Amare, A., Worku, W. & Negussie, H., 2012b, 'Coccidiosis prevailing in parent stocks: A comparative study between growers and adult layers in Kombolcha poultry breeding and multiplication center, Ethiopia', *Global Veterinaria* 8(3), 285–291.
- Ashenaf, H., Tdesse, S., Medhin, G. & Tibbo, M., 2004, 'Study of coccidiosis scavenging indigenous chickens in central Ethiopia', *Tropical Animal Health and Production* 36, 693–701. <https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000042852.82477.af>
- Bachaya, H.A., Raza, M.N., Khan, Z., Iqbal, R.Z. Abbas, S. Murtaza & Badar, N., 2012, 'Predominance and detection of different *Eimeria* species causing coccidiosis in layer chicken', *Journal of Animal and Plant Sciences* 22(3), 597–600.
- Badran, I. & Lukesova, D., 2006, 'Control of coccidiosis and different coccidia of chicken in selected technologies used in tropics and subtropics', *Agricultura Tropica et Subtropica* 39(1), 39–43.
- Carvalho, F.S., Wenceslau, A.A., Teixeira, M., Carneiro, J.A.M., Melo, A.D.B. & Albuquerque, G.R., 2011, 'Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies', *Veterinary Parasitology* 176, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.015>
- Chapman, H.D., 2009, 'A landmark contribution to poultry science-prophylactic control of coccidiosis in poultry', *Avian Pathology* 38, 813–815. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00316>
- Conway, D.P. & McKenzie, M.E., 2007, 'Poultry coccidiosis and effect of coccidiosis diagnostic and testing procedures', 3rd edn., Blackwell Publishing, Ames, IA.
- 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. <https://doi.org/10.2307/1591464>
- Dakpogan, H.B., Salifou, S., Mensah, G.A., Gbangbotche, A., Youssao, I., Naciri, M. et al., 2012, 'Problématique du contrôle et de la prévention de la coccidiose du poulet', *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 6(6), 6088–6105.
- DeGussem, M., 2007, 'Coccidiosis in poultry: Review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health', *16th European Symposium on Poultry Nutrition*, France, 26–30 August, pp. 253–261.
- Dinka, A. & Tolossa, Y.H., 2012, 'Coccidiosis in Fayoumi chickens at Debre Zert a Agricultural Research Center poultry farm, Ethiopia', *European Journal of Applied Sciences* 4(5), 191–195.
- Djemai, S., Mekroud, A. & Jenkins, M.C., 2016, 'Evaluation of ionophore sensitivity of *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* isolated from the Algerian to Jijel province poultry farms', *Veterinary Parasitology* 224, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.040>
- Gadelhaq, S., Rafa, W. & Aboelhadid, S., 2014, 'Molecular characterization of *Eimeria* species naturally infecting Egyptian Baldi Chickens', *Iranian Journal of Parasitology* 10(1), 87–95.
- Gharekhan, J.G., Dehkordi, Z.S. & Mohammadali, B., 2014, 'Prevalence of coccidiosis in broiler chicken farms in Western Iran', *Journal of Veterinary Medicine* 2014, 4p.
- Grema, H.A., Suleiman, A., Rabana, J.L. & Geidam, Y.A., 2014, 'A six-year (2005–2010) retrospective study of avian coccidiosis diagnosed in Gombe veterinary clinic, Nigeria', *Sokoto Journal of Veterinary Sciences* 12(2), 8–13.
- Guinebert, E. & Penaud, J., 2005, 'Intérêt d'un traitement biologique des litières de volaille par apport d'un additif microbien en présence des animaux', *6e Journées de la Recherche Avicole*, Saint Malo, 30–31 March, 122–125.
- Hachimi, M., Belghyti, D., El Kharrim, K. & El Guamri, Y., 2008, 'Coccidioses du poulet dans la région du Gharb (Maroc)', *Bulletin de la Société Pharmacie de Bordeaux* 147(1), 49–60.
- Hadipour, M.M., Olyai, A., Naderi, M., Azand, F. & Nekouie, O., 2011, 'Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran', *African Journal of Microbiology Research* 5(20), 3296–3299.
- Haug, A., Gjevve, A.G., Eysteine, S. & Magne, I., 2008, 'A survey of the economic impact of subclinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway', *Avian Pathology* 37(3), 333–341. <https://doi.org/10.1080/03079450802050705>
- Johnson, J. & Reid, W.M., 1970, 'Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens', *Experimental Parasitology* 28(1), 30–36.
- Kaboudi, K., Umar, S. & Munir, M.T., 2016, 'Prevalence of coccidiosis in free-range chicken in Sid Thabet, Tunisia', *Scientifica* 2016, 6p. <https://doi.org/10.1155/2016/7075195>
- Kawahara, F., Zhang, G., Suzui, T., Iwata, A., Nagamune, K. & Nunoya, T., 2014, 'Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan', *Journal of Veterinary Medical Science* 76(1), 25–29.
- Kumar, S., Garg, R., Ram, H., Maurya, P.S. & Banerjee, P.S., 2015, 'Gastrointestinal parasitic infections in chickens of upper Gangetic plains of India with special reference to poultry coccidiosis', *Journal of Parasitic Diseases* 39(1), 22–26. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0273-x>
- Lanckriert, A., Timbermont, L., DeGussem, M., Marien, M., Vancaeynest, D., Haesebrouck, F. et al., 2010, 'The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model', *Avian Pathology* 39, 63–66. <https://doi.org/10.1080/03079450903505771>
- Lawal, J.R., Gulani, I.A., Ali, A.M., Bello, A.M., Abadam, F.A., Mustapha, M. & Biu, A.A., 2016, 'Dry season prevalence of avian coccidia infection in domesticated chickens (*Gallus domesticus*) in Jere Council Borno State, Nigeria', *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine* 9(6), 653–659.
- Lin, H., Decuypere, E. & Buyse, J., 2006, 'Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens', *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 144(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.032>
- Lobago, F., Worku, N. & Wossene, A., 2005, 'Study in coccidiosis in Kombolcha poultry farm, Ethiopia', *Tropical Animal Health and Production* 37(3), 245–251. <https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000049302.72937.12>
- Long, P.L. & Reid, W.M., 1982, 'A guide for diagnosis of coccidiosis in chickens', Research report 404, University of Georgia, USA, College of Agriculture Experimental Stations, 15.
- Luna, L.G., 1968, 'Routine staining procedures', in *Manual histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd edn., pp. 32–46, McGraw-Hill, New York.

- Lunden, A., Thebo, P., Gunnarsson, S., Hooshmand-Rad, P., Tauson, R. & Ugglå, A., 2000, 'Eimeria infections in litter-based, high stocking density systems for loose-housed laying hens in Sweden', *British Poultry Science* 41(4), 440–447. <https://doi.org/10.1080/713654973>
- Mohammed, B.R. & Sunday, O.S., 2015, 'An overview of the prevalence of avian coccidiosis in poultry production and its economic importance in Nigeria', *Veterinary Research International* 3(3), 35–45.
- McDougald, L.R. & Fitz-Coy, S.H., 2008, 'Coccidiosis', in Y.M. Saif, (eds.), *Disease of poultry*, 12th edn., pp. 1068–1080, Blackwell Publishing, Ames, IA.
- McDougald, L.R., 2003, 'Coccidiosis diseases of poultry', 11 edn., Iowa State Press, IA, pp. 1001–1010.
- Mujahid, A., Akiba, Y. & Toyomizu, M., 2007, 'Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young White Leghorn cockerels by down regulation of avian uncoupling protein', *Poultry Science* 86(2), 364–371. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.364>
- Muazu, A., Masdoq, A.A., Ngbede, J., Salihu, A.F., Haruna, G., Habu, A.K. et al., 2008, 'Prevalence and identification of species of *Eimeria* causing coccidiosis in poultry within Vom, Plateau State, Nigeria', *International Journal of Poultry Sciences* 7(9), 917–918. <https://doi.org/10.3923/ijps.2008.917.918>
- Mwale, M. & Masika, P.J., 2011, 'Point prevalence study of gastro-intestinal parasites in village chickens of Centane district, South Africa', *African Journal of Agricultural Research* 6(9), 2033–2038.
- Nematollahi, A., Moghaddam, G.H. & Farshbaf Pourabad, R., 2009, 'Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran)', *Munis Entomology & Zoology* 4(1), 53–58.
- Obasi, O.L., Ifut, O.J. & Offiong, A.E., 2006, 'An outbreak of caecal coccidiosis in a broiler flock post Newcastle disease vaccination', *Journal of Animal and Veterinary Advances* 5(12), 123–124.
- Rachid, H., 2011, 'Aviculture et viandes blanches en Algérie: Une filière en pleine transition', *Le Maghreb*, viewed 15 January 2016, from <https://www.djazairess.com/fr/lemaghreb/35310>
- Sharma, S., Iqbal, A., Azmi, S., Mushtaq, I., Wani, A.Z. & Ahmad, S., 2015, 'Prevalence of poultry coccidiosis in Jammu region of Jammu and Kashmir State', *Journal of Parasitic Diseases* 39(1), 85–89. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0286-5>
- Shirley, M.W., Smith, A.L. & Tomley, F.M., 2005, 'The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination', *Advances in Parasitology* 60, 285–330. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60005-X)
- Soulsby, E.J.L., 1982, *Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals*, Academic Press, London, pp. 630–639.
- Soulsby, E.J.L., 1986, *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*, 8th edn., Tindall Cassel, London, pp. 651–661.
- Smith, M.C. & Sherman, D.M., 2009, 'Goat medicine', 2nd edn., Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, pp. 513–515.
- Toulah, F.H., 2007, 'Prevalence and comparative morphological studies of four *Eimeria* sp. of sheep in Jeddah area, Saudi Arabia', *Journal of Biological Sciences* 7(2), 413–416. <https://doi.org/10.3923/jbs.2007.413.416>
- Triki Yamani, R.R. & Bachir Pacha, M., 2010, 'Diagnosis of the broiler coccidiosis in the department Blida (Algeria)', *Agricultura, Agricultural Practice and Science Journal* 73(1–2), 107–112.
- Triki-Yamani, R.R., Said, R.M., Benaissa, F., Bachir-Pacha, M. & Bouyoucef, A., 2014, 'The coccidiosis of the broiler in the sub-Saharan regions (Biskra-Algeria)', *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 71(1), 237–241.
- Williams, R.B., Marshall, R.N., Pagés, M., Dardi, M. & Del Cacho, E., 2009, 'Pathogenesis of *Eimeria praecox* in chickens: Virulence of field strains compared with laboratory strains of *E. praecox* and *Eimeria acervulina*', *Avian Pathology* 38(5), 359–366. <https://doi.org/10.1080/03079450903186028>
- Yakhchali, M. & Tehrani, A., 2007, 'Eimerioidosis and pathological findings in New Zealand white rabbits', *Journal of Biological Sciences* 7(8), 1488–1491. <https://doi.org/10.3923/jbs.2007.1488.1491>
- Yegani, M. & Korver, D.R., 2008, 'Factors affecting intestinal health in poultry', *Poultry Science* 87(10), 2052–2063. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>
- Zhou, K., Wang, Y., Chen, M., Wang, L., Huang, S., Zhang, J. et al., 2006, '*Eimeria tenella*: Further studies on the development of the oocyst', *Experimental Parasitology* 113, 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.01.001>
- Zhang, L., Liu, R., Song, M., Hu, Y., Pan B., Cai, J. & Wang, M., 2013, '*Eimeria tenella*: Interleukin 17 contributes to host immunopathology in the gut during experimental infection', *Experimental Parasitology* 133(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.009>



In Vitro Anticoccidial Activity of Olive Pulp (*Olea europaea* L. var. Chemlal) Extract Against *Eimeria* Oocysts in Broiler Chickens

Nedjima Debbou-louknane¹ · Cristina Nerín² · Meriem Amrane³ · Menana Ghemghar³ · Khodir Madani³ · Abdelhanine Ayad¹

Received: 11 April 2019 / Accepted: 23 August 2019
© Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences 2019

Abstract

Aim The objective of the present study was to investigate in vitro anticoccidial effect of olive pulp (*Olea europaea* L. var. Chemlal) extract on the destruction of *Eimeria* spp. oocysts isolated from infected chickens naturally.

Materials and methods The olive pulp (OP) powder was stirred manually in aqueous ethanol in preparation for extraction using the microwave-assisted extraction system. The identification of the phenolic compounds was obtained by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation (HPLC–ESI–MS). The treatment of *Eimeria* oocyst with OP extract and standard compounds (quercetin and oleuropein) leads to their lysis as shown by the release of substances absorbing at 273 nm.

Results Our results showed that the maximum number of reduced oocysts was recorded after 8 h of incubation of optimum OP extract, quercetin and oleuropein for different periods of time. Also, the number of *Eimeria* oocysts decreased considerably with increase concentrations after adding the optimum of OP extract in concentration ranging from 0.023 to 0.371 mg/ml. Positive correlation between the optimum OP extract concentrations and the number of *Eimeria* oocysts reduced was $R^2 = 0.959$. From this in vitro experiment, it can be concluded that the OP extract possesses an anti-*Eimeria* spp activity.

Conclusion To our knowledge, this is the first time that quercetin and oleuropein were tested to evaluate their anticoccidial activity. The findings of this study showed that phenolic compound of OP extract tested separately possesses anti-*Eimeria* spp. effect. Further studies should be carried out to test its in vivo efficacy of the OP bioactive compounds in broiler chickens.

Keywords *Olea europea* L. var. Chemlal · Co-products · Anticoccidial activity · Chickens · In vitro

Introduction

Coccidiosis is one of the most important diseases of poultry worldwide caused by protozoan parasites of the genus *Eimeria*. This infection causes an extensive destruction of the enterocytes [1] which results in reduced feed efficiency,

body weight gain, and a temporary reduction in egg production [2]. The worldwide annual losses due to *Eimeria* infection were estimated to more than \$3 billion [3].

It is very necessary to intensify control, especially in the current intensive farming conditions; because *Eimeria* oocysts are ubiquitous, easily disseminated in the broilers houses and their large reproduction potential [4]. Several factors can facilitate the disease development such as *Eimeria* virulence, high oocyst challenge, poor ventilation, high stocking density, low immune status of the host, bacterial enteritis, high humidity in litter and a lack of effectiveness of anticoccidial drugs. [5].

Since 60 years, anticoccidial drugs in feed of chickens have been used to control the coccidiosis [5, 6]. However, the main problem associated with their ineffective response is the development of resistance in *Eimeria* species of all synthetic available molecules [7–9]. In addition,

✉ Abdelhanine Ayad
hanine06@gamil.com

¹ Department of Environment Biological Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Route de Targa Ouzemmour, 06000 Bejaia, Algeria

² Aragón Institute for Engineering Research (I3A), University of Zaragoza, Campus, Rio Ebro María de Luna 3 50018 Saragossa, Spain

³ Laboratory of Biomathematics, Biochemistry, Biophysics and Scientometrics (L3BS), University of Bejaia, Route de Targa Ouzemmour, 06000 Bejaia, Algeria

the anticoccidial drugs in broiler meat may be potentially harmful to both the consumers and the environment [10, 11].

This situation encourages the use of herbal remedies in poultry diets instead of synthetic drugs. Some herbal extracts stimulate the immune system, enhance growth performance and can supply as well the anticoccidial effects [7]. Many studies have been carried out on medicinal plants and forages as alternative strategies to controlling avian coccidiosis and improving poultry performance worldwide [12, 13]. In Algeria, the olive trees represent a significant portion of the agricultural economy (32,300,000 trees) with production of 6,844,606 quintals of olive oil as the production is variable from 1 year to another [14]. According to the Provincial Direction of Agricultural Services, a large part of the olive production is concentrated in Bejaia province (600,551 quintals, 5,212,000 olive trees) which generated a huge quantity of residues called pomace. Pomace is a very promising source of valuable substances, as they contain a large number of bioactive compounds [15, 16]. These co-products become more and more usable in different fields, as animal feed, energy source and vegetation fertiliser [17–20]. However, to our knowledge, the anticoccidial activity of pomace olive has never been reported. The objective of the present study was to investigate in vitro anticoccidial effect of olive pulp (OP) extract on the destruction of *Eimeria* oocysts isolated from naturally infected chickens.

Materials and Methods

Plant Materials

The olive pulp (*Olea europaea* L., var. Chemlal) was collected in the traditional mill immediately after the olive pressing operation in the area of Bejaia (Algeria). Samples were dried for 17 days in the shade at room temperature until constant weight was obtained, and then crushed using a traditional grinder. The resulting powder was passed through a standard 250 µm sieve. Only the fraction with particle size ≤ 250 µm was collected, stored at +4 °C in amber bottles and sterilised until used.

Extraction and Optimization of Total Phenolic Compounds (TPC)

Microwave-Assisted Extraction (MAE)

A domestic microwave oven (2450 MHz, Samsung Model NN-S674MF, Kuala Lumpur, Malaysia) was modified to extract the phenolic compounds from the olive pulp powder [21]. One gram of olive pulp powder was stirred manually in aqueous ethanol in preparation for extraction using the MAE system. The MAE parameters were microwave power

(300–700 W), extraction time (30–120 s), liquid–solid ratio (10–50 ml/g) and ethanol proportion (20–50%). After that, the extract was filtered through a Buchner funnel lined with Whatman No 3 filter paper and the supernatant was collected in a volumetric flask. The extract was stored at +4 °C until used.

Determination of Total Phenolic Content

The content of the total phenolics of the OP extract was determined according to the Folin–Ciocalteu test [22]. The absorbance of the extract was compared to a calibration curve of gallic acid to estimate the concentration of total phenolic (TPC) in the sample. PTC was expressed as mg Gallic Acid Equivalents (GAE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

Determination of Flavonoids Contents

Aluminium chloride colorimetric method was used for flavonoids determination [23]. Briefly, 1 ml of hydroethanolic extract solution was added to 1 ml of 2% methanolic $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution. The absorbance was measured with a spectrophotometer (UV–Vis SpectroScan 50) at 415 nm length wave after 10 min of equilibrium and then compared to a quercetin standard curve for the determination of the concentration of total flavonoids in the samples. The results were expressed in mg Quercetin/g Equivalent/g of powder on dry weight basis (mg QE/g DW).

Determination of Condensed Tannin (Proanthocyanidins) Contents

The method based on butanol/HCl dosage was performed with small modifications [24]. Two hundred and fifty microliters of extract were mixed with 2.5 ml of an acid solution of ferrous sulphate (77 mg of ferric ammonium sulphate ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) dissolved in 500 mL of (3:2 *n*-butanol:HCl)). After mixing and incubating at 95 °C for 50 min, the absorbance at 550 nm length wave was measured against a blank. Condensed tannins content (CTC) was calculated using the following formula:

$$\text{CTC} = \frac{A_{550 \text{ nm}} \times \text{DF} \times \text{MW}}{\epsilon L},$$

where DF is the dilution factor; MW is the molecular weight of the cyanidin (287 g/mol), ϵ is the molecular extinction coefficient (34,700 l/mol/cm) and L is the spectrophotometer cell thickness (1 cm). The condensed tannin concentrations (mg/ml) were expressed as mg of cyanidin (CE) equivalents per g of extract dry weight (DW).

Determination of the Antioxidant Activity

Scavenging Activity Against the ABTS⁺ Radical

The method of Re et al. [25] was adopted for the evaluation of the antioxidant activity of pulp olive extract. Briefly, a radical solution (7-mM ABTS and 2.45-mM potassium persulfate) was prepared in an ethanolic solution and left to stand in the dark at room temperature (27 °C) for 12–16 h before performing in the assay. This solution was then diluted with ethanol to get an absorbance of 0.700 ± 0.02 and equilibrated at 30 °C. The antioxidant activity (AOX) was calculated as the percentage of inhibition of absorbance at 734 nm length wave and the IC₅₀ (µg/ml) was determined as follows.

$$\text{AOX}\% = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100,$$

where A_{control} is the absorbance of the blank control (ABTS⁺ solution without test sample) and A_{sample} is the absorbance of the test sample.

Scavenging Activity Against the DPPH Radical

The OP extract was tested for the scavenging effect on the DPPH[•] (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl) radical using a colorimetric method [26]. 50 µl of hydroethanolic extract at different concentrations was added to 2 ml of DPPH stock solution (0.004%; w/v) and the reaction mixture was thoroughly mixed and incubated for 30 min at 37 °C. The absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm length wave with a spectrophotometer. As a positive control, a synthetic gallic acid antioxidant was used and the IC₅₀ was determined. The DPPH radical scavenging activity (*S* %) was calculated using the following formula

$$S\% = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}},$$

where A_{control} is the absorbance of the blank control (containing all reagents except the extract solution) and A_{sample} is the absorbance of the sample.

Measurement of the Ferric Reducing Power (FRAP)

The ferric reducing power was determined as described by Oyaizu [27]. Briefly, 120 µl of OP extract solution at different concentrations was mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4) and 2.5 ml of potassium ferricyanide (1%). After an incubation of the mixture at 50 °C for 20 min, 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%; w/v) was added, and the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. A 2.5-ml aliquot of the supernatant was mixed with 2.5 ml

of distilled water and 0.5 ml of ferric chloride (0.1%; w/v); then, the absorbance was measured at 700 nm wave length. The higher the absorbance value, the stronger the reducing power.

High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLC–ESI–MS) Analysis of Phenolic Compounds

The identification of phenolic compounds of OP extract was obtained by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation (UPLC–ESI–MS) and quadrupole-time of flight detector (QTOF). The equipment was Xevo G2 mass spectrometer consisting of a hexapole, a collision cell and a time of flight analyser (QTOF) supplied by Waters (Milford, MA, USA). The electrospray probe was used in positive (ESI+) and negative (ESI–) modes as well as sensitivity analyser mode. The mass range considered was from 10 to 1000 Da. The corona voltage was 2.5 kV for (ESI+) and 0.5 kV for (ESI–). The sampling cone voltage was optimised between 20 and 50 V. Finally, 30 V was selected for the screening because more peaks were detected. Other MS parameters were as follows: the source temperature was 150 °C, the desolvation gas temperature 450 °C and the desolvation gas flow 650 l/h. MSE mode was selected for the acquisition, and collision ramp energy from 5 to 40 V was used. Mass Lynx v.4.1 software (Waters, Milford MA, USA) was used to analyse the samples and Croma Lynx (Waters, Milford MA, USA) was used to deconvolve the spectra. Quantitative data for pulp phenolic compounds were obtained by calibration curves obtained from known standards.

Determination of the Anticoccidial Activity

Eimeria Oocysts Isolation and Purification

Oocysts sample of *Eimeria* spp. was isolated from fresh faeces of broilers suffering from coccidiosis in Bejaia area (Algeria). The oocysts were sporulated by incubation in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution in the presence of suitable humidity and temperature [28]. Sporulated oocysts were washed and counted using Malassez chamber. Mean number of oocysts per millilitre of sample was calculated. The identification of *Eimeria* species in chickens was made on the basis of some standard parasitological techniques [28]. The oocysts were identified according to size, shape, presence or absence of micropyle, time of sporulation, intestinal location and appearance and coarse characteristics of intestinal lesions. The percentage of each species in the mixed suspension was approximately 32.05% *E. acervulina*, 26.92% *E. tenella*, 15.35% *E. mitis*, 14.10% *E. brunetti* and 11.53% *E. maxima*.

The purification of the oocysts was carried out from one-litre phosphate-buffered saline (PBS, containing 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.13 g/l Na₂HPO₄, 2H₂O and 0.2 g/l KH₂PO₄) with some modifications [29]. Neutral substrates containing antibiotics (Streptomycin 1 mg/ml and penicillin V 100 IU) were added to prevent any bacterial evolution and Fluconazole (17 mg/ml) was added as antifungal agent. The pH was adjusted to 7.4 and the solution was sterilised by membrane filtration through a 0.2-µm filter. The HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) medium was prepared in the laboratory (NaCl, 8.0; KCl 0.4; CaCl₂, 0.139; D-glucose, 1.0; Na₂HPO₄, 0.0478; KH₂PO₄, 0.06 and MgSO₄, 0.097 g/l in 1 l of distilled water). The solution was sterilised as well as that of the 0.2% agar.

Effects of the Pulp Extract and Standard Compounds on the Decrease of Oocysts Number

The activity of olive pulp extract and standard compounds (quercetin and oleuropein) (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ, USA) was determined in triplicate by incubation at ambient temperature for 24 h [30]. The suspension solution was incubated at different periods of time: 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h. One millilitre suspension contains: 100 µl of washed suspension of *Eimeria* oocysts at 4.16×10^6 oocysts/ml; 700 µl of PBS; 200 µl of the optimum olive pulp extract. After incubation, the samples were centrifuged at 320g for 5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 273 nm by spectrophotometer (Shimadzu, model: UV 100 Japan). Then, the percentage of destruction of sporulated oocysts was estimated. The LC₅₀ value was then inferred from the regression curve. The number of oocysts was counted three times in a cell volume of 1 µl amounts to 4.16×10^4 . The ethanol solvent was also used as a negative control.

Effect of the Diclazuril, Sulfaquinoxaline Sodium on the Decrease of the Oocysts Number

Diclazuril (Diclosol[®], Avico, Arab Industry Veterinary Co, Amman, Jordanie) and Sulfaquinoxaline sodium (Cocciopan[®], Avico, Arab Industry Veterinary Co, Amman, Jordanie) were tested in triplicate (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 mg/ml) using the microplate method described by Remmal et al. [31]. The number of oocysts was counted twice in a cell volume of 1 µl amounts to 2.32×10^4 .

Statistical Analysis

A statistical analysis was performed using JMP[®] Software, version 7.0 (SAS Institute Inc, 2007). The results were expressed in mean ± SE. The values were statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05. Inoculums suspension taken on time 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h on oocysts number was

examined by the Student's *t* test. The lethal concentration is defined as the concentration that reduces the initial number of sporulated oocysts to 50%.

Results

The optimum of OP (*Olea europaea* L., var. Chemlal) concentration (22.30 mg/g; 0.743 mg/ml and 03 min) and the optimised parameters of the extract of OP are illustrated in Fig. 1. The identification of the phenolic compounds of the OP extract by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation (HPLC–ESI–MS) revealed the presence of biophenol molecules (Fig. 2). The quantitative data for the phenolic compounds of the extract were obtained by calibration curves from known standards.

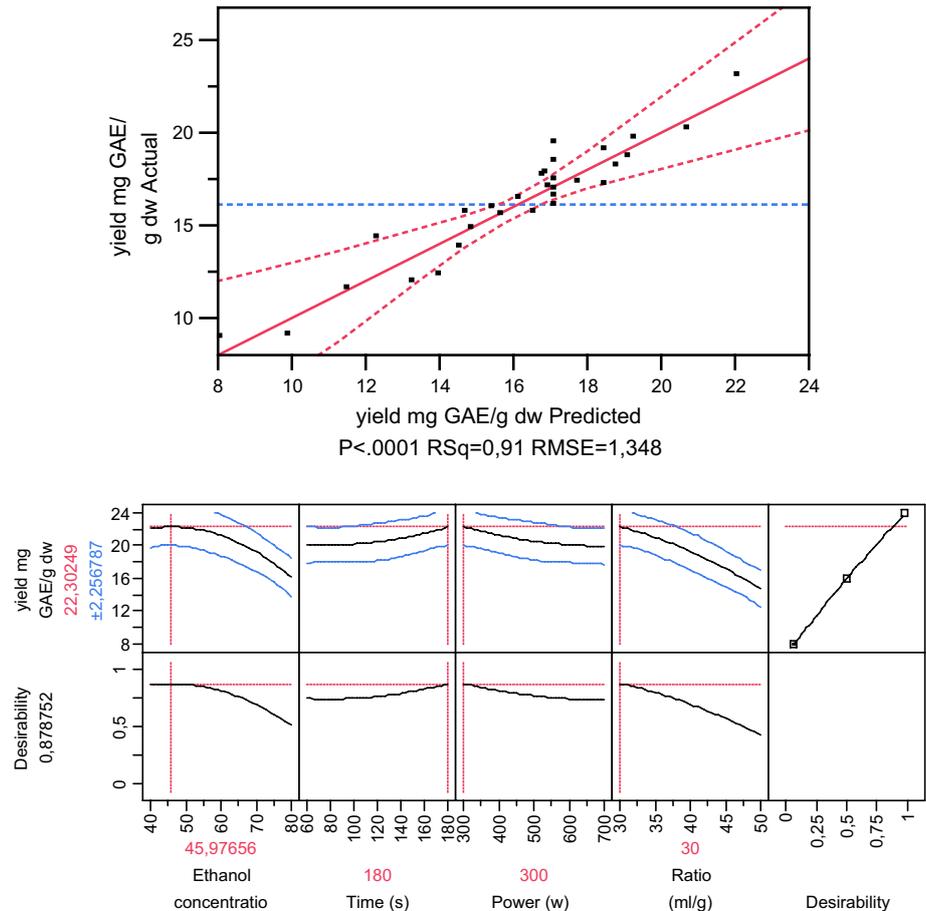
The antioxidant capacities of the OP extract at different dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 and 1/128) and the standard compounds (quercetin, oleuropein) at different concentrations (0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 mg/ml) were evaluated by DPPH, ABTS^{•+} and FRAP tests (Table 1). The IC₅₀ determination shows a significant difference (*P* < 0.05) between the OP extract and the used standards. Quercetin has a pronounced antioxidant activity (0.102 ± 0.014 mg/ml) compared to oleuropein and OP extract (0.276 ± 0.037 and 0.509 ± 0.047 mg/ml, respectively).

According to our results, the OP extract and the standards compound tested at different concentrations (0.743 and 0.139 mg/ml, respectively) showed that the number of oocysts decreases after the treatment. However, the quercetin was most effective (45.38%), followed by oleuropein and the OP extracts (33.25% and 25.36%), respectively, after 8-h treatment. The lethal concentration LC₅₀ of OP extract and diclazuril were 14.44 ± 1.206 and 0.5 ± 7711 mg/ml, respectively. The ethanol-treated *Eimeria* suspension (negative control) was significantly (*P* ≤ 0.05) higher than the tested concentration of OP extract and the standards compound. The result of two anticoccidial effects (diclazuril and sulfaquinoxaline sodium) on the number of oocysts at 0.5 mg/ml concentration is shown in Fig. 5.

Figure 3a–c showed that a rate of 25.36, 45.38 and 33.25% of the oocysts number reduced has been recorded after 8 h of incubation with 0.745 mg/ml of the optimum OP extract, quercetin and oleuropein for different periods of time, respectively. This decrease in the number of oocysts causes a considerable release of 273 nm absorbing material from *Eimeria* oocysts that this depends on the concentration of the optimum OP extract, quercetin and oleuropein.

Figure 4 shows the number of *Eimeria* oocysts decreases considerably with increase in concentration of OP extract in concentration ranging from 0.023 to 0.371 mg/ml. Positive correlation between the optimum OP extract

Fig. 1 Optimization of parameters of extraction of olive pulp (*Olea europaea* L., var. Chemlal) by microwave



concentrations and the number of *Eimeria* oocysts reduced was $R^2 = 0.959$. The result of two anticoccidial effects (diclazuril and sulfaquinoxaline sodium) on the number of oocysts at 0.5 mg/mL concentration is shown in Fig. 5.

Discussion

The use of plant extracts as remedy can attenuate the resistance of coccidia to medications and their impact on consumer's health, because they are not only natural products, but also include new therapeutic molecules for which no resistance has never been reported [32, 33]. This work was carried out to find a phytotherapeutic substance to help the control of *Eimeria* parasites in broiler chicken and to provide an alternative use of a plant extracts. To our knowledge, this is the first study to evaluate the effect of anticoccidial of the OP optimum (*Olea europaea* L., var. Chemlal) extract and their phenolic compounds directly on the viability of *Eimeria* oocysts collected from broiler chicken parasites in vitro. The results of this investigation have demonstrated that the OP extracts have a noticeably destructive effect on *Eimeria* parasite. Previous investigations have used in vitro test to

screen the anticoccidial effect of some plant compounds in broiler chickens [34–38].

The study carried out by Hady and Zaki [12] demonstrated that *Artemisia annua* extract decreases the bloody diarrhoea in broilers experimentally infected by *E. tenella* compared to the infected control group. Other researchers reported that *Artemisia annua* and *Foeniculum vulgare* have an anticoccidial activity in chickens infected by *E. tenella*, and a significant reduction in faecal oocysts was recorded [39]. Likewise, *Artemisia herba-alba* anticoccidial activity was relied on decreasing excretion of *E. tenella* oocyst and bloody diarrhoea as reported by Messai et al. [40].

As described before in several studies, the phenolic components (flavonoids, flavonoids, phenolic acid, tannins, etc.) revealed a wide range of biological properties such as antibacterial, antiviral, anticancer, anti-proliferative and anti-inflammatory [41–45]. These compounds or secondary metabolites particularly possess also anti-protozoan activities, especially against *Plasmodium*, *Leishmania* and *Trypanosoma* spp. [46–50]. Then, the phenolic compounds are good candidate molecules due to a relatively low or no toxicity and because the presence of some flavonoids limits the resistance of protozoan to other drugs [51]. Moreover, the polyphenols from *Palmae* (*Cocos nucifera* L.) fibres

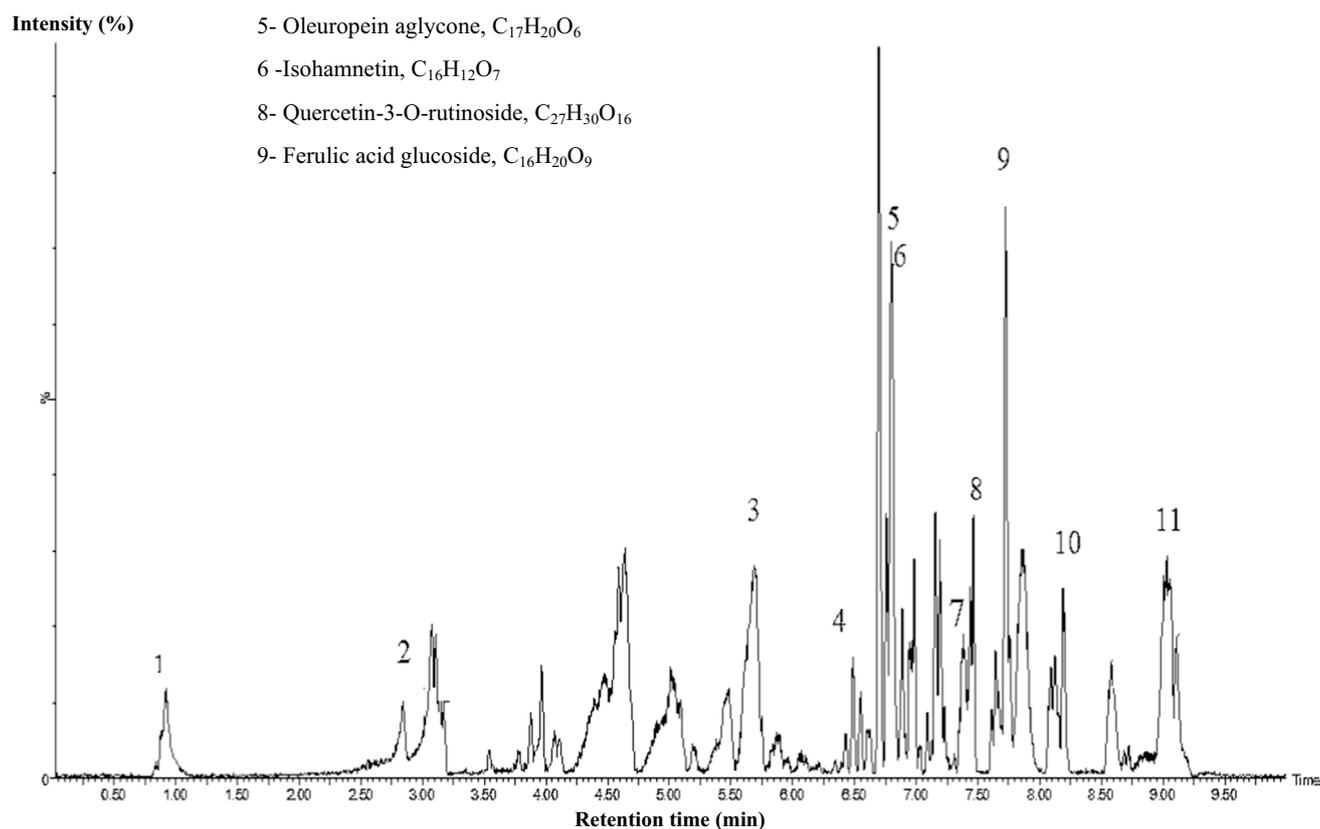


Fig. 2 HPLC–ESI–MS chromatograms of the phenolic profile of the olive pulp extract (*Olea europaea* L., var. Chemlal)

Table 1 DPPH, ABTS⁺ and FRAP tests of phenolic compounds of the olive pulp extract (*Olea europaea* L., var. Chemlal), quercetin and oleuropein

Compounds	IC ₅₀ Concentration (mg/ml, ±SD)		Inhibition (%)		FRAP (OD, 1 mg/ml)
	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	
Quercetin	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.03	76.52	65.64	2.08
Oleuropein	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.0	59.2	58.72	1.18
Hydroethanolic extract of pulp	0.51 ± 0.05	0.54 ± 0.05	25.36	23.54	1.76

IC₅₀ inhibitory concentration 50, SD standard deviation, OD optical density, DPPH 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl, ABTS 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

showed antiproliferative activity against *Leishmania amazonensis* [52].

In the present study, the OP extract used as natural anticomicrobial product is very interesting because the results of the characterization by HPLC show that the OP extract contains large concentrations of polyphenolic compounds or biophenols (Caffeoylputrescine, apigenin 7-O-glucoside, oleuropein aglycone, quercetin 3,7,-O-glucoside, 3,4-DHPEA-EA,

quercetin-3-O-rutinoside, diligustilide, ferulic acid glucoside, 4-*p*-coumaroylquinic acid, deacetoxyoleuropein aglycon). In addition, the major compounds of OP extract are flavonoids called again bioflavonoid. It should be noted that these flavonoids are recognised archetypal antioxidants such as oleuropein (OE), hydroxytyrosol (HT), tyrosol (T), coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, quercetin, etc. and had interesting biological activities [53]. In addition, Ghanbari et al. [54] confirmed that the different parts of olives and their by-products have a valuable bioactive profile as well as medicinal and functional proprieties.

The OP extract at different concentrations showed a significant antioxidant activity in agreement with those reported by Morelló et al. [55] and Moudache et al. [56, 57]. The results of present study correspond also with those published previously, which demonstrated that the antioxidant activity of plant extracts contains quercetin and oleuropein [58–63]. Antioxidant activity is often accompanied by antiviral and antibacterial activities of the phenolics compounds. In addition, it was shown that the antioxidant activity of flavonoids is determined by the presence of free hydroxyl groups and their mutual location [64].

The results of DPPH, ABTS⁺ and FRAP tests of the optimum and the standard compounds (quercetin,

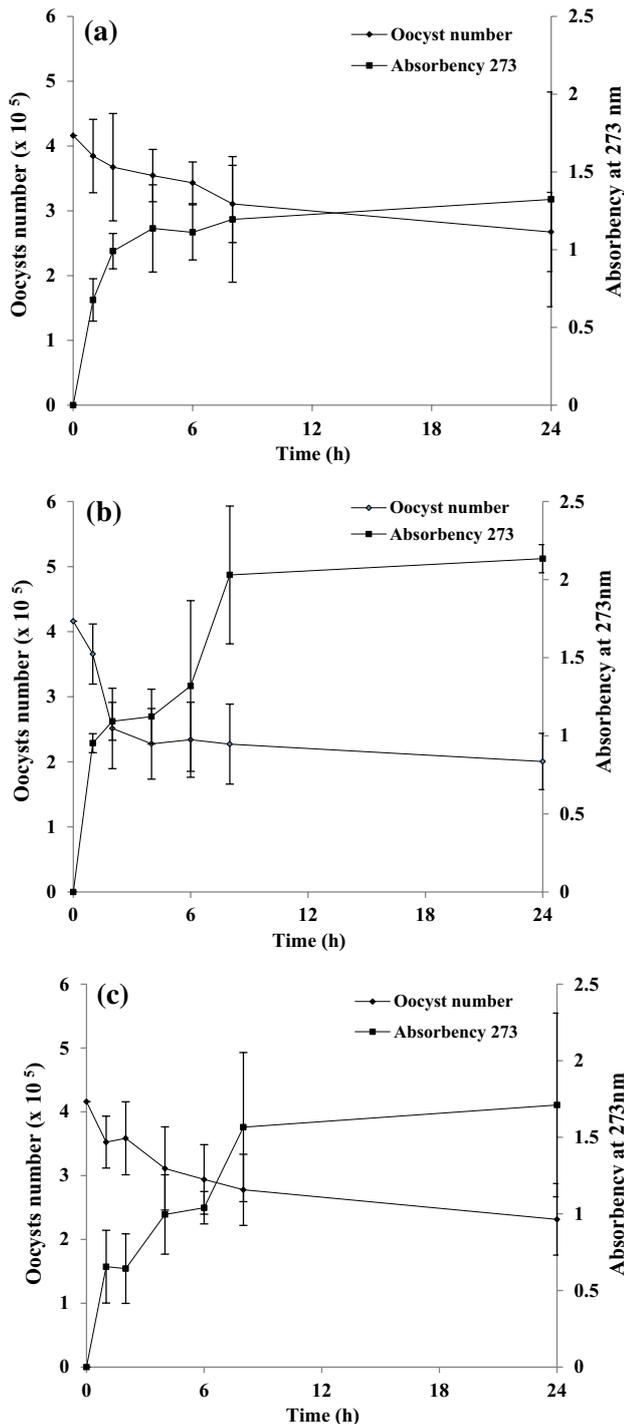


Fig. 3 Kinetics of the decrease of the oocysts number and 273 nm wave length absorbing material release from *Eimeria* oocysts treated by optimum of olive pulp extract (*Olea europaea* L., var. Chemlal) (a), quercetin (b) and oleuropein (c)

oleuropein) were revealed by the antioxidant capacities. However, the difference of quercetin, oleuropein and the optimum of OP extract values could be attributed to a polar character which can contribute to the potentialisation

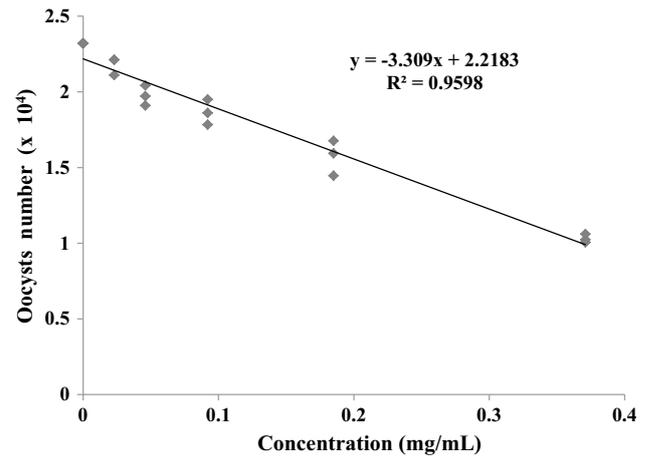


Fig. 4 The correlation between the optimum of olive pulp extracts (*Olea europaea* L., var. Chemlal) concentrations and the number of *Eimeria* oocysts

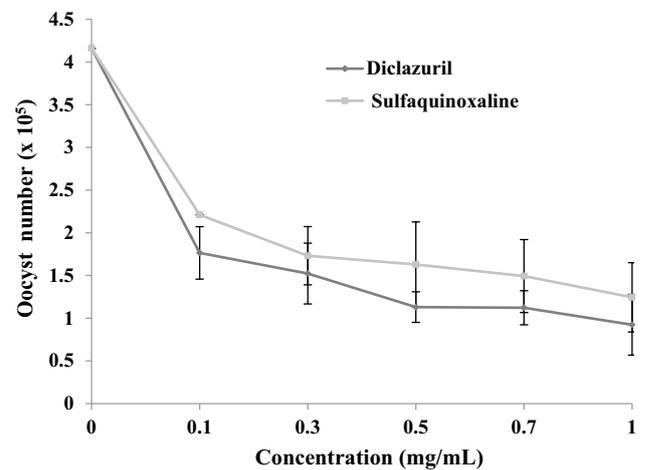


Fig. 5 Effect of diclazuril and sulfaquinoxaline concentrations on oocysts number

of power to reduce the free radicals [44, 65]. According to Miguel [66], some flavonoids having multiple hydroxyl (OH) groups act as pro-oxidants. Several studies have shown that the reducing power of phenolic compounds can be considered as an indicator potential antioxidant effect [67, 68]. The results of this study correspond also with those published previously, which demonstrated the antioxidant activity of the olive oil co-product [69]. This effect could be attributed to the hydrogen donor ability to form stable free radicals, thus preventing the oxidation and their propagation. In addition, the mixtures of different phenolic compounds present in the olive oil co-product extracts have greater antioxidant activity than the individual compounds because of their synergy [70].

To test the decrease potential of the OP extract on *Eimeria* parasite in broiler chicken, the extract optimal concentration (22.3024 mg/g GAE of dry matter: 0.743 mg/ml) was used to define the time necessary for the oocysts maximum reduction. The results of anticoccidial effect have been evaluated from the lysed oocysts number after treatment depending on time. This observation is based on the alteration state of oocysts treated surfaces and the cells fragmentation. Note that the positive control is also taken into account which gives a strong support for the tested extract. The data of this study showed a correlation of OP extract concentrations with the reduced oocysts numbers. This destructive effect of oocysts is a result of intracellular content release such as aromatic amino acids and nucleotides that are expressed by UV absorption substances after treatment [31]. The results of this study also correspond to those previously published, which showed that the increase in the concentration of plant extracts leads to an increase in anticoccidial activity [30, 31]. Regarding the concentration of extraction solvent at 45.97% ethanol (Fig. 1) of optimum extract, neither destruction of oocysts nor deleterious effect were recorded. In contrast, Gadelhaq et al. [71] reported that a significant effect of inhibition of sporulation and oocysts deterioration occurred at high ethanolic concentrations (50 and 70%).

This anticoccidial activity could be attributed to an individual or a combined effect of the bioactive compounds [72]. These constituents could play many beneficial-associated properties such as antioxidant and anti-inflammatory effects associated with compounds rich in bioactive elements (e.g., polyphenolic) [73, 74]. Our in vitro results could be explained by the in vivo positive effects of the olive pulp extract on the chicken production reported by Sayehban et al. [20]. The results of this study correspond to those previously published, which demonstrated that the anticoccidial activity might be due to the bioactivity constituents such as ascorbic acid, flavonoids, phenol compounds and carotenoids [75, 76].

Many investigations have established relationships between the activity, the chemical structure and the mode of action of flavonoids as well as the absorption level and their bioavailability [5, 77–79]. In this research, it may be assumed that the different proportions of OP extract, quercetin and oleuropein are related to factors cited previously. In addition, the hydrophilic and hydrophobic nature of bioactive (quercetin and oleuropein, respectively) may be the major cause of anticoccidial activity. According to Tasdemir et al. [80], quercetin showed an in vitro leishmanicidal activity with IC₅₀ of 1.0 µg/ml. The insertion of two OH functions improved considerably the leishmanicidal in vivo activity with 15.3% of inhibiting infection, while other flavonoids were completely inactive.

It has been demonstrated that the olive pulp of the family *Oleaceae* has higher antioxidant activity, mainly residing in

the hydrophilic nature [55], in contrary to oleuropein. This could be explained by the fact that oleuropein is to some extent polar and thus, it would rapidly diffuse through the bilayer of the intestinal epithelial cell membrane [81]. On the other hand, Gourama and Bullerman [82] showed that oleuropein has an influence on the development and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. It is important to underline that those natural antioxidants containing soluble lipid seem to be more effective due to their penetration into the cell, which could affect the intracellular of *Eimeria* [83].

In the present investigation, the difference in proportions (oocysts destroyed) could be explained by the difference of polarity and the hydrophilic or lipophilic nature. Also, other studies showed the beneficial effect of plant extracts against multiple or monospecific infections with either *E. tenella* or *E. acervulina* [84, 85]. This is supported by Allen and Danforth [86], who demonstrated that the antioxidant compounds are well known to have a cellular protective action against oxidative stress and reduce the severity of *E. tenella* infections by altering the degree of intestinal lipid.

According to Peek and Landman [87], the use of Diclazuril (0.5 mg/ml) showed a significant reductive efficiency on sporulated *Eimeria* oocysts after 24 h of incubation compared to our results, while the sulfaquinoxaline showed a slight reduced oocysts number. Indeed, in agreement with our observations, many investigations demonstrated that the in vitro anticoccidial effect of diclazuril is high [88, 89]. This difference may be attributed necessarily to pharmacological properties of drugs and their action on coccidia development. Diclazuril lethal effect against both asexual and sexual stages of *E. tenella*, *E. necatrix* and *E. acervulina*, the gametocytes of *E. brunetti*, and the zygote of *E. maxima* was documented [90].

Conclusion

From this in vitro experiment, it can be concluded that the OP (*Olea europaea* L., var. Chemlal) extract possesses the ability to destroy *Eimeria* spp. collected from naturally infected broiler chickens. To our knowledge, this is the first time that quercetin and oleuropein are tested to evaluate their anticoccidial activity. The findings of this study showed that phenolic compound of OP extract tested separately possesses anti-*Eimeria* effect. Further studies should be carried out to test the in vivo efficiency of the OP bioactive compounds in broiler chickens.

Author contributions NID carried out the experimental work and wrote the manuscript. CN participated in biochemistry analysis of extract plant and reviewed the manuscript. MA, MG and KM contributed in technical assistance of plant extraction. AA designed, supervised the

experimental study and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no potential conflict of interest.

Ethical approval Ethics committee approval was received for this study from the scientific committee of Faculty of Life and Nature Sciences, University A. Mira, Bejaia, Algeria.

References

- Lillehoj HS, Okamura M (2003) Host immunity and vaccine development to coccidia and Salmonella infections in chickens. *Poultry Sci* 40:151–193
- Razzaq A, Ali T, Saghir A, Arshad S, Cheema A (2011) Training needs assessment of poultry farmers in tehsil Faisalabad. *J Anim Plant Sci* 21:629–631
- Dalloul RA, Lillehoj HS (2006) Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5:143–163
- Allen PC, Fetterer RH (2002) Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Mic Rev* 15:58–65
- Shivaramaiah C, Barta JR, Hernandez-Velasco X, Téllez G, Hargis BM (2014) Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. *Vet Med Res Reports* 5:23–34
- Blake DP, Tomley FM (2014) Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol* 30:12–19
- Abbas RZ, Iqba Z, Khan MN, Zafar MA, Zia MA (2010) Anticoccidial activity of *Curcumatonga* L. in broiler chickens. *Braz Arch Biotech* 53:63–67
- Abbas RZ, Iqbal Z, Blake D, Khan MN, Saleemi MK (2011) Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. *World's Poultry Sci J* 67:337–350
- Alnassan AA, Thabet A, Dausgies A, Bangoura B (2015) In-Vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol Res* 114:625–630
- Ogbe AO, Mgbojikwe LO, Abdu PA, Atawodi SE (2008) Organ and carcass weight variation and histopathological changes in *Eimeria tenella* infected broiler chickens treated with aqueous extract of a wild mushroom (*Ganoderma lucidum*). *Electron J Env Agri Food Chem* 7:2906–2913
- Nogueira VA, França TN, Peixoto PV (2009) Ionophore poisoning in animals. *Pesq Vet Bras* 29:191–197
- Hady NMM, Zaki MM (2012) Efficacy of some herbal feed additives on performance and control of cecal coccidiosis in broilers. *APCBEE Procedia* 4:163–168
- Masood S, Abbas RZ, Iqbal Z, Mansoor MK, Sindhu ZUD, Zia MA, Khan JA (2013) Role of natural antioxidants for the control of coccidiosis in poultry. *Pak Vet J* 33(4):401–407
- Ministry of Agriculture and Rural Development (MARD), Algeria. Le renouveau agricole et rural en marche. *Revue et perspectives*. Published 15 July 2018. <http://www.minagri.dz> please mention here the exact URL, this link took me to the ministry website
- Vega-Galvez A, Miranda M, Punte Diaz L, Lopez L, Uribe E, Rodriguez K (2010) Effective moisture diffusivity determination and mathematical modeling of the drying curves of the olive-waste cake. *Bioresour Technol* 101:7265–7270
- Yu J, Zhang J, He J, Liu Z, Yu Z (2009) Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresour Technol* 100:903–908
- Christian MS, Sharper VA, Hoberman AM, Seng JE, Fu L, Covell D, Diener RM, Bitler CM, Crea R (2004) The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem Toxicol* 27:309–330
- De Pablos LM, Santos MFB, Montero E, Garcia-Granados A, Parra A, Osuna A (2010) Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol Res* 107:601–604
- Gacioui F, Hadj Amar Z, Oussaid S (2013) Extraction, optimisation et pouvoir antioxydant des polyphénols des feuilles d'oleastre. *Nut Santé* 2:30–38
- Sayehban P, Seidavi A, Dadashbeiki M, Ghorbani A, Araujo WAG, Albino LFT (2016) Effects of different levels of two types of olive pulp with or without exogenous enzyme supplementation on broiler performance and economic parameters. *Braz J Poultry Sci* 18:489–500
- Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K (2014) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem* 166:585–595
- Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ (2005) Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 53:1370–1373
- Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, DineT Brunet C, Luyckx M et al (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol* 72:35–42
- Vermerris W, Nicholson R (2006) The role of phenols in plant defence. In: Vermerris W, Nicholson R (eds) *Phenolic compound biochemistry*, Chapter 6. Springer, Dordrecht, pp 211–234
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–1237
- Brand Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28:25–30
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nut* 44:307–315
- Carvalho FS, Wenceslau AA, Teixeira M, Alexandre J, Carencro M, Diego A, Milo AD, George B, Albuquerque R (2011) Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. *Vet Parasitol* 176:95–100
- Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A (2003) The mechanism of bacterial action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichiacoli* and *Bacillus subtilis*. *J Essent Oil Res* 15:286–292
- Remmal A, Achahbar S, Bouddine L, Chami F, Chami N (2013) Oocysticidal effect of essential oil components against chicken *Eimeria* oocysts. *Int J Vet Med* 2013:599816
- Remmal A, Achahbar S, Bouddine L, Chami N, Chami F (2011) In-Vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet Parasitol* 182:121–126
- Becerril R, Nerin C, Gómez-Lus R (2012) Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog Dis* 9(8):699–705
- Ola-Fadunsin SD, Ademola IO (2014) Anticoccidial effects of *Morindalucida* acetone ex tracts on broiler chickens naturally infected with *Eimeria* species. *Phar Biol* 52:330–334

34. Molan AL, Zhuojian L, De S (2009) Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitol* 56:1–5
35. Narsih KS, Wignyanto WS (2012) Identification of aloin and saponin and chemical composition of volatile constituents from *Aloe vera* (L.) Peel. *J Agric Food Tech* 2:79–84
36. Pieri FA, Silva VO, Vargas FS, Veiga Junior VF, Moreira MAS (2014) Antimicrobial activity of *Copaiferalangsdorffii* oil and evaluation of its most bioactive fraction against bacteria of dog's dental plaque. *Pak Vet J* 34:165–169
37. Xiao CW, Ji QA, Rajput ZI, Wei Q, Liu Y, Bao GL (2014) Antifungal efficacy of *Phellodendronamurense* ethanol extract against *Trichophyton mentagrophytes* in rabbits. *Pak Vet J* 34:219–223
38. Habibi H, Firouzi S, Nili H, Razavi M, Asadi SL, Daneshi S (2016) Anticoccidial effects of herbal extracts on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens: in-vitro and in-vivo study. *J Parasit Dis* 40:401–407
39. Drănga L, Györke A, Ferreira JFS, Pop IA, Dunca I, Drăgan M, Mircean V, Dan I, Cozma V (2014) Effects of *Artemisia annua* and *Foeniculum vulgare* on chickens highly infected with *Eimeria tenella* (Phylum Apicomplexa). *Acta Vet Scand* 56:22
40. Messai A, Bensegueni A, Abdeldjelil M, Agabou A, Redouane-Salah S (2014) Effects of white wormwood (*Artemisia herba-alba Asso*) during an experimental coccidiosis in broilers. *Ann Biol Res* 5:61–66
41. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-barberán FA, Datta N, Sinsanganusong R, Chen SS (2004) Flavonoids in food and their health Benefits. *Plant Foods Human Nut* 59:113–122
42. Ghedira K (2005) Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4:162–169
43. Ghedadba N, Hambaba L, Ayachi A, Aberkane MC, Bousselsela H, Oueld Moukhtar SM (2015) Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie* 13:118–129
44. Liu Y, Young K, Rakotondraibe LH, Brodie PJ, Cassera MB, Callmander MW, Rakotondrajaona R, Rakotobe E, Rasamison VE, Tendvke K, Shen Yand Kingston DG (2015) Antiproliferative compounds from *cleistanthus boivinianus* from the Madagascar dry forest. *J Nat Prod* 78:1543–1547
45. Dai Y, Liu Y, Rakotondraibe LH (2018) Novel bioactive natural products isolated from madagascar plants and marine organisms (2009–2017). *Chem Pharm Bull* 66:469–482
46. Kayser O, Albrecht FK, Simon LC (2003) Natural products as potential antiparasitic drugs. *Parasitol Res* 90(2):S55–S62
47. Nikmehr B, Ghaznavi H, Rahbar A, Sadr S, Mehrzadi S (2014) In-Vitro anti-leishmanial activity of methanolic extracts of *Calendula officinalis* flowers, *Datura stramonium* seeds, and *Salvia officinalis* leaves. *Chinese J Nat Med* 12:423–427
48. Sülsen VP, Puente V, Papademetrio D, Batlle A, Martino VS, Frank FM, Lombardo ME (2016) Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 11:e0150526
49. Ramdane F, Essid R, Fares N, El Ouassis D, Aziz S, Mohammed MH, Ould Hadj MD, Limam F (2017) Antioxidant antileishmanial cytotoxic and antimicrobial activities of a local plant *Myrtus nivellei* from Algeria Sahara. *Asian Pac J Trop Biomed* 7:702–707
50. Panda KS, Luyten W (2018) Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. *Parasite* 25:10
51. Kerboeuf D, Riou M, Guégnard F (2008) Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini Rev Med Chem* 8:116–128
52. Mendonça-Filho RR, Rodriguez IA, Alviano DS, Santos AL, Soares RM, Alviano CS, Lopes AH, Rosa Mdo S (2004) Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Res Microbiol* 155:136–143
53. Dabrosca D, Pacifico S, Cefarelli G, Mastellone C, Fiorentino A (2007) Limoncella apple, an Italian apple cultivar: phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chem* 104:1333–1337
54. Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N (2012) Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *Int J Mol Sci* 13(3):3291–3340
55. Morelló JR, Vuorela S, Rome MP, Motilva MJ, Heinonen M (2005) Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *J Agric Food Chem* 53:2002–2008
56. Moudache M, Colon M, Nerín C, Zaidi F (2016) Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chem* 212:521–527
57. Moudache M, Nerín C, Colón M, Zaidi F (2017) Antioxidant effect of an innovative active plastic film containing olive leaves extract on fresh pork meat and its evaluation by Raman spectroscopy. *Food Chem* 229:98–103
58. Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A (2003) Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africana leaves. *J Ethnopharmacol* 84:299–305
59. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 89:191–198
60. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued L, Triki-Ellouz Y, Nasri M (2009) Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem* 114:1198–1205
61. Tamatopoulos S, Katsoyannos E, Chatzilazarou A (2014) Antioxidant activity and thermal stability of oleuropein and related phenolic compounds of olive leaf extract after separation and concentrations by salting-out-assisted cloud point extraction. *Antioxidants* 3:229–244
62. Yua JJ, Wang CZ, Ye JZ, Tao R, Zhang YS (2015) Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europea* (Olive) leaf extract and antioxidant activities. *Molecules* 20:2903–2921
63. Cordero JG, García RE, Avila J, Gargini R, Escudero VG (2018) Benefit of oleuropein aglycone for Alzheimer's disease by promoting autophagy. *Oxid Med Cell Longev* 2018:5010741
64. Wang L, Tu YCh, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu J (2006) Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem* 54:9798–9804
65. Lafka TI, Lazou Andriana E, Sinanoglou Vassilia J, Lazos Evangelos S (2013) Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Food* 2:18–31
66. Miguel MG (2010) Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr J* 25:291–312
67. Kumaran A, Karunakaran RJ (2007) In-vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT Food Sci Technol* 40:344–352
68. Bougandoura N, Bendimered N (2012) Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de *Satureja calamintha* spp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nat Techn* 9:14–19
69. Xie P, Huang L, Zhang C, Zhang Y (2015) Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure activity relationships. *J Funct Foods* 16:460–471
70. Ramos P, Santos S, Guerra A, Guerreiro O, Felício L, Jerónimo E, Silvestre A, Pascoal C, Duarte M (2013) Valorization of olive mill residues: antioxidant and breast cancer anti-proliferative activities

- of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Ind Crops Prod* 46:359–368
71. Gadelhaq SM, Arafab WM, Abolhadid SM (2018) In-Vitro activity of natural and chemical products on sporulation of *Eimeria* species oocysts of chickens. *Vet Parasitol* 251:12–16
 72. Kalmobé J, Ndjonka D, Boursou D, Vildina JD, Liebau E (2017) Phytochemical analysis and in-vitro anthelmintic activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the bovine parasite *Onchocerca ochengi* and on drug resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complement Altern Med* 17:404
 73. Fadili K, Amalich S, Ndedianhoua SK, Bouachrine M, Mahjoubi M, El Hilali F, Zair T (2015) Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*. *Int J Innovation Sci Res* 17:24–33
 74. Kandouli C, Cassien M, Mercie A, Delhedde C, Ricquerbourg E, Stocker P, Mekaouche M, Leulmi Z, Mechakra A, Thétiot-Laurent S, Culcasi M, Pietri S (2017) Antidiabetic, antioxidant and anti-inflammatory properties of water and n-butanol soluble extracts from Saharian *Anvillea radiata* in high-fat-diet fed mice. *J Ethnopharmacol* 207:251–267
 75. Fard MT, Arulselvan P, Karthivashan G, Adam SK, Fakurazi S (2015) Bioactiveextract from *Moringa oleifera* inhibits the pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Pham Mag* 11:556–563
 76. Abdel-Latif M, El-Shahawi G, Aboelhadid SM, Abdel-Tawab H (2017) Modulation of murine intestinal immunity by *Moringa oleifera* extract in experimental hymenolepiasis nana. *J Helminthol* 6:1–12
 77. Manso S, Cacho-Nerin F, Becerril R, Nerín C (2013) Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control* 30(2):370–378
 78. Clemente I, Aznar M, Silva F, Nerín C (2016) Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innov Food Sci Emerg Technol* 36:26–33
 79. Clemente I, Aznar M, Salafranca J, Nerín C (2017) Raman spectroscopy, electronic microscopy and SPME-GC-MS to elucidate the mode of action of a new antimicrobial food packaging material. *Anal Bioanal Chem* 409(4):1037–1048
 80. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P (2006) Antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in-vitro, in-vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 50:13
 81. Edgecombe SC, Stretch GL, Hayball PJ (2000) Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nut* 130:2996–3002
 82. Gourama H, Bullerman LB (1987) Effects of oleuropein on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Unknown J* 20:226–228
 83. Atawodi SE, Liman ML, Onyike EO (2013) Antioxidant effects of *Tamarindus indica* following acute and chronic carbon tetrachloride induced liver injury. *Int J Agric Bio* 15:410–418
 84. Kurkure NV, Kolte SW, Bhandarkar AG, Kalorey DR (2006) Evaluation of herbal coccidiostat “coxynil” in broilers. *Ind J Exp Biol* 44:740–744
 85. Chandrakesan P, Muralidharan K, Kumar VD, Ponnudurai G, Harikrishnan TJ, Rani KSVN (2009) Efficacy of a herbal complex against caecal coccidiosis in broiler chickens. *Vet Arh* 79:199–203
 86. Allen PC, Danforth HD (1998) Effects of dietary supplementation with n-3 fatty acid esters on coccidiosis in chickens. *Poultry Sci* 77:1631–1635
 87. Peek H, Landman, WJM (2011) Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet Q* 31(3):143–161
 88. El-Banna HA, El-Bahy MM, El-Zorba HY, El-Hady M (2005) Anticoccidial efficacy of drinking water soluble diclazuril on experimental and field coccidiosis in broiler chickens. *J Vet Med A* 52:287–291
 89. Ruiz A, Guedes AC, Muñoz MC, Molina JM, Hermosilla C, Martín S, Hernández YI, Hernández A, Pérez D, Matos L, López AM, Taubert A (2012) Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol Res* 110(6):2131–2136
 90. Conway DP, McKenzie ME (2007) *Poultry coccidiosis and effect of coccidiosis diagnostic and testing procedures*, 3rd edn. Blackwell Publishing, Ames

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

In vitro anticoccidial effects of Olive Leaf (*Olea europaea* L. var. Chemlal) extract against broiler chickens *Eimeria* oocysts

Nedjima Debbou-Iouknane¹, Cristina Nerín², Meriem Amrane-Abider³, Abdelhanine Ayad¹

¹Department of Environment Biological Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Algeria.

²Aragón Institute for Engineering Research (I3A), University of Zaragoza, Campus, Rio Ebro, María de Luna 3, Spain.

³Applied Biochemistry Laboratory, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Algeria.

Keywords: *Olea europaea* L., var. Chemlal; olive leaves; anticoccidial activity; chickens; in vitro.

Abstract. The aim of the present study was to evaluate in vitro the anticoccidial activity of olive leaves (OL) on the destruction of *Eimeria* oocysts isolated from naturally infected chickens. The identification of phenolic compounds was obtained by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. The treatment of *Eimeria* oocyst with the OL extract and standard compounds (quercetin and oleuropein) leads to their lysis as shown by the release of substances absorbing at 273 nm. The results indicated that the optimum OL extract and the standard compound showed that the number of oocysts decreased after treatment. The OL extract at a concentration of 1.46 mg/mL recorded a decrease rate of 5.89% of *Eimeria* oocysts after 7-h treatment. On the other hand, quercetin was most effective (48.57%) followed by oleuropein (27.53%) after 7-h treatment. The ethanol treated *Eimeria* suspension was significantly ($P \leq 0.05$) higher than the tested concentration of the OL extract and the standard compound. The findings of the present study showed that it could be concluded that the OL extract possesses the ability to destroy *Eimeria* spp. In future, in vivo investigations are required to assess the efficiency of the OL bioactive compounds in broiler chickens.

Introduction

Coccidiosis is defined as an enteric parasitic pathology of birds between the ages of 3 and 18 weeks caused by the protozoa *Eimeria* spp. belonging to the genus *Eimeria* (Metwaly et al., 2012). It is one of the most common and important diseases that has a negative impact on the growth of poultry industry, resulting in about \$1.5 billion losses in poultry industry annually worldwide (Arabkhazaeli et al., 2014). This infection causes reduced feed efficiency, body weight gain, and temporary reduction in egg production.

Anticoccidial drugs in feed and water of chickens have a considerable success. The major problem observed of the commonly available anticoccidial drugs is development of resistance in *Eimeria* species, huge residual effects of anticoccidial drugs in meat and toxic effects of disinfectants. There is an intense need to establish new successful treatments to control coccidiosis in poultry farms and to search for alternative environmentally friendly anti-*Eimeria* agents. Surveys have been published that some botanicals have been reported for their promising results as anticoccidials and improving poultry performance worldwide in broiler chickens (Abbaset al., 2013).

In Algeria, *Olea europaea* L. (var. Chemlal) is the most dominant olive variety, representing nearly 45% of the national oil production. Olive tree pruning produces a huge quantity of olive leaves (~25 kg/tree). It has been estimated that approximately 100 g of leaves are present for every kilogram of olives used in oil extraction. It has been shown that dried leaves

of the leaf olive (*Olea europaea* L.) plant have been used in traditional Algerian medicine for thousands of years.

Many deep studies have shown that the beneficial properties of olive leaves are due to valuable biphenolic compounds. Likewise, the use of whole olive leaves and olive leaf extracts has increased considerably in the pharmaceutical and food industries as food additives. Moreover, they are used for antioxidant (Bullotta et al., 2011), antimicrobial (Pereira et al., 2007), lipid-low (Lee and Lee, 2010), and anticoccidial activity (De Pablo et al., 2010). In addition, other investigations have demonstrated the potential role of anti-proliferative and apoptotic effects of olive leaves (Han et al., 2009). However, to the author's knowledge, the anticoccidial activity of olive leaves (*Olea europaea* L., var. Chemlal) has never been reported. The aim of the present study was to evaluate in vitro the anticoccidial activity of olive leaves (OL) growing in Algeria (area of Bejaia) on the destruction of *Eimeria* oocysts isolated from naturally infected chickens.

Materials and methods

Ethics committee approval

Ethics committee approval was received for this study from the scientific committee of Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Algeria.

Plant materials

The leaves of olive (*Olea europaea* L. var. Chemlal) were collected from Soummam Valley, Bejaia province (Algeria), during March and June 2018. Samples were dried in the shade at room temperature until

Correspondence to Prof. Dr. Abdelhanine Ayad, Department of Environment Biological Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Bejaia, Bejaia 06000, Algeria.
Email: abdelhanine.ayad@univ-bejaia.dz

constant weight was obtained, and then crushed using a traditional grinder. The resulting powder was passed through sieves of a standard 125 µm. Only the fraction with a particle size of ≤ 125 µm was collected, stored at +4°C in amber bottles and sterilized until used.

Extraction and optimization of total phenolic compounds (TPC) by microwave assisted extraction (MAE)

A domestic microwave oven (2450 MHz, Samsung model NN-S674MF, Kuala Lumpur, Malaysia) was modified in order to extract phenolic compounds from the OL powder. Olive pulp powder (1 g) was stirred manually in aqueous ethanol in preparation for extraction using the MAE system. The MAE parameters were microwave power (700–900 W), extraction time (45–75 s), liquid-solid ratio (20–40 mL/g) and ethanol proportion (20–60%). After that, the extract was centrifuged at 10,000 rpm and filtered through a Buchner funnel lined with Whatman No 3–filter paper, and the supernatant was collected in a volumetric flask. The extract was stored at +4°C until used.

High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) analysis

The identification of phenolic compounds of the OL extract was obtained by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization (UPLC-ESI-MS) and quadrupole-time of flight detector (QTOF). The equipment was Xevo G2 mass spectrometer consisting of an hexapole, a collision cell and time of flight analyser (QTOF) supplied by Waters (Milford, MA, USA). The electrospray probe was used in the positive (ESI⁺) and negative (ESI⁻) modes as well as the sensitivity analyzer mode. The mass range considered was from 10 to 1,000 Da. The corona voltage was 2.5 kV for (ESI⁺) and 0.5 kV for (ESI⁻). The sampling cone voltage was optimized between 20 and 50 V. Finally, 30 V was selected for the screening because more peaks were detected. Other MS parameters were as follows: the source temperature was 150°C, the desolvation gas temperature was 450°C and the desolvation gas flow was 650 Lh⁻¹. The MSE mode was selected for the acquisition, and collision ramp energy from 5 to 40 V was used. MassLynx v.4.1 software (Waters, Milford MA, USA) was used to analyze the samples, and CromaLynx (Waters, Milford MA, USA) was used to deconvolve the spectra.

Evaluation of anticoccidial activity

Eimeria oocysts isolation and purification

An oocysts sample of *Eimeria* spp. was isolated from fresh feces of broilers suffering from coccidiosis in Bejaia area (Algeria). Oocysts were sporulated by placing in 2.5% K₂Cr₂O₇ solution in the presence of

suitable humidity (> 70%) and temperature (28°C). Sporulated oocysts were cleaned and counted using Malassez chamber. The mean number of oocysts per milliliter of the sample was calculated. The identification of *Eimeria* species in chickens was made on the basis of some criteria such as size, shape, presence or absence of micropyle, time of sporulation, intestinal location and appearance and coarse characteristics of intestinal lesions (Carvalho et al., 2011). The percentage of each species in the mixed suspension was approximately 32% *E. acervulina*, 27% *E. tenella*, 15% *E. mitis*, 14% *E. brunetti* and 12% *E. maxima*.

The purification of oocysts was carried out from 1 L phosphate buffered saline (PBS, containing 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.13 g/L Na₂HPO₄, 2H₂O and 0.2 g/L KH₂PO₄). Neutral substrates containing an inhibitor (streptomycin 1 mg/mL and penicillin V 100 IU) were added to prevent any bacterial evolution, and fluconazole, 17 mg/mL, was used as antifungal. The pH was adjusted to 7.4 and the solution was sterilized by membrane filtration through a 0.2 µm filter. The HBSS (Hanks balanced salt solution) medium was carried out in the laboratory (NaCl, 8.0, KCl 0.4, CaCl₂, 0.139, D-glucose, 1.0, Na₂HPO₄, 0.0478, KH₂PO₄, 0.06 and MgSO₄, 0.097 g/L in 1000 mL of distilled water). The solution was sterilized as well as that of the 0.2% agar.

Effects of the leaf extract and standard compounds on the decrease of oocysts number

The activity of the OL extract and standard compounds (quercetin and oleuropein) (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ, USA) was determined at a concentration of 18.8 mg/mL in triplicate by incubation at ambient temperature (25°C) for 24 h (Debbou-Iouknane et al., 2019). The suspension was incubated at different periods of time: 0, 1, 3, 5, 7, and 24 h. One milliliter of the suspension contained 100 µL of washed suspension of *Eimeria* oocysts at 4,006x10⁶ oocysts/mL, 700 µL of PBS, and 200 µL of the optimum OL extract.

After incubation, the samples were centrifuged at 320 g for 5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 273 nm by spectrophotometer (Shimadzu, model: UV 100 Japan). Then, the percentage of destruction sporulated oocysts was recorded. The LC₅₀ value was then inferred from the regression curve. The number of destructions of sporulated oocysts was estimated three times in a cell volume of 1 µL amounts to 4.006x10⁴. The ethanol solvent was also used as a negative control.

Effect of the diclazuril sodium on the decrease of the oocysts number

Diclazuril (Algicox 10 mg/mL), molecular formula C₁₇H₈C₁₃N₄NaO₂ and anticoccidiosis (Diclosol[®], Avico, Arab Industry Veterinary Co, Amman, Jordanie) were

tested in triplicate (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1 mg/mL) using the microplate method. The number of oocysts was counted twice in a cell volume of 1 μ L amounts to 3.98×10^4 oocysts/mL.

Statistical analysis

A statistical analysis was performed by using JMP[®] Software, version 7.0 (SAS Institute Inc, 2007). The results were expressed in means \pm SE. The values were statistically significant when the *P* value was ≤ 0.05 . Inoculum suspension taken at 0, 1, 3, 5, 7 and 24 h on oocysts number was examined by the Student *t* test. The lethal concentration is defined as the concentration that reduces the initial number of sporulated oocysts to 50%.

Results

Fig. 1 represents the chromatogram of the phenolic profile of the OL extract by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectro metry with electrospray ionization (HPLC-ESI-MS). The molecular analysis of molecules revealed the presence of several biophenol classes (Table 1) *viz.* flavonols (luteoline-7-O-glucoside, quercetin, quercetin-3-O-rutinoside, quercetino-O-O-(O-galloyl)-hexoside, phenolic acids (chlorogenic acid), secoiridoids (oleuropein, phenolic alcohol (tyrosol/p-hydroxyphenyl ethanol/p-HPEA), isohamnetinneobavaisoflavone, 2, 3-dihydro-amentoflavone, quercetin-3-O-rutinoside, chlorogenic acid, isorhamnetin 3-O-(6''-O-feruloyl)-glucoside) and diligustilide.

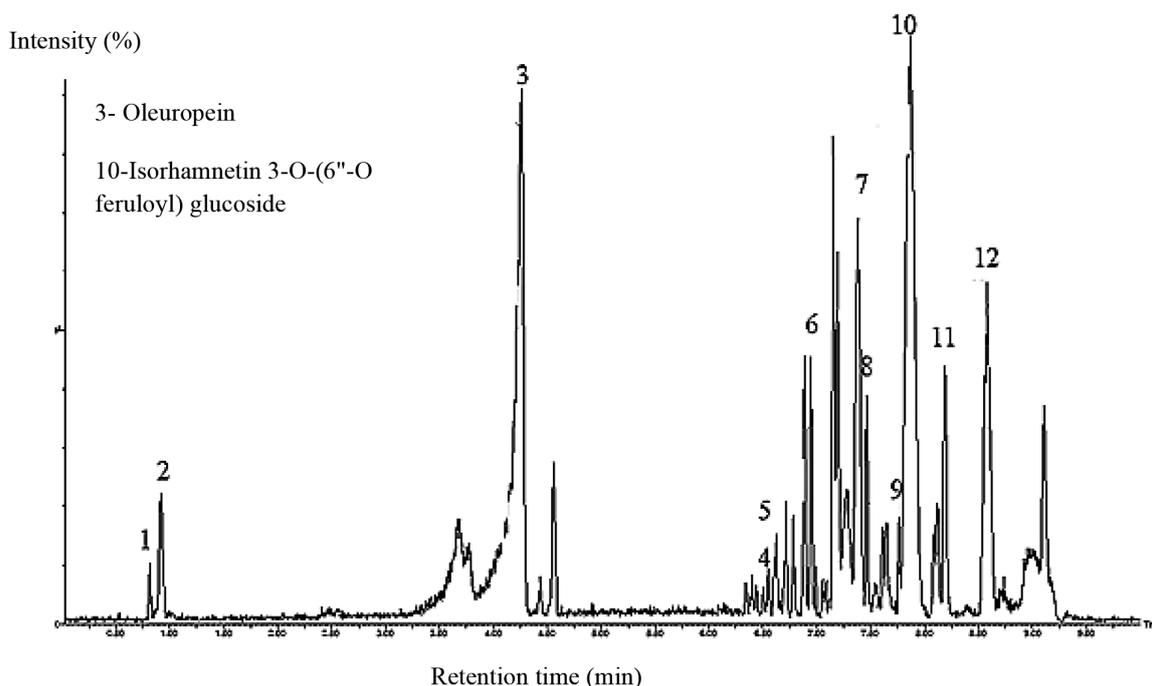


Fig. 1. HPLC-ESI-MS chromatogram of the phenolic profile of olive leaves

Table 1. Prediction profile phenolic for the optimal conditions obtained by CCD model

	TR	M-H	μ g/g	Name	Formula
1	0.89	447	400,120	Cynarosid/luteolin-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$
2	0.92	137	8261,999	Tyrosol	$C_8H_{10}O_2$
3	4.26	539	75477,543	Oleuropein	$C_{25}H_{32}O_{13}$
4	6.55	301	2023,187	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$
5	6.63	315	4155,147	Isohamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$
6	6.89	321	11056,997	Neobavaisoflavone	$C_{20}H_{18}O_4$
7	7.38	539	36946,034	2, 3-dihydro-amentoflavone	$C_{30}H_{20}O_{10}$
8	7.46	609	7692,308	Quercetin-3-O-rutinoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$
9	7.76	706	3140,942	Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$
10	7.87	688	90257,447	Isorhamnetin 3-O-(6''-O-feruloyl)-glucoside)	$C_{32}H_{30}O_{15}$
11	8.19	379	13853,776	Diligustilide	$C_{24}H_{28}O_4$
12	8.58	615	32845,634	Quercetin-o-(o-galloyl)-hexoside	$C_{28}H_{24}O_{16}$

The results indicated that the optimum OL extract and the standard compound, tested at respective concentrations of 44.001 and 18.771 mg/g, showed that the number of oocysts decreased after treatment. The OL extract at a concentration of 1.46 mg/mL recorded a decrease rate of 5.87% of *Eimeria* oocysts after 7-h treatment. On the other hand, quercetin

was most effective (56.5%), followed by oleuropein (35.1%) after 7-h treatment. The lethal concentration LC_{50} of the OL extract, quercetin and oleuropein was recorded to be the concentration of 194.92, 14.88 and 173.93 mg/mL, respectively (Fig. 2A, B and C, respectively). Anticoccidial effects of diclazuril were shown as a diminution of the oocysts number

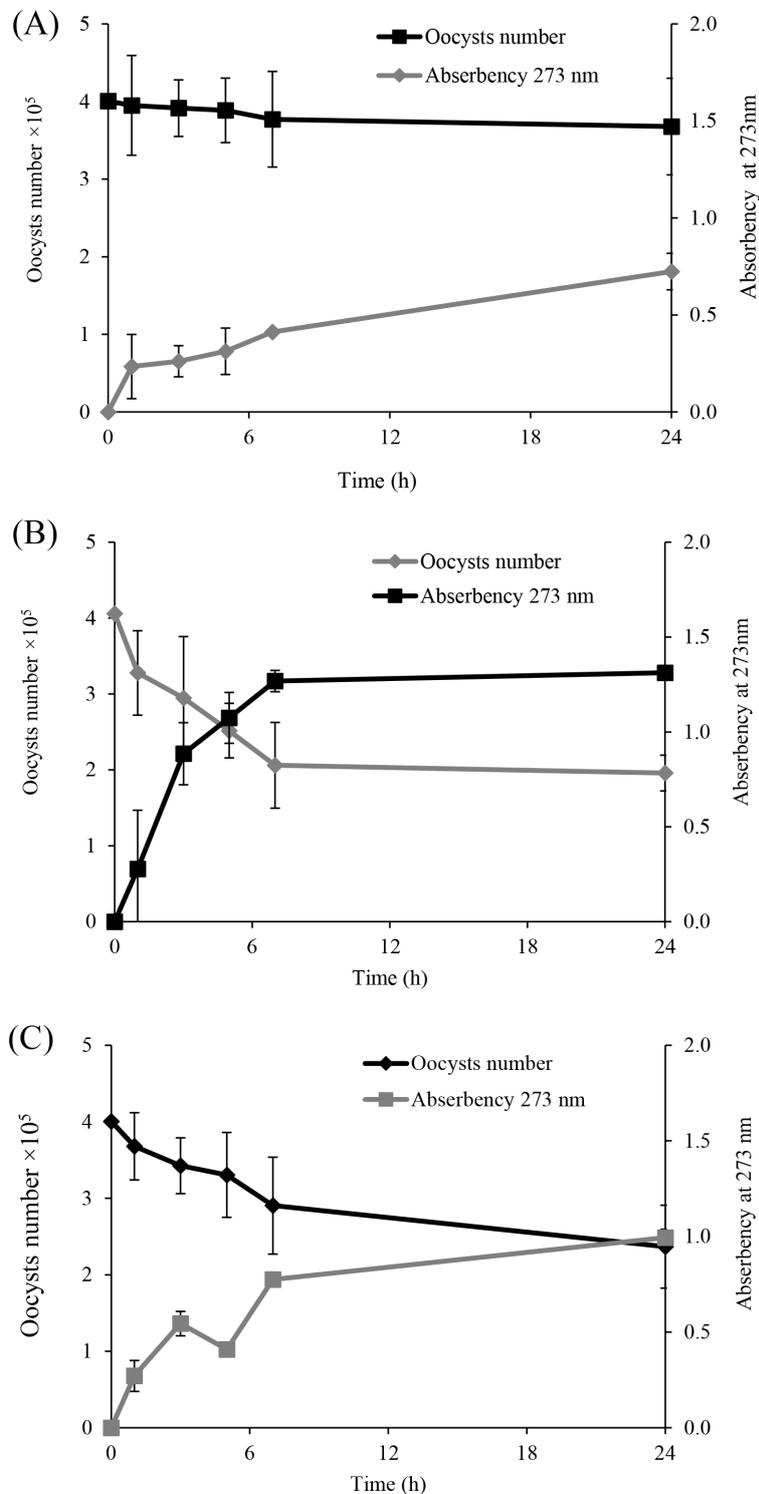


Fig. 2. Kinetics of the decrease of the oocysts number and 273 nm wave length absorbing material release from *Eimeria* oocysts treated by optimum olive leaf extract (*Olea europaea* L., var. Chemlal) (A), quercetin (B), and oleuropein (C)

of 44.3% at 0.5 mg/mL concentration (Fig. 3). The ethanol treated *Eimeria* suspension (negative control) was significantly ($P \leq 0.05$) higher than the tested concentration of the OL extract and the standard compound.

According to our results, the OL extract, quercetin and oleuropein were recorded to reduce the oocysts number after 7 h for different periods of time (5.89,

48.57 and 27.53%, respectively). This decrease in the number of oocysts causes a considerable release of 273 nm of absorbing material from *Eimeria* oocysts that is depending concentration of the OL extract, quercetin and oleuropein. Fig. 4 (A, B) illustrates a considerable decrease in the number of *Eimeria* oocysts with an increase in the concentration of quercetin and oleuropein ranging from 0.1 to 1 mg/mL.

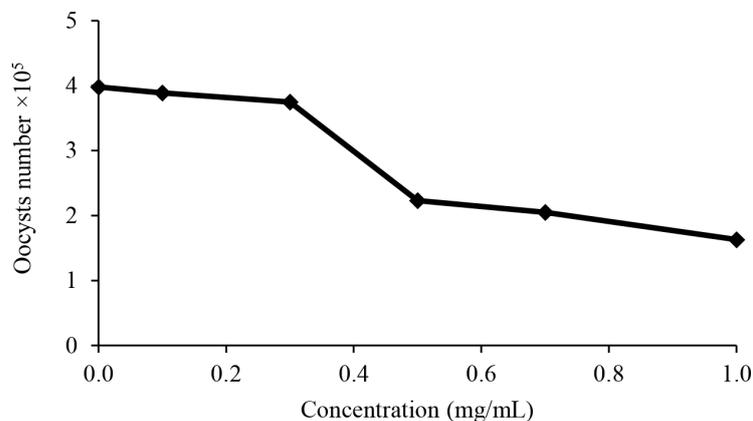


Fig. 3. Effect of diclazuril concentrations on the oocysts number

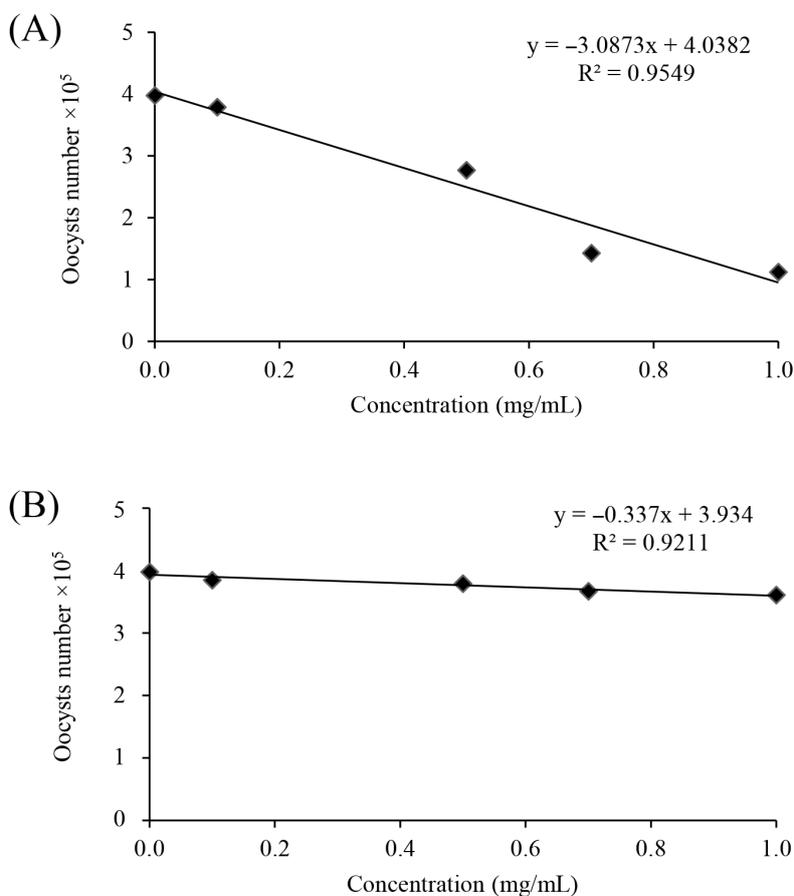


Fig. 4. The correlation between quercetin (A) and oleuropein (B) concentrations and the number of *Eimeria* oocysts

Discussion

Due to the emergence of resistance and drug residues, the use of plant extracts with biological activity has become particularly important to restrict the use of synthetic compounds against coccidial infections (Abbas et al., 2012). Therefore, the use of co-products as an anticoccidial remedy is promising as an alternative for controlling coccidiosis in poultry. Recently, one study has demonstrated the effect of phytochemicals of plant extracts on suppression of *Eimeria* species (Muthamilselvan et al., 2016). The present study work was carried out in order to find a phytobiotic alternative based on an olive co-product to help minimize gastrointestinal disorders caused by *Eimeria* coccidial infection in broiler chickens. To the author's knowledge, this present study is the first to assess in vitro anticoccidial activity of the OL (*Olea europaea* L., var. Chemlal) extract and its phenolic compounds directly on the viability of *Eimeria* oocysts collected in broiler chickens.

It is known that the leaf is the main site of plant metabolism and can be considered as a potential source of bioactive compounds (Tsimidou and Papoti, 2010). Based on an oocyst wall alteration of *Eimeria*, this study showed that the OL extract (*Olea europaea*) had a destructive effect of sporulated oocysts. This anti-*Eimeria* activity may be attributed to bioactive molecules of OL extracts individually or a synergistic interaction of bioactive compounds. It would be more effective to control or treat coccidiosis by the use of a multiple compound, which requires a combination of immunostimulators that induce a good response of essential oils and other natural compounds from medicinal plant extracts that can destroy the *Eimeria* oocyst or interfere with the life cycle (Quiroz-Castañeda, 2018).

In the present study, the characterization by HPLC of the OL extract shows the presence of large concentrations of polyphenolic or biophenols (cynarosid/luteolin-7-O-glucoside; tyrosololeuropein quercetinisohamnetin; neobavaisoflavone 2, 3-dihydro-amentoflavone quercetin-3-O-rutinoside-chlorogenic acid, isorhamnetin 3-O-(6"-O-feruloyl)-glucoside), diligustilide quercetin-o-(o-galloyl)-hexoside) that can be used as natural anticoccidial products. Previous investigations have studied that the polyphenol content of olive leaves is richer in bioactive phenolic compounds than fruits and olive oil (Lalas et al., 2011). In addition, one other study has demonstrated the efficacy of plants and plant extracts against mixed or *Eimeria* individual infections (Udo and Abba, 2018). The results of the present study correspond also with those published previously, which showed that maslinic acid (2- α , 3- β -dihydroxiolean-12-en-28-oic acid), an active compound in the leaves and fruits of the olive tree (*Olea europaea*), has an anticoccidial effect against *E. tenella* oocysts and also increases the weight in chicks treated (De Pablos et al., 2010). In addition,

the active compound of *Olea europaea* has been shown to affect *Toxoplasma gondii* parasites, which may be by inhibiting the serine proteases of the protozoan protein, that is a mechanism necessary for the entry of tachyzoites into the cytoplasm of the host cell (Aladedunye et al., 2008). Therefore, this activity, as well as anti-inflammatory (Aladedunye et al., 2008) and antioxidant properties (Montilla et al., 2003), may be responsible for the anticoccidial properties. Moreover, it has been shown that the use of natural antioxidants such as polyphenols of olive by-products is safer than synthetic polyphenols in chicken diets in order to reduce lipid oxidation (Starčević et al., 2015). Also, Varmaghany et al. (2013) have shown that an olive leaf supplementation diet (oleuropein content, 72.63 mg/g) has an anti-hypertensive effect and reduces the incidence of ascites without affecting the performance of broilers.

Khalafalla and Dauschies (2011) have demonstrated that curcumin, natural polyphenolic component derived from *Curcuma longa*, inhibited the cell invasions of *E. tenella* sporozoites in vitro and in vivo. Thus, anticoccidial activity of *M. oleifera*, including anti-inflammatory and antioxidant properties, was attributed to the biological constituents, including ascorbic acid, flavonoids, phenolics and carotenoid (Abdel-Latif et al., 2017). In other contexts, antimicrobial effects of phenolic compounds are targeted against the bacterial cell wall affecting the cell wall structure (Botta et al., 2005). This is supported by Molan et al. (2009) who explained that condensed tannins could penetrate the wall of the oocyst and cause damage to the cytoplasm by inactivating endogenous enzymes responsible for the sporulation process. Our results in vitro showed the low destruction rate of *Eimeria* oocysts that could be explained by the difference in oocyst resistance. This can be attributed to the impermeability of the inner phospholipid membrane to hydrophilic substances.

In the current study, the OL extract showed low activity with an LC₅₀ of 192.94 mg/mL for a reduction rate of 19.4% compared with allucin hydraulic extract with an LC₅₀ of 180 mg/mL for an inhibition percentage of 99.9% (Alnassan et al., 2015). In another study, the aqueous extract of *T. sanguine* containing phenolic components at a concentration of 2.5 mg/mL significantly inhibited ($P < 0.05$) the capacity of the sporozoites *E. tenella* and *E. necatrix* (Konan et al., 2012). It is important to underline that our observations regarding the concentration of the extraction solvent at 60% ethanol of the OL extract are divergent with those reported by Gadelhaq et al. (2018), where a significant effect of inhibition of sporulation and oocyst deterioration occurred at ethanolic concentrations of 50–70%. In this study, the low destruction rate of oocysts could be explained by the difference in oocyst resistance. This can be attributed to the presence of internal phospholipid membrane, known for its impermeability to lipophilic compounds. This dif-

ference between the reduction rates of oocysts can be attributed to the molecular structure, nature (lipophilic or hydrophilic), the mode of action of these synthetic phenolic compounds, molecular weight and the chemical composition of the oocyst wall. The anticoccidial potential effect of *A. annua* is generally known to have a multitude of antioxidants (vitamin A, C and E) including flavonoids such as quercetin (Bohorun et al., 2004). It has been confirmed that phenols interact with cytoplasmic membranes and change their cation permeability leading to impairment of crucial processes in coccidia cells and finally leading to their death (Sikkema et al., 1995). Our results are in agreement with those of Abuakkada and Ellakany (2008) who reported that diclazuril was more effective in decreasing the oocyst output of isolates of *E. tenella*.

Conclusion

The findings of the present study showed that it could be concluded that the OL (*Olea europaea* L., var. Chemlal) extract possesses the ability to destroy *Eimeria* spp. collected from naturally infected broiler chickens. In addition, quercetin and oleuropein were tested to evaluate separately in vitro anticoccidial

activity against *Eimeria* oocysts for the first time. From this in vitro experiment, our observations showed that the phenolic compound of the OL extract tested separately possesses an anti-*Eimeria* effect. In future, in vivo investigations are required to assess the efficiency of the OL bioactive compounds in broiler chickens.

Conflict of interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgement

Authors gratefully acknowledge professor K. Madani and her team (Laboratory of Biomathematics, Biochemistry, Biophysics and Scientometrics (L3BS), University of Bejaia, Algeria) for technical assistance and reception in her laboratory.

Authors' contributions

NID carried out the experimental work and wrote the manuscript. CN and MAA participated in biochemistry analysis of extract plant and reviewed the manuscript. AA designed, supervised the experimental study and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Abbas R. Z., Colwell D. D., Gilleard J. Botanicals: An alternative approach for the control of avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*. 2012. 68.P 203–15.
2. Abbas R. Z., Iqbal Z., Mansoor M. K., Sindhu Z. U. D., Zia M. A., Khan J. A. Role of natural antioxidants for the control of coccidiosis in poultry. *Pakistan Veterinary Journal*. 2012. 33(4).P. 401–407.
3. Abdel-Latif M., El-Shahawi G., Aboelhadid S. M., Abdel-Tawab H. Modulation of murine intestinal immunity by *Moringa oleifera* extract in experimental hymenolepiasis nana. *Journal of Helminthology*. 2018. 92(2).P. 142–153.
4. Abuakkada S. S., Ellakany H. F. Sensitivity of two field isolates of *Eimeriatenella* from broiler chickens to salinomycin and diclazuril in a battery trial., *Proceedings of the 13th Scientific Congress of the Faculty of Veterinary Medicine (Assut University, Egypt)*. 2008. P. 347–364.
5. Aladedunye F. A., Okorie D. A., Ighodaro M. O. Anti-inflammatory and antioxidant activities and constituents of *Platostoma africanum* P. Beauv. *Natural Product Research*. 2008. 22(12).P. 1067–1073.
6. Alnassan A. A., Thabet A., Dauschies A., Bangoura B. In vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology Research*. 2015., 114.P. 625–630.
7. Arabkhazaeli F., Nabian S., Modirsanei M., Madani S. A. The efficacy of a poultry commercial anticoccidial vaccine in experimental challenge with *Eimeria* field isolates. *Iranian Journal of Parasitology*. 2014. 8(2).P. 234–24.
8. Bohorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., Acuoma O. I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004. 84 P. 1553–1561.
9. Botta B., Vitali A., Menendez P., Misiti D., Monache G. G. Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*. 2005., 12(5).P. 713–739.
10. Bulotta S., Corradino R., Celano M., Agostino M. D., Maiuolo J., Oliverio M., Procopio A., Iannone M., Rotiroli D., Russo D. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry*. 2011. 127(4).P. 1609–1614.
11. Carvalho F. S., Amauri A. W., Marcel T., João A. M. C., Antônio D. B. M., George R. A. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. *Veterinary Parasitology*. 2011. 176.P. 95–100.
12. De Pablos M., Santos M. F. B. D., Montero E., Garcia-Grana-dos A., Parra A., Osuna A. Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitology Research*. 2010.1, 107.,P. 601–604.
13. Debbou-Iouknane N., Nerin C., Amrane M., Ghemghar M., Madani K., Ayad A. In vitro anticoccidial activity of olive pulp (*Olea europaea* L. var. chemlal) extract against *Eimeria* oocysts in broiler chickens. *Acta Parasitologica*. 2019 64(4).P. 887–897.
14. Gadelhaq S. M., Arafab W. M., Abolhadid S. M. In vitro activity of natural and chemical products on sporulation of *Eimeria* species oocysts of chickens. *Veterinary Parasitology*. 2018 251.P. 12–16.
15. Han J., Talorete T. P. N., Yamada P., Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. 2009. 59(1).P. 45–53.
16. Khalafalla R. E., Dauschies A. In vivo evaluation of anticoccidial effect of antibody fragments expressed in pea (*Pisum sativum*) on *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology Research*. 2010 107.P. 983–986.
17. Konan K. S., Toure A., Ouattara K. D., Djaman A. J., N'guessan J. D. In vitro anticoccidial activity of *Thonningia sanguinea* extract on *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix* sporozoites cells. *African Journal of Microbiology Research*. 2012. 6(33).P. 6247–625.
18. Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J., Bogiatzis F. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. 2011. 127(4).P. 1521–1525.
19. Lee O., Lee B. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*. 2010. 101(10).P. 3751–3754.
20. Metwaly M. S., Dkhil M. A., Al-Quraishy S. The potential role of Phoenix dactylifera on *Eimeria papillata*-induced infection in mice. *Parasitology Research*. 2012. 111.P. 681–687.

21. Molan A. L., Zhuojian L., De S. Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitologica*. 2009. 56.P. 1–5.
22. Montilla M. P., Agil A., Navarro M. C., Jiménez M. I., García-Granados A., Parra A., Cabo M. M. Antioxidant Activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Medica*. 2003. 69(5). P. 472–474.
23. Muthamilselvan T., Kuo T. F., Wu Y. C., Wu Y. Herbal remedies for coccidiosis control. A review of plants compounds, and anticoccidial actions. *Evid-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016.P. 1–19.
24. Pereira A. P., Ferreira I. C. F. R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P. B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. A. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*. 2007. 12(5).P. 1153–1162.
25. Quiroz-Castañeda R. E. Avian coccidiosis, new strategies of treatment. *Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment*. 2018.P. 119.
26. Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 1995. 59(2). P. 201–222.
27. Starčević K., Krstulović L., Brozić D., Maurić M., Stojević Z., Mikulec Ž., Bajić M., Mašek T. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015.95(6). P. 1172–1178.
28. Tsimidou M. Z., Papoti V. T. *Bioactive Ingredients in Olive Leaves*, Elsevier Inc. Amsterdam, The Netherlands. 2010.
29. Udo E. J., Abba A. M. Comparative Study of in-vitro anticoccidial efficacy of *Allium sativum* and *Carica papaya*. *Journal of Zoology Research*. 2018. 2(2).P. 10–14.
30. Varmaghany S., Rahimi S., Torshizi M. K., Lotfollahian H., Hassanzadeh M. Effect of olive leaves on ascites incidence, hematological parameters and growth performance in broilers reared under standard and cold temperature conditions. *Animal Feed Science and Technology*. 2013. 185(1–2).P. 60–69.

Received 28 December 2020

Accepted 10 February 2021

Discussion générale

L'utilisation des extraits végétaux comme remède peut atténuer la résistance des coccidies aux médicaments et leur impact sur la santé des consommateurs, car ce ne sont pas seulement des produits naturels, mais aussi de nouvelles molécules thérapeutiques pour lesquelles aucune résistance n'a encore été développée (Ola-Fadunsin et Ademola, 2013).

Dans un premier temps, nous dressons un inventaire des coccidies récoltés de 19 cas positifs sur 35 fermes avicoles de type poulet de chair avec une prévalence globale de 54,28%. De même, une autre investigation, le taux d'infestation similaire est enregistré (55%) dans la région de Blida (Triki et Pacha, 2010). Contrairement, Lawal et son équipe (2016) notent une forte prévalence de l'ordre de 87,4% et (Grema et al., 2014) un taux faible de 11,4% en Nigeria. Ces variations peuvent être liées à une multitude de facteurs tels que la zone géographique, la période d'échantillonnage et les conditions climatiques (Lawal et al., 2016). Dans la présente étude, 71,55% des intestins examinés après autopsie sont parasités quel que soit l'âge des individus. La valeur de prévalence élevée observée peut provenir de mauvaises pratiques de gestion dans les élevages de poulets de chair telles que les fuites d'eau, les fèces accumulées, une mauvaise hygiène, une faible ventilation et une forte densité de population (Guinebert et Penaud, 2005). Nous constatons qu'il y a une différence significative des prévalences entre les groupes d'âges ($P < 0,05$). Le groupe d'âge 32-46 jours se montre plus alarmant dans cette enquête. De nombreuses études montrent que les poussins plus jeunes sont plus sensibles aux infections naturelles que les plus âgés (Ahmed et al., 2003; Al-Quraishy et al., 2009; Amare et al., 2012b).

Nos résultats révèlent la présence de cinq espèces identifiées par la méthode conventionnelle à savoir : *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. maxima* et *E. mitis*. *E. acervulina* et *E. tenella* dont les deux dernières sont les plus répandues avec des taux respectifs de 32,05 % et 26,92 %, qui sont connues pour leur potentiel élevé reproductif (Williams et al., 2009). Ce taux considérable d'oocystes d'*Eimeria* explique probablement l'échec de la lutte contre la maladie parasitaire par chimio prophylaxie qui peut être dû à une mauvaise utilisation des coccidiostatiques induisant un développement de la résistance aux anticoccidiens (Hadipour et al., 2011; Zhang et al., 2013). Récemment, des oocystes d *E. acervulina* et *E. maxima* sont isolés au Nord-Est de l'Algérie (Jijel) en utilisant la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) et la morphométrie (Djemai et al., 2016).

Des résultats similaires de prévalence élevée de la coccidiose chez le poulet de chair sont signalés par plusieurs équipes de chercheurs (Adhikari et al., 2008 ; Hadipour et al., 2011 ; Amare et al., 2012a ; Gadelhaq et al., 2014 ; Kumar et al., 2015 ; Adang et Isah, 2016). Nos résultats étayent les rapports tirés de la littérature dans divers pays que les espèces d'*Eimeria* identifiées sont largement répandues dans les élevages de poulets de chair.

Le second volet de cette thèse consiste à trouver une alternative pyhtobiotique à base des molécules bioactives issues des co-produits oléicoles de l'olivier (*Olea europea* L. var. Chemlal) à savoir la pulpe et la feuille pour aider à minimiser les troubles gastro-intestinaux causés par les protozoaires coccidiens d'*Eimeria* chez le poulet de chair. Les tests in-vitro sont effectués pour évaluer l'activité anticoccidienne des extraits de ces derniers sur la réduction des oocystes chez le poulet de chair. Nos résultats démontrent un effet potentiel notable de l'activité de la pulpe épuisée et également un effet modéré de l'extrait de feuille d'olivier vis-à-vis des espèces coccidiennes.

Ces co-produits naturels sont dotés de métabolites bioactifs (flavonoïdes, acide phénolique, tanins, etc. . .) tels décrits précédemment par plusieurs études (Japan-Lujan et al., 2006 ; Morelloä et al., 2008 ; Lalas et al., 2011 ; ; Moudache et al., 2016 ; Moudache et al., 2017). Ce sont de bonnes molécules candidates en raison d'une toxicité relativement faible ou nulle de certains flavonoïdes qui limitent la résistance des protozoaires aux autres médicaments (Kerboeuf et al., 2008). Il est à noter que l'activité anticoccidienne des plantes qui contiennent des substances phytochimiques telles que, les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes et les saponines peut être corrélée à un composé bioactif ou à un effet synergique entre les composés fonctionnels (Muthamilselvan et al., 2016). Les résultats de cette étude montrent que les extraits éthanoliques de la pulpe épuisée et de la feuille réduisent l'activité coccidienne significativement ($P < 0,05$) avec des taux respectifs de 25,36 et 5, 89%. Ces dernières sont en accord avec les résultats de (De Pablos et al., 2010) qui révèlent que les feuilles et la pulpe d'*Olea europea* contenant le principe actif (2-, 3--dihydroiolean-12-en-28-oic acid) réduisent le parasitisme chez les poussins de *Gallus domesticus* infectés par *E.tenella*, et augmentent parallèlement le poids des oiseaux traités. Dans notre étude, l'optimum de l'extrait de feuille (OEF) hydro-éthanolique montre une très faible activité avec une CI_{50} de 192,94 mg/ml pour un taux de réduction de 5,89 % comparé à l'extrait aqueux d'allicine avec une CI_{50} de 180 mg/ml pour un pourcentage d'inhibition de 99,9% (Alnassan et al., 2015). Dans une autre expérimentation, l'extrait aqueux de *T. sanguine* contenant des composants phénoliques inhibe significativement ($P < 0,05$) la capacité des sporozoïtes d'*E.tenella* et *E.necatrix* à une concentration de 2,5 mg/ml (Konan et al., 2012). Ces différences de résultats peuvent être liées au profil phénolique des extraits utilisés ainsi qu'à la bioactivité des principes actifs. Il est clair que le mode d'action des polyphénols n'est pas clair.

Cependant, (Molan, et al., 2009) suggèrent que le mécanisme d'action des tanins condensés peut être leur pénétration dans la paroi de l'oocyste qui cause l'endommagement du cytoplasme puisque les tanins peuvent inactiver des enzymes endogènes responsables du processus de sporulation. Ceci est renforcé par l'apparition de sporocystes anormaux dans les oocystes.

Dans la présente étude, nous utilisons les contrôles positifs et négatifs afin de rendre l'évaluation plus tangible. La quercétine, considérée comme flavonoïde, à une concentration de (0.139 mg/ml) note un taux de réduction des oocystes de 45,38 et 48,12% avec l'EP et l'EF, respectivement. Une observation similaire concernant l'effet des flavonoïdes est rapportée par (Kerbouf et al., 2008) qui signalent une inhibition de 15,3% de l'activité leishmanicide in-vivo. Quant aux contrôles positifs, *Diclazuril* (10mg/ml) réduit considérablement les oocystes d'*Eimeria* (51,25%) en comparaison avec Sulfaquinoxaline sodique (29,74%), (Peek et Landman., 2010), l'utilisation de *Diclazuril* (0,5 mg/ml) montre une efficacité de réduction significative sur les oocystes sporulés d'*Eimeria* après incubation de 24 heures comparable à nos résultats, tandis que la sulfaquinoxaline montre une légère réduction du nombre d'oocystes. En effet, nos observations sont en accord avec de nombreuses études qui démontrent que l'idéal anticoccidien avec un potentiel élevé in-vitro est le *Diclazuril* (Verheyen et al., 1989; El-Banna et al., 2005; Ruiz et al., 2012). Cette différence peut être attribuée probablement aux propriétés pharmacologiques des médicaments et à leur spectre d'action sur les stades de développement des parasites. Il est important de souligner que les antioxydants naturels qui contiennent des lipides solubles, semblent être plus efficaces en raison de leur pénétration dans la cellule qui peut affecter l'intracellulaire d'*Eimeria* (Atawodi et al., 2013). D'autres études également montrent l'effet bénéfique des extraits de plantes contre des infections multiples ou mono spécifiques avec *E.tenella* ou *E.acervulina* (Kurkure , 2006; Chandrakesan , 2009). De même, (Allen et al., 1998) démontrent que les composés antioxydants ont une action protectrice cellulaire bien connue contre le stress oxydatif et réduisent la gravité des infections à *E.tenella* en modifiant le degré de lipides intestinaux. Dans cette étude, les résultats montrent que la forte concentration n'est pas liée obligatoirement à l'augmentation du taux de réduction des oocystes, ceci suggère que la qualité des molécules en question peut être à l'origine de cette destruction. En outre, les molécules standards à savoir la quercétine enregistré presque le même taux de réduction à une faible et forte concentration. Le *Diclazuril* se montre également efficace par rapport aux extraits de feuille et de pulpe et aux polyphénols synthétiques (quercétine et oleuropéine).

Il est clair que le *Diclazuril* montre effet potentiel sur la réduction du nombre d'ocystes en raison de son mode d'action, car il décompose tous les stades du développement intracellulaire des cycles de reproduction asexuée et sexuée d'*E.tenella* (Brander et al., 1991), des schizontes asexués d'*E.acervulina* et agit contre le zygote sexuel d'*E.maxima* et des gamétocytes d'*E.brunetti*. Conway et al. (2001) suggèrent que le mode d'action du *Diclazuril* est différent de celui des autres produits chimiques et ionophore. Zhou et al.(2010) , démontrent que le *Diclazuril* induit des changements ultra structuraux chez les mérozoïtes et perturbe le potentiel transmembranaire des mitochondries.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, une nouvelle investigation sur la coccidiose intestinale chez le poulet de chair à base de métabolites secondaires des co-produits oléicoles (*Olea europea* L. var. Chemlal) comme alternative phytothérapeutique est menée dans la région de Bejaia.

La première étude a permis :

- D'estimer la prévalence de la coccidiose dans les élevages de poulet de chair dans la wilaya de Bejaia.
- D'identifier les espèces d'*Eimeria* par les méthodes conventionnelles, dont *E. tenella* et *E. acervulina* sont les plus répandues dans les élevages de poulet de chair.
- De démontrer que la coccidiose est une pathologie intestinale parasitaire omniprésente dans les élevages de poulet de chair.
- De conclure que cette pathologie parasitaire peut fortement réduire les performances de production des poulets de chair.
- De signaler que la coccidiose peut être un facteur important à l'origine des pertes économiques des exploitations avicoles de la région d'étude.
- De suggérer une identification génétique des espèces *Eimeria* par la technique PCR et d'estimer les pertes économiques causées par la coccidiose chez le poulet de chair.

La deuxième et la troisième études ont permis :

- D'effectuer l'extraction assistée par micro-ondes et optimiser les conditions liées à cette dernière de la teneur des composés phénoliques totaux de la pulpe, de la feuille et noyau de l'olivier (*Olea europea* L. var. Chemlal).
- D'identifier les composés phénoliques de ces extraits par la technique HPLC-ESI-MS, et de déterminer leur activité antioxydante.
- De tester in-vitro l'effet anticoccidien de la pulpe et de la feuille de l'olivier (*Olea europea* L. var. Chemlal) sur les oocystes *Eimeria* collectés chez le poulet de chair.
- D'évaluer pour la première fois l'effet *anti-Eimeria* de la quercétine et l'oleuropéine séparément.
- De conclure que l'extrait de la pulpe et de la feuille de l'olivier possède une activité antioxydante et la capacité de détruire *Eimeria spp.*
- De suggérer que d'autres études devraient être menées pour tester l'efficacité in-vivo des composés bioactifs de la pulpe de l'olivier chez le poulet de chair.

Bibliographie

- A**fssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). (2007) Propositions pour une démarche d'évaluation de substances ou de produits « nouveaux » destinés à l'alimentation animale. Cas particulier des substances et produits à base de plantes.
- Abbas RZ , Iqba Z , Khan MN , Zafar MA , Zia MA (2010) Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broiler chickens. Braz Arch Biotech 53 :63–67
- Abbas RZ , Iqbal Z , Blake D , Khan MN , Saleemi MK (2011a) Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia : the state of play revisited. World's Poultry Sci J 67 :337–350
- Abbas RZ , Colwell D D , Gilleard J (2012) Botanicals : an alternative approach for the control of avian coccidiosis. World's Poultry Sci J 68 : 203-215
- Alloui MN , Szczurek W , Swiątkiewicz S (2013) The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition. Rev Ann Anim Sci 13 (1) 17–32
- Arab HA , Rahbari S , Rassouli A , Moslemi MH , Khosravirad F (2006) Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. Trop Anim Hlth Prod 38 : 497-503
- Aladedunye FA , Okorie D A , Ighodaro M O (2008) Anti-inflammatory and antioxidant activities and constituents of *Platostoma africanum* P. Beauv. Nat Prod Res. Formerly Nat Prod Lett 22(12) :1067-1073
- Abaza L , Talorete TPN , Yamada P , Kurita Y , Zarrouk M , Isoda H (2007) Induction of growth inhibition and differentiation of human *Leukemia* HL-60 cells by a tunisian Gerboui olive leaf extract. Bios Biotech Biochem 71 (5) : 1306–1312
- Abaza L , Benyoussef N , Menai H , Mahddoub Haddada F, Methini K , Zerrouk M (2011) Chétoui olive leaf extract : influence of the solvent type of phenolics and antioxidant activities. Grasas aceites 62 : 96- 104
- Abaza M S , Orabi KY, Al-Quattan E , Al-Attayah RJ (2015) Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer. Cancer Cell Int 15 : 46
- Allen PC, Fetterer RH (2002) Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin Microbiol Rev 15 :58–65
- Allen PC (2007) Anticoccidial effects of *Xanthohumol*. Avian Dis 51 : 21–26
- Allen PC , Danforth HD (1998) effects of dietary supplementation with n-3 fatty acid esters on coccidiosis in chickens. Poultry Sci 77 : 1631–1635
- Ahmedov EI , Mamedova F Z , Mamedova S M (2006) Pathogenesis of Eimeriosis in the local chicken breeds (*Apicomplexa*, *Coccidia*, *E. tenella*). Transaction Inst Zool. Baku 28 : 170-175 (in Azerbaijani)
- Adl S M, Simpson A G B, Farmer M A, Anderson RA, Anderson R O, Barta J R, Bowser S S, Brugerolle G, Fensome R A, Fredericq S, James TY, Karpov S , Kugrens P, Krug J , Lane C E, Lewis LA, Lodge J, Lynn D H, Mann

- D G, Mccourt R M, Mendoza L, Moestrup Q, Mozley- Standridge SE, Nerad T A, Shearer C A, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor M F J R (2005) The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *J Euk Mic* 52 : 399- 451
- Ayaz M , Akhtar M , Hayat CS , Hafeez MA , Haq A (2003) Prevalence of coccidiosis in broiler chickens in Faisalabad. *Pak Vet J* 23 : 51-52
- Aarthi S , Dhinakar Raj G , Raman M , Gomathinayagam S , Kumanan K (2010) Molecular prevalence and preponderance of *Eimeria spp.* among chickens in Tamil Nadu, India. *Parasitol Res* 107 : 1013- 1017
- Al-Quraishy S , Abdel-Baki AS , Dkhil M A (2009) *Eimeria tenella* infection among broiler chicks *Gallus domesticus* in Riyadh city Saudi Arabia. *J King Saud Uni Sci* 21(3) : 191-193
- Al-Sheikhly YF, Al-Saieg A (1980) Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Dis* 24(2) : 324-333
- Adams C , Vahl H A , Veldman A (1996) Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens : development of an experimental infection model. *British J Nut* 75 (6) :867-873
- Adewole S O (2012) The efficacy of drugs in the treatment of coccidiosis in chicken in selected poultries. *Acad Res Int* 2 (1) : 20-24
- Alnassan AA , Thabet A , Dauschies A , Bangoura B (2015) In vitro efficacy of *allici* on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol Res* 114 :625–630
- Alfaro DM , Silva AVF, Borges SA , Maiorka FA , Vargas S , Santin E (2007) Use of *Yucca schidigera* extract in broiler diets and its effects on performance results obtained with different coccidiosis control methods. *J Appl Poultry Res* 16 : 248-254
- Athanasiadou S , Githiori J , Kyriazakis I (2007) Medicinal plants for helminthes parasite control : *Facts Fict Anim* 1 (9) :1392–1400
- Atawodi SE , Liman ML , Onyike EO (2013) Antioxidant effects of *Tamarindus indica* following acute and chronic carbon tetrachloride induced liver injury. *Int J Agric Biol* 15 :410–418
- Aberoumand A , Deokule S S (2008) Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pak J Nut* 7(4) :582-585
- Ahn J , Grun IU , Fernando LN (2002) Antioxidant properties of natural plant extract containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *J Food Sci* 67 : 1364-136
- Abd El-Maksoud HA , Afaf D , Abdel-Magid , El-Badry MA (2014) Biochemical effect of coccidial infestation in laying hens. *Benha J Vet Med* 26 (1) :127-133
- Almeida G F D , Thamsborg S M , Madeira A M B N et al (2014) The effects of combining *Artemisia annua* and *Curcuma longa* ethanolic extracts in broilers challenged with infective oocysts of *Eimeria acervulina* and *E. maxima* . *Parasitol* 141 (3) : 347–355
- Anosa G N , Okoro O J (2011) Anticoccidial activity of the methanolic extract of *Musa paradisiaca* root in chickens. *Trop Anim Hlth Prod* 43 (1) 245–248
- Adamu M , Boonkaewwan C (2014) Effect of *Lepidium sativum* L.(garden cress) seed and its extract on experimental *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Kaset J* 48 : 28–37

- Altioek E , Bayçin D , Byraktar O , Ülkü S (2008) Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea*L.) by adsorption on silk fibroin. *Separ Purif Technol* 62 : 342-348
- Allouche N , Feki I , Sayadi S (2004) Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill waste waters. *J Agric Food Chem* 52 : 267-273.
- Artajo LS , Romero M P, Morelloa J R , Motilva M J (2006) Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds; evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J Agric Food Chem* 54 : 6079–6088
- Artajo LS , Romero M P, Suárez M , Molriva MJ (2007) Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *Europ Food Res Technol* 225 (5-6) : 617-625
- Ammar S , del Mar Contreras M , Gargouri B , Segura-Carretero A , Bouaziz M (2017) RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. *Phytochem Anal* 28 : 217–229
- Alagna F , Mariotti R , Panara F, Caporali S , Urbani S , Veneziani G , Esposito S , Taticchi , Adolfo A , Rosati A , Rao R , Perrotta G , Servili M , Baldoni L (2012) Olive phenolic compounds : metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol* 10 ; 12 :162
- Amro B , Aburjai T, Al-Khalil S (2002) Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia* 73 : 456–461
- Azizollahi Aliabadi M , Kazemi Darsanaki R , Rokhi M L , Nourbakhsh M , Raeisi G (2012) Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Ann Biol Res* 3 (8) :4189-4191
- Aimesther O B (2008) Analyse, extraction et récupération de poly-3-hydroxybutyrate présent dans la biomasse. Université Québec à Montréal 107-109
- Afoakwah A , Owusu J , Adomako C , Teye E (2012) Microwave Assisted Extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global J Bios Biotech* 1 :132-140
- Alu'datt M H , Alli I , Ereifej K , Alhamad M , Al-Tawaha A R , Rababah T (2010) Optimisation , characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chem* 123 :117-122
- Aouidi F, Dupuy N , Artaud J , Roussos S , Msallem M , Perraud-Gaime I. , Hamd M (2012) Discrimination of five Tunisian cultivars by mid infraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive *Olea europaea* leaves. *Food Chem* 131 :360–366
- Ahmad J , Langrish TAG (2012) Optimization of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy : The importance of the Maillard reaction. *J Food Eng* 109 :162
- AL Farsi M A , Lee C Y (2008) Optimization of phenolic and dietary fiber extraction from date seeds. *J Food Chem* 108 : 977-985
- Abad-Garcia B , Berrueta L A , Lopez Marquez D , Crespo-Ferrer (2007) Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices June. *J Chromatog A* 1154 (1-2) :87-96

- Allion A (2010) Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. *Inst Technol*
- Almela L , B ayçin D , Sanchez-Munoz B , Fernande-Lopez J A , Rocam .J , Rabe V (2006) Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatog A* 1120 : 221-229
- Atoui AK , Mansouri A , Boskou G , Kefalas P (2005) Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 89 : 27-36
- Arnao M.B , Cano A , Acosta M (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73 : 239-244
- Antolovich M , Prenzler P D , Patsalides E , Mcdonald S , Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127 : 183-198
- Apak R , Güçlü K , Özyürek M , Esin Çelik S (2008) Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay *Microchimi Acta* 160 : 413-419
- Akinmoldun AC , Ibulkune O , Dan -Ologe I A (2007) Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata*. *Sci Res Essay* 2(6) : 191-194
- Ahmed N E , Negm Eldin M M , El Akabawy L M , El-Medawy R S (2003) Incidences of some protozoan parasites in birds. *Kafr El-Sheikh. Vet Med J* 1(1) : 235-251
- Amare A , Mengistu A , Nazir Sh (2012a) Prevalence and aetiology of poultry coccidiosis and associated risk factors in White Leghorn Grower Chickens at Kombolcha Poultry Farm, Ethiopia. *World's Poultry Res J* 2(3) :54-59
- Amare A , Worku W, Negussie H (2012b) Coccidiosis prevailing in parent stocks : A comparative study between growers and adult layers in Kombolcha poultry breeding and multiplication center, Ethiopia. *Global Vet* 8(3) : 285-291
- Adang LK , Isah Z (2016) Prevalence of *Eimeria* species in local breed chickens in Gombe metropolis, Gombe State, Nigeria. *Int J Bio Chem Sci* 10(6) : 2667-2676
- Adhikari A , Gupta R G , Pant R (2008) Prevalence and identification of coccidian parasite (*Eimeria spp*). in layer chicken of Ratnagar municipality, Chitwan district, Nepal. *J Nat History Museum* 23 45-50
- B** Blake DP, Tomley FM (2014) Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol* 30 : 12-19
- Bulotta S , Corradino R , Celano M , Agostino MD , Maiuolo J , Oliverio M , Procopio A , Iannone M , Rotiroti D , Russo D (2011) Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chem* 127(4) : 1609-1614
- Bondia -Pons L , Aura A M , Vuorela S, Kolehmainen M, Mykanen H , Poutanen K (2009) Rye phenolic in nutrition and health. *J Cer Sci* 3 : 1-14
- Branciarri R , Ranucci D , Ortenzi R , Roila R , Trabalza-Marinucci M , Servili M et al (2016) Dietary administration of olive mill wastewater extract reduces *Campylobacter spp*. Prevalence in Broiler Chickens *Sustainability* 8 :837
- Boissieu C, Guerin JL (2008) Les coccidioses

aviaires.AVIcampus

Buldgen A , Parent R , Steyaert P, Legrand D (1996) Aviculture semi industriel en climat subtropical : guide pratique. Gembloux : Les presses agronomiques 122

Bussiéras J , Chermette R (1992b) Fascicule II : Protozoologie veterinaire. In Abrege de parasitol vet Edition : Alfort

Bussieras J, Chermette R (1992) Parasitologie vétérinaire, Protozoologie. Edité par le service de parasitologie, ENV d'Alfort

Baltazart A (2010) Propriétés physiques, chimiques, biologiques et nutritives des litières en élevage de volailles. Thèse de doctorat d'état en médecine vétérinaire.  cole nationale vétérinaire d'Alfort, Faculté de médecine de Créteil.

Barta J R , Martin D S , Liberator PA , Dashkevicz M , Anderson JW, Feighner S D, Elbrecht A A , Perkins-Barrow MC , Jenkins HD , Danforth H D , Ruff M D , Profous-juchelka H (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. J Parasitol 83 : 262-271

Bandyopadhyay PK , Bhakta JN , Shukla R (2006) *Eimeria Indiana* (*Apicomplexa, Sporozoea*), a new *Eimeria* n species from the hen, Gallus *Gallus domesticus* (Aves, Phasianidae). Ind Protistol 4 (3) : 203-206

Belli SI , Smith NC , Ferguson DJP (2006) The coccidian oocyst : a tough nut to crack! Trend Parasitol 22 : 416-423

Bouhelier B M B (2005) Prévalence des coccidies en élevage de poulets sous label rouge du Gers, étude expérimentale. Thèse de doctorat d'état en médecine vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Bostvironnois C , Zadjian C (2011) Coccidiose subcliniques en production de poulet de chair : Bilan et prospectives. Neuvième Journée de Recherche Avicole, Tours, p. 585- 588.

Barker I K (1993) Pathological processes associated with coccidiosis. In : Barta, J.R., Fernando, M.A. Proceeding of the VIth International Coccidiosis Conference, Guelph, Department of Pathology, Ontario College, University of Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada 81-94

Belot J, Pangui JL (1986) Observation sur l'excrétion ookystale des volailles dans quelques élevages de Dakar et des environs. Bull Anim Hlth Prod Afric 34 : 286-289

Bichet H (2003) Estimation de l'impact sanitaire, zootechnique et économique des coccidies cliniques chez la poule pondeuse Thèse de l'institut National Polytechnique de Toulouse, N 2002

Bansal K , Bilaspuri GS (2011) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int Article ID 686137 : 7

Balunas M J , Kinghorn A D (2005) Drug discovery from medicinal plants. Life Sci 78(5) : 431-441

Brenes A , Roura A (2010) Essential oils in poultry nutrition : Main effects and modes of action. Anim Feed Sci Technol 158 : 1-14

Bakkali F, Averbeck S , Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils. Food Chem Toxicol 46 : 446-475

Bartolome AP, Villase nor IM , Yang WC , Yang WC (2013) *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) : Botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 340215

- Bozkurt M , Giannenas I , Ukyilmaz K K uc , Christaki E , Florou-Paneri P (2013) An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British Poultry Sci* 54(6) :713–727
- Bakari GG , Max RA , Mdegela RH , Phiri ECJ , Mtambo MMA (2013) Effect of resinous extract from *Commiphora swynnertonii* (Burrt) on experimental coccidial infection in chickens. *Trop Anim Hlth Prod* 45 : (1) 455–459
- Breton C , Besnard G , Bervillé A (2006) Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. In : Documenting Domestication : new genetic and archaeological paradigms. Berkeley : University of California Press (Zeder MA., Decker W. D., Bradley D. Smith B., eds).pp :47
- Belkacem S (2012) Phytoprotection de l'huile d'olive vierge (HOV) par ajout des plantes végétales (thym, ail, romarin). Université M'hamed Bougara de Boumerdès 8-36
- Boukhari R (2014) Contribution à l'analyse génétique et caractérisation de quelques variétés d'olivier et l'influence de l'environnement sur leurs rendements au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou. Université Abou Beker Belkaid – Tlemcen 120 pages.
- Benderradji L , Brin F, Kellou K , Ykhlef N (2014) Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes under Saline and Heat Stress Conditions anuary ISRN Agronomy(6)
- Benavente-Garcia O , Castillo J , Lorente J , Ortuno A , Del Rio J (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea*L. leaves. *Food Chem* 68 : 457-462
- Briante R , Patumi M , Limongelli S , Febbraio F, Vaccaro C , Di Salle A , La Cara F, Nucci R (2002) Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Sci* 162 : 791-798
- Briante R , Patumi M , Febbraio F, Nucci R (2004) Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by *hyperthermophilic -glycosidase*. *J Biotech* 111(1) : 67-77
- Boudet A M (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochem* 68 (22-24) :2722-35
- Bianco A , Buiarelli F, Cartoni G , Coccioli F, Jasionowska R , Margherita P (2003) Analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry of biophenols compounds in olives and vegetation waters, part 1. *J Separ Sci* 26 :409-416
- Boizot N , Charpentier J P (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, numéro spécial 79-82
- Bouaziz M , Fki I , Jemai H , Ayadi M , Sayadi S (2008) Effect of storage on refined and husk olive oils composition : Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem* 108 : 253–262
- Brahimi F, Mechri B , Dabbou S , Dhibi M , Hammami M (2012) The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind Crops Prod* 38 : 146–152
- Brahimi F, Mechri B , Dabbou S , Dhibi M , Hammami M (2013) Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Ind Crop Prod* 49 : 256-264

- Bahmani M , Zargaran A , Rafieian-kopaei M , Kouros S (2014) Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in the Urmia, Northwest Iran. *Asian Pacific J Trop Med* 7(S1) :348-354
- Brand Williams W, Cuvelier ME , Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28 :25–30
- Box GEP ,Wilson K B (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. *J Roy Statist Soc Series B* 13 : 01–38
- Bonnaillie C , Salacs M , Vassilova E , Saykova I (2012) Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*) 7 : 35-45
- Ballard T, Mallikarjuna W, Zhou K , Sean O (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food chem* 120 : 1185-1192
- Banat R , Fares M (2015) Olive oil waste filled high density polyethylene bio composite : mechanical, morphological and water absorption properties. *Int J Compos Mat* 5 :133-141
- Ben Salah H , Abdelmelek , Abderraba M (2012) Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med Chem* 2 (5) :107–111
- Boskou G , Saltaf N , Chrysostomou S , Mylona A , Chiou A , Andrikopoulos NK (2006) Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem* 94 : 558-564
- Bouderba S , Sanz M N , Sánchez Martin C , El-Mir M (2012) Hepatic mitochondrial alterations and increased oxidative stress in nutritional diabetes-prone psammomys obesus model. *Experiment Diab Res* (1) :430176
- Bukhari S B, Memon S, Mahroof-Tahir M ,Bhanger M I (2009) Molecular and biomolecular spectroscopy synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. *Spectrochimica Acta Part A* 71 (5) :1901-1906
- Barhé TA, Tchouya F G R (2015) Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa L.*, *Glycine max L. Merr.*, Yellow Tea and Red Wine through reaction with DPPH Free Radicals. *Arabian J Chem* 3(1)
- Bahloul N , Boudhrioua N , Kouhila M , Kechaou N (2009) Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea L.*). *Int J Food Sci Technol* 44 : 2561–2567
- Bourgou S , Ksouri R , Bellila A , Skandrani I , Falleh H , Marzouk B (2008) Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. *C. R. Biologies* 48-55
- Bouaziz M , Chamkha M , Sayadi S (2004) Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia. *J Agric Food Chem* 52 : 5476–5481
- Bouaziz M , Grayer RJ , Simmonds MSJ , Damak M , Sayadi S (2005) Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali Growing in Tunisia. *J Agric Food Chem* 53(2) : 236- 241
- Bowman D D (1999) *Georgi's Parasitology for veterinarian.* Saunders (Ed), Philadelphia, p 414.
- Brander GCD M , Pugh RJ , Bywater , Jenkins W L (1991) *Veterinary applied pharmacology.*

logy and therapeutic, 5th edn. Bailliere Tindall, London, 552 pp.

C Castillo J J, Alcaraz M , Benavente-García O (2010) Antioxidant and radio protective effects of olive leaf extract. olive oil in H lth. Des Prev 951-958

Chermette R , Bussiera S (1992) Parasitologie vétérinaire. Protozoologie, imprimerie du cercle des élèves ENVA 2 (42-58) :160-168

Conway DP, McKenzie ME (2007) Poultry coccidiosis and effect of coccidiosis diagnostic and testing procedures, 3rd edn. Blackwell Publishing, Ames

Cocciforum (2007) <http://www.cocciforum.org> consulté le 17/11/2018

Corliss J O (2001) Protozoan taxonomy and systematics. Nat Publish Group :1-7

Cavalier-Smith T, Chao E E (2004) Protalveolate phylogeny and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. Nov). Eur J Protistol 40 : 21-48

Chapman H D (1984a) Drug resistance in avian coccidia (A review). Vet Parasitol 15 :11

Chapman H D, Skinner JT, Waldroup PW, Schleifer JH (1993) Research note : Dose compensatory growth occurs following withdrawal of salinomycin from diet of broilers. Poultry Sci 72 : 383-386

Chapman H D , Hacker AB (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 (1999) Anticoccidial drugs and their effect upon the development of immunity of *Eimeria* infections in poultry. Avian Patholog 28 :521-535

Chapman H D , Cherry T D , Danforth T H D , Richards G , Shirley MW, Williams RB

(2002) Sustainable coccidiosis control in poultry production : the role of live vaccines. Int J Parasitol 32 : 617-629

Chapman HD , Matsler P, LaVorgna MW (2004) The effects of salinomycin and roxarsone upon the performance of broilers when included in the feed for four, five, or six weeks and infected with *Eimeria* species during the starter or grower phase of production. Poultry Sci 83 : 761-764

Chapman HD , Roberts B , Shirley W M , Williams RB (2005) Perspectives for the control of coccidiosis in poultry by chemotherapy and vaccination. In : Proceedings of The IXth International Coccidiosis Conference. Foz de Iguassu Paran Brazil 99- 103

Chapman H D (2009) A landmark contribution to poultry science – prophylactic control of coccidiosis in poultry. Poultry Sci 88 : 813-815

Chapman HD , Jeffers TK , Williams RB (2010) Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. Poultry Sci 89 (9) : 1788–1801

Castañóna CAB , Fraga JS , Fernandez S , Grubera A , Costa LDF (2007) Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria* . Pattern Recognition 40 : 1899 – 1910

Carvalho FS , Wenceslau AA , Teixeira M , Alexandre J , Carencro M , Diego A , Milo AD , George B , Albuquerque R (2011) Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. Vet Parasitol 176 :95–100

Canning E U , Anwar M (1968) Studies on meiotic division in coccidial and malarial parasites. J Protozool 15 : 290–298

- Chartier C , Paraud C (2012) Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Res* 103 : 84-92
- Creveu G, Naciri M (2001) Effet de l'alimentation sur les coccidioses chez le poulet. INRA, production animales 14
- Coudert P, Yvore P, Provot F (1973) Sporogonie de *E. stiedae*. Influence de la temperature sur la respiration et sur la duree de la segmentation. *Ann Rech Vet* 4 : 371-388
- Christaki E , Bonos E , Giannenas I , Florou-Paneri P (2012) Evaluation of oregano and -tocopheryl acetate on laying Japanese quail diets. *J Basic Appl Sci* 8 :238-242
- Ceylan E , Fung DYC (2004) Antimicrobial activity of spices. *J Rap Med Aut Microbiol* 12 : 1-55
- Cross DE , Mcdevitt R M , Hillman K , Acamovic T (2007) The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Sci* 48 : 496-506
- Chang C LT , Kuo H K , Chiang Y M et al (2005) Butanol fraction of *Bidens pilosa* Linn. can prevent Th1-mediated autoimmune diabetes but aggravate Th2-mediated ova-induced asthma. *J Biomed Sci* 12 (1) :79-89
- Cedric Y, Payne VK , Nadia NAC , et al (2017) In vitro anticoccidial, antioxidant activities and cytotoxicity of *Psidium guajava* extracts. *J Parasit Dis Diagn Ther* 2(2) :14-24
- Chandrakesan P, Muralidharan K , Kumar VD , Ponnudurai G , Harikrishnan TJ, Rani KSVN (2009) Efficacy of a herbal complex against caecal coccidiosis in broiler chickens. *Vet Arh* 79 :199-203
- Cronquist A (1988) The Evolution and classification of flowering plants, 2nd edition Bronx, N.Y USA : The New York Botanical Garden, page 145
- Chuchene A (2012) Valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique. Thèse de Doctorat. Ecole nationale d'ingénieurs de Monastir et de l'Université de Haute-Alsace. France. 208
- Cioffi G , Dal Piaz F , De Caprariis P , Sannone R , Marzocco S , Autore G , DeTommasi N (2006) Antiproliferative triterpene saponins from *Entada africana*. *J Nat Prod* 69 :1323-1329
- Cardoso A P, Mirione E , Ernesto M , Massaza F, Cliff J , Haque M R , Bradbury J H (2005) Processing of cassava roots to remove cyanogens. *J Food Composit Analys* 18 : 451-460
- Cardozo SV, Berto BP, Cardozo TSF, Mesquita EFM , Lopes CWG (2013) Oocysts of *Cryptosporidium Tyzzer*, 1907 (*Apicomplexa* : *Cryptosporidiidae*) in brown mussels *Perna perna* L., 1758 (Mollusca : Bivalviae) in Ponta do Tingui, Mangaratiba, RJ : A biomarker of environmental contamination. *Coccidiosis* 1(2) : 32-38
- Chan S , Lee C , Yap C , Mustapha WAW , Ho C (2009) Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *Int Food Res J* 16 : 203-213
- Chan C H , Yusoff R , Ngoh GC , Kung FW (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J chromatog A* 1218 :6213

- Chen H, Zhang M, Qu Z, B Xie B (2008) Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). Food Chem 106 (2) : 559-563
- Chew Y L , Goh J K , Lim YY (2009) Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from leguminosae family in Peninsular Malaysia. Food Chem 116 : 13-18
- Choi J S , Chung H Y , Kang S S , Jung M J , Kim J W , No J K , Jung H A (2002) The structure–activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. Phyto Res 16 : 232–235
- Chirinos R , Rogez H , Campos D , Pedrechi R , Larondelle Y (2007) Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz Pavón*) tubers. J Separ Purif Technol 55 : 217-225
- Cacace J E , Mazza G (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compound from Milled Berries. J food Eng 59 (4) : 379-398
- Chen W, Wang W P, Zhang H S , Huang Q (2012) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis mycelia* using response surface methodology. Carbohydrate Polymers 87 :614
- Chen M , Zhao Y, Yu S (2015) Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar *beet molasses*. Food Chem 172 :543–550
- Caponio F, Gomes T, Pasqualone A (2001) Phenolic compounds in virgin olive oils : influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. Eur Food Res Technol 212(3) :329-333
- Cabral de Oliveira E , Barros V, Silva C , Henriques Bechara A , Paes de Barros M et al (2009) Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powder of tropical fruit residues. Food Chem 115 : 469-475
- Crisosto C H , Bremer V , Ferguson L , Crisosto G M (2010) Evaluating quality attributes of four fresh fig (*Ficus carica* L.) cultivars harvested at two maturity stages. Hort Sci 45 : 707-710
- Celik E E , Gokmen V, Skibsted L H (2015) Synergism between soluble and dietary fiber bound antioxidants. J Agric Food Chem 63 : 2338–2343
- Chung Y , Chien C , Teng K , Chou S (2006) Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides Sieb zucc.* Food Chem 97 : 418-425
- Cuvelier M E , Berset C , Richard H , Pellerin P (1991) Antioxidative activity of natural extracts : Efficacy-Comparison-Application to rosemary. Riu Ital EPPOS 374-386
- Cheung L M , Cheung P C K, Ooi V E C (2003) Antioxidant activity and total phenolics of *edible mushroom* extracts. Food Chem 81 : 249-255
- Chanda S , Dave R (2009) In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties : An overview. Afric J Microbiol Res 3(13) :981-996
- Cyboran S , Zylka R , Bonarska-Kujawa D (2014) Phenolic content and biological activity of extracts of *blackcurrant* fruit and leaves.

- Cao G , Sofic E , Prior R L (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids : Structure–activity relationships. *Free Radical Biol Med* 22 :749–760
- Chimi H , Cillard J . Rahmani M (1991) Peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Agric O C S* 68 (5) :307-312
- Conway DP , Mathis G F, Johnson J , Schwartz M , Baldwin C (2001) Efficacy of diclazuril in comparison with chemical and ionophorous anticoccidials against *Eimeria spp.* in broiler chickens in floor pens. *Poultry Sci* 80 :426–30
- D**SA (2013) Direction des services agricoles. Filière aviaire.
- Dalloul RA , Lillehoj HS (2006) Poultry coccidiosis : recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5 :143–163
- De Gussem M (2007) Coccidiosis in poultry : review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. 16th European Symposium on Poultry. *Nutr* 253-261
- Diarra MS , Silversides FG , Diarrassouba F, Pritchard J , Masson L , Brousseau R , Bonnet C, Delaquis P, Bach S , Skura B J (2007) Topp E. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus counts*, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* Isolate. *Appl Env Microbiol* 73 : 6566-6576
- De Pablos LM , Santos MFBD , Montero E , Garcia-Granados A , Parra A , Osuna A (2010) Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol Res* 107 :601–604
- Dal Bosco A , Castellini C , Cardinali R , Mourvaki E , Moscati L , Battistacci L , Servili M ,Taticchi A (2007) Olive cake dietary supplementation in rabbit : Immune and oxidative status. *Ital J Anim Sci* 6 : 761–763
- Dakpogan H B, Salifou S, Mensah GA, Gbangbotche A, Youssao I , Naciri M, Sakiti N (2012) Problématique du contrôle et de la prévention de la coccidiose du poulet. *Int J Biol Chem Sci* 6(6) : 6088–6105
- Dubremetz J F, Schwartzman J D (1993) Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res Immunol* 144 : 31-33
- Dickinson E M , Scofid R H (1939) The effect of Sulphur against artificial infection with *Eimeria F acervulina* and *Eimeria tenella*. *Poultry Sci* 18 (6) :419 -31
- Del Cacho E . Pagés M , Gallego M , Monteagudo L , Snchez-Acedo (2005) Synaptonemal complex karyotype of *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol* 35 :1445–1451
- Dykstra DD , Reid WM (1978) Effects of anaerobic Bacteria on *Eimeria tenella* infection in bacteria-free, monofloral, and conventional chickens. *Poultry Sci* 57(1) : 85-89
- Doran J D (1966) The Migration of *Eimeria acervulina* Sporozoites to the duodenal glands of lieberkühn. *J Euk Mic* 13 : 27-33
- Davies FM , Joyher LP (1962) Infection of the fowl by the parenteral inoculation of oocysts of *Eimeria* . *Nat* 194 : 996-997
- Du A ,Wang S (2005) Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Eimeria tenella* infection in chickens. *Int J Parasitol* 35 : 777–785
- Donal B ,Mutuku F ,Bustinduy A L,Mungai P L ,Muchiri E M,King C H ,Kitron U (2014)

- Cross-sectional study of the burden of vector-borne and soil-transmitted polyparasitism in rural communities of Coast province, Kenya.
- Del Cacho M, Gallego M , Francesch J , Qu ´ ılez , Sanchez-Acedo C (2010) Effect of *artemisinin* oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. Parasitol Int 59 (4) :506–511
- 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
- Drănga L , Györke A , Ferreira JFS , Pop IA , Dunca I , Drăgan M , Mircean V, Dan I , Cozma V (2014) Effects of *Artemisia annua* and *Foeniculum vulgare* on chickens highly infected with *Eimeria tenella* (Phylum *Phylum Apicomplexa*). Acta Vet Scand 56 :22
- Della Greca M , Previtera L , Temessi F, Carrelli A (2004) Low molecular- weight components of olive oil mill waste-waters. Phyto Chem Anal 15 :184–188
- Djeziri M , Babakhouya N (2017) Valorisation des déchets oléicoles : cas des grignons d'olive. Journée scientifique « Med Mag Oliva ». Palais des expositions-Pins Maritimes- Alger. 36
- Djadoun S (2010) Influence de l'hexane acidifié sur l'extracton de l'huile de grignon assistée par micro-ondes. Thèse de magister. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ozou. Faculté des sciences, departemen,t de chime. 65
- Doymaz I , Gorel O , Akgun N A (2004) Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. Bios Eng 88 : 213-219
- Dahmoune F, Boulekbache L , Moussi K , Aoun O , Spigno G , Madani K (2013) Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants : Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. Ind Crops Prod 50 :77
- Dahmoune F, Nayak B, Moussi K , Remini H , Madani K (2014) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. Food Chem 166 :585–595
- Djeridane A , Yousfi M , Nadjemi B , Boutassouna D , Stocker P, Vidal N (2006) Antioxidant activity of some Algeria medicinal plant extracts containing phenolic compounds. Food Chem 97(4) : 654-660
- Djeridane A, Yousfia M , Brunelb J M , Stocker P (2010) Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food Chem Toxicol 48(10) :2599-2606
- Devasagayam PA , Bolor KK , Ketaki S , Sane , Tilak J C (2003) Free radicals and antioxidants in human health : Current Status and Future Prospects November. J Asso Phyto India 2 : 794-804
- De leonardis A , Aretini A , Alfano G , Macciola V, Ranalli G (2008) Isolation of hydroxytyrosol- rich extract from olive leaves (*Olea europea* L) and evaluation of the its antioxidant properties. Eur Food Res Technol 226 : 653-659
- Dekdouk N , Malafronte N , Russo D (2015) Immacolata Faraone,3 Nunziatina De 197 Tommasi Ameddah S , Severino L , Milella. L. Phenolic compounds from *Olea europaea* L. Possess antioxidant activity and inhibit carbohydrate metabolizing enzymes in vitro.
- DeJong S , Lanari M C (2009) Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork : Contribution of individual

phenolics to the antioxidant activity of the extract. Food Chem 116(4) :892-897

Demiral T, Turkan S (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Env Experiment Botany 53(3) :247-257

Djantou Njatou EB (2006) Optimisation du broyage des mangues séchées *Manguidéra indiana* var Kent : Influence sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des poudres obtenues. Thèse en Biotechnologies et Alimentaire. INPL, Lorraine

Didier S, Villate (2001) Maladie des volailles édition France Agricole, 2eme édition : page 104-117, 86-97,119-329, 107, 117,178-183, 384,368-378, 98-101

Darboux R (1994) Réalisation de coupe histologique pour le microscope optique. Faculté des Sciences de la Santé de l'Université d'Abomey-Calavi Bénin.
<http://www.transfer32.bj.refer.org-rdarboux/Cours.html>.

Djemai S, Mekroud A, Jenkins M C (2016) Evaluation of ionophore sensitivity of *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* isolated from the Algerian to Jijel province poultry farms. Vet Parasitol 224 : 77-81

Efferth T (2009) Chapter 11 : *Artemisinin* : A versatile weapon from traditional chinese medicine. 173-194. K.G. Ramawat (ed.), Herbal Drugs : Ethnomed Mod Med Springer-Verlag Berlin Heidelberg

El Hachemi A, El Mecherfi KE, Benzineb K, Saidi D, Kheroua O (2008) Supplementation of olive mill wastes in broiler chicken feeding. Afric J Biotech 6 :1848-1853

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 (1987) Protozoologie médicale comparée, Vol II : Infection déterminées par les *Myxozoa* (*Myxosporidioses.l.*) et les *Micropora* (*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 Toxoplasmosse), Fondation Mérieux Ed 62- 257

Ellis J, Bumstead J (1990) *Eimeria* species : studies using rRNA and rDNA probes. Parasitol 101 :1-6

Edgar S A (1955) Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidia. J Parasitol 41 :214-216

Edgar SA (1964) Stable coccidiosis immunization united states patent 3 : 147 -186

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 103-119

El-Ghousein SS, Al-Beitawi NA (2009) The effect of feeding of crushed thyme (*Thymus vulgaris* L) on growth, blood constituents, gastrointestinal tract and carcass characteristics of broiler chickens. J Poultry Sci 46 : 100-104

El SN, Karakaya S (2009) Olive tree (*Olea europaea*) leaves potential beneficial effects on human health. Nutr Rev 67(11) : 632-638

Escribano-Bailon MT, Santos-Buelga C (2003) Polyphenol extraction from foods. Methods in polyphenol analysis 1-16

- Eskilsson CS , Björklund E (2000) Analytical-life-history of *Eimeria* (*Coccidium*) *avium* : a scale microwave-assisted extraction. J Chromatog A 902 : 227-250
- Elbir M , Amhoud A , Mbarki M , Visioli F (2014) Antioxidant activity of a crude preparation rich in phenolic compounds from the olive stones of two Moroccan cultivars, a preliminary study. Curr Topics Nutr Res 12 : 9
- Ebrahimi NS , Hadian J , Mirjalili M H , Sonboli A , Yousefadi M (2008) Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food chem 10 (4) : 927-931
- Ebrahimzadeh MA , Pourmorad F , Hafezi S (2008) Antioxidants activities of Iranian Corn Silk. Turk J Biol 32 : 1-7
- El-Banna HA , El-Bahy MM , El-Zorba HY , El-Hady M (2005) Anticoccidial efficacy of drinking water soluble diclazuril on experimental and field coccidiosis in broiler chickens. J Vet Med A 52 :287-291
- F** Farag R S , Mahmoud EA , Basuny AM (2007) Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. Int J Food Sci Technol 42(1) : 107-115
- Fontaine M , Cadoré J C (1995) Maladies classées par étiologie : les maladies parasitaires. In : Vade-Mecum du vétérinaire. Vigot. 16ème éd 1192-1209
- Foster AO (1949) The economic losses due to coccidiosis. Ann New York Acad Sci 52 : 434-442
- Fornace KM , Clark EL , Macdonald SE , Namangala B , Karimuribo E , Awuni JA , Thieme O , Blake DP , Rushton J (2013) Occurrence of *Eimeria* species.
- Fantham HB (1909) The morphology and Sporoz causing a fatal disease among young grouse. Proc Zool Soc London 672-91
- Ferguson DJ , Belli SI , Smith NC , Wallach MG (2003) The development of the macrogamete and oocyst wall in *Eimeria maxima* : immuno-light and electronmicroscopy. Int J Parasitol 33 : 1329-134
- Fayer R (1982) Control of coccidiosis. In : Long, P. L. (eds). The Biology of the Coccidia. Univ Park Press Baltimore Md 453-487
- Freeman BM (1970) Evidence for the production of a toxin by *Eimeria tenella* XIV Congress Int Avic Mad Sec II 604-605
- Fernando M A , McCraw B M (1973) Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. J Parasitol 59 : 493-501
- Fowler NG (1995) Anticoccidial information including safety, toxicity, incompatibilities and associated matters. Canterbury (GBR), ANITEC ASSOCIATES, 182
- Falleh H , Ksouri R , Chaieb K , Karray-Bouraoui N , Trabelsi N , Boulaaba M , Abdelly C (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. Compt Rend Biol 331 : 372-379
- Francis G , Kerem Z , Makkar HPS , Becker K (2002) The biological action of saponins in animal systems. Brit J Nutr 88(6) :587-605
- Faostat (2013) Statistical databases (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Site web : <http://faostat.fao.org/>
- FAO (1984) Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen.
- FAO (2002). Améliorer la nutrition grâce aux jardins potagers : Module de formation

à l'intention des agents de terrain en Afrique. Food Agric Org 272.

Fitz-Coy S H (2005) The stealth chicken *Eimeria* : *E.mivati*—a new perspective. In proceedings of the Ixth international coccidiosis conference, Foz do Iguassu, Brazil.

Fisher R A (1935) The design of experiments. Hafner publishing company, New York.

Ferreira C F R , Barros L , Soares M E , Bastos M L , Pereira JA (2007) Antioxidant activity and total phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. Food Chem 103 : 188–195

Fernandez-Bolanos J , Rodriguez G , Rodriguez R , Heredia A , Guillen R , Jimenez A (2002) Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid–solid waste of two phase olive oil processing or “Alperujo”. J Agric Food Chem 50 : 6804–6811

Fiorentino A , Gentili A , Isidori M , Monaco P, Nardelli A , Parrella A E , et al (2003) Environmental effects caused by olive mill wastewaters : Toxicity comparison of low-molecular weight phenol components. J Agric Food Chem 51 : 1005–1009

Franconi F, Loizzo A , Ghirlanda G , Seghieri G (2006) Taurine supplementation and diabetes mellitus. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9 :32–36

Frankel EN , Kanner J , Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet 341 : 454-7

G Guo FC , Suo X , Zhang GZ , Shen JZ (2007) Efficacy of decoquinate against drug sensitive laboratory strains of *Eimeria tenella* and field isolates of *Eimeria spp.* in broiler chickens in China. Vet Parasitol 239-245

Gonçalves C, Lopes M , Ferreira JP, Belo I (2009) Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. Bioresour Technol 100 : 3759-3763

Gharbi FR , Benarif T (2011) Opportunité économique de l'introduction de grignons dans l'alimentation des animaux en tunisie. Biotech Agric Soc Env 15(2) : 259-270

Gordon RF (1979) Pathologies des volailles. Maloine, Ed SA.

Güven E , Beckstead RB , Kar S , Vatansever Z , Karaer Z (2013) Molecular identification of *Eimeria* species of broiler chickens in Turkey. Ankara Üniversitesi. Vet Fak Derg 60 : 245-250

Gaillard JL , Berche P, Frehel C ,Gouin E ,Cossart (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cellular 65 : 1127-1141

Graat EAM , Henken A M , Ploeger HW , Noordhuizen J T M ,Vertommen M H (1994) Rate and course of sporulation of oocysts of *Eimeria acervulina* under different environmental conditions. Parasitol 108 : 497–502

Goñi I , Brenes A , Centeno C , Viveros A , Saura-Calixto F , Rebole A , Arija I , Estevez R (2007) Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. Poultry Sci 86 : 508–516

Gong H , Zhu X , Chen K , Wang S , Zhang C (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. Plant Sci 169 : 313–321

Georgieva NV, V Koinarski , Gadjeva V (2006) Antioxidant status during the course of an *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. Vet J 172 : 488-492

- Gokila R , Withania S (2014) Determination of antioxidant scavenging potential Naganathan Srinath.1(2)
- Gherida K (2005) les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4 : 162-169
- Goupy J (2006) Introduction aux plans d'expériences- 5ème édition Dunod
- Goupy J, Creighton L (2005) Introduction aux plans d'expériences-3ème édition. Dunod
- Georgé S , Brat P, Alter P, Amiot MJ (2005) Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 53 :1370–1373
- Ghorbannezhad P, Bay A ,Yolmeh M ,Yadollahi R , Moghadam JY (2016) Optimization of coagulation–flocculation process for medium density fiberboard (MDF) wastewater through response surface methodology. *Des Wat Treat* 57 :26916–26931
- Gómez-Rico A , Fregapane G , Salvador MD (2008) Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res Int* 41 : 433–440
- Gautham SA , Onkarappa R (2013) In vitro antioxidant activity of metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1. *Int J Drug Dev Res* 5(1) : 235-244
- Goldschmidt Lins P, Piccoli Pugine M S , Scatolini AM , Pires de Melo M (2018) In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea*L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon* 4:00805
- Goulas VT , Papouti V, Exarchou M Z ,Tsimiddou LP, Gérothanassis (2010) Contribution of flavonoid to the overall radical scavenging of olive –*Olea europea* L) leaf polar extract. *J Agric Food Chem* 58 : 3303-3308
- Goulas V, Vicente A , Manganaris G (2012) Structural diversity of anthocyanins in fruits In book : *Anthocyanins : Structure, biosynthesis and health benefits* (pp.225-250)
- Govindan P, Muthukrishnan S (2013) Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhavia erecta*. *J Act Med* 3 : 103-109
- Gallo L , Liabot LM , Allmandi D , Bucalà V, Piña J (2010) Influence of spray drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (*Càscara sagrada*) extract powder physical properties. *Powder Technol* 208 :204-214
- Gordon M H , Paiva-Martins F, Almeida M (2001) Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem* 49(5) : 2480-2485
- Grema HA , Suleiman A , Rabana J L , Geidam YA (2014) A six-year (2005-2010) retrospective study of avian coccidiosis diagnosed in Gombe veterinary clinic, Nigeria. *Soko J Vet Sci* 12(2) :8–13
- Guinebert E , Penaud J (2005) Intérêt d'un traitement biologique des litières de volaille par apport d'un additif microbien en présence des animaux. 6e Journées de la Recherche Avicole, Saint Malo, 30–31 March, 122–125
- Gadelhaq S , Rafa W, Aboelhadid S (2014) Molecular characterization of *Eimeria* species naturally infecting egyptian baldi chickens. *Iran J Parasitol* 10 (1) : 87–95

- H** HanTPN , Talorete P, Yamada H , Isoda (2009) Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotech* 59(1) : 45–53
- Hammond D M (1973) Life cycles and development of coccidia. In the *Coccidia. Eimeria* , *sospora*, *Toxoplasma* , and related genera (Hammond D M, Long P L eds) 45–79 University Park Press
- Horthon-Smith P, Long P (1954) Preliminary observations on the possible effects on the parasitic populations. 10th World's Poultry DINBURG, Proceeding 266-2
- Hartwigk H, Féhiberg J (1966) Experimentelle infektion von Broileküken und junghähnen mit geringen Dosen von *Eimeria* (E.) *acervulina*. *Berl Münch tierärztl Ytschr* 79(14) :261
- Hegazy S H , Hassanein Z A , EL-Sheshtawy EA et al (1999) Effect of dual infections of *Escherichia coli* and pure caecal *Eimeria* sp. in broiler. *J Egypt Soc Parasitol* 29(3) :859-872
- Holdsworth PA , Conway DP , McKenzie ME , Dayton AD , Chapman HD , Mathis GF , Skinner JT, Mundt HC, Williams RB (2004) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet Parasitol* 121 : 189–212
- Hounscome PN , Hounscome B , Tomosc DG, Edwards-Jones G (2009) Changes in antioxidant compounds in white cabbage during winter storage. *Posth Biol Technol* 52(2) : 173-179
- Herrero M , Temirzoda T N , Segura –Carretero A , Quirantes R , Plaza M , Ibañez E (2011) New possibilities for the valorization olive oil by-products. *J Chromatog A* 1218(42) : 7511-7520
- Hayes J E , Stepanyan V, Allen P, O’Grady M N , O’Brien N M , Kerry J P (2009) The effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on lipid oxidation and oxymyoglobin oxidation in bovine and porcine muscle model systems. *Meat Sci* 83(2) :201-8
- Hayes J P , Allen N , Brunton M , O’grady J. Kerry (2011) Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products : Olive leaf extract (*Olea europaea*L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem* 126 :948–955
- Hayat K , Hussain S , Abbas S , Farooq U , Ding B , Xia S , et a (2009) Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from *citrus mandarin* peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separ Purif Technol* 70 :63
- Herodez SS , Hadolin M , Škerget M , Knez Z (2003) Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *J Food Chem* 80 (2) : 275–282
- He B , Zhang LL , Yue XY , Liang J , Jiang J , Gao XL , Yue PX (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem* 204 :70–76
- Hiranvarachat B , Devahastin S , Chiewchan N , Raghavan GV (2013) Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of -carotene from carrots. *J Food Eng* 115 (2) : 190-197
- Hiranvarachat B , Devahastin S (2014) Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation : extraction of carotenoids from carrot waste. *J Food Eng* 126 :17-26

- Hajimahmoodi M , Haniffeh M , Oveysi M , Sadeqhi N , Janat B (2008) Determination of total antioxidant activities of green teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. Iran J Env Hlth Sci Eng 5 (3) : 167- 172
- Hannachi H , Elfalleh W, Marzouk S (2013) Oil, protein, antioxidants and free radical scavenging activity of stone from wild olive trees (*Olea europaea*L.). Pak J Pharmacol Sci 26 : 503- 510
- Hseu YC , Chang WH , Chen CS , Wang J , Huang LCJ , Joulu F, Chia YIC , Hsu H K , Wu JJ ,Yang H L (2008) Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. Food Chem Toxicol 46 :105–114
- Hebi M , Eddouks M (2016) Evaluation of the antioxidant activity of *Stevia rebaudiana*. Phytothérapie 14 (1) : 17-22
- Hendrix C M (1998) Diagnostic veterinary Parasitology. Mosby Inc, 2nd Ed, Saint-Louis, p321.
- Haug A , Gjevre AG , Eystein S , Magne I (2008) A survey of the economic impact of sub-clinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway. Avian Patholog 37(3) :333–341
- Hadipour MM , Olyaie A , Naderi M , Azand F, Nekouie O (2011) Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran. Afric J Microbiol Res 5(20) : 3296–3299
- I** Inoue T, Tsubaki S , Ogawa B , Onishi K , Azuma J I (2010) Isolation of hesperidin from peels of *thinned Citrus unshiu* fruits by microwave-assisted extraction. Food Chem 123 : 542-547
- Itavi (1997) L'ammoniac. Sci et Technol Avicoles Hors-Série 49-52
- Iqbal MF, Zhu WY (2009a) Bioactivation of flavonoid diglycosides by chicken cecal bacteria. FEMS Microbiol Lett 295 : 30-41
- Iqbal M F, Zhu WY (2009b) Characterization of newly isolated *Lactobacillus delbrueckii-like* strain MF-07 isolated from chicken and its role in isoflavone biotransformation. FEMS Microbiol Lett 291 : 180-187
- J** 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
- Japón-Luján R , Luque-Rodríguez J M , Luque de Castro M D (2006) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. J Chromatog A 1108 (1) : 76–82
- Jang S I , Jun M H , Lillehoj H S et al (2007) Anticoccidial effect of green tea-based diets against *Eimeria maxima*. Vet Parasitol 144 (1-2) 172–175
- Johnson WT (1930) A study of *Eimeria necatrix*. Agric Expert State 538 : 30-33
- Jolley WR , Burton SD , Nyberg PA (1976) Formation of sulfhydryl groups in the of *Eimeria stiedai* and *Eimeria tenella* oocysts subjected to in vitro excystation. J Parasitol 62(2) :199-202
- Jeurissen SHM , Janse EM , Vermeulen A N , Vervelde L (1996) *Eimeria tenella* infections in chickens : aspects of host-parasite : interaction. Vet Immun Immunopath 54 : 231-238
- Johnson J E , Reid W M (1970) Anticoccidial drugs : Lesion scoring technique in battery and floor pen experiment with chickens. Expres Parasitol 28 : 30-36

- Jeffers TK (1975) Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J Parasitol* 61 : 1083-1090
- Judd WS , Campbell CHS , Kellogg EA , Stevens P (2002) Botanique systématique une perspective phylogénétique. 87
- Jones GA , Mcallister TA , Muir AD , et al (1994) Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl Env Microbiol* 60 (4) :1374-8
- Jez C , Beaumont C, Magdelaine P, Paillard S (2009) Prospective : la filière avicole française à l'horizon 2025. In : Rapport du groupe de travail Prospective avicole. INRA - ITAVI.
- Jemai H , El-Feki A , saydi S (2009) Antidiabetic and antioxidant effects of hydrotyrosol and oleuropein from olive leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *J Agric Food Chem* 3-6
- Johns O (1999) Xanthin oxidase inhibitory northeastern American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol* 64 : 149-169
- Jain T, Jain V, Pandey R , Vyas A , Shukla S (2009) Microwave assisted extraction for phytoconstituents-An overview. *Asian J Res Chem* 2 : 19-25
- Jerman T, Trebše P, Mozetič Vodopivec B (2010) Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chem* 123 :175
- Jomova PK , Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol Rev* 283 (2-3) :65-87
- Jiménez-Escrig A , Rincón M , Pulido R, Saura-Calixto F (2001) Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J Agric Food Chem* 49 (11) :5489-5493
- Jamshidzadeh A , Rezaeian Mehrabadi A (2010) Protective effect of quercetin on oxidative stress in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes in vitro. *Iran J Pharmacol Res* (2) :169-75
- Jerman Klen T, Mozetič Vodopivec B (2012) Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication. *Food Chem* 134 (4) :2481-2488
- K** Konaki E , Yamaguchi S , Maru I , Kinoshita M , Kakehi K , Ohta Y , Tsukada Y (2003) Identification of anti-α-amylase components from olive leaf extract. *Food Sci Technol Res* 9 : 35-39
- Kadhim LI (2014) Histopathological changes of broilers immunized with sonicated oocysts against *Eimeria tenella*. *I.J A B R* 4 (1) : 31-35
- Kabay M (1996) Coccidiosis in poultry. *Anim hlth laboratories*. South Perth western Australia
- Kreier JP, Baker JR et al (1987) In : Parasitic Protozoa. Ed. Allen and Unwin Boston MA
- Kheysin YM (1972) Chapter V. Sporulation of oocysts and their survival in the external environment. In : Todd KS Jr (ed) Life cycles of coccidia of domestic animals. Univ Park Press London 149-177
- Kosal M E , Anderson D E (2004) An unaddressed issue of agricultural terrorism : a case study on feed security. *J Anim Sci* 82 : 3394-3400
- Kerboeuf D , Riou M , Guégnard F (2008) Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini Rev Med Chem* 8 :116-128
- Koga T, Meydani M (2001) Effect of plasma

- metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *J Clin Nutr* 73 (5) : 941-948
- Khanbabee K , van Ree T (2001) Tannins classification and definition. *Nat Prod Rep* 18 : 641-649
- Kaleem A , Aziz S , Iqtedar M (2014) Investigating changes and effect of peroxide values in cooking oils subject to light and heat.
- Kheirabadi J , Kaboutari K , Shaha BAT, Silvad A , Dehghani S , Cheraghchi Bashie M (2014) Comparison of the anticoccidial effect of granulated extract of *Artemisia sieberi* with monensin in experimental coccidiosis in broiler chickens. *Experiment Parasitol* 141 : 129-133
- Kontogianni VG , Gerathanassis I P (2012) Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Nat Prod Res* 26(2) :186-9
- Karakaya S E S (2009) Studies of olive tree leaf extract indicate several potential health benefits. *Nutr Rev* 67 : 632-639
- Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Fellah H, Grignon C, Abdelly C (2007) Salinity effects on polyphenol contents antioxidant activities of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiol Bioch* 45 :244-249
- Ksouri R , Falleh H , Megdiche W, Traibelsi N , Mhamdi B , Chaieb K , et al (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol* 47 :2083
- Kiritsakis K , Kontominas M G , Kontogiorgis C , Hadjipavlou-Litina D , Moustakas A , Kiritsakis A (2010) Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *J Americ Oil Chem Soc* 87 (4) :369-376
- Kumaraswamy M , Satish S (2008) Antioxidant and anti-lipoxygenase activity of *Thespesia lampas Dalz Gibs*. *Adv Biol Res* 2 : 56-59
- Kossah R , Nsabimana C, Zhang H , Chen W (2010) Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruits. *Res J Phytochem* 4 :146-153
- Khizar H , Xiaoming Z, Hanqing C, Shuqin X , Chenggsheng J, Fang Z (2010) Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of *citrus mandarin* pomace. *Food Chem* 123(2) : 423-429
- Karazhiyan H , Razavi S M A , Phillips G O (2011) Extraction and optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium Sativum*) using response surface methodology. *Food Hydro* 25 : 915-920
- Kyriakopoulou K , Papadaki S , Krokida M (2015) Life cycle analysis of β -carotene extraction techniques. *J Food Eng* 167 : 51-58
- Kormin F, Ahmed I , bin Mohd Yunus R , Abidin Mohd Yusof Z (2010) The potential of modified microwave extraction system (MMES) to extract bioactive components from ferns. *Int J Eng Technol I jet-I jens* 10(02) : 7-12
- Kekuda PTR , Shobha KS , Onkarappa R (2010) Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soil of Agumbe, Karnataka. *J Pharmacol Res* 3(1) : 26-29
- Koutsomitopoulou J C, Bénézet A , Berge-ret GC, Papanicolaou (2014) Preparation and characterization of olive pit powder as a filler to PLA-matrix biocomposites, *Powder Technol* 255 : 10-16

- Kumar P , Kumaravel S , Lalitha C (2003) Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo* 4(7) : 191-195
- Kumar S , Garg R , Ram H , Maurya P S , Banerjee P S (2015) Gastrointestinal parasitic infections in chickens of *upper Gangetic* plains of India with special reference to poultry coccidiosis. *J Parasit Dis* 39 (1) : 22–26
- Kawanishi S, Oikawa S , Murata M (2005) Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antioxid Redox Signal* 7 : 1728-1739
- Konan KS , Konan A , Toure K , Ouattara D , Djaman A J , N’guessan J D (2012) In vitro anticoccidial activity of *Thonningia sanguinea* extract on *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix* sporozoites cells. *Afric J Microbiol Res* 6 (33) :6247-625
- Kurkure NV , Kolte SW, Bhandarkar AG , Kalorey DR (2006) Evaluation of herbal coccidiostat “*coxynil*” in broilers. *Ind J Expert Biol* 44 :740–744
- Kaur R , Arora S , Singh B (2008) Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. *Biore-sour Technol* 99(16) : 7692 -98
- L** Lee O H , Lee B , Lee G , Lee H B , Son J Y , Park C S , Shetty K , Kim YC (2009) Assessment of phenolics–enriched extract and fractions of olive leave an their antioxidants activities. *Biore-sour Technol* 100 : 6107-6113
- Lee O , Lee B (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Biore-sour Technol* 101(10) : 3751–3754
- Lancaster JE (1983) Incidence des maladies aviaires : 5ème conférence de la commission régionale de l’O.I.E. pour l’Afrique. *Rev Sci Technol* 1088-1081
- Levine PP (1938) *Eimeria haganin* sp. (*Protozoa : Eimeriidae*), a new *Coccidium* of the chicken. *Cornell Vet* 28 : 263–66
- Levine PP (1942) A new *Coccidium* pathogenic for chickens. *Eimeria brunetti* sp. (*Protozoa : Eimeriidae*). *Cornell Vet* 32 : 430-439
- Levine N D (1963) Coccidiosis *Annu Rev Microbiol* 17 : 179-198
- Levine N D (1982) Taxonomy and life cycles of Coccidia. In : Long, P.L. (eds) *The Biologie of the Coccidia* University Park Press, Baltimore, Md1-33
- Levine ND (1988) Progress in taxonomy of the *Apicomplexan Protozoa*. *J Protozool* 35 : 518-52
- Long J R (1973) Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. *Can J Comp Med* 37 : 302-308
- Lister S , Knott C (2000) Coccidiosis. *Ranger magazine* Crowshall vet service.
- Lillehoj H S , Trout J M (1993) Coccidia : a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Patholog* 22 :3–21
- Lillehoj H S (1998) Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int J Parasitol* 28 :1071-1081
- Losson B (1996) *Protozoologie vétérinaire. Cours de parasitologie vétérinaire. Université de Liège* 53-110
- Lafont JP, Bree A ,Naciri M et al (1983) Experimental study of some factors limiting ‘competitive exclusion » of *salmonella* in chickens. *Res Vet Sci* 34 (1) : 16-20

- Landers EJ (1960) Studies on excystation of coccidial oocysts. *J Parasitol* 46 : 195–200
- Long PL , Reid WM (1982) A guide for diagnosis of coccidiosis in chickens, Research report 404, department of poultry science, the University of Georgia, Athens
- Lopez S , Pacheco Y M , Bermudez B , Abia R , Muriana F J G (2004) Olive oil and cancer. *Grasas Aceites* 55 : 33-41
- Lima ES , Abdalla D S P (2001) Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostas biológicas. *Bras J Pharmacol Sci* 37 : 293-303
- Linne C (1753) *Species plantarum*, Tom II 561-1200 Stockholm.
- Loussert R , Brousse G (1978) "L'olivier" Ed. Moissonneuve et Larose Paris
- Luna A , Labaque M C , Zygadlo JA , Marin RH (2010) Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Sci* 89 : 366- 370
- Lee-Huang S , Zhang LPL , Chang YT, Huang PL (2003) Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 307 : 1029–1037
- Lee JJ , Kim D H , Lim J J (2012) Anticoccidial effect of supplemental dietary Gallarhois against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Avian Patholog* 41(4) : 403–407
- Lee J , Lee Y, Choe E (2007) Temperature dependence of the autoxidation and antioxidants of soybean, sunflower and olive oil. *Eur Food Res Technol* 226 : 239- 246
- Lesage-Meessen L , Navarro D , Maunier S , Sigoillot JC , Lorquin J , Delattre M , Simon JL , Asther M , Labat M (2001) Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem* 75(4) :501–507
- Lafka T I , Lazou A E , Sinanoglou VJ , Lazos E S (2011) Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem* 125 :92–98
- Lafka TI , Lazou Andriana E , Sinanoglou Vassilia J , Lazos Evangelos S (2013) Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Food* 2 :18–31
- Licciardello B , Wittenauer S , Saenger L , Matthias R , Corneli S (2015) Rapid assessment of the effectiveness of antioxidant active packaging—Study with grape pomace and olive leaf extracts. *Food Pack Shelf Life* 6 :1-6
- Li H B , Cheng KW , Wong CC , Fan KW , Chen F , Jiang Y (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 102 : 77
- Li J, Zu Y G, Fu YJ, Yang YC , Li SM , Li ZN , et al (2010) Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia Bunge.*) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innov Food Sci Emerg Technol* 11 : 637
- Li H , Deng Z , Wu T, Liu R , Loewen S , Tsao R (2012) Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem* 130(4) : 928
- Lee B , Jung J , Choi Y (2005) Optimization of microwave-assisted extraction process of *Rehmannia Radix preparata* by response surface methodology. *Food Eng Prog* 9 : 283-290
- Ložienė P , Venskutonis R , Šipailienė A ,

- bokasa J (2007) Radical scavenging and 206 antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. Food Chem 103 (2) : 546-559
- Laguerre M , López-Giraldo LJ , Lecomte J, Pina M ,Villeneuve (2007) Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. O C L 14 (5) : 278-292
- Liyanapathirana C, Shahidi F (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chem 93 : 47-56
- Liyanapathirana F , Shahidia C, Alasalvarc C (2006) Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem .) and its concentrated juice. Food Chem 99 (1) :121- 128
- Liu B , Peng J , Zhang L , Wan R , Guo S , Zhou L (2010) Optimization of preparation for Co3O4 by calcination from cobalt oxalate using response surface methodology. Chem Eng Res Design 88 :971-976
- Lumaret R , Ouazzani N , Michaud H , Vivier G , Deguilloux MF, Di Giusto F (2004) Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea*L.) in the Mediterranean Basin Heredity 92 : 343–351
- Lalas S , Athanasiadis V, Gortzi O , Bounitsi M , Giovanoudis I , Tsaknis J , Bogiatzis F (2011) Enrichment of table olives with polyphenols extracter from olive leaves. Food Chem 127(4) :1521-1525
- Lim DH , Choi D , Choi OY, Cho K A , Kim R , Choi HS , Cho (2011) Effect of *Astragalus sinicus* L. seed extract on antioxidant activity. J Ind Eng Chem 17 : 510-516
- Lien EBJ , Ren S , Bui H H , Wang R (1999) Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free radical Biol Med 26 :285-294
- Luna L G (1968) Routine staining procedures', in Manual histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology, 3rd edn., pp. 32–46, McGraw-Hill, New York.
- Lobago F, Worku N , Wossene A (2005) Study in coccidiosis in Kombolacha poultry farm, Ethiopia. Trop Anim H lth Prod 37(3) : 245–251
- Lawal JR , Gulani I A , Ali A M , Bello A M , Abadam F A , Mustapha M , Biu A A (2016) Dry season prevalence of avian coccidia infection in domesticated chickens (*Gallus domesticus*) in Jere Council Borno State, Nigeria. J Anim Sci Vet Med 9(6) :653–659
- M** 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.
- McDonald LR , DaSilva J M L , Solis J (1986) Drug sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms. Avian Dis 30 : 690- 694
- McDougald LR , Reid WM (1991) Coccidiosis. In Diseases of Poultry, 9th ed., ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C.W. Beard, W. M. Reid, and H.W. Yoder, Jr., 780–97. Ames, IA : Iowa State Univ. Press
- McDougald L R , Reid WM (1997) Coccidiosis. In : Calnek H J , Barnes CW, Beard W M , Reid HW, Yoder Jr (eds). Diseases of Poultry 10th Edition, Iowa State University Press Ames IA 865-883
- McDougald LR (2003) Coccidiosis. Diseases of Poultry (11th edn). Iowa State University Press : Ames, IA, USA
- McDougald LR , Steve H FC (2008) Coccidiosis. In Saif Y, Fadly M, Glisson J R , Nolan L K ,Swayne D E Dis Poultry. 12th ed, Black-

well Publishing, 1068-1085

McDougald L R , Fitz-Coy S H (2008) Coccidiosis in Diseases of Poultry, pp. 1068–1085, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA,

Montilla MP, Agil A , Navarro M C , Jiménez M I , García-Granados A , Parra A , Cabo M M (2003) Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med* 69(5) : 472-474

Mekalti M (2003) Incidence pathologique de la coccidiose en Aviculture. Magister en médecine vétérinaire, Université de Batna, Faculté des sciences, Département vétérinaire, Option pathologie des animaux domestiques.

Majaro OM (1980) The epidemiology and economic importance of poultry coccidiosis in oyo state, Nigeria. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 33 : 377-379

Maikai VA , Makeri HK , Adeiza AA , Maikai BVO (2007) Preliminary studies of anticoccidial effect of Mahogany (*Khaya senegalensis*) and African Locust Bean Tree (*Parkia biglobosa*) aqueous bark extracts on chicken infected with coccidia. *Savannah. J Agric* 2 : 43-45

Morris GM , Woods WG , Grant Richards D , Gasser RB (2007) The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments. *Molecules Cellular Probes* 21 : 288-294

Molinier C (2002) Chapitre 4 : Les sporozoaires in éditions médicales internationales; parasitologie et mycologie médicales : éléments de morphologie et de biologie; Lassay-Les Cha-teaux : Europe Média Duplication SA ; 2003 :101-144

Mai K , Sharman P A , Walker R A , Katrib M , DeSouza D , McConville M J , Wallach M G , Belli S I , Ferguson DJ , Smith N C (2009) Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 :281–289

Molan A L , Meagher LP, Spencer PA , Sivakumaran S (2003) Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 33 :1691–1698

Molan AL , Zhuojian L , De S (2009) Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitol* 56 :1–5

Mouafo AN , Richard F, Entzeroth R (2000) Observation of sutures in the oocyst wall of *Eimeria tenella* (*Apicomplexa*). *Parasitol Res* 86 (12) : 1015-1017

Mayberry LF, Marquardt C , Nash D J , Plan B (1982) Genetic dependent transmission of *Eimeria separata* from Rattus to three strains of *Mus musculus* , an abnormal host. *J Parasitol* 68 :1124-1129

Mathis GF, McDougald LR (1987) Evaluation of interspecific hybrids of the chicken, guinea fowl, and Japanese quail for innate resistance to coccidia. *Avian Dis* 31 :740-745

McCully R M , van Niekerk J W , Kruger S P (1967) Observations on the pathology of *Bilharziasis* and other parasitic infestations of *Hippopotamus amphibius* Linnaeus , 1758, from the Kruger. *Nat Park. Onderspoort J Vet Res* 34 : 563-618

Mafwillla (2002) Contribution à l'application des drèches de la brasserie séchée dans l'alimentation de poulet de chair, *Annales de la faculté des sciences agronomiques*.

Mathis G F (1999) Anticoccidial sensitivity

- of recent field isolates of chicken coccidia. Poultry Sci 78 :116
- Mathis G F (2003) Vaccine can decrease anticoccidial resistance. World Poultry 4 : 22-23
- Manger BR (1991) In Veterinary applied, Pharmacology and Therapeutics, Part III Control of infectious diseases : chemotherapy, Chapitre 33 : Anticoccidials, 5th Ed, Ed Bailliere Tindall, London , UK.
- Mathis GFL , McDougald R , McMurray B (1984) Effectiveness of therapeutic anticoccidial drugs against recently isolated coccidia. Poultry Sci 63 :1149–53
- Muthamilselvan T, Kuo TF , Wu YC , Yang WC (2016) Herbal Remedies for coccidiosis control : A review of plants, compounds, and anticoccidial actions evidence-based complementary and alternative medicine 19
- Macheix J J , Fleuriet A , Sarni-Manchado P (2006) Composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôles. Edition : Lavoisier
- Masood S , Abbas RZ , Iqbal Z , Mansoor MK , Sindhu ZUD , Zia MA , Khan JA (2013) Role of natural antioxidants for the control of coccidiosis in poultry. Pak Vet J 33(4) :401–407
- Messai A , Bensegueni A , Abdeldjelil M , Agabou A , Redouane S (2014) Effects of white wormwood (*Artemisia herba-alba Asso*) during an experimental coccidiosis in broilers. Ann Biol Res 5 :61–66
- Miguel MG (2010) Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour Fragr J 25 :291–312
- Mahmood H , Wardah S , Shahiddi R, Gokhan Zengine A, Fawzi M ,Mahomood I , Ashraf M
- Ahemad N (2008) Clinical enzymes inhibitory activities, antioxidant potential and phytochemical profile of *Vernonia oligocephala* (DC.) Sch.Bip. ex Walp roots. Biocatalys Agric Biotechnol 18 : 101039
- Meskerem A , Boonkaewwan C (2013) Protective effects of *Moringa stenopetala* leaf supplemented diets on *Eimeria tenella* infected broiler chickens in debre zeit, central, Ethiopia. Kasetart J 47(3) :398–406
- Mansour M , Ammar khodja N , Belkhir (2017) Valorisation du grignon d'olive par la culture de champignons comestibles. Journée scientifique « Med Mag Oliva ». Palais des expositions-Pins Maritimes- Alger. 31
- Mendil M, Sebai A (2006) Catalogue ddes variétés algériennes de l'olivier. Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF).Dépôt légal ,n°1840,100
- Mendil M (2009) l'oléiculture : expériences algériennes. Revue FILAHA. N°4 : 6
- Moussouni A (2012) Etude de faisabilité de nouvelles techniques pour la valorisation des déchets dans le secteur agroalimentaire au Maghreb sous-secteur : huile d'olives .REME. 25 :38
- Michailidies M , Christou G , Akrotos CS , Tekerlekpoulou AG , Vayenas DV (2011) Composting of olive leaves and pomace from a three-phases olive mill plant. Int Biodet Biodeg 56 :560-564
- Manios T (2004) The composting potential of different organic solid wastes, experience from the island of Crete. Env. Int. 2004, 29 :1079–1089
- Mourtzinis I , Salta F, Yannakopoulou K , Chiou A , Karathanos VT (2007) Encapsulation of olive leaf extract in becyclodextrin. J Agric Food Chem 55 : 8088–8094

- Mulinacci N , Romani A , Galardi C, Pinelli P, Giaccherini C, Vincieri FF (2001) Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *J Agric Food Chem* 49 :3509–3514
- Morelló JR , Vuorela S , Rome MP, Motilva MJ , Heinonen M (2005) Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *J Agric Food Chem* 53 :2002–2008
- Marcos C , Sárragaa M , Castellaria F , Kappen G , Schennink , Jacint A (2014) Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. *Food Pack Shelf Life* 1(2) :140-150
- Myers R , Montgomery D (2001) Response surface methodology. Wiley, New York 2001
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant. *Res Pharm Rev* 1 :7
- Mustafa A , Turner C (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction : A review. *Analys Chim Acta* 703 :8
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26 :211
- Mylonaki S , Kiassos E , Dimitris P M , Panagiotis K (2008) Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem* 392 : 977985
- Madhujith T, Shahidi F (2006) Antioxidant Potential of Pea Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) . *J Food Sci* 70(1) :S85 - S90
- Mojerlou Z , Elhamirad A (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds from olive cake. *J Food Sci Technol* 55 (3) : 977–984
- Michiels JA , Kevers C, Pincemail J , Defraigne J O , Dommès J (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chem* 130 : 986-993
- Morelli LL , Prado MA (2012) Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. *Ultrason* 210 *Sonochem* 19 :1144
- Malheiro R N , Rodrigues G , Manzke A , Bento Pereira J , Casal S (2013) The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Ind Crops Prod* 44 :37–43
- Mcdonald S , Prenzler PD , Autolovich M , Robards K (2001) Phenolic content and antioxidant activity of olive extract. *Food Chem* 73 :73-84
- Mebirouk-Boudechiche L , Boudechiche LA , Ferhat R , Tahar A (2014) Relationship between availability of grass, food intake and grazing activities of sheep. *Arch Zootec* 63 : 242
- Córdoba
- Miliauskas PR , Venskutonisa TA , Van Beek (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 85 (2) : 231-237
- Maisuthisakul P, Suttajit M , Pongsawatmanit R (2007) Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem* 100 :1409–1418

- Mota R , Thomas G , Barbosa Filho J M (1985) Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. J Ethnopharmacol 13 :289-300
- Minioti KS , Georgiou CA (2010) Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. Grasas Aceites 61 : 45–51
- Moyer R , Hummer K E , Finn C, Frei B , Oregon S (2002) anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits : Vaccinium , Rubus , and Ribes. J Agric Food Chem 50 (3) :519-25
- Mansouri A , Emberek G , Kokkalou E, Kealas P (2005) Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). J Food Chem 89 : 411-420
- Miller NJ , Rice-Evans CA (1999) Spectrophotometric determination of antioxidant activity. Redox Report 2 : 161-171
- Manian R , Anusuya N , Siddhuraju P, Manian S (2008) The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. Food Chem 107 :1000-1007
- Manmohan S , Arindam P, Hemendra P S, Sushil K D, Kalpesh G (2011) Evaluation of reducing power assay of chalcone semicarbasones. J Chem Pharmacol Res 3 : 639-645
- Malik S Y, Haddadin G, Arabiyat O I , Hattar B (2008) Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *phanerochaeta chrysosporium*. Bioresour Technol 100 :4773-4782
- Malheiro R , Casal S , Sousa A , de Pinho P G , Peres A M , Dias L G , Bento A , Pereira J A (2012) Effect of cultivar on sensory characteristics, chemical composition, and nutritional value of stoned green table olives. Food Bioprocess Technol 5 : 1733–1742
- Moon J K , Shibamoto T (2009) Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J Agric Food Chem 57(5) : 1655–1666
- Moudache M , Colon M , Nerín C , Zaidi F (2016) Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. Food Chem 212 :521–527
- Moudache M , Nerín C , Colón M , Zaidi F (2017) Antioxidant effect of an innovative active plastic film containing olive leaves extract on fresh pork meat and its evaluation by Raman spectroscopy. Food Chem 229 :98–103
- N**ematollahi A , Moghaddam GH , Farshbaf Pourabad R (2009) Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tabriz (Northwest of Iran). Munis Ent Zoo 4(1) : 53–58
- Naidoo V, McGaw LJ , Bisschop S P R, Duncan N , Eloff J N (2008) The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. Vet Parasitol 153 (3-4) : 214–21
- Naciri M , Brossier F (2009) Les coccidioses aviaires : importance et perspectives de Recherche. Bull Acad Vét France 162 (1) :47-50
- Naciri M (2000) *Eimeria* , pathologie aviaire et parasitologie. INRA, centre de tours.
- Naciri M , Nouzilly (2001) Les moyens de lutte contre la coccidiose Aviaire In Actualités-Space
- Nogueira VA , França TN , Peixoto PV (2009) Ionophore poisoning in animals. Pesq Vet

Bras 29 :191–197

Nikmehr B , Ghaznavi H , Rahbar A , Sadr S , Mehrzadi S (2014) In-vitro anti-leishmanial activity of methanolic extracts of *Calendula officinalis* flowers, *Datura stramonium* seeds, and *Salvia officinalis* leaves. Chinese J Nat Med 12 :423–427

Nweze N E , Obiwulu I S (2009) Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides* . J Ethnopharmacol 122 (1) : 6–9

Nehal F, Dilmi Buras A (2017). Valorisation des feuilles d'*Olea europea* pour la bio conservation de la viande. Journée scientifique « Med Mag Oliva ». Palais des expositions-Pins Maritimes- Alger. 32

Nefzaoui A (1984) Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. In : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude

Nefzaoui A (1987) Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. OLIVAE IV. Tunisie

Nacz M , Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food; J Chromatog A 1054 : 95-111

Nacz M , Shahidi F (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables : Occurrence, extraction and analysis. J Pharmacol Biomed Analys 41 : 1523-1542

Nashwa FS , Morsy, Abdel-Aziz M E (2014) Efficiency of olive (*Olea europaea*L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. J Agro Proc Technol 20(1) : 46-53

Nemes S , Orsat V (2011) Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside -method development. Food Biop Tech-

nol 4 :1219

Nadour M , Michaud P, Moulti-Mati F(2012) Antioxidant activities of polyphenols extracted from olive (*Olea europaea*) of Chamlal variety. Appl Biochem Biotech 167 : 1802–1810

Nadour M (2015) Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issue des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides a visée alimentaire. Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou.

Nur A , Nusrat J , Bristi M , Uzzaman R (2013) Review on in vivo and in vitro methods 211 evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmacol J 21(2) :143-152

Nabavi S F, Nabavi S M , William N , Setzer , Nabavi SA , Nabavi SA , Ebrahimzadeh M A (2013) Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado. Fruits 68 : 185–193

Niranjan TG , Krishnakantha T P (2000) Membrane changes in rat erythrocyte ghosts on ghee feeding. Molecules Cellular Biochem 204 : 57–63

Nasir SA , Malik , Joe , Bradford M (2008) Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive(*Olea europaea*L.) leaves. J Food Agric Env 6 (2) : 8 -13

O O bied HK , Allen MS , Bedgood DR , Prenzler PD , Robards K , Stockmann R (2005) Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. J Agric Food Chem 53 :823–37

Obeid H K , Allen M S , Bedgood DR , Prenzler PD , Robards K , Stockmann R (2007) Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. J Agric Food Chem 53 : 823-837

- Ovington K S, Alleva LM , Kerr EA (1995) Cytokines and immunological control of *Eimeria spp.* Int j Parasitol 25 :1331-1351
- Ogbe AO , Mgbojikwe LO , Abdu PA , Atawodi SE (2008) Organ and carcass weight variation and histopathological changes in *Eimeria tenella* infected broiler chickens treated with aqueous extract of a wild mushroom (*Ganoderma lucidum*). Electron J Env Agri Food Chem 7 :2906–2913
- Ola-Fadunsin SD, Ademola IO (2013) Anticoccidial effects of *Morinda lucida* acetone extracts on broiler chickens naturally infected with *Eimeria* species. Pharmacol Biol 52 :330–334
- Owai P U , Gloria M (2010) Effects of components of *Melia azadirachta* on coccidia infections in broilers in calabar, Nigeria. Int J Poultry Sci 9 (10) : 931-934
- Oliveras-Lopez M J , Innocenti M , Giacherini C , Ieri F , Romani A , Mulinacci N (2008) Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils : Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. Talanta 73 : 726-732
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reactions : antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nut 44 :307–315
- Ortega-Garcia F, Blanco S , Ángeles- Peinado M , Peragón J (2008) Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. ‘Picual’ trees during fruit ripening. Victoria, Canada. Tree Physiol 28 : 45–54
- Ozguven A I , Tatli H , Coskun M , Dasgan Y (1996) Mediterranean and Aegean pomegranate varieties under ecological conditions of Adana, Turkey. Acta Horticult 441 :345–348
- Ozsoy N, Can A , Yanardag R , Akev N (2008) Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food Chem 110 :571-583
- Orak HH , Yagar H , Isbilir SS (2012) Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. Food Sci Biotech 21 : 373-387
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (1997) Parasitologie technique de base pour le laboratoire. Bibliothèque de l’OMS.
- P** Prakashbabu B C , Thenmozhi V , Limon G , Kundu K , Kumar S , Garg R , Clark EL , Srinivasa Rao A S R , Raj D G , Raman M , Banerjee P S, Tomley F M , Guitian J, Blake D P (2017) *Eimeria species* occurrence varies between geographic regions and poultry production systems and may influence parasite genetic diversity. Vet Parasitol 233 : 62-72
- Pereira P, Ferreira I C F R , Marcelino F, Valentão P , Andrade P B , Seabra R , Estevinho L , Bento A , Pereira J A (2007) Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules 12(5) : 1153–1162
- Procnier J D, Fernando M A , Barta J R (1993) Species and strain differentiation of *Eimeria spp.* of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. Parasitol Res 79 :98–102
- Patra G , Ayub Ali M , Victoria Chanu Kh , Jonathan L , Joy L K , Prava1 M , Ravindran R , Das G , Inaotombi Devi L (2010) PCR based diagnosis of *Eimeria tenella* infection in broiler chicken. Int J Poultry Sci 9 (8) : 813- 818
- Perard C (1924) Recherche sur la destruction des oocystes des coccidies C. R. heb. Scéanc.

Acad Sci 179 (14) :36-1438

Pellerdy L P (1965) Coccidia and coccidiosis. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

Pout D D (1967) Villous atrophy and coccidiosis. Nat 213 : 306-307

Palo P E (1987) La coccidiose du poulet de chair au Burkina. I. Pathogénicité de l'infection expérimentale à *Eimeria tenella*. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux

Pattillo WH (1959) Invasion of the caecal mucosa of the chicken by sporozoites of *Eimeria tenella*. J Parasitol 45 : 253-258

Peek HW, Landman WJ (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 J M (2003) Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria spp.* field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. Avian Patholog 32 : 391-401

Peek H W, Landman W J M (2010) Coccidiosis in poultry : anticoccidial products and alternative prevention strategies (a review) Animal Health Service (GD), P.O. Box 9, 7400 AA Deventer, the Netherlands

Panda KS , Luyten W (2018) Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. Parasite 25 :10

Porter W L (1993) Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems. Toxicol Ind Hlth 9

Platel K , Srinivasan K (2004) Digestive stimulant action of spices : A myth or reality Indian. J Med Res 119 : 167-179

Pincemail J , Bonjean K , Cayeux K , De-

fraigne J O (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. Nut Clin Métabol 16 : 233-239

Pourali M , Kermanshahi H , Golian A , Razmi G R , Soukhtanloo M (2014) Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria* -infected and uninfected broiler chickens. Iran J Vet Res 15 (3) : 227-232

Paredes-Gamero E J , Casaes-Rodrigues R L , Moura G E D , Domingues TM , Buri M V , Ferreira V H C et al (2012) Cell-permeable gomesin peptide promotes cell death by intracellular Ca²⁺ overload. Molecules Pharm 9 : 2686-2697

Paiva-Martins F , Pinto M (2008) Isolation and characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (*Olea europaea*) leaves. J Agric Food Chem 56 (14) : 5582-5588

Peralbo-Molina A , Luque de Castro M (2013) Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. Trends Food Sci Technol 32 :16-24

Peschel W, Sanchezrabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzia I, Jimenez D, Lamuela-Raventos R, Buxaberas S, Codina C (2006) An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruitwastes. Food Chem 97 :137-150

Popovici C , Saykova I , Tylkowski B (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Rev Génie Ind 4 :25-39

Prieto P , Pineda M , Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem

269 : 337–341

Prasad N , Yang B, Dong X, Guoxiang J , Zhang H, Xie H , Jiang Y (2009) Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innov Food Sci Emerg Technol* 10 (4) : 627-632

Prasad KN , Hassan FA , Yang B , Kong KW, Ramanan RN , Azlan A , Ismail A (2011) Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* *Kos- term* Peels. *Food Chem* xxx xxx–xxx

Priya A , Aparna S (2012) Chemical profile studies on the secondary metabolites of medicinally important plant *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb) DC using HPTLC 1293

Perron N R , Brumaghim J L (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 53 : 75 – 100

Polzonetti V , Egidi D , Vita A et al (2004) Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chem* 88 :1-15

Paiva-Martins F , Gordon M , H Gameiro P (2003) Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem Phys Lipids* 124 : 23-36

Park H J, Cha HC (2003) Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean J Biol Soc* 7 : 327-330

Pin-Der-Duh X (1998) Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa Linne*) : it's scavenging effect on free radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc* 75 : 455–461

Patton S , Kurt GW (1951) 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J Dairy Sci* 34 : 669-74

Peters T (1995) All about albumin. *Bio-*

chemistry, genetics, and medical applications. Acad Press.

Q Quairoz-Castaned RE, Dantăn-González E (2015) Control of avian coccidiosis : future and present natural alternatives. *Biol Med Res In* 11

Qin RZ , Arakawa A , Baba E (1995) *Eimeria tenella* infection induces recrudescence of previous *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Poultry Sci* 74(11) : 1786-1792

Quirantes-Piné R , Lozano-Sánchez J, Herero M, Ibáñez E, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2013) HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts. *Phytochem Anal* 24 : 213–223

Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, DineT Brunet C, Luyckx M et al (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat

R eperant JM , Ribot J, Thomas HM, Morel H, Morel J, Jestin V (2003) Marqueurs immunologiques d'especes de coccidies parasites du poulet. *Cinquiemes Journees de la Recherche Avicole Tours* 26 et 27 Mars 2003

Railliet A , Lucet A (1981) 'ote sur quelques especes de coccidies encore peneytudiies. *B Soc Zoll. France* 16 : 246 250

Reid MW, Calnek BW, Mc Dougald LR (1978) Protozoa- coccidiosis : “Diseases of poultry”. *Aimes Iowa (USA)* : Iowa State Univ Press 783-814

Reid WM , Kowalski L , Taylor EM , Johnson J (1970) Efficacy evaluations of robenzidene for control of coccidiosis in chickens. *Avian Dis* 14 : 788-796

Ryley JF (1973) In the *Coccidia. Eimeria* , *Isospora* , *Toxoplasma* , and Related Genera

- (Hammond D M, Long P L eds). *Cytochem physiol biochem* 145–181 Univ Park Press
- Ruff MD , Reid WM (1975) Coccidiosis and intestinal pH in chickens. *Avian Dis* 19(1) : 52-58
- Ruff MD , Fuller H L (1975) Some mechanisms of reduction of carotenoid levels in chickens infected with *Eimeria acervulina* or *E. tenella* .*J Nutr* 105 :1447–1456
- Ruff MD (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
- Reid A J , Blake D , Otto TD , Sanchez A , Sanders M , Tay Y , Dear P , Wan K , Berriman M , Pain A , Tomley F (2010) *Eimeria tenella* genome from GeneDB, BBSRC, Wellcome Trust Sanger Institute.
- Romier B , Schneider YJ , Larondelle Y (2009) During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev* 67 : 363-378
- Ramdane F, Essid R , Fares N , El Ouassis D , Aziz S , Mahammed MH , Ould Hadj MD , Limam F (2017) Antioxidant antileishmanial cytotoxic and antimicrobial activities of a local plant *Myrtus nivellei* from Algeria Sahara. *Asian Pac J Trop Biomed* 7 :702–707
- Raper G (2008) Increased interest for plant extracts. *Feed Mix*. 15.
- Rana G , Rinaldi M , Introna M (2003) Valorization of substances after spreading olive oil waste water on soil in Mediterranean environment. *Agric Ecosys Env* 96 : 49-58
- Ruberto G , Renda A , Daquino C, Amico V, Spatafora C , Tringali C , Tommasi N (2007) Polyphenols constituents and antioxidant activity of grape pomace from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem* 100 : 203-210
- Rahman B . Begum T, Sarker Y A et al (2015) Comparative efficacy of alcoholic extracts of black Peppers (*Piper nigrum*) and Chutra leaves (*Urtica dioica*) with Esb3 against coccidiosis in chickens. *Res Agric Live Fish* 2(1) :117–124
- Romero C, Brenes M , Garcia P, Garrido A (2002) Hydroxytyrosol 4--D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J Agric Food Chem* 50 :3 835–3839
- Ryan D , Robards K (1998) Phenolic compounds in olives. *Analys* 123 :31 –44
- Ryan D , Lawrence H , Prenzler P , Antolovich M , Robards K (2001) Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Analyt Chim Acta* 21449 :1-11
- Ryan D , Antolovich M , Prenzler P , Robards K , Shimon L (2002) Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europaea*. *L. Scientia Horticulturae* 92 : 174-176
- Rubio L , Moltiva MJ , Alba M , RamoT, Romero MP (2012) Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds an complementary phenols from Thyme. *Foo Chem* 60 : 3105-3112
- Ranalli A , Lucera L , Contento S , Simone N , del Re P (2004) Bioactive constituents, flavors and aromas of virgin oils obtained by processing olives with a natural enzyme extract. *Eur J Lipid Sci Technol* 106 : 187–197
- Ranalli A , Contento S , Lucera L , Di Febo M , Marchegiani D , Di Fonzo V (2006) Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*L.). *J Agric Food Chem* 54 :434-440

- Re R , Pellegrini N , Proteggente A , Pan-nala A , Yang M , RiceEvans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26 : 1231–1237
- Ribéreau-Gayon , Gautheret (1968) Les comp-sés phénoliques des végétaux .Edition Dunod. Paris 173-201
- Ramic M , Vidovic S , Zekovic Z , Vladic J , Cvejic A , Pavlic B (2015) Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrason Sonochem* 23 :360–368
- Rodríguez G , Lama A , Rodríguez R , Jiménez A , Guillén R , Fernández-Bolanos J (2008) Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresourc Technol* 99 :5261-5269
- Rafiee Z , Jafari SM , Alami M , Khomeiri M (2012) Microwave-assisted-extraction of phenolic compounds from olive leaves, a comparison with maceration. *J Anim Plant Sci* 21(4) 738-745
- Ramos P, Santos S A O , Guerra À R , Guerreiro O , Felicio L , Jerónimo E , Silvestre A J D , Neto C P, Duarte M (2013) Valorisation of olive mill residues : Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Ind Crops Prod* 45 : 359-368
- Rajeshwar Y , Kumar G P S , Gupta M . Mazumber U K (2005) Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens (Fabaceae)* seeds. *Europ Bultt Drug Res* 13(1) :31-39
- Ribeiro S , Barbosa L , Queiroz J , Knödler M , Schieber A (2008) Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chem* 110 : 620-626
- Remmal A , Achahbar S, Bouddine L , Chami N, Chami F (2011) In-vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet Parasitol* 182 :121–126
- Ruiz A , Guedes AC , Muñoz MC , Molina JM , Hermosilla C, Martín S , Hernández YI , Hernández A , Pérez D , Matos L , López AM , Taubert A (2012) Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol Res* 110 (6) :2131–2136
- S**hirley M W (1975) Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitol* 71 : 369-76
- Shirley M W (1986) New methods for the identification of species and strains of *Eimeria* .In McDougald L R, Joyner L P, Long P L (Eds.), *Res Avian Cocci* 13-35 Athens : University of Georgia.
- 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*. *Europ Comm Luxe* 1-25
- Shirley M W, Smith A L, Tomley F M (2005) The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv Parasitol* 60 :285–330
- Shirley M W, Smith A L , Blake D P (2007) Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine* 25 : 5540–5547
- Schwarz R S , Jenkins M C, Klopp S , Miska K B (2009) Genomic analysis of *Eimeria* spp. populations in relation to performance levels of broiler chicken farms in Arkansas and North Carolina. *J Parasitol* 95 : 871-880
- Scholtyssek (1973) Chapite 4 Ultrastructure.

- In Hammond DM, Lon P L (eds) The coccidia. University Park Press Baltimore - Butterworths – London. Edité par Datus M. Hammond avec Peter L. Long University Park Press 81-144
- Stotish RL ,Wang CC, Meyenhofer M (1978) Structure and composition of the oocyst wall of *Eimeria tenella*. J Parasitol 64 :1074-1081
- Soulsby EJ L (1982) Coccidia of domestic fowl. In : Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated Animals, 7th edition, Edited by E.J.L Soulsby. Baillière Tindall London UK 631-64
- Soulsby E J L (1986) Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, 8th edn., Tindall Cassel, London 651–661
- Suls L (1999) The continuig battle against coccidiosis. World poultry Elsevier special.
- Smith K C, Lee D E (1986) Monosaccharide transport by *Eimeria tenella* sporozoites. J Parasitol 72 :163-171
- Sharma N N (1964) Response of the fowl (*Gallus domesticus*) to parenteral administration of seven coccidial species. J parasitol 50 : 509-517
- Sherkov S (1976) Study of the effect of egg white and thiamine on coccidiosis in chickens caused by *E. tenella* [Bulgarian]. Vet Med Nauki 13 :93-99
- Surdeau P, Henaff R (1979) La Production du Poulet levage pratique, 1979 Edition Baillière, Collection de l'élevage pratique.
- Saville P (1999). La coccidiose aviaire Santé animale : fiche technique N°3/ Communauté du pacifique.
- Sülsen VP, Puente V, Papademetrio D, Batlle A, Martino VS, Frank FM, Lombardo ME (2016) Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi* . PLoS One 11 :e0150526
- Sims G P, Rowe D C ,Rietdijk S T , Herbst R , Coyle A J (2010) HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. Ann Rev Immunol 28 :367-388
- Spelman E , Nichols D (2006) Modulation of cytokine expression by traditional medicines : A review of herbal immunomodulators Jj Burns Nasha Winters July Alternative medicine review : J Clin Therap 11(2) :128-50
- Selma M V, Carlos J , Francisco E, Tomás-Barberán A (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota : Role in Human Health. J Agric Food Chem 57(15) :6485-501
- Sikkema J , De Bont JAM , Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 59(2) : 201-222
- Samaha H A , Haggag YN , Nosair MA , Habib HM (2013) Assessment efficiency of some chemical disinfectants commonly used against *Coccidia* in poultry farms.
- Sahraoui N . Brahim M , Errahmani D . Ammi-Baazizi N. Hezili M A . Bennaji H. Boulariahi D . Chaouadi J L . Hornick D . Guetarni (2015) Effet de l'extrait végétal de *Yucca schidigeras* sur l'excrétion oocystale chez le poulet de chair. Rev Mar Sci Agron Vét 3 (2) :53-57
- Schubert U , Fuchs J , Zimmermann J , Jhan D , Zoudal K (2005) Extracellular calcium deficiency an ryanodine inhibit *Eimeria tenella* sporozoites invasion in vitro. Parasitol Res 97 : 59 62
- Sarkozi S , Almassy J, Lukacs B et al (2007) Effect of natural phenol derivatives on skeletal type SR Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. J Mus Res Cell Motil 28 :167-74
- Sansoucy R (1984) Utilisation des sous-

- produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. Etude FAO Production et Santé Animales, Rome, FAO No.43
- Sayehban P, Seidavi A , Dadashbeiki M , Ghorbani A , Araujo WAG , Albino LFT (2016) Effects of different levels of two types of olive pulp with or without exogenous enzyme supplementation on broiler performance and economic parameters. *Braz J Poultry Sci* 18 :489–500
- Soler-Rivas C , Espin J C , Wichers H (2000) Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric* 80 :1013-1023
- Savournin C , Baghdikian B , Elias, Riad , Dargouth-Kesraoui F , Boukef K , Balansard G (2001) Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J Agric Food Chem* 49(2) :618-621
- Shahidi F, Naczk M (2004) Phenolic in food and nutraceutical; CRC Press : Boca Raton, FL, USA,
- Servilli M , Selvaggini R , Esposto S , Taticchi A , Montedoro G F, Morozzi G (2004) Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols : agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatog A* 1054 : 113–127
- Servilli M, Minnocci F, Veneziani G , Taticchi A , Urbani S , Esposto S , Sebastiani L , Valmorri S , Coretti A (2007) Compositional and tissue modifications induced by the natural fermentation process in table olives. *J Agric Food Chem* 56 : 6389–6396
- Sheikh B Y, Gabr S (2016) Influence of extraction solvents and phytochemical analysis in the evaluation of in-vitro antioxidant activity of Saudi Arabian olive leaves extract. *J Chem Applic* 3(2) : 6-12
- Silva S , Gomes L , Leitao F et al (2006) Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci Technol Int* 12 :385–395
- Spigno G , Tramellil, De Faverid M (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng* 81 :200-208
- Silva EM , Rogez H , Larondelle Y (2007) Optimisation of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *J Separ Purif Technol* 55 : 381-387
- Santos-Buelga C , Gonzalez-Manzano S , Dueñas M , Gonzalez-Paramas A M (2012) Extraction and isolation of phenolic compounds. *Nat Prod Isol* 427-464
- Spigno G , De Faveri D M (2009) Microwave-assisted extraction of tea phenols : A phenomenological study. *J Food Eng* 93 : 210-217
- Shao P, He J , Sun P, Zhao P (2011) Analysis of conditions for microwave-assisted extraction of total water-soluble flavonoids from *Perilla Frutescens* leaves. *J Food Sci Technol* 1-8
- Savova M , Kulusheva T, Stourza A , Seikova I (2007) The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of *Vitis vinifera* L. within a wide polarity range in solvent mixtures. *J Univ Chem Technol Metal* 42 : 295- 300
- Sousa A , Ferreira C F R , Barros L , Bento A , Pereira J A (2008) Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives alcaparras. *Food Sci Technol* 41 :739-725

- Suárez M , Romero MP, Ramo T, Macia A , Motilva MJ (2009) Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. J Agric Food Chem 57 :1463–1472
- Sawa T , Nakao M , Akaike T , Ono K , Maeda H (1999) Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds : implications for the anti-tumor-promotor effect of vegetables. J Agric Food Chem 47 : 397- 402
- Selvaraj N , Zachariah B , Sathiyapriya V (2006) Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin : An in vitro study on human erythrocytes. Clin Chim Acta 366(1-2) :190-195
- Stanisavljević IT, Veličković DT, Todorović ZB , Lazić ML , Veljković VB (2009) Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil. Europ J Lipid Sci Technol 111 :513
- Sarr SO , Fall AD, Gueye R , Diop A , Diatta K , Diop N , NDiaye B , Diop YM (2015) Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (*Verbenaceae*). Int J Biol Chem Sci 9 (3) :1263-1269
- Saija A , Scalese M , Lanza M , Marzullo D , Bonina F. Castelli F (1995) Flavonoids as antioxidant agents : importance of their interaction with biomembranes. Free Rad Biol Med 19 : 481–486
- Scheffer A , Rauwald HW, Kampa B et al (2008) *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca²⁺ channel antagonistic effects. J Ethnopharmacol 120 :233–240
- Salami M , Galli C , De Angelis L , Visioli F (1995) Formation of F₂- isoprostanes in oxidized low density lipoprotein : inhibitory effect of hydroxytyrosol. Pharmacol Res 31 : 275–279
- Saija A , Trombetta D , Tomaino A , Lo Cascio R , Princi P , Uccella N , Bonina F , Castelli F (1998) In vitro evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. Int J Pharmacol 166 : 123– 133
- Senevirathne M , Kim SH , Siriwardhana N , Ha J H , Lee KW. Jeon YJ (2006) Antioxidant potential of *ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. Food Sci Technol Int 12(1) : 27–38
- 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 Cong Bris Aust 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. Int J Parasitol 32 : 595– 616
- Tyzzer EE (1929) Coccidiosis in gallinaceous birds. American J Hyg 10 : 269-383
- Trees A J (2001) Parasitic diseases. In : Alexander, D., Faragher, T., Pattison, M. (eds). Poultry diseases, 5th edition Saunders London 405-421
- Turc D E , Stephens J F (1967) Gas trointestinal tract disease and zinc absorption : Cecal coccidiosis. Poultry Sci 46 : 936- 943
- Tipu M A , Akhtar M S , Anjum M I , Raja M L (2006) New deminsion of medicinal plants as animal feed. Pak Vet J 26 (3) : 144-148
- Tewari AK , Singh H , Sudan V, Rao JR (2010) Recombinant surface antigen 2(SAG 2) based serodetection of toxoplasmosis in cattle. In Proceedings of XX Nat Congress. Vet Para-

sitol 42

Turner R , Etienne N , Alonso M G (2004) Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *Int J Vitam Nutr Res* 75 : 61–70

Tasdemir D , Kaiser M , Brun R , Yardley V, Schmidt TJ , Tosun F, Rüedi P (2006) Antileishmanial activities of flavonoids and their analogues : in-vitro, in-vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 50 :13

Tomati U, Goli E (2006) A common policy to face the problem of olive oil mill wastes. In *Biotechnology and quality of olive tree products around the Mediterranean basin*. Ismaili-Aioui M, Roussas S, Perraud-Gaime I (eds), Actes Editions, Rabat : 375-382

Tsimidou M Z , Tsimidou V T, Papoti (2010) Bioactive ingredients in olive leaves; elsevier inc Amsterdam, the Netherlands.

Taamalli A , Arráez-Román D , Ibañez E , Zarrouk M , Segura-Carretero A , Fernández-Gutiérrez A (2012) Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf Phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS2 . *J Agric Food Chem*

Taamalli A , Arráez Román D , Gómez Caravaca AM , Zarrouk M , Segura Carretero A (2019) Geographical characterization of Tunisian olive tree leaves (cv. Chemlali) using HPLC-ESI-TOF and IT/MS fingerprinting with hierarchical cluster analysis. *J Anal Meth Chem* 678-9704

Talli A , Mahboub N , Boudjeh S , Siboukeur O , Moulti-Mati F (2010) Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de Dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) Va-

riete GHARS. *Ann Sci Technol* 2 :107-114

Tabaraki R , Nateghi A (2011) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrason Sonochem* 18 :1279

Tsiaka T, Zoumpoulakis P, Sinanoglou V J , Makris C, Heropoulos G A , Calokerinos A C (2015) Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. *Analyt chimica acta* 877 : 100-110

Talhaoui N , Taamalli A , Gomez-Caravaca A M , Fernández-Gutiérrez A , Segura-Carretero A (2016) Phenolic compounds in olive leaves : analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res Int* 77 : 92–108

Thaipong K , Boonprakob U , Crosby Cisneros-Zevallos L , Byrne D H (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* 19 : 669-675

Turkmen N, Vilioglu YS, Sari F, Polat G (2006) Effects of extraction conditions on measured total polyphenol content and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12 :484-496

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. *Europ Comm Lux* 25-39 Triki

Yamani R R , Bachir Pacha M (2010) Diagnosis of the broiler coccidiosis in the department Blida (Algeria). *Agric Pract Sci J* 73(1–2) :107–112

U Udo EJ , Abba AM , Abdulhamid Y , Mudassir (2018) In-vivo evaluation of anticoccidial efficacy of aqueous extract of *Alium sativum* and *Carica papaya* in experimentally infected broiler chicks. *Curr Trenn Biomed Eng Bios* 16 (5)

Upadhyay R , Ramalakshmi K , Jagan Mohan Rao L (2012) Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chem* 130 :184

Uma D , Ho C , Wan Aida W (2010) Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana* 39 :119-128

V Venkateswara Rao P , Raman M , Gomathinayagam S (2013) Sporulation dynamics of poultry *Eimeria* oocysts in Chennai. *Nadu Veterinary Animal Sciences University, Vepery, Chennai 600 007. India J Parasit Dis*

Villate D (2001) *Maladies des volailles (manuel pratique)*. Ed France agricole.

Vermeulen A N , Schapp D C , Schetters T P (2001) Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet Parasitol* 100 : 13–20

Vega-Galvez A , Miranda M , Punte Diaz L , Lopez L , Uribe E , Rodriguez K (2010) Effective moisture diffusivity determination and mathematical modeling of the drying curves of the olivewaste cake. *Bioresour Technol* 101 :7265–7270

Vermerris W , Nicholson R (2006) The role of phenols in plant defence. In : Vermerris W , Nicholson R (eds) *Phenolic compound biochemistry*, Chapter 6. Springer, Dordrecht, pp 211–234

Veillet S (2010) *Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre tradition et innovation*. Thèse de doctorat , université d'Avignon

et des pays de l'auchuse 132p.

Virginie G , Espérance M S , Guévara N , Reine B. A G , Pascal A D , Dominique S C , (2015) Study and evaluation of granulometry influence on the natural polyphenols kinetic extraction from *Pterocarpus erinaceus* acclimated in Benin]. *Int J Innovation Appl Studies* 12 : 325

Vinatoru M (2001) An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultra Sonochem* 8 : 303-313

Vinha A F , Ferreres F , Silva B M , Valentão P , Gonçalves A , Pereira J A , Oliveira M B , Seabra R M , Andrade P B (2005) Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea*L.) : Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem* 89 :561–568

Valko M , Rhodes C , Moncol J , Izakovic MM , Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemicobiol Interact* 160 (1) : 1-40

Visioli F , Bellomo G , Montedoro G F , Galli C (1995) Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117 : 25

Visioli F , Galli C (1998) Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J Agric Food Chem* 46 : 4292–429

Visioli F , Galli C , Borner F , Mattei A , Patelli R , Galli G , Caruso D (2000) Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* 486 159–160

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. *Parasitol Res*

75 :604–10

- W**illiams RB (1995) Epidemiologic studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*). Physical condition and survival of *Eimeria acervulina* oocysts in poultry. *Houes litter, appl parasitol* 36
- Williams RB , Busttel AC, Reperant JM , Doy TG , Morgan JH , Shirley MW , Yvoré P, Carr MM , Fermont YA (1996) Servey of *Eimeria* species in commercially reared chickens in France during 1994. *Avian patholog* 25
- Williams RB (1999) A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int J Parasitol* 29 :1209-1229
- Williams RB (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. *Int J Parsitol* 31 : 1056-1069
- Williams RB (2002b) Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). *Avian Dis* 46 :775-802
- Williams R B (2005) intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens : rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Patholog* 34 :159–180
- Williams R B , Marshall R N , Pagés M , Dardi M , Del Cacho E (2009) Pathogenesis of *Eimeria praecox* in chickens : Virulence of field strains compared with laboratory strains of *E. praecox* and *Eimeria acervulina*. *Avian Patholog* 38 (5) : 359–366
- Waldenstedt L , Lunden A , Elwinger K , Thebo P , Uggla A (1999) Comparison between a live, attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial ionophore, on performance of broilers raised with or without a growth promoter, in an initially *Eimeria* -free environment. *Acta Vet Scandinavica* 40 :11–21
- Waldenstedt L , Elwinger K , Lunden A , Thebo P, Uggla A (2001) Sporulation of *Eimeria maxima* oocysts in litter with different moisture contents. *Poultry Sci* 80 :1412–1415
- Wappelman R M (1976) Mass spectrometric analysis of the fattyacids and nonsaponifiable lipids of *Eimeria tenella* oocysts. *Lipids* 11 : 209–215
- Wang CC, Stotish R (1975c) Pancreatic chymotrypsin as the essential enzyme for excystation of *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 61(5) : 923-927
- Witlock DR , Lushbaugh WB , Danforth H D , Ruff M D (1975) Scanning electron microscopy of the cecal mucosa in *Eimeria -tenella-infected* and uninfected chickens.
- Warren EW, Ball S J (1963) The effect of sulphaquinoxaline and amprolium on the life cycle of *Eimeria adenoeides* Moore and Brown, 1951. *Turk poultry Parasitol* 53 : 653-662
- Wang S , Chen F, Wu J , Wang Z , Liao X , Hu X (2008) Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *J Food Eng* 78 : 693-700
- Wu T , Yan J , Liu R , Marcone MF , Aisa HA , Tsao R (2011) Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chem* 133 (4) : 1292
- Wang J , Zhou P, Wang TT , liu Z Y, Li Z Y (2009) Oxidative stress , DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp , *Litopenaeus Vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comp Biochm Physiol partC : T oxicol Pharmacol* 150 :428 -435

- Wang L , Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* 17 : 300–312
- Wongkittipong R , Prat L , Damronglerd S , Gourdon C (2004) Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study, kinetic reaction and model. *Separ Purif Technol* 40(2)
- Wegenbach G E, Burns (1969) Purification of *Eimeria tenella* sporozoites with glass bead columns. *J Parasitol* 55 (4) : 833-838
- Wang G T , Kobland J , Ingle D (1986) Anticoccidial efficacy of Cygro, monensin, and salinomycin in floor pen studies. *Proceedings 35th Western Poultry Dis Conf* 203–8
- Wiseman SA , Ballentine DA , Frei B (1997) Antioxidant in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37 : 705-718
- X** Xiang Z , Ning Z (2008) Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT Food Sci Technol* 41 (7) : 1189-1203
- Xie L , Shen M , Wen P , Hong Y , Liu X (2012) Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of phosphorylated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food Chem Toxicol* 145 :111754
- Xiao Z , Lester G, Luo Y, Wang Q (2012) Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products : edible microgreens. *J Agric Food Chem* 60 (31) :7644-51"
- Xie P L , Huang C , Zhang , Zhang Y (2015) Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea*L.) extracts and their structure–activity relationships. *J Funct Foods* 16 :460–471
- Y** 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 K Athens Georgia USA 128-168
- Yvoré P, Coudert P (1972) Etude de la respiration endogène et de la segmentation de L'ocyste d'*Eimeria tenella* durant la sporogonie. *Annales de Recherche Vétérinaire* (1) : 131-143
- Yvoré P, Lesur J, Mainguy P (1972) Incidence de la coccidiose sur la coloration jaune du poulet. *Annales de Recherche Vétérinaire* 3 : 389-398
- Yvoré P, Dubois M , Sauveur B , Aycardi J (1972 a) Pathogénie de la coccidiose duodénale à *Eimeria acervulina*. *Annales de Recherche Vétérinaire* 3 : 61-82
- Yvoré P (1992) Les coccidioses en aviculture. *Manuel de parasitologie aviaire*, Ed chaire de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour.
- Yun C H , Lillehoj H S , Zhu J, al (2000) Kinetic differences in intestinal and systemic interferon-gamma and antigen-specific antibodies in chickens experimentally infected with *Eimeria maxima*. *Avian Dis* 44(2) : 305-312
- Yvoré P, Dubois M , Sauveur B , Aycardi J (1972d) Pathogénie de la coccidiose duodénale à *Eimeria acervulina*. *Ann Rech Vet* 3 : 61-82
- Youn H J , Noh J W (2001) Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol* 96(4) :257–263
- Yang W C , Tien Y J , Chung CY et al (2015) Effect of *Bidens pilosa* on infection and

- drug resistance of *Eimeria* in chickens. Res Vet Sci 98 : 74–81
- Yu J , Zhang J , He J , Liu Z , Yu Z (2009) Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. Bioresour Technol 100 : 903–908
- Yuan JJ , Wang CZ , Ye JZ , Tao R , Zhang YS (2015) Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europea* (Olive) leaf extract and antioxidant activities. Molecules 20 :2903–2921
- Yolmeh M , Najafzadeh M (2014) Optimization and modelling green bean's ultrasound blanching. Int J Food Sci Technol 49 :2678–2684
- Yolmeh M , Habibi Najafi , M B , Farhoosh R (2014) Optimisation of ultrasoundassisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). J Food Chem 155 : 319-324
- Yang B , Liu X , Gao Y (2009) Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from *Gardenia (Gardenia jasminoides Ellis)* fruits with response surface methodology. Innovation Food Sci Emerg Technol 10 : 610-615
- Yi ZB, Yu Y, Liang YZ , Zeng B (2008) In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new *Citrus* cultivar and its main flavonoids, LWT-Food Sci Technol 4 : 1000-1016
- Z**ouzoua M (1990) Prophylaxie médicale de la coccidiose du poulet de chair à l'aide d'antibiotiques polyéthers ionophores. Thèse. Médecine Vétérinaire Nantes
- Zhou W, Jianzhong S , Xun S, Shiyun Z , Xingyun G (2006) Experimentally induced monensin-resistant *Eimeria tenella* and membrane fluidity of sprozoites. Vet Parasitol 138 : 186- 193
- Zhou B , Wang H , Xue E , Wang X , Fei C, Wang M , Zhang T , Yao X , He P (2010) Effects of diclazuril on apoptosis and mitochondrial transmembrane potential in second generation- merozoites of *Eimeria tenella* .Vet Parasitol 168 : 217-222
- Zhang Z S , Li D , Wang L J , Ozkan N , Chen XD, Mao Z-H, et al (2007) Optimization of ethanol– water extraction of lignans from flaxseed. Separ Purif Technol 57 :17
- Zhang B, Yang R , Liu C Z (2008) Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. Separ Purif Technol 62 :480
- 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. Vet Parasitol 191 : 29-34
- Zubair M , Anwar F, Ali Shahid S (2012) Effect of extraction solvents on phenolics and antioxidant activity selected varieties of Pakistani rice (*orayza sativa*). Int J Agric Biol 1560-8530
- Zhai Z, Devon H, Wu L , Solco A, Murphy P A , Wurtele E S , show all (2007) Alcohol extracts of Echinacea inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by macrophages in vitro. J Med Food 221-236
- Zaidi F, Hassissene N , Allouache H , Kichou M , Ourani S , Rezki K , Brlal M , Gronget L , Youyou A (2009) Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. Revue de Médecine Veterinaires 160 :67
- Zheng W, Wang SY (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J Agri Food Chem 49(11) :5165–5170

Zhang Y W, Thompson R , Zhang H , Xu H
(2011) APP processing in Alzheimer's disease.
Molecular Brain 4(1) : 3

Zhong S , Xu Mengtian T , Li Y, Liu F,
Li X , Dai R (2010) Antioxidant properties of
(*Eucommia ulmoides* Oliv.) extracts and their
effects on color stability and lipid oxidation of
raw pork patties. J Agric Food Chem 58 (12)
7289–7296

Première annexe

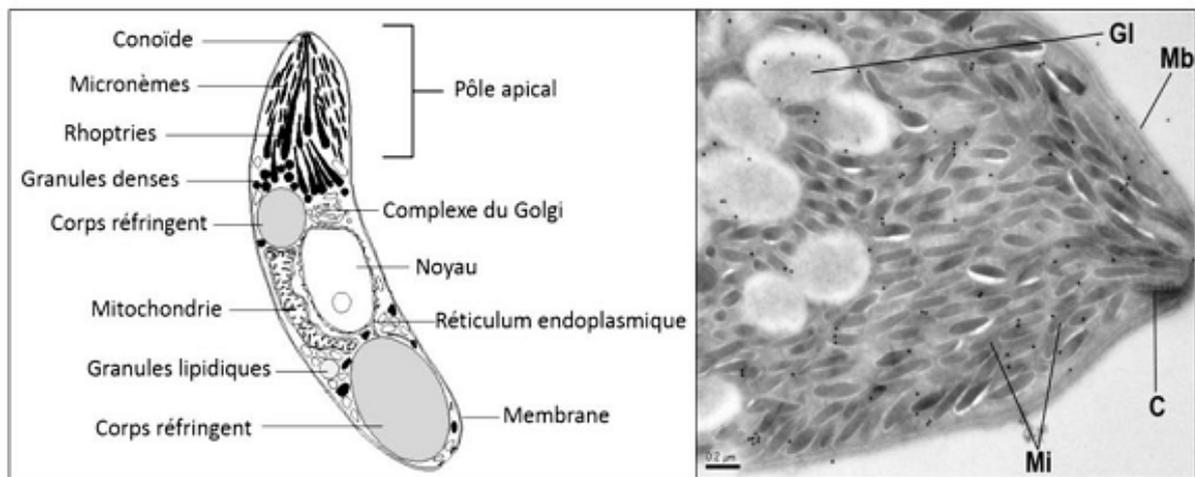


FIGURE 50 – Annexe A – Ultrastructure d'*Eimeria tenella*

Schéma de la structure d'un sporozoïte et photographie en microscopie électronique d'un pôle apical d'*E. tenella*. Sur la figure sont indiqués le conoïde (C), les micronèmes (Mi), la membrane (Mb) et les granules lipidiques (Gl) (Gaillard et al., 1991).

Deuxième annexe

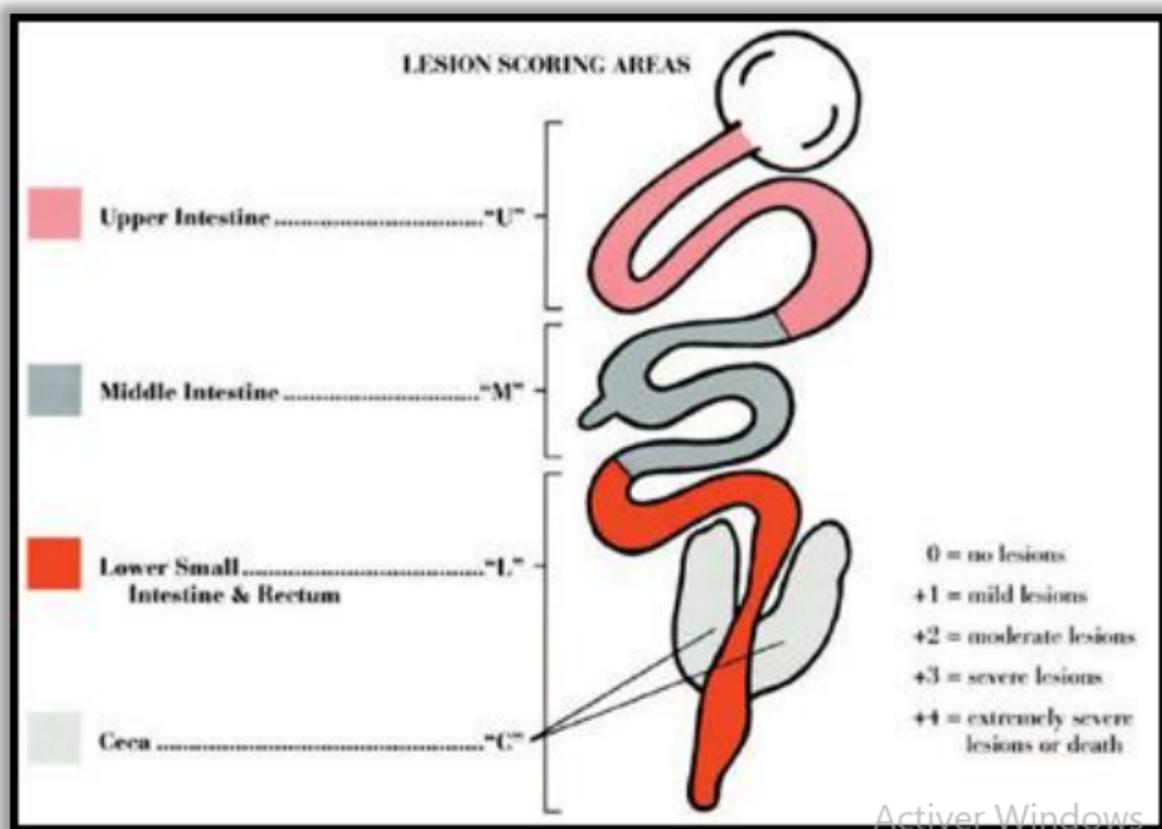


FIGURE 51 – Annexe B – Classification des lésions caractéristiques de la coccidiose selon la méthode de Johnson et Reid (Conway et McKenzie, 2007)

Troisième annexe

TABLE C.1 – Autorisations de coccidiostatiques en tant qu'additifs pour l'alimentation animale dans la législation communautaire (2008).

Nom des produits	Titulaire de l'autorisation	Date de l'autorisation	Fin de la période de l'autorisation	Espèces cibles	DA	L.M.R
Decoquinatate (Deccox)	Alpharma	AS 2004	17/07/2014	Poulets d'engraissement	3jours	
Monensin-sodium (Flancoban)	Eli Lily and Company Limited	2004	30/07/2014	Poulets, poulettes destinées à la ponte, et dinde < 16 semaines	3jours	25 μ g/Kg : Peau et graisse 8 μ g/Kg : foie, rein et muscul
Monensin-sodium (Coxidin)	Huvepharm NV Belgium	2007	06/02/2017	Poulets et dindes < 16 semaines	3jours	25 μ g/Kg : Peau et graisse 8 μ g/Kg : foie, rein et muscle
Chlorhydrate de Robénidine (Cycostat)	Alpharma (Belgium) BVBA	2004	29/10/2014	Poulets, dindes et lapins	5jours	
Lasalocide Asodium (Avatec)	Alpharma (Belgium) BVBA	2004	20/08/2014	Poulets et poulettes destinées à la ponte < 16 semaines	5jours	20 μ g/Kg : Muscle 100 μ g/Kg : Peau, graisse et foie 50 μ g/Kg : Rein 150 μ g/Kg : Oeufs
		1999	30/09/2009	Dindes < 12 semaines		

Salinomycine sodium (Saxcox)	Huvepharma NV	2004	21/08/2014	Poulets d'engraissement	1jour	
		2003	11/11/2013	Poulettes destinées à la ponte < 12 semaines		
		2001	31/05/2011	Poulets d'engraissement	5jours	5µg/Kg : Tous les tissus
Maduramicine Ammonium (Cygro)	Alpharma AS	1999	30/09/2009	Poulets d'engraissement	5jours	
		2001	15/12/2011	Dindes < 16 semaines		
<i>Diclazuril</i> (Clinacox)	Janssen Animal Health BVBA	2003	20/01/2013	Poulettes destinées à la ponte < 16 semaines		
		2001	28/02/2011	Dindes < 16 semaines		
		1999	30/09/2009	Poulets d'engraissement		
Salinomycine sodium (Salinomax)	Alpharma (Belgium)	2005	22/04/2015	Poulets d'engraissement	1jour	5µg/Kg : Tous les tissus
Narasin Nicarbazine (Maxiban)	Eli Lilly and Company Edt	1999	30/09/2009	Poulets d'engraissement et dindes d'engraissement	5jours	
Semduramicine sodium (Aviax)	Phibro Animal Health	2006	20/10/2016	Poulets d'engraissement	5jours	

Quatrième annexe

TABLE D.1 – Réactifs et produits chimiques utilisés.

Produit chimique	Marque	Provenance
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	Prolabo	France
Folin-Ciocalteu	Prolabo	France
Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$)	Prolabo	France
Chlorure de sodium (NaCl)	Prolabo	France
Chlorure de potassium (KCL)	Prolabo	France
Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	Prolabo	France
1,1 diphényle-2-picrylhydrazyl (Na_2HPO_4DPPH)	Prolabo	France
2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)	Prolabo	France
Acide gallique	Biochem-chemopharma	UK
Acide ascorbique	Biochem-chemopharma	UK
Chlorure ferrique ($FeCl_3$)		
Ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$]	Biochem-chemopharma	UK
Acide trichloroacétique (TCA)	Biochem-chemopharma	UK
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	Biochem-chemopharma	UK
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	Biochem-chemopharma	UK
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$)	Biochem-chemopharma	UK
Sulfate d'ammonium ferrique : Fe^{2+} (SO4)	Biochem-chemopharma	UK

D-glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Biochem- chemopharma	UK
Oleuropein, Quercetine MDA (malondialdehyde) TBA (acide 2-thiobarbiturique) Tris (hydroxyméthyl) <i>Diclazuril</i> (Algicox) et Sulfaquinoxaline so- dique Penicilline V, Streptomycine et Flucanazol Bichromate de potassium ($K_2CR^2O^7$) Butanol, Mrthanol et Ethanol	Fisher scientific	USA Cabinet vétérinaire Pharmacie

Cinquième annexe

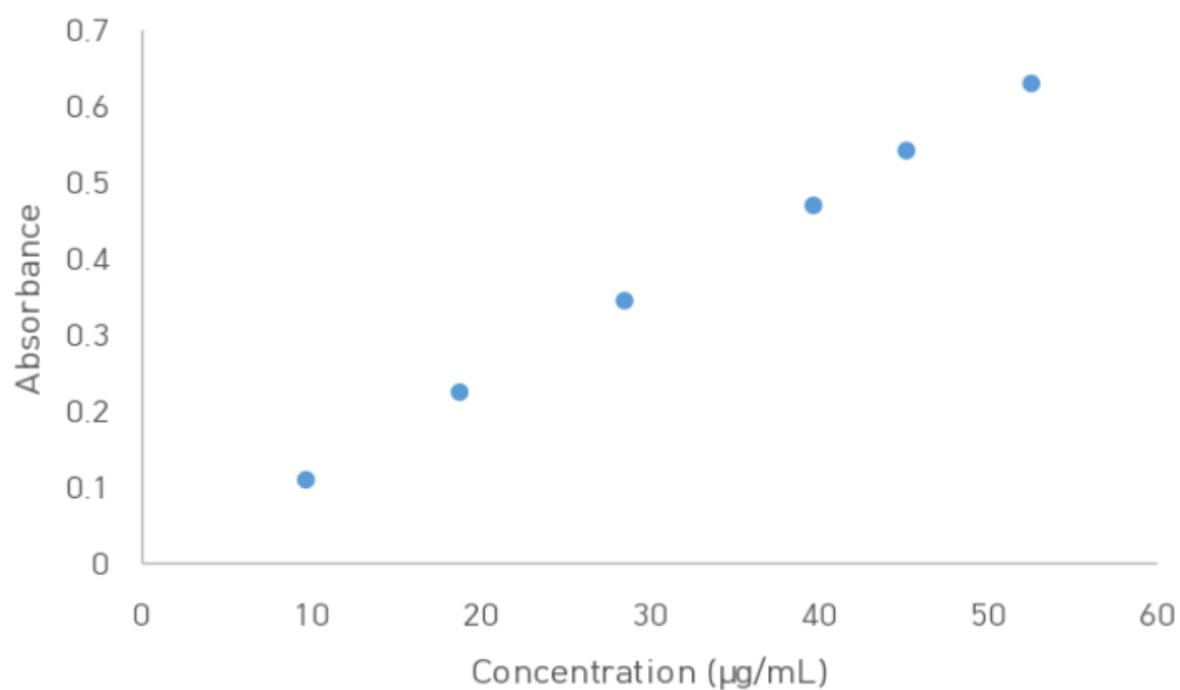


FIGURE 52 – Annexe E – Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux (Acide gallique).

Sixième annexe

TABLE F.1 – Central-Composite Design avec les réponses expérimentales et les valeurs prédites de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT) par l'EAM de la pulpe.

Concentration de l'éthanol (v/v) %	Puissance W	Temps d'irradiation (s)	Ratio (Liquide/Solide) ml/g	Rendement des (CPTmg GAE/g) Ve Vp	
60	700	180	50	16,06	18,47
40	300	120	40	17,72	16,91
40	500	180	40	19,66	19,24
60	300	180	50	11,45	11,50
40	700	120	40	17,11	18,41
40	500	120	40	19,41	17,14
20	500	120	40	13,62	14,78
20	300	180	30	15,95	22,11
20	700	60	30	17,04	16,94
20	500	120	40	18,35	17,14
40	300	60	50	17,89	16,08
40	500	120	50	17,81	14,84
40	500	120	40	17,41	17,14
60	500	120	40	15,82	13,24
20	300	180	50	12,19	13,96
60	300	60	30	16,02	15,88
40	500	120	40	16,47	17,14
20	300	60	50	15,89	15,41
60	700	60	30	14,23	12,24
60	700	60	50	13,77	14,56
40	500	120	40	16,89	17,14
60	700	180	30	18,64	19,08
40	500	120	40	16,06	17,14
40	500	60	40	16,57	16,58
40	300	180	30	16,38	16,15
60	700	180	50	15,64	14,74
20	300	60	30	20,19	20,69
20	500	120	30	17,22	17,78
40	700	60	50	17,05	15,69
20	700	180	30	18,09	18,82

TABLE F.2 – Annexe F.2 – Central-Composite Design avec les réponses expérimentales et prédites pour le rendement total en composés phénoliques (CPT) de l'EF (Extrait de Feuille) par l'EAM.

Concentration de l'ethanol (v/v) %	Puissance W	Temps d'irradiation (s)	Ratio (Liquide/Solide ml/g)	Rendement des (CPTmg GAE/g)	
				Ve	Vp
20	900	45	30	38,88	37,23
40	800	60	20	30,16	31,29
20	800	60	20	39,25	35,06
60	900	75	30	22,91	22,45
40	800	60	30	31,83	34,05
20	700	75	30	27,58	26,60
60	700	75	30	41,33	38,49
20	900	75	10	36,75	36,35
40	800	60	10	34,08	31,33
40	800	60	20	30,33	31,29
20	900	45	10	31,25	34,28
60	700	45	10	29,64	28,10
40	800	60	20	30,41	31,29
20	700	75	10	25,5	25,80
40	800	75	20	24,33	26,91
60	900	45	10	18	18,91
60	900	75	10	29,41	27,87
20	700	45	30	33,91	35,66
40	800	45	20	30,08	26,96
20	900	75	30	27,5	29,23
40	900	60	20	30,33	28,80
40	800	60	20	31,41	31,29
60	800	60	20	29,66	33,32
40	700	60	20	31,08	32,08
40	800	60	20	32,75	31,29
60	900	45	30	23,66	23,56
60	700	45	30	40,33	40,66
60	700	75	10	34,41	36,00
40	700	60	20	31,08	31,29
20	800	45	10	24,41	24,80

TABLE F.3 – Annexe F.3 – Central-Composite Design avec les réponses expérimentales et prédites pour le rendement total en composés phénoliques (CPT) du noyau par MAE.

Concentration de l'ethanol (v/v) %	Puissance W	Temps d'irradiation (s)	Ratio (Liquide/Solide) ml/g)	Rendement des	
				Ve (CPTmg GAE/g)	Vp
20	900	60	20	6,4416	5,9158
20	300	120	40	8,1361	8,825
20	300	60	20	6,6222	7,721
50	600	90	30	8,055	7,721
50	600	90	40	7,8194	7,517
20	900	60	40	2,9222	3,545
50	600	90	30	7,1	7,721
80	300	120	20	2,725	3,0037
20	300	60	40	7,05	6,918
80	900	60	40	7,4511	6,879
80	300	120	40	6,0388	5,189
20	900	120	40	8,8916	8,601
50	900	90	30	10,075	9,651
80	300	60	40	6,9444	7,089
50	600	90	20	7,3166	7,610
50	600	60	30	5,41388	5,781
20	900	120	20	8,83611	9,168
80	300	60	20	8,03888	8,829
80	900	120	20	7,04166	6,706
80	900	120	20	8,2638	8,020
80	600	90	20	7,8861	8,573
50	600	900	30	7,463	6,9404
50	600	900	30	7,1138	7,7216
50	600	900	30	8,07222	7,7216
50	600	900	30	7,8333	7,7216
20	600	900	30	6,91388	7,4291
20	300	120	20	8,11944	7,3158
50	900	30		7,0861	7,7216
50	600	120	30	6,8333	6,4578
80	900	120	40	7,8444	8,1305

Ve : valeurs expérimentales ; Vp : valeurs prédites ; W : puissance ; s : seconde ; v/v : volume/ volume ;
mg EAG : milligramme équivalent d'acide gallique.

Septième annexe

TABLE G.1 – Mesures (en μm) de la longueur, largeur, et de l'index (longueur/largeur) des coccidies dans la suspension parasitaire.

N° Coccidie	Longueur	E.type	Largeur	E.type	Index	N° Cocci	Long	E.type	Larg	E. type	Index
1	19,883	1,074	14,183	0,1037	1,40	53	22,656	3,846	19,796	1,801	1,14
2	17,89	0,968	12,853	2,077	1,39	54	18,13	1,105	13,37	1,164	1,35
3	11,073	0,956	14,82	0,631	0,75	55	33,593	2,493	21,6	1,162	1,55
4	19,183	0,973	16	1,1	1,20	56	18,613	1,682	13,023	1,413	1,42
5	18,396	1,432	15,517	1,117	1,18	57	18,5	0,843	14,855	0,823	1,24
6	18,24	2,514	15,78	3,617	1,15	58	17,89	2,5234	15,036	1,056	1,18
7	16,557	0,849	14,735	1,147	1,12	59	18,699	0,853	14,194	0,890	1,31
8	18,746	1,190	14,46	0,440	1,29	60	29,866	2,444	18,666	0,923	1,60
9	18,14	0,945	12,443	2,504	1,45	61	20,32	0,291	17,07	0,072	1,19
10	15,666	0,886	15,383	0,285	0,98	62	23,466	2,830	19,123	1,947	1,22
11	23,466	2,830	18,8	2,499	1,24	63	18,29	0,391	15,996	0,660	1,14
12	31,466	5,143	17,76	4,419	1,77	64	15,28	1,111	13,066	1,618	1,16
13	22,08	2,153	16,2133	1,303	1,36	65	19,623	2,237	16,216	2,101	1,21
14	22,08	1,623	19,84	4,778	1,11	66	19,473	0,959	15,272	1,080	1,27
15	20,113	3,059	19,626	4,0170	1,02	67	17,843	3,028	13,773	0,688	1,25
16	33,593	2,493	21,6	1,1629	1,55	68	21,42	0,058	19,86	4,778	1,07
17	21,5467	3,296	15,52	3,538	1,38	69	18,443	1,497	16,446	0,515	1,29
18	18,4733	3,9412	14,513	2,409	1,27	70	17,88	2,065	13,786	0,570	1,29
19	19,36	5,202	14,6133	2,407	1,32	71	22,72	3,509	14,56	2,164	1,56
20	22,7667	2,4106	18,92	2,963	1,20	72	20,373	0,9257	16,85	2,301	1,25
21	16,96	2,308	13,3867	1,848	1,26	73	25,586	5,622	17,44	3,477	1,46
22	18,9867	4,509	17,12	0,554	1,10	74	22,8267	2,491	19,3067	2,480	1,18
23	30,7733	2,270	18,72	6,599	1,64	75	18,3	1,350	17,35	0,964	1,05
24	19,0933	0,562	18,5067	0,821	1,03	76	17,88	3,107	14,82	3,271	1,20
25	16,4800	2,790	16,8533	1,520	0,97	77	12,1067	3,841	16,3200	1,120	0,74
26	11,4667	5,384	16,4800	2,257	1,43	78	19,2267	1,975	15,95	2,651	1,21
27	14,3467	2,013	17,6267	6,595	0,81	79	36,4933	2,765	31,9700	1,508	1,14
28	15,6268	2,298	13,28	2,268	1,17	80	20,8	3,204	17,92	2,997	1,16
29	16,65	2,414	16,25	2,979	1,02	81	28,9033	1,952	29,5933	1,915	0,97

30	19,0093	0,311	16,47	0,854	1,15	82	29,1333	3,903	22,0003	4,875	1,32
31	18,5	1,361	14,9733	5,586	1,23	83	19,7167	4,709	13,45	0,527	1,46
32	18,15	1,825	15,2533	2,766	1,18	84	25,6067	3,415	24,5333	3,892	1,04
33	14,5067	2,511	19,1466	4,720	0,76	85	14,9333	6,629	13,1733	1,935	1,13
34	18,3466	2,562	16,8134	2,740	1,09	86	15,36	3,763	18,8	1,126	0,81
35	19,55	0,879	12,9067	1,895	1,51	87	17,5	0,709	14,53	1,314	1,20
36	15,8934	2,572	18,72	0	0,84	88	22,08	1,623	19,84	4,7709	1,11
37	22,6668	2,973	17,92	2,997	1,26	89	33,12	3,741	28,3667	1,180	1,16
38	17,7	1,132	15,8	1,212	1,12	90	30,3600	1,626	28,2403	1,497	1,07
39	20,4	0,984	15,5166	4,265	1,31	91	35,1900	1,301	25,9200	3,220	1,35
40	10,5600	4,266	7,413	6,592	1,42	92	18,1500	1,825	12,2234	1,304	1,48
41	21,3	2,329	14,5	2,134	1,46	93	25,3500	0,955	23,12	1,434	1,09
42	19,36	7,5251	17,0667	1,361	1,13	94	21,3867	1,603	13,5467	1,611	1,57
43	15,5733	4,538	10,2933	3,901	1,51	95	23,24	1,218	21,7067	0,805	1,07
44	26,6667	4,353	16,7467	1,784	1,59	96	21,3867	1,603	13,5467	1,611	1,58
45	22,6667	4,663	15,6267	3,579	1,45	97	25,44	2,200	20	1,270	1,27
46	19,946	4,814	17,9967	1,087	1,10	98	22,72	3,883	19,1266	2,811	1,18
47	21,9733	1,379	14,08	2,893	1,56	99	24,48	4,556	20,32	2,416	1,20
48	26,44	3,531	16,0233	1,406	1,64	100	23,7867	2,423	16,8	3,603	1,41
49	21,5467	3,296	15,52	3,538	1,38	101	18,1867	4,971	19,36	1,782	0,93
50	21,8667	4,270	14,7733	3,477	1,48	102	17,7067	2,088	16,48	2,257	1,07
51	18,6133	1,642	15,4667	2,320	1,20	103	21,6	3,538	19,68	2,933	1,09
52	23,2533	0,910	17,0667	2,480	1,36	104	26,1333	4,481	15,7867	7,041	1,65

Hiutième annexe

TABLE H.1 – Les composés phinoliques de pulpe identifiés par HPLC–ESI-MS

	TR	M-H	µg/g	Name	Formula
1	0.92	249	11762,079	N-Caffeoylputrescine	$C_{13}H_{18}N_2O_3$
2	2.85	431	24185,696	apigenin 7-o-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$
3	5.69	625	56666,960	Quercetin 3,7,-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{17}$
4	6.49	337	8293,608	4-p-coumaroylquinic acid	$C_{16}H_{18}O_8$
5	6.80	319	43978,824	oleuropein aglycone	$C_{17}H_{20}O_6$
6	6.81	315	31020,824	Isohamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$
7	7.44	377	11053,496	3,4-DHPEA-EA	$C_{19}H_{22}O_8$
8	7.46	609	14064,219	quercetin-3-O-rutinoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$
9	7.73	355	40166,610	Ferulic acid glucoside	$C_{16}H_{20}O_9$
10	8.19	379	15759,448	Diligustilide	$C_{24}H_{28}O_4$
11	9.04 9.06	639	49508,433	deacetoxyoleuropeinaglycon	$C_{25}H_{32}O_{13}$

TABLE H.2 – Les composés phinoliques de feuille identifiés par HPLC–ESI-MS

	TR	M-H	µg/g	Name	Formula
1	0.89	447	400,120	Cynarosid=luteolin-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$
2	0.92	137	8261,999	Tyrosol	$C_8H_{10}O_2$
3	4.26	539	75477,543	Oleuropein	$C_{25}H_{32}O_{13}$
4	6.55	301	2023,187	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$
5	6.63	315	4155,147	Isohamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$
6	6.89	321	11056,997	Neobavaisoflavone	$C_{20}H_{18}O_4$
7	7.38	539	36946,034	2, 3-dihydro-amentoflavone	$C_{30}H_{20}O_{10}$
8	7.46	609	7692,308	quercetin-3-O-rutinoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$
9	7.76	706	3140,942	Chlorogenicacid	$C_{16}H_{18}O_9$
10	7.87	688	90257,447	Isorhamnetin 3-O-(6"-O-feruloyl)-glucoside)	$C_{32}H_{30}O_{15}$
11	8.19	379	13853,776	Diligustilide	$C_{24}H_{28}O_4$
12	8.58	615	32845,634	Quercetin-O-(O-galloyl)-hexoside	$C_{28}H_{24}O_{16}$

TABLE H.3 – Les composés phénoliques de noyau identifiés par HPLC–ESI-MS

	TR	M-H	µg/g	Name	Formula
1	6.49	153	795,408	Protocatechicacid	$C_7H_6O_4$
2	6.50	337	1734,823	4-p-coumaroylquinic acid	$C_{16}H_{18}O_8$
3	6.76	315	4926,218	Isohamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$
4	6.97	319	7372,820	oleuropein aglycone	$C_{17}H_{20}O_6$
5	7.39	539	5185,52033	2, 3-dihydro-amentoflavone	$C_{30}H_{20}O_{10}$
6	7.44	377	6330,331	3,4-DHPEA-EA	$C_{19}H_{22}O_8$
7	7.72 7.73 7.74	355	28670,544	Ferulic acid glucoside	$C_{16}H_{20}O_9$
8	8.59	615	6668,624	Quercetin-O-(O-galloyl)-hexoside	$C_{28}H_{24}O_{16}$
9	9.06	639	2623,062	Deacetoxyoleuropeinaglycon	$C_{25}H_{32}O_{13}$

Neuvième annexe



FIGURE 53 – Annexe I – lame MALASSEZ

Résumé

Résumé :

Une prévalence globale de 54,28% a été enregistrée dans 19/35 fermes.93 sur 147 échantillons de litière et 78 des 109 du contenu intestinal sont infectés par les oocystes d'*Eimeria* mixte, soit un taux de 63,26% et 71,55%, respectivement. L'identification des coccidies a mis en évidence cinq espèces d'*Eimeria* : *E.maxima*, *E. brunetti*, *E.mitis*, *E.maxima*, *E.acervulina* et *E.tenella* dont les deux dernières sont les prédominantes avec des taux respectifs de 32,05 % et 26,92 %, ($p < 0, 05$). HPLC-ESI-MS, MEB et le statut antioxydant des extraits de feuille, pulpe et noyau sont étudiés afin de tester l'activité anticoccidienne in- vitro. L'extrait de pulpe impactait positivement l'infection parasitaire en détruisant les oocystes d'*Eimeria. spp*, à un taux de 25,36% par rapport au contrôle ($p < 0,05$). Contrairement à la feuille, qui s'est révélé moins coccidiocide (5,89), Quant à l'extrait du noyau, il s'est manifesté négativement vis-à-vis des espèces coccidiennes.

Mots clés : Coccidiose aviaire - *Eimeria spp* - activité anticoccidienne - co-produits oléicoles (*Olea europea* L, var Chamlal) - Activité antioxydante.

Abstract :

An overall prevalence of 54.28% was recorded in 19/35 farms.93 Out of 147 litter samples and 78 out of 109 intestinal contents were infected with mixed *Eimeria* oocysts, a rate of 63.26% and 71.55%, respectively. Identification of coccidia revealed five species of *Eimeria* : *E.maxima*, *E. brunetti*, *E.mitis*, *E.maxima*, *E.acervulina* and *E.tenella*, of which the last two were the predominant ones with rates of 32.05% and 26.92%, respectively ($p < 0.05$). HPLC-ESI-MS, SEM and the antioxidant status of leaf, pulp and kernel extracts were studied to test the in vitro anticoccidial activity. The pulp extract positively impacted the parasitic infection by destroying *Eimeria spp*. oocysts at a rate of 25.36% compared to the control ($p < 0.05$). In contrast to the leaf, which was found to be less coccidiocidal (5.89), the core extract was negatively affected by the coccidian species.

Keywords : Avian coccidiosis - *Eimeria spp* - Anticoccidial activity - Olive co-products (*Olea europea* L, var Chamlal) - Antioxidant activity.

ملخص:

تجلت نسبة انتشار إجمالية قدرها 54,28% في 19/35 مزرعة، 93 من أصل 147 عينة فضلات و 78 من 109 محتويات معوية مصابة بكيسات الأيميريا المختلطة بنسبة 63,26% و 71,55% على التوالي. كشف تحديد الكوكسيديا عن خمسة أنواع من الإيميريا: *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.brunetti*, *E.maxima* و *E.tenella*، وآخر نوعين منها سائدان بمعدلات 32,05% و 26,92%، ($p < 0,05$). تمت دراسة HPLC-ESI-MS و MEB وحالة مضادات الأكسدة لمستخلصات الأوراق واللبن والنواة لاختبار النشاط المضاد للفطريات في المختبر. أثر مستخلص اللب إيجابياً على العدوى الطفيلية من خلال تدمير بيوض *Eimeria.spp* بمعدل 25,36% مقارنة بالسيطرة ($p < 0,05$). خلافا للورقة، التي تبين أنها أقل قاتلا للكوكسيديوسيد (5,89)، أما بالنسبة لمستخلص النواة، فقد ثبت أنه سلبى تجاه الأنواع الكروية.

الكلمات المفتاحية: الكوكسيديا الطيور - *Eimeria spp* - النشاط المضاد للفطريات - المنتجات الثانوية لزيت الزيتون (*Olea europea* L var Chamlal) - النشاط المضاد للأكسدة.