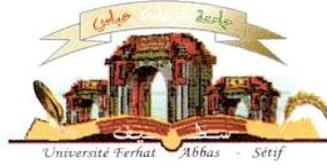


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سétif 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N° ...../SNV/2016

**THÈSE**

Présentée par

**NAILI Oumaima**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT 3<sup>ÈME</sup> CYCLE**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

**THÈME**

**Effet des extraits de *Abies numidica* de Lannoy  
sur la croissance et sur la microflore caecale et  
fécale des poussins de chair**

Soutenue publiquement le 13/03/2016

DEVANT LE JURY

Président	ZERROUG Mohamed Mihoub	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	HARZALLAH Daoud	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	HOUHAMDI Moussa	Pr. U. Guelma
	BENDJEMANA Katia	MCA. U. Khenchela
	DJENIDI Redha	MCA. U. Bordj Bou-Argeridj

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mon père mon professeur de toujours, et ma très chère mère pour  
leur soutien et encouragement*

*A mes chères frères : Bachir, Salah et Chouaib*

*A toute ma famille*

*A toutes mes amies*

*A tous mes professeurs*

*A tous ceux qui sont proches de mon cœur*

*A la promotion de doctorat microbiologie L.M.D de Sétif, la  
promotion (2011) du master microbiologie de l'environnement de  
Guelma et la promotion (2009) de la licence de Khenchela sans  
exceptions.*

***N. Oumaima***

## **Remerciements**

*Je tiens à exprimer mes plus chers et vifs remerciements à:*

*Mr. Harzallah D. pour m'avoir encadré, en me faisant bénéficier de ses connaissances, de son aide et de ses conseils.*

*Mr. Zerroug MM. de me faire l'honneur de présider le jury.*

*Mr. Houhamdi M., Mme. Bendjemana K. et Mr. Djenidi R. pour leur disponibilité et pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Mr. Rmadnia R. chef de service de laboratoire central de l'hôpital de Khenchela et Mme. Krache S. maitre assistante en anatomie pathologique à l'hôpital de Sétif pour leur aide précieuse dans la réalisation des analyses.*

*Mme. Boussoualim N., Mr. Belhadj H., Mr. Bouzerzour H., Mr. Mouafek N., Mr. Khennouf S., Mme. Dahamna S., Mr. Mennani A., Mr. Keziz T., Mr. Arrar L., Mme. Dahmouni Z. et Mr. Baghiani A. pour leur collaboration.*

*Tout mes collègues et amis : Zineb, Naila, Khawla, Amel, Warda, Habiba, Sana, Asma, Saliha, Nafissa, Wafa, Rafika, Naima, Hanane, Milouda, Lina, Sabrina, Abdelwaheb, Saoussen, Sofiane, Abdallah, Nouari et Amina pour leur encouragement.*

*Toute ma famille pour leur soutien moral.*

*Toutes les personnes qui m'ont aidé de réaliser ce travail.*

## RESUME

L'objectif de cette étude consiste à évaluer quelques propriétés de l'extrait brut (hydroalcoolique) et l'extrait aqueux de sapin de l'Algérie (*Abies numidica*). La mise en évidence de l'activité antioxydante des deux extraits a été réalisée par deux techniques : le piégeage du radical libre DPPH et le blanchissement du  $\beta$ -carotène. Les IC50 ont été de l'ordre de 13.74  $\mu\text{g/mL}$  pour l'extrait brut et 21.34  $\mu\text{g/mL}$  pour l'extrait aqueux. Cependant, l'inhibition de l'oxydation de  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été estimée de 88.46 % et 83.13% pour l'extrait brut et l'extrait aqueux, respectivement. L'extrait brut semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant. Les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins ont été déterminées et les résultats montrent que ces extraits représentent une source importante des composés phénoliques. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la technique de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis huit bactéries Gram négatif, quatre bactéries Gram positif, trois champignons et une levure. Les deux extraits présentent une activité importante contre les Gram positif et une activité modérée contre les Gram négatif. Cependant, aucune activité antifongique n'a été obtenue. Le test de la toxicité aigüe a révélé que les deux extraits ne sont pas toxiques pour les poulets lorsqu'ils sont administrés par voie orale à une dose de  $2\text{g.Kg}^{-1}$ . Afin de déterminer l'effet des extraits *in vivo*, 50 poussins de chair ont été répartis en cinq lots (un lot témoin, et les quatre lots ont reçu  $2\text{g/kg}$  et  $4\text{g/kg}$  de chaque extrait) et nourris pendant 21 jours. Les poulets ont été pesés à l'âge de 1, 7, 14 et 21 jours. La consommation alimentaire de chaque lot a été enregistrée chaque semaine et l'indice de consommation a été calculé. A l'âge de 21 jours, deux poussins pour chaque lot ont été sacrifiés et le tractus intestinal a été prélevé pour les analyses microbiologiques. Les résultats obtenus montrent que l'addition de  $4\text{g/kg}$  de l'extrait brut de *A. numidica* dans l'aliment des poulets a un effet bénéfique sur le gain de poids durant toute la période d'études et surtout pendant la première semaine où on a noté une différence significative dans le gain de poids par rapport au lot témoin. La consommation alimentaire, l'indice de consommation et le nombre de la microflore caecale n'ont pas été affectés par les différents traitements. En outre, ces extraits présentent une activité inhibitrice contre les souches staphylocoques isolées à partir de la matière fécale des poulets alors qu'ils n'ont pas d'effet sur les entérobactéries et les entérocoques. Les résultats de cette étude montrent que les extraits des aiguilles de *A. numidica* peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire comme alternatifs des composés synthétiques.

**Mots clés :** *Abies numidica*, activité antioxydante, activité antimicrobienne, poussins de chair, microflore caecale.

## تأثير مستخلصات الصنوبر الجزائري على النمو وعلى الميكروفلورا المعوية و البرازية لصيوان اللحم

### ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم بعض خصائص المستخلص الخام (الكحولي-المائي) و المستخلص المائي لأوراق شجرة الصنوبر الجزائري (*Abies numidica*). تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستعمال كل من اختبار جذر DPPH و اختبار تبييض البيتاكاروتين/ حمض اللينوليك, حيث قدرت النسبة المثبطة للأكسدة المزدوجة للبيتاكاروتين و حمض اللينوليك بـ 88.46% للمستخلص الخام و 83.13% للمستخلص المائي بينما قدرت التراكيز المثبطة للجذر الحر DPPH بـ 21.34 و 13.74 ميكروغرام/مل للمستخلص المائي و المستخلص الخام على التوالي. من جهة أخرى تم تقدير محتوى المستخلصين من المركبات المتعددة الفينول و الفلافونويدات و الدباغ. أظهرت النتائج احتواء المستخلصين على كمية معتبرة من المواد الفينولية. تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات باستعمال تقنية الانتشار على الأغار ضد ثمانية سلالات بكتيرية (Gram -)، أربع سلالات بكتيرية (Gram+), ثلاثة أعفان و خميرة. أظهرت النتائج أن للمستخلصين نشاطا عاليا ضد بكتيريا (Gram+) و متوسطا ضد بكتيريا (Gram -), في حين لم نسجل أي نشاط تثبيطي للسلالات الفطرية. كما كشف اختبار السمية الحادة أن أخذ جرعة 2غ/كغ عن طريق الفم لا يشكل خطرا على صحة الدجاج اللحم. لغرض تحديد تأثير المستخلص على الدجاج تم إحضار 50 صوص و تقسيمهم إلى خمس مجموعات (المجموعة الشاهد و أربع مجموعات يضاف إلى غذائها 2غ و 4غ من كل مستخلص/كغ). تم تغذيتها مدة 21 يوما ثم سجلت أوزان الصيوان في اليوم الأول، السابع، الرابع عشر و الواحد و العشرين و كمية الغذاء المستهلكة لكل مجموعة. كما تم حساب التحول الغذائي. في اليوم الواحد و العشرين، تم ذبح صوصين من كل مجموعة و استخراج أمعائهما لإجراء التحليل الميكروبيولوجية. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن إضافة 4غ من المستخلص الخام إلى الغذاء له تأثير مفيد في زيادة الوزن خاصة في الأسبوع الأول مقارنة مع المجموعة الشاهد. لم يتم تسجيل أي إختلاف في كمية الغذاء المستهلكة، التحول الغذائي و كذا في عدد بكتيريا المعى الأعور. إضافة إلى ذلك أظهر المستخلصين فعالية ضد سلالات staphylocoques المعزولة من فضلات الدجاج، في حين لم يظهر لهما أي تأثير ضد سلالات entérobactéries و entérocoques. بينت نتائج هذه الدراسة أنه يمكن استغلال مستخلصي أوراق *A. numidica* في الصناعة الغذائية عوضا عن المركبات الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية: الصنوبر الجزائري، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، صيوان

اللحم، بكتيريا المعى الأعور.

## **Effect of *A. numidica* extracts on growth and on caecal and fecal microflora of broiler chick**

### **SUMMARY**

The aim of this study was to investigate *in vitro* and *in vivo* properties of crude (hydroalcoholic) and aqueous extracts of Algerian fir needles (*Abies numidica*). Antioxidant activity was evaluated by two separate methods: scavenging of free radical DPPH and the inhibition of linoleic acid oxidation. In the first case the IC<sub>50</sub> value was 13.74 µg/mL for the crude extract and 21.34 µg/mL for the aqueous one, in the β-carotene-linoleic acid system, the inhibition values of linoleic acid oxidation were estimated as 88.46% and 83.13% for the crude and aqueous extract respectively. In both tests the crude extract was the most active. The amount of dried extract, the content of total phenolics, flavonoids and tannins was also determined and the results showed that these extracts represent a significant source of phenolic compound. Antimicrobial activity was studied using disc diffusion method against four Gram positive bacteria, eight Gram negative bacteria, three fungal strains and yeast. Both extracts present an important antibacterial activity against Gram positive bacteria and moderate activity against Gram negative bacteria. However, no antifungal activity was obtained for both types of extracts. Acute toxicity test indicated that extracts were not toxic when administered by the oral route to broiler chickens at 2g.Kg<sup>-1</sup>. To determine *in vivo* effects of extracts, a total of fifty, one-day-old broiler chicks were allocated into five dietary treatments groups (Control group and four experimental groups with the addition of 2g and 4g of each extract) and fed for 21 days. The chicks were weighed individually on days 1, 7, 14 and 21. Feed intake for each pen was recorded weekly and feed conversion ratio was calculated. At 21 d of age, two chickens from each treatment were slaughtered and their intestinal tracts were removed for microbiological analysis. The obtained results showed that the use of 4g/kg of crude extract of *Abies numidica* in broiler feeds has a beneficial effect on body weight gain during the overall rearing period and results significantly better weight gain in the first week of age compared to basal diet. The feed intake, feed conversion ratio and microbial population were not affected by dietary treatments. Also, these extracts presented a good inhibitory activity against staphylococci strains isolated from fecal microflora of broiler chickens, whereas no effect was noted on enterobacteria and enterococci strains. The results of this study show that extracts from needles of *Abies numidica* can be used as an easily accessible source of natural antioxidants or in food industry as safe alternatives for synthetic compounds.

**Keywords** : *Abies numidica*, antioxydant, antimicrobial, broiler chicks, caecal microflora.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ANOVA</b>	Analyse de variance
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>BHT</b>	Hydroxytoluene butyle
<b>CASFM</b>	Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
<b>CLMA</b>	Collection du laboratoire de microbiologie appliquée
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CMV</b>	Complément minéral vitaminé
<b>DPPH</b>	1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
<b>DMSO</b>	Diméthyle sulfoxyde
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EAq</b>	Extrait aqueux
<b>EBr</b>	Extrait brut
<b>J</b>	Jour
<b>IC</b>	Indice de Consommation
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice de 50%
<b>PC</b>	Poids corporel
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>UI</b>	Unité Internationale
<b>UPGMA</b>	Unweighted pair group method with rithmetic averaging
<b>UFC</b>	Unité formant colonie

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Appareil digestif du poulet.....	12
<b>Figure 2:</b> Composition de la flore bactérienne iléale et caecale chez les poulets de chair	18
<b>Figure 3:</b> Schéma récapitulatif des modes d’action des phytobiotiques sur la croissance du poulet.....	23
<b>Figure 4:</b> Photographies de <i>Abies numidica</i> .....	26
<b>Figure 5:</b> La plantation du sapin de Numidie à Seraidi.....	28
<b>Figure 6:</b> Protocole préparation de l’extrait aqueux.....	31
<b>Figure 7:</b> Protocole de préparation de l'extrait brut.....	32
<b>Figure 8:</b> Droite d’étalonnage de l’acide gallique.....	33
<b>Figure 9:</b> Droite d’étalonnage de la quercétine.....	34
<b>Figure 10:</b> Droite d’étalonnage de l’acide tannique.....	35
<b>Figure 11:</b> Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé.....	47
<b>Figure 12:</b> Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits étudiés.....	51
<b>Figure 13:</b> Représentation de l’inhibition du radical DPPH par l’estimation des valeurs de l’IC50 des deux extraits de <i>Abies numidica</i> et le BHT.....	51
<b>Figure 14:</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène/acide linoléique à 490 nm en présence et en absence des extraits de <i>Abies numidica</i> et de BHT	53
<b>Figure 15:</b> Activité antioxydante relative des extraits, du BHT, du MeOH et du H <sub>2</sub> O dans le système $\beta$ -carotène/acide linoléique .....	54
<b>Figure 16:</b> Evaluation de la fonction rénale par le dosage de l’urée et la créatinine.....	60
<b>Figure 17:</b> Evaluation de la fonction hépatique par le dosage de TGO, TGP et la Gamma-GT .....	61
<b>Figure 18:</b> Variation des valeurs de la masse relative des organes.....	63
<b>Figure 19:</b> Photographies des coupes histologiques du tissu rénal des poulets.....	64
<b>Figure 20:</b> Photographies des coupes histologiques du tissu hépatique des poulets.....	66
<b>Figure 21:</b> Variation des valeurs de la masse relative des organes.....	70
<b>Figure 22:</b> Dendrogramme de similarité entre les trente souches d’entérobactéries pour l’ensemble des caractères phénotypiques.....	73
<b>Figure 23:</b> Dendrogramme de similarité entre les quinze souches de staphylocoques pour l’ensemble des caractères phénotypiques.....	76
<b>Figure 24:</b> Aspect des colonies entérocoque sur milieu bile esculine.....	78

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Structure des squelettes des polyphénols.....	5
<b>Tableau 2:</b> Les différents types des espèces réactives.....	9
<b>Tableau 3:</b> Nombre de bactéries viables des groupes majoritaires dans le tube digestif du poulet.....	17
<b>Tableau 4:</b> Principaux antibiotiques utilisés en aviculture.....	21
<b>Tableau 5:</b> Classification scientifique de <i>Abies numidica</i> .....	27
<b>Tableau 6:</b> Composition de l'aliment de démarrage et de croissance des poulets de chair	38
<b>Tableau 7:</b> Composition de l'aliment utilisé durant l'expérience.....	41
<b>Tableau 8:</b> Liste des antibiotiques utilisés.....	46
<b>Tableau 9:</b> Teneurs des extraits de <i>Abies numidica</i> en phénols totaux, flavonoïdes et en tannins .....	49
<b>Tableau 10:</b> Diamètres des zones d'inhibition des extraits de <i>A. numidica</i> ..... ;.....	55
<b>Tableau 11:</b> Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'EAq et l'EBr de <i>A. numidica</i> .....	57
<b>Tableau 12:</b> Effet des extraits de <i>A. numidica</i> sur les paramètres zootechniques des poussins.....	59
<b>Tableau 13:</b> Résultats de l'analyse des paramètres hématologiques.....	62
<b>Tableau 14:</b> Effet de l'inclusion d'extraits de <i>A. numidica</i> sur les paramètres de croissance des poulets.....	67
<b>Tableau 15:</b> Paramètres biochimiques sanguins des poussins.....	69
<b>Tableau 16:</b> Nombre de population bactérienne caecale.....	71
<b>Tableau 17 :</b> Caractères biochimiques des souches entérobactéries de différents clusters	74
<b>Tableau 18:</b> Caractères biochimiques des souches staphylocoques de différents clusters	77
<b>Tableau 19:</b> Antibiogramme des entérobactéries isolées.....	80
<b>Tableau 20:</b> Antibiogramme des staphylocoques isolées.....	81
<b>Tableau 21:</b> Antibiogramme d'entérocoques isolées.....	82
<b>Tableau 22:</b> Effet des extraits de <i>A. numidica</i> sur la microflore caecale et fécale <i>in vitro</i>	83

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1. Les plantes médicinales.....	3
2. Les métabolites secondaires.....	4
2.1. Les polyphénols.....	4
2.1.1 Les acides phénoliques.....	5
2.1.2. Flavonoïdes.....	6
2.1.3. Tannins.....	6
2.1.4. Les coumarines.....	7
2.2. Les anthocyanines.....	7
2.3. Les alcaloïdes.....	7
2.4. Les isoprénoides (Terpénoides).....	8
3. Le stress oxydatif.....	8
3.1. Les radicaux libres.....	8
3.2. Les types d'antioxydants.....	9
3.3. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	10
4. Toxicité aiguë.....	10
4.1. Les organes cibles.....	10
4.1.1. Foie.....	10
4.1.2. Reins.....	11
4.2. La toxicité des plantes médicinales.....	11
5. Anatomie et rôle de l'appareil digestif de poulet.....	12
6. La microflore digestive des volailles.....	16
6.1. Répartition de la flore intestinale du poulet.....	17
6.2. Mode de colonisation.....	18
6.3. Effet du microbiote intestinal.....	19
7. Les antibiotiques en médecine vétérinaire.....	20
7.1. Utilisation des antibiotiques chez les animaux d'élevage.....	20
7.2. Impact de l'antibiothérapie vétérinaire sur la santé humaine.....	21
7.2.1. Résidus de traitement et flore intestinale humaine.....	21
7.2.2. Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'homme.....	22
8. Les phytobiotiques.....	22
8.1. Utilisation dans l'alimentation des volailles et effet sur l'animal et ses produits.....	22
8.1.1. Effet sur les performances de croissance.....	22
8.1.2. Effet sur la qualité de la viande.....	24
8.1.3. Effet sur la production et la qualité des œufs.....	24
8.2. Mécanismes d'action sur le statut oxydant.....	24
9. <i>Abies numidica</i> .....	25
9.1. Nomenclature.....	25
9.2. Description botanique.....	25
9.3. Position systématique.....	27
9.4. Ecologie et répartition géographique.....	27
9.5. Usage traditionnel et travaux scientifiques réalisés sur <i>Abies numidica</i> .....	28

## MATERIEL ET METHODES

1. Matériel.....	29
2. Méthodes.....	30
2.1. Extraction.....	30
2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	30
2.1.2. Préparation de l'extrait brut.....	30
2.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et tannins.....	33
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	33
2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	34
2.2.3. Dosage des tannins.....	35
2.3. Activité antioxydante.....	36
2.3.1. Test de DPPH.....	36
2.3.2. Test du blanchissement de $\beta$ -carotène/acide linoléique.....	36
2.4. Activité antimicrobienne.....	37
2.4.1. Préparation de l'inoculum et des solutions d'extraits.....	37
2.4.2. Ensemencement et dépôt des disques.....	37
2.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	37
2.5. Toxicité aigue.....	38
2.5.1. Animaux et alimentation.....	38
2.5.2. Traitement des animaux.....	38
2.5.3. Enregistrement des performances.....	39
2.5.4. Prélèvement du sang, analyses biochimiques et hématologiques.....	39
2.5.5. Réalisation des coupes histologiques.....	40
2.6. Etude de l'effet des extraits de <i>Abies numidica</i> sur les poussins de chair..... ;.....	41
2.6.1. Provenance des poussins et mise en place.....	41
2.6.2. Alimentation des animaux.....	41
2.6.3. Traitements.....	42
2.6.4. Suivi des performances zootechniques de croissance.....	42
2.6.5. Effet sur les paramètres biochimique.....	42
2.6.6. Effet sur le poids de quelques organes.....	43
2.6.7. Effet sur la microflore caecale des poussins <i>in vivo</i> .....	43
2.6.7.1. Echantillonnage.....	43
2.6.7.2. Analyse microbiologique.....	43
2.6.8. Effet sur la microflore caecale et fécale <i>in vitro</i> .....	43
2.6.8.1. Isolement des souches bactériennes.....	43
2.6.8.1.1. Isolement à partir d'échantillons caecaux.....	43
2.6.8.1.2. Isolement à partir d'échantillons fécaux.....	44
2.6.8.2. Conservation des isolats.....	44
2.6.8.3. Identification des isolats.....	44
2.6.8.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	45
2.6.8.5. Activité antibactérienne des extraits.....	47

## RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendements des extraits.....	49
2. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins.....	49
3. Pouvoir antioxydant des extraits.....	50
3.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	50

3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène/acide linoléique .....	52
4. Activité antimicrobienne.....	54
5. Toxicité aigue.....	58
5.1. Mortalité et comportement des animaux.....	58
5.2. Performances de croissance.....	59
5.3. Analyse du sang.....	60
5.3.1. Analyse biochimique.....	60
5.3.2. Analyse hématologique.....	62
5.4. Effet sur le poids des organes.....	62
5.5. Histopathologie des organes (foie et reins).....	63
5.5.1. Etude histologique des reins.....	63
5.5.2. Etude histologique de foie.....	65
6. Effet de l'incorporation des extraits sur les poussins <i>in vivo</i> .....	67
6.1. Les performances de croissance.....	67
6.2. Les paramètres biochimiques du sang.....	69
6.3. La masse relative des organes.....	70
6.4. Effet sur la microflore caecale des poussins <i>in vivo</i> .....	70
7. Analyse des critères phénotypiques des entérobactéries par UPGMA.....	72
8. Analyse des critères phénotypiques des staphylocoques par UPGMA.....	75
9. Identification des souches d'entérocoques.....	78
10. Sensibilité des souches isolées aux antibiotiques.....	79
10.1. Croissance des entérobactéries en présence d'antibiotiques.....	79
10.2. Croissance des staphylocoques en présence d'antibiotiques.....	81
10.3. Croissance des entérocoques en présence d'antibiotiques.....	82
11. Effet des extraits de <i>A. numidica</i> sur la microflore caecale et fécale <i>in vitro</i> .....	83
<b>Discussion générale.....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>89</b>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ANNEXES

# *Introduction*

Au cours des dernières années, l'intérêt public pour l'utilisation des plantes médicinales dans l'industrie pharmaceutique a considérablement augmenté non seulement dans les pays en développement, mais aussi dans les pays industrialisés. Parmi les différentes plantes médicinales, certaines espèces endémiques ont un intérêt particulier, car ils peuvent être utilisés pour la production des matières premières contenant des composés phytochimiques avec des propriétés antioxydantes et divers avantages pour la santé (Exarchou *et al.*, 2002; Shukla *et al.*, 2009).

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (Gausson et Leroy, 1982). *Abies numidica* est une espèce d'arbre en forme de cône large, n'existe à l'état naturel que dans les montagnes des Kabylie, non loin d'Alger (Cheers et Burnie, 2005). Ces dernières années, beaucoup d'attention a été accordée aux espèces du genre *Abies*, en raison de leurs diverses activités biologiques (Yang *et al.*, 2008).

En production aviaire, les traitements antimicrobiens sont largement utilisés comme moyen de lutte efficace contre les maladies aviaires qui causent des taux de mortalités très importants, engendrant des pertes économiques considérables (Blanco *et al.*, 1997), et comme stimulateurs de croissance. Cependant, cette utilisation abusive de ces derniers a fait apparaître une chimiorésistance, et un développement de nouvelles souches de bactéries résistantes (Nowak, 1994; Dutil *et al.*, 2010). Notamment en Algérie, l'utilisation curative et préventive des antibiotiques dans l'élevage n'est pas réglementée, ce qui présente un risque potentiel pour la santé du consommateur (Hakem *et al.*, 2013).

En vu des effets négatifs de l'utilisation fréquente des antibiotiques, sur la microflore intestinales, et ces conséquences potentielles sur la santé des consommateurs, les scientifiques se sont penchés vers la recherche de composés alternatifs naturels, qui pourraient contribuer à la lutte contre les différentes pathologies aviaires, sans pour autant nuire aux animaux, notamment à leurs flore intestinale bénéfique, et à la sante du consommateur. de nombreuses solutions surtout au niveau de l'alimentation ont été proposées, notamment les additifs alimentaires ayant le potentiel de stimuler la croissance, de réduire la pathogénicité et la propagation de certain microorganismes pathogènes dans les élevages tout en favorisant la préservation, et le développement des microorganismes bénéfiques du tube digestif .

Parmi ces additifs alimentaires, les phytobiotiques, molécules d'efficacités très variables, et très utilisées pour améliorer les performances de croissance des volailles élevées dans des conditions défavorables à leur croissance. Plusieurs études ont permis la mise en évidence, *in vitro*, de certaines activités biologiques, notamment l'action antibactérienne (Ceylan et Fung, 2004) et antioxydante (Wei et Shibamoto, 2007) de ces molécules. Les mécanismes d'action des phytobiotiques restent également mal connus, mais pourraient être liés à une action sur le microbiote digestif. En effet, de nombreux phytobiotiques contiennent des molécules capables d'inhiber *in vitro* la croissance des bactéries digestives, mais leur action *in vivo* a peu été étudiée (Guardia, 2011).

Cette étude est envisagée pour objectif principal d'évaluer l'effet de l'incorporation des extraits de *Abies numidica* comme additif alimentaire sur les performances zootechniques et sur la microflore caecale et fécale des poussins de chair, ainsi qu'une étude de quelques propriétés de la plante.

Le manuscrit de cette thèse est présenté comme suit:

- Etude bibliographique, rassemble des généralités et notions essentielles à la compréhension de notre travail.
- Partie Matériels et méthodes, présente le matériel et les techniques utilisées pour réaliser les expérimentations.
- Partie résultats et discussion, mentionne les résultats obtenus au cours de notre étude expérimentale.
- Conclusion qui permettra de tirer les perspectives nécessaires pour mieux approfondir dans ce travail.

# *Partie bibliographique*

## 1. Les plantes médicinales

La majorité des plantes qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Iserin, 2001). Ces principes actifs peuvent avoir les mêmes propriétés que les médicaments de synthèse.

Le terme de plantes médicinales comprend les divers types de plantes utilisées en herboristerie et certaines de ces plantes ont des activités médicinales. Les plantes médicinales demeurent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

La phytothérapie est l'utilisation des plantes pour le traitement des maladies. De nos jours, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques qui sont considérés comme la solution quasi universelle aux infections a été diminuée. Les bactéries se sont peu à peu adaptées aux médicaments et leur résistent de plus en plus (Iserin, 2001).

En phytothérapie, il y a plusieurs modes de préparation (selon l'usage que l'on veut faire) soit par l'utilisation de la plante elle-même ; en poudre, infusion, décoction, macération, soit par l'utilisation des produits d'extraction ; huiles essentielles, alcoolats, sirop, *etc.*). La qualité du recueil des plantes, leur conservation et leur préparation est essentielle si nous voulons être en mesure de juger de l'efficacité d'un traitement phytothérapeutique. De plus, il est impératif de vérifier l'absence de toxicité des plantes employées.

Les plantes médicinales ont un avenir prometteur, car il ya environ 500 000 plantes dans le monde entier, et la plupart d'entre ne sont pas encore étudiées. Leurs activités médicales pourraient être décisives dans le traitement des études actuelles ou futures (Rasool Hassan, 2012).

## 2. Les métabolites secondaires

Les plantes produisent un très grand nombre de composés organiques qui résultent des réactions chimiques ultérieures à la photosynthèse. On les nomme les métabolites secondaires, et ne sont pas par essence nécessaires, vitaux pour la cellule, et l'organisme. Ils regroupent un très grand nombre de composés, de variété structurale extraordinaire. Plusieurs dizaines de milliers sont déjà connus. Les métabolites secondaires ont des fonctions très différentes : de protection, d'attraction des pollinisateurs, et de régulation.

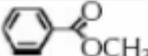
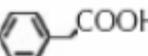
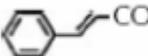
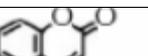
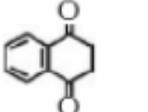
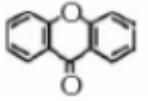
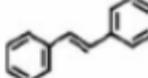
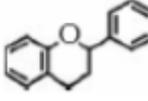
Les métabolites secondaires sont synthétisés par différentes parties de plantes, selon leurs rôles biologiques. Les principales familles de métabolites secondaires sont les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques (Crozier *et al.*, 2006).

### 2.1. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques hydrosolubles largement trouvées dans les végétaux. Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques liés à des structures complexes, de poids moléculaires importants (Bruneton, 1999; Lugasi *et al.*, 2003).

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, et appartiennent à quatre principaux groupes ( les flavones, les flavonones, les flavols, et les anthocyanines), les tannins, et les coumarines (King et Young, 1999; Tapiero *et al.*, 2002).

**Tableau 1 :** Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide p-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

### 2.1.1 Les acides phénoliques

On distingue deux types appartenant à cette classe; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique. L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café (El Gharras, 2009).

Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres (Manach *et al.*, 2004).

Les acides phénoliques présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, anti radicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants (Bruneton, 1999).

### **2.1.2. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour (Alan et Miller, 1996; Rajnerayanama *et al.*, 2001). Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets (Bruneton, 1993; Rajnerayanama *et al.*, 2001) .

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent dans la défense, comme polinisateur, et comme molécules signaux de reconnaissance entre les plantes diazotrophes (Maxwell et Phillips, 1990).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-oxydantes (Rice-Evans *et al.*, 1997; van den Berg *et al.*, 2000), antibactériens (Mori *et al.*, 1987), anti-virales (Amaral *et al.*, 1999), anti-tumorales (Shi *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005), anti-inflammatoires (Middleton et Kandaswami, 1992; Read, 1995), anti-allergiques (Nijveldt *et al.*, 2001).

### **2.1.3. Tannins**

Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Da ( Mangan, 1988; Zhu *et al.*, 1997; Khanbabae et van Ree, 2001; McSweeney *et al.*, 2001; Makkar, 2003). les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tannins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tannins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

#### **2.1.4. Les coumarines**

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Elles se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Madhavi *et al.*, 1996).

#### **2.2. Les anthocyanines**

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993). Ils sont responsables de la couleur automnale des feuilles. Les anthocyanes sont utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire et aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (Hennebelle *et al.*, 2004).

#### **2.3. Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale (Briemann *et al.* 2006). Ils se trouvent dans 15 à 30% des plantes à fleurs et sont particulièrement fréquents dans certaines familles, comme les Fabaceae, les Liliaceae, les Ranunculaceae, les Apocynaceae, les Solanaceae et les Papaveraceae. Les alcaloïdes les plus répandus sont la caféine et la berbérine (Pengelly, 2004). Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques, certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques, dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens ou agents anticancéreux.

## 2.4. Les isoprénoides (Terpénoides)

Les isoprénoides sont des composés aromatiques de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le  $\beta$  carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (Bruneton, 1999; Harborne, 1998).

## 3. Le stress oxydatif

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006), il se produit dans la cellule quand la concentration des espèces réactives excède les capacités antioxydantes de cette cellule (Roberts et Sindhu, 2009). Les cibles biologiques susceptibles aux attaques radicalaires sont : les lipides, les protéines et l'acide desoxyribonucléique (Kohen et Nyska, 2002)

### 3.1. Les radicaux libres

On définit comme radical libre, n'importe quelle molécule indépendante contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) (Christopher *et al.*, 1995). Les radicaux libres sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité.

Les radicaux libres qui proviennent de l' $O_2$  sont appelés « Les espèces réactives de l'oxygène » (ERO) alors que les radicaux libres qui sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont considérés comme une sous-classe des radicaux libres appelée « Les espèces réactives de l'azote » (ERN) (Penna *et al.*, 2009). On trouve aussi d'autres espèces qui sont réactives mais ne sont pas des radicaux libres et peuvent être des précurseurs de radicaux (Tableau 2).

**Tableau 2:** Les différents types des espèces réactives (Fontaine, 2007).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$	Peroxyde organique	$ROOH$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$	Acide hypochlorique	$HOCl$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$	Oxygène singulet	$O_2$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$	Peroxynitrite	$ONOO^-$

### 3.2. Les types d'antioxydants

Les antioxydants ce sont de deux types, l'un endogène et l'autre naturel:

- Les antioxydants endogènes sont issus d'un système de défense primaire (composé d'enzyme et de substances antioxydantes, d'une part comme exemple :

- La superoxyde distumase (SOD): diminue la durée de vie de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  .
- La catalase: transforme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en simple molécule d'eau.
- La glutathion peroxydase (GPx): détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
- Les molécules piègeurs: la glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone, *etc.*

D'autre part, un système de défense secondaire, comme exemple: Composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonucléase et ligase et des macroxyprotéinases.

- Les antioxydants naturels sont plusieurs et variés à savoir: la vitamine E, les caroténoïdes; la vitamine C, l'acide  $\alpha$ -lipoïque, des flavonols (catéchine, flavan-3-ols) et certaines huiles volatiles (Sari, 2011).

### 3.3. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreux désordres et maladies, notamment l'athérosclérose ( Ko *et al.*, 1998; Harrisson *et al.*, 2003), la cancérogenèse (Hussain *et al.*, 2003; Klaunig et Kamendulis, 2004), la maladie d'Alzheimer, de Parkinson (Sorg, 2004), le diabète sucré (Pal Yu, 1994). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Martínez-Cayuela, 1995; Valko *et al.*, 2007).

Malgré que le concept du stress oxydant ne date que de quelques dizaines d'années, plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées d'une importante propriétés anti-oxydantes. Ceci vient du fait que le stress oxydant est impliqué dans un grand nombre de maladies humaines, et que l'idée derrière l'utilisation de plusieurs recettes traditionnelles est non pas pour le traitement des maladies, mais pour leur prévention, et pour ralentir le processus du vieillissement (Scartezzini et Speroni, 2000).

## 4. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë englobe tous les phénomènes spécifiques et les signes adverses, qui se manifestent juste après l'exposition de l'organisme à une prise unique ou plusieurs prises très rapprochées d'un agent chimique. L'effet toxique aigu est généralement considéré comme un effet qui se produit immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition (LeBlanc, 2010).

### 4.1. Les organes cibles

#### 4.1.1. Le foie

Le foie est un organe très important, aussi bien par sa taille que par le rôle qu'il assure. Il joue un rôle est très important dans le maintien d'un état de santé optimal. Il assure la transformation et l'élimination de substances toxiques circulantes dans le sang. Au delà de son rôle de détoxification, il assure en effet bien d'autres fonctions telles que la mise en réserve des glucides sous forme de glycogène, la synthèse des enzymes, et la participation au métabolisme de graisses (Lapointe, 2004). Les marqueurs enzymatiques du foie sont :

- **Les enzymes non spécifiques** : Aspartate aminotransférase (AST), lactate déshydrogénase (LDH), isocitrate déshydrogénase (ICD), phosphatase alcaline (PAL).

- **Enzymes spécifique** : Alanine aminotransférase (ALT), Sorbitol déshydrogénase (SDH), Glutamate déshydrogénase (GDH), Arginase (ARG), Gamma-glutamyltransferase (GGT) (Limdi et Hyde, 2003).

#### 4.1.2. Les reins

Les reins sont des organes vitaux responsables de la sécrétion de l'urine. Ils jouent un rôle important dans l'élimination des déchets qui proviennent du fonctionnement de l'organisme, et contribuent à débarrasser le sang de certaines substances toxiques, et maintiennent l'équilibre des liquides du corps (Lapointe, 2004). Les marqueurs biochimiques de la fonction rénale sont:

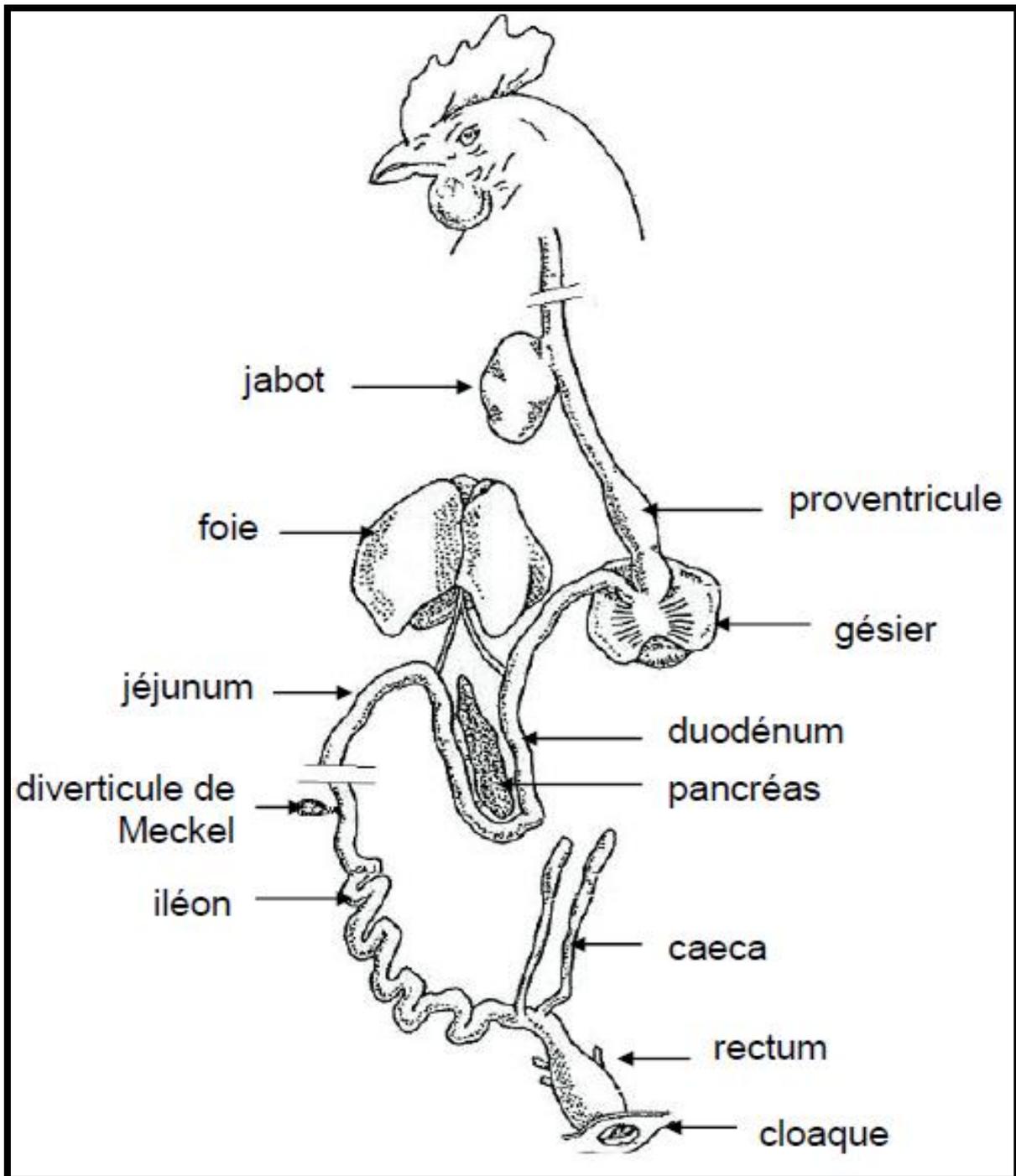
- **La créatinine** : La mesure de la créatinine dans le sang permet d'évaluer la capacité d'excrétion des reins de façon plus spécifique que l'urée. La créatinine provient du catabolisme normal de la créatine contenu dans le tissu musculaire (Pagana et Pagana, 2007). Elle est strictement éliminée par les reins. Son dosage est employé pour l'évaluation de la fonction rénale et plus particulièrement pour l'estimation du débit de filtration glomérulaire (Marchall et Bangert, 2004).
- **L'urée** : est la forme principale d'élimination de l'azote. Elle est produite par le foie lors du catabolisme des acides aminés (Pagana et Pagana, 2007) et est ensuite excrétée par les reins. L'urée est l'un des premiers marqueurs qui a été utilisé pour mesurer le débit de filtration glomérulaire (Frank *et al.*, 1992). L'augmentation du taux de l'urée dans le sang révèle indirectement un dysfonctionnement rénal (Pagana et Pagana, 2007).
- **Les hormones parathyroïdiennes et calcitonine**: Ces hormones jouent un rôle dans la régulation du métabolisme phospho-calcique (Tarloff et Lawrence, 2004).

#### 4.2. La toxicité des plantes médicinales

Les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques (Trevoux *et al.*, 2000; Saad *et al.*, 2006).

## 5. Anatomie et rôle de l'appareil digestif de poulet

L'appareil digestif des oiseaux se décompose en plusieurs segments : le bec, l'œsophage, le jabot, les estomacs sécrétoire et musculaire et l'intestin qui débouche dans le cloaque (Villate, 2001). Il comprend aussi deux glandes annexes: le foie et le pancréas. L'anatomie du tractus digestif du poulet est illustrée par la figure 1.



**Figure 1:** Appareil digestif du poulet (Gadoud *et al.*, 1992)

➤ **Du bec au jabot**

Le bec des poules est fort et conique, il est composé de deux parties : dorsalement la maxille ou mandibule supérieure ; ventralement les mandibules ou mandibule inférieure. Il permet la préhension des aliments (Alamargot, 1982). Les glandes salivaires présentes dans la cavité buccale sont groupées en massifs éparpillés. Chaque glande possède plusieurs fins canaux excréteurs. Elles secrètent la salive qui possède une amylase mais son rôle essentiel est de lubrifier et de ramollir les aliments (Alamargot, 1982). La langue de la poule à une forme triangulaire, elle est limitée en arrière par des papilles filiformes cornées et possède à son apex un pinceau de soies tactiles. Elle est recouverte d'un épithélium corné qui lui donne une apparence dure. Ses muscles intrinsèques rudimentaires lui confèrent une souplesse très réduite (Alamargot, 1982). La mobilité de la langue lui permet de diriger l'aliment vers l'œsophage sans mastication préalable (Denbow, 1999).

L'œsophage est un organe tubuliforme tapissé dans toute sa longueur d'une muqueuse aux plis longitudinaux très marqués. Il possède une musculature longitudinale interne très développée et très dilatable. Il assure le transport des aliments de la cavité buccale à l'estomac. (Alamargot, 1982). Le jabot est un élargissement de l'œsophage en forme de poche situé à la base du cou, au ras de l'entrée de la poitrine. Il se présente chez la poule sous la forme d'un sac ventral très extensible qui adhère dans sa partie ventrale à la peau et aux muscles sous-cutanés du cou et dans sa partie caudo-dorsale aux muscles pectoraux droits. la paroi du jabot est très mince et a une musculature peu développée mais riche en fibres élastiques (Alamargot, 1982). L'aliment stocké dans le jabot des oiseaux se ramollit sous l'action du mucus et de l'eau ingérée (Hodges, 1974).

➤ **Le proventricule et le gésier**

Le proventricule est appelé aussi l'estomac glandulaire du poulet. La muqueuse du proventricule contient en effet une abondance de glandes de deux types principaux :

- les glandes tubulaires qui secrètent le mucus.
- les glandes gastriques avec leurs cellules oxynticopeptiques qui secrètent de l'HCl et la pepsine (Klasing, 1998).

Le proventricule est séparé du gésier par un isthme appelé la zone intermédiaire gastrique (Denbow, 1999).

Le gésier est l'estomac musculaire des poulets. Sa paroi est musculaire, cornée vers l'intérieur et couvert par une lame épaisse et rugueuse. Il joue un rôle très important :

- La musculature développée de gésier permet la réduction mécanique de la taille des particules alimentaires.
- Il permet également à l'HCl et à la pepsine mélangée à l'aliment lors du passage dans le proventricule, d'exercer leurs effets protéolytiques.

la zone pylorique qui le sépare du duodénum ne permet pas le passage des particules alimentaires (supérieure à environ 1 mm) vers l'intestin grêle (Denbow, 1999).

### ➤ **Intestin grêle et ses glandes annexes**

L'intestin grêle des poulets est divisé en trois segments: Le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

Le duodénum est la portion de l'intestin qui fait suite à l'estomac. Il débute au pylore puis forme une grande anse qui enserre le pancréas. Cette anse est la partie la plus ventrale de l'intestin dans la cavité abdominale. Elle contourne caudalement le gésier et dorsalement elle est en rapport avec les caecums. Le duodénum reçoit deux ou trois canaux pancréatiques et deux canaux biliaires au niveau d'une même papille. L'emplacement de cette papille marque la fin du duodénum et le début de l'iléon (Villate, 2001).

Le jéjunum est divisé en deux parties ; l'une proximale qui est la plus importante : tractus du Meckel. Petit nodule, est parfois visible sur le bord concave de ses courbures et l'autre distale qui s'appelle l'anse supraduodénale (Villate, 2001).

L'iléon est défini comme étant la partie allant de diverticule de Meckel à la jonction iléo-caecale (Klasing, 1998). Il est court et rectiligne. La majeure partie de la digestion chimique et l'absorption des aliments se déroule au niveau de cette partie (Alamargot, 1982).

Généralement la muqueuse intestinale est constituée de trois feuilles : une couche interne glandulaire, une couche intermédiaire contient les vaisseaux sanguins et les nerfs, et une couche externe constituée de muscles lisses responsable de la motricité intestinale. Le suc intestinal renferme du mucus, des enzymes et des électrolytes. Les constituants du suc intestinal sont d'origine pancréatique et biliaire à l'exception du mucus qui est sécrété dans le tube digestif (Larbier et Leclerc, 1992).

L'intestin des poulets possède également deux glandes annexes :

- ***Le pancréas***

Le pancréas est compacte, blanche ou rouge, enserrée dans l'anse duodénale. Il est issu de trois ébauches séparées qui se constituent en lobe ventral et lobe dorsal. Le pancréas possède une fonction amphicrine (Alamargot, 1982). Il sécrète des hormones et des enzymes impliqués dans la digestion (Denbow, 1999).

- ***Le foie***

Le foie est la glande la plus massive de tous les viscères (33 g environ chez la poule). Il est constitué de deux lobes réunis par un isthme transversal qui renferme partiellement la veine cave caudale. Le lobe droit est plus développé que le lobe gauche. Les deux lobes déversent la bile, par deux conduits séparés. Le canal du lobe gauche (canal hépatique gauche) s'abouche directement dans l'intestin. Le canal du lobe droit (canal hépatique droit) se renfle d'abord en vésicule biliaire avant de se jeter dans le duodénum (Alamargot, 1982). Il joue un rôle de détoxification et peut modifier certaines nutriments et molécules (Klasing, 1998).

- **Les cæcums**

Le caecum se présente comme un sac qui débouche dans le tube intestinal à la jonction de l'iléon et du rectum au niveau d'une valvule iléocæcale. Lorsqu'ils existent, ils sont toujours pairs, ils sont accolés à la partie terminale de l'iléon par un méso. Ils sont en rapport ventralement avec l'anse duodénale et dorsalement avec la portion moyenne de l'iléon. Bien développés chez la poule (Villate, 2001). Les deux caecums possèdent une zone proximale étroite avec un épithélium lisse et une zone terminale plus large, siège d'une importante fermentation bactérienne à ce niveau il y a aussi une absorption considérable d'eau et de sels minéraux (Delteil, 2012).

➤ **Le rectum**

Le rectum fait suite à l'iléon et débouche dans le cloaque et son diamètre est plus grand que celui de l'iléon. Le rectum des oiseaux présente des villosités. Il réabsorbe l'eau de son contenu (fèces et urines), ces fonctions lui ont valu parfois le nom de colorectum (Alamargot, 1982).

➤ **Le cloaque**

Le cloaque est composé de trois chambres, en allant de la partie antérieure vers la partie postérieure, le coprodeum, l'urodeum et le proctodeum. Ces compartiments ont un rôle important dans la réabsorption d'eau (Denbow, 1999).

## **6. La microflore digestive des volailles**

Selon la définition d'Isolauri et ses collaborateurs (2001), le microbiote intestinal normal est un consortium complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et qui remplissent un rôle dans la nutrition, la physiologie et le fonctionnement du système immunitaire de l'hôte. La composition de ce microbiote intestinal est en équilibre relativement stable dans le tube digestif.

La composition de la microflore des volailles varie en fonction de plusieurs facteurs tels que l'âge, l'environnement, et le type d'aliment. Elle entraîne des changements de la structure et du fonctionnement du tube digestif, ainsi que dans la digestion des aliments. La flore indigène a des conséquences sur la santé de l'animal du fait de la production de différents métabolites (Fuller, 1989).

La microflore bactérienne digestive peut être divisée en trois groupes distincts (Larbier et Leclercq, 1992; Villate, 2001; Lu *et al.*, 2003; Gabriel *et al.*, 2005)

- une flore dominante (plus de  $10^7$  germes/g) composée d'espèces anaérobies strictes et spécifique de l'espèce aviaire : lactobacilles, entérobactéries.
- une flore sous dominante ( $10^5$  à  $10^7$  germes/g) composée de streptocoques et d'entérobactéries moins spécifique de l'espèce.
- une flore transitoire (moins de  $10^5$  germes/g) sont aussi souvent anaérobies strictes.

### 6.1. Répartition de la flore intestinale du poulet

Chez le poulet, la flore intestinale varie d'un segment à l'autre. Généralement, le jabot et les caeca sont les deux segments importants d'activité bactérienne. La flore du jabot à l'iléon terminal est composée principalement d'anaérobies facultatives cependant les caeca contiennent en plus des anaérobies strictes, qui sont les plus dominants (Fuller, 1984; Schrezenmeir et DeVrese, 2001; Lan *et al.*, 2002).

**Tableau 3:** Nombre de bactéries viables (log 10 / g de contenu) des groupes majoritaires dans le tube digestif du poulet (Smith, 1965).

	Jabot	Gésier	Duodénum	Iléon	Caeca
Lactobacilles	8.7	7.3	8.0	8.6	8.7
Entérocoques	4.0	3.7	4.0	4.2	6.7
Coliformes	1.7	-	2.0	2.7	5.6
Levures	2.7	-	1.7	-	2.0
Clostridies	-	-	(-)	(-)	9.0
Anaérobies obligatoire non sporulant	-	-	-	-	10.0
Streptocoques anaérobies	-	-	-	-	10.0

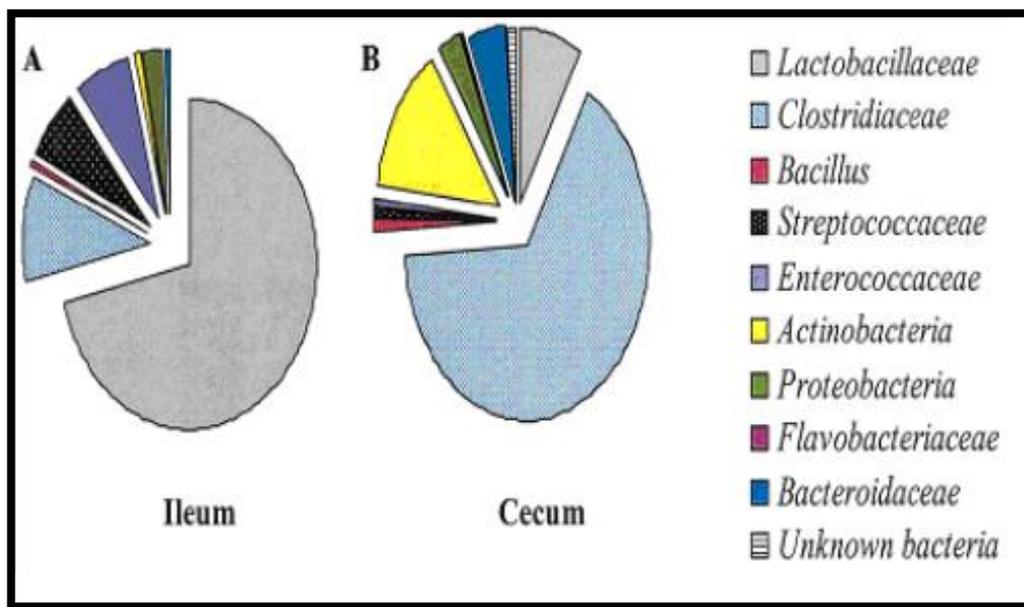
- : log<1 ; (-) : pas toujours présent

Au niveau du jabot, la présence des grandes quantités d'acide lactique et d'acide acétique produits par les *Lactobacillus*, qui représentent la flore dominante dans cette partie de tractus intestinal, rend le pH acide. Cette acidité empêche le développement des bactéries non acidotolérantes. La présence d'*E. coli* est due à l'ingestion des fèces (Gournier-Château *et al.*, 1994).

La présence des enzymes et des composés antimicrobiens tels que les sels biliaires en forte concentration dans le duodénum minimise le développement bactérien. Dans ce segment, on trouve des lactobacilles, des souches d'*Enterococcus hirae* et des *Clostridium perfringens* (Gournier-Château *et al.*, 1994).

La flore bactérienne de l'iléum se compose principalement par les aéro-anaérobies facultatives: les coliformes, les entérocoques et les lactobacilles. L'étude réalisée par Lu et ses collaborateurs (2003) sur la diversité de la microflore iléale des poulets de chair révèle que les lactobacilles représentent 70% de la flore et les Clostridiaceae représentent 11%.

Le caecum est une importante zone d'activités microbiennes dans le tractus gastro-intestinal de poulets (Erener *et al.*, 2010). Il contient une population stable de nombreuses espèces bactériennes (Barnes, 1982; Fuller, 1989). La famille des Clostridiaceae au niveau de caecum était majoritaire et représente 65% de la population caecale, suivie par *Fusobacterium* (14%), les lactobacilles (8%) et les bacteroides (5%) (Figure 2) (Lu *et al.*, 2003).



**Figure 2:** Composition de la flore bactérienne iléale et caecale chez les poulets de chair.

A: Flore iléale ; B: Flore caecale (Lu *et al.*, 2003).

## 6.2. Mode de colonisation

La colonisation du tube digestif par les *Enterococcus* et les entérobactéries débute dans le caecum, puis ils vont se propager dans la totalité du tractus digestif vingt-quatre heures après la naissance. Au cours des trois jours suivants, leur nombre diminue progressivement (sauf dans le caecum) au profit des *Lactobacillus* qui deviennent largement majoritaires. L'installation de la flore du tractus digestif prend deux semaines, toutefois, pour que la flore caecale s'installe et se stabilise, il faut au moins quatre à six semaines (Gournier-Château *et al.*, 1994).

### 6.3. Effet du microbiote intestinal

- **Sur les microorganismes néfastes**

La flore autochtone empêche l'implantation de la flore pathogène "effet barrière". Ainsi, les lactobacilles excluent les coliformes chez les animaux gnotobiotique (Fuller, 1977). Cependant, cet effet est moins important chez les poulets conventionnels (Watkins et Kratzer, 1983).

- **Sur le système immunitaire**

La microflore permet le développement et la maturation du système immunitaire intestinal. Cette microflore interagit avec les cellules épithéliales pour le maintien de la santé de l'hôte (Gérard et Bernalier-Donadille, 2007).

- **Sur les performances de croissance**

Le microbiote digestif a généralement un impact négatif sur les performances de croissance des animaux en augmentant l'indice de consommation. Ainsi, les animaux conventionnels présentent une croissance moindre que les animaux axéniques, tout en ayant une consommation similaire (Furuse et Okumura, 1994). Cet effet est peut être dû à la présence de certains microorganismes dans le caecum.

- **Sur la qualité des produits animaux**

Plusieurs effets peuvent être observés sur la qualité bactériologique, la qualité organoleptique et la composition de la viande et de l'œuf. La modification de la flore intestinale au moyen d'alimentation entraîne une modification de la saveur de la viande (Mead *et al.*, 1983). Il a été établi aussi que la viande des poulets conventionnels a une saveur poulet forte que celle des poulets axénique (Harris *et al.*, 1968). De plus, au moment de l'abattage, la contamination de la carcasse par les bactéries intestinale peuvent avoir un effet négatif sur la qualité sanitaire des produits avicoles.

Le changement de la microflore intestinale par les probiotiques ou les antibiotiques peut aussi modifier l'aspect de l'œuf (Mohan *et al.*, 1995), en résultant la réduction de la teneur en cholestérol, et le changement de la couleur du jaune d'œuf (Angelovicova, 1996). Ainsi, certains probiotiques peuvent augmenter l'épaisseur de la coquille, sa teneur en

calcium et sa résistance ( Tortuero et Fernandez, 1995; Angelovicova, 1996; Panda *et al.*, 2000).

- **Sur la valeur nutritionnelle de l'aliment**

La microflore intestinale a la capacité de convertir une grande variété de substrats (glucides, protéines et lipides) en substances nutritives. Ces substances génèrent une diversité d'effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, sur la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon (Gérard et Bernalier-Donadille, 2007) et sur le développement d'une barrière microbiologique contre la colonisation des microorganismes pathogènes.

## **7. Les antibiotiques en médecine vétérinaire**

Depuis des années, les antibiotiques sont utilisés pour traiter les maladies infectieuses des animaux car ils ont la capacité de détruire ou empêcher la multiplication des bactéries. Cependant, certaines bactéries sont capables d'échapper à l'action de ces antibiotiques, ce phénomène est appelé l'antibiorésistance. De ce fait, plusieurs mesures ont été prises à différents niveaux pour réduire l'utilisation des antibiotiques, et leur consommation totale en médecine vétérinaire a baissé considérablement.

### **7.1. Utilisation des antibiotiques chez les animaux d'élevage**

En élevage, les antibiotiques sont utilisés selon deux grands usages: thérapeutique ou zootechnique.

En usage thérapeutique, l'administration d'antibiotiques a deux buts : un but curatif visant à l'éradication d'une infection avérée et un but prophylactique pour la prévention de possibles infections particulièrement à l'occasion de vaccinations ou de périodes de stress comme les transports.

En usage zootechnique, les antibiotiques sont administrés à doses sous-thérapeutiques dans les élevages en entraînant une meilleure assimilation des aliments par les animaux (Sanders, 2005). Ils sont alors définis comme additifs alimentaires dans la classe des promoteurs ou facteurs de croissance.

Les principales familles d'antibiotiques utilisées en aviculture sont mentionnées dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Principaux antibiotiques utilisés en aviculture (Mogenet et Fedida, 2011).

Famille	Exemples
Beta-lactamines	Aminopénicillines : Ampicilline et Amoxicilline
	Céphalosporine : Ceftiofur
Aminosides et apparentés	Dihydrostreptomycine, Gentamicine, Néomycine, Spectinomycine, Framycétine
Quinolones	Acide oxolinique, Fluméquine, Enrofloxacin, <i>etc.</i>
Tétracyclines	Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline
Polypeptides	Colistine (polymyxine E)
Macrolides et apparentés	Erythromycine, Josamycine, Lincomycine, Spiramycine, Tylosine, Tilmicosine Tiamuline (pleuromutiline)
Sulfamides	Sulfadiazine, Sulfadimidine, Sulfadiméthoxine, Sulfaquinoxaline
Diaminopyrimidines	Triméthoprime

## 7. 2. Impact de l'antibiothérapie vétérinaire sur la santé humaine

### 7. 2.1. Résidus de traitement et flore intestinale humaine

Des résidus d'antibiotiques sont parfois retrouvés dans les produits animaux après leur traitement par des antibiotiques destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies, l'éleveur n'observe pas le temps d'attente prescrit par la législation. Chez certains animaux il est possible de retrouver des résidus d'antibiotiques même après le temps d'attente officiel mais ce risque est très faible (Kesteman, 2009).

Les résidus d'antibiotiques présents dans les aliments d'origine animale représentent plusieurs risques sur la santé humaine. En plus des effets toxiques, d'autres effets d'ordres allergiques sont aussi notés (Dewdney *et al.*, 1991; Boisseau, 1993). Ces résidus peuvent notamment perturber la flore intestinale humaine. En effet, même à très faibles doses les antibiotiques ingérés ont un impact sur l'écologie de la flore intestinale *in vitro* (Carman et

Woodburn, 2001) et *in vivo* (Corpet *et al.*, 1989; Perrin-Guyomard *et al.*, 2001; Perrin-Guyomard *et al.*, 2006).

### **7.2.2. Diffusion des bactéries résistantes entre l'animal et l'homme**

Les agents antimicrobiens couramment utilisés pour traiter ou prévenir des infections bactériennes chez les animaux appartiennent essentiellement aux mêmes classes de composés que ceux utilisés en médecine humaine. De plus, les bactéries isolées chez les animaux et celles isolées chez l'homme, que ce soit lors d'une infection ou en situation de colonisation, partagent les mêmes mécanismes de résistance. Cela est un argument extrêmement solide de l'absence d'étanchéité entre le monde animal et les populations humaines (Kesteman, 2009).

## **8. Les phytobiotiques**

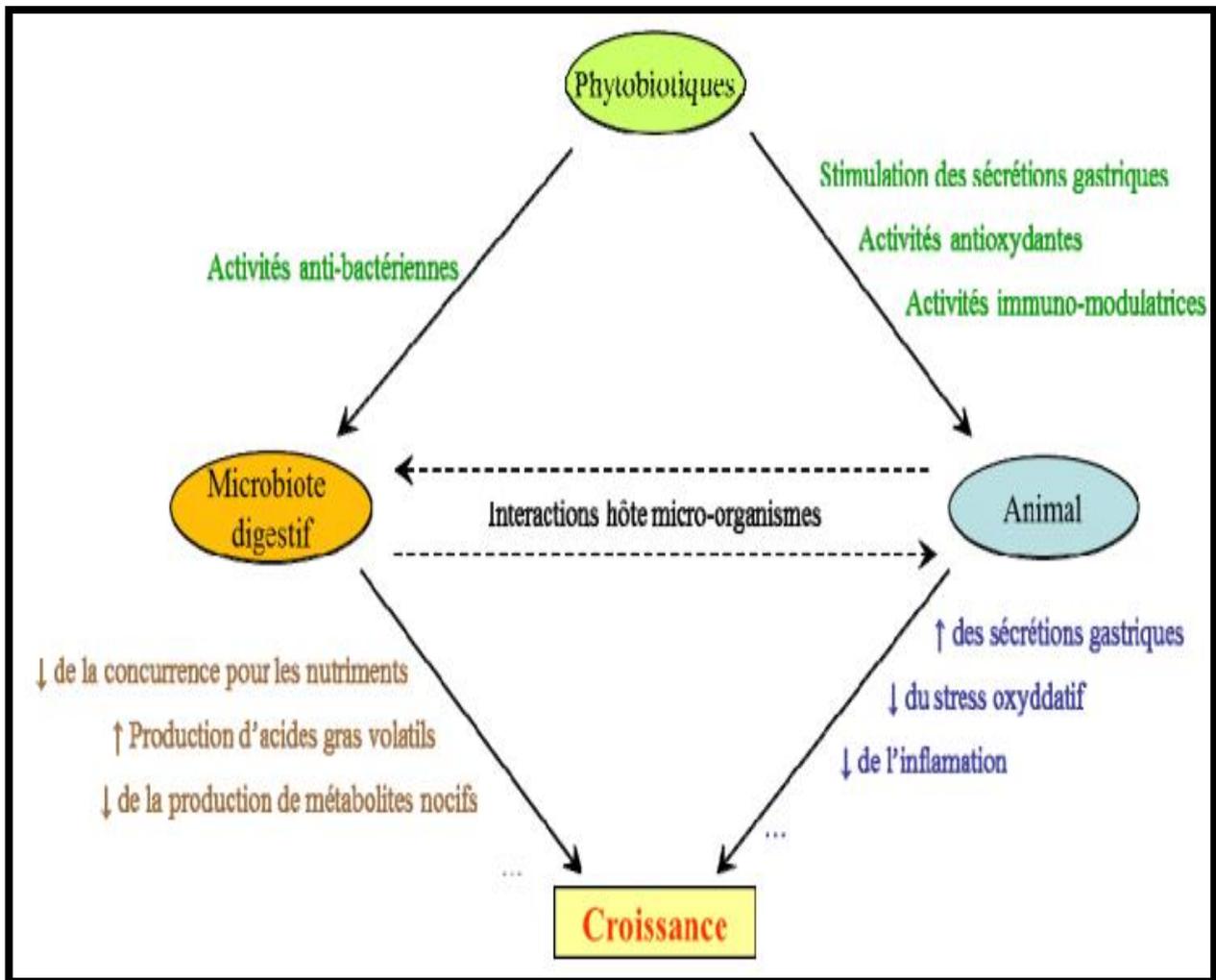
Généralement, les phytobiotiques regroupent les herbes, les épices, ainsi que les huiles essentielles et les oléorésines, correspondant respectivement aux extraits aqueux et non-aqueux, de composés volatils odorants (Windisch *et al.*, 2008). La plupart des molécules bioactives de ces produits végétaux leur confèrent un goût ou une odeur prononcée. Elles font partie du grand groupe des métabolites secondaires des plantes (Bakkali *et al.*, 2008; Schwab *et al.*, 2008).

### **8.1. Utilisation dans l'alimentation des volailles et effet sur l'animal et ses produits**

Les phytobiotiques sont généralement incorporés dans l'aliment, ou dans l'eau de boisson des volailles. Ils sont couramment employés pour améliorer les performances de croissance, et la qualité de la viande chez le poulet de chair, ainsi que la qualité des œufs chez la poule pondeuse (Windisch *et al.*, 2008; Brenes et Roura, 2010).

#### **8.1.1. Effet sur les performances de croissance**

Des études sur l'effet de phytobiotiques dans l'amélioration des performances zootechniques ont montré des résultats prometteurs, pour les paramètres de production des poulets, dont l'alimentation a été complétée par une mixture d'origan, de laurier, de sauge, d'anis, et d'huiles essentielles d'agrumes (24 mg/kg) (Cabuk *et al.*, 2006). Une mixture d'huiles essentielles a significativement amélioré l'indice de conversion chez les poulets de chair (Alloui, 2011). Les phytobiotiques peuvent agir directement ou indirectement sur la croissance des animaux (Figure 3).



**Figure 3:** Schéma récapitulatif des modes d'action des phytobiotiques sur la croissance du poulet (Guardia, 2011).

Les activités directes des phytobiotiques sur l'animal ou son microbiote sont décrites en vert et représentées par des flèches pleines. Leurs activités indirectes sont représentées par des flèches discontinues. Les mécanismes d'action expliquant directement l'amélioration de croissance des animaux sont décrits en marron, s'ils sont liés au microbiote, et en bleu s'ils sont liés à la physiologie de l'animal et sont représentés par des flèches pleines. Les mécanismes indirects sont représentés par des flèches discontinues.

### **8.1.2. Effet sur la qualité de la viande**

Concernant l'amélioration des caractéristiques de la viande par les phytobiotiques, ceux-ci sont susceptibles d'intervenir sur les caractéristiques des carcasses (état d'engraissement, développement des muscles), la susceptibilité de la viande à s'oxyder durant sa conservation et ses caractéristiques organoleptiques ainsi que sur la qualité bactériologique de la viande (Guardia, 2011).

### **8.1.3. Effet sur la production et la qualité des œufs**

Certaines huiles essentielles comme les huiles essentielles de thym, d'origan et de curcuma permettent d'augmenter la production d'œuf de poule et le poids des œufs. Elles peuvent également améliorer leur statut oxydant durant des conservations de plus de 15j (Radwan *et al.*, 2008).

Les extraits de plantes peuvent également être utilisés comme source naturelle de caroténoïdes (Karadas *et al.*, 2006) pour la pigmentation des œufs.

## **8.2. Mécanismes d'action sur le statut oxydant**

Les propriétés antioxydantes de plusieurs des composés phytobiotiques peuvent contribuer à la protection des lipides alimentaires de l'oxydation. Cependant cet aspect n'a pas été bien identifié dans l'alimentation des volailles, mais l'utilisation des plantes labiées comme antioxydants dans l'alimentation humaine comme dans l'alimentation des animaux de compagnie s'avère très positive (Cuppett et Hall, 1998). Ces substances évitent surtout l'oxydation des lipides, qui peut entraîner la détérioration des aliments (rancissement). L'utilisation d'extraits de plantes comme antioxydant n'est pas importante seulement pour la santé des animaux, mais aussi pour la stabilité oxydative de leurs produits (Alloui, 2011).

## 9. *Abies numidica*

*Abies numidica* est un arbre appartenant à la famille des Pinaceae et endémique uniquement d'Algérie.

### 9.1. Nomenclature

*Abies numidica* : vient du grec *Abies* est l'arbre du sapin et *numidica* est l'ancien nom de l'Algérie.

- **Nom latin:** *Abies numidica* De Lannoy ex Carrière, *A. baborensis*, *A. pinsapo* Boiss. var. *baborensis* Coss.
- **Nom français:** Le sapin de Numidie, sapin d'Algérie, sapin de Kabylie, sapin des Babors.
- **Nom anglais:** The fir of Numidia, the fir of Algeria.

### 9.2. Description botanique

*Abies numidica* est un arbre pouvant atteindre 25m de hauteur, son écorce est grise et lisse dans le jeune âge puis rhytidome brunâtre et divisée en écailles irrégulières. Rameau vert olive ou brun, faiblement sillonné presque glabre, aiguilles des rameaux stériles droites de 15 à 25mm de longueur et épaisses. Aiguilles des rameaux fertiles disposées en brosse, relevées et épaisses (Figure 4). Bourgeons ovoïdes pointus d'un brun rouge résineux à la base (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013).

La floraison a lieu en avril. Les fleurs mâles ont leurs boutons floraux de couleur rouge et deviennent jaune quand elles s'épanouissent. Les fleurs femelles sont vertes et donnent naissance à des cônes de 15cm de long par 3 à 4 cm de diamètre, cylindriques, de couleur brun gris à maturité. Ils contiennent des graines ailées de 2 à 3 cm de long (graine plus aile) (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013).



**Figure 4:** Photographies de *Abies numidica*; **A)** Les aiguilles de *Abies numidica*, **B)** Les rameaux de *Abies numidica*.

### 9.3. Position systématique

**Tableau 5:** Classification scientifique de *Abies numidica* (Quezel et Santa, 1963)

Classification	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Coniferophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Genre	<i>Abies</i>
Espèce	<i>Abies numidica</i>

### 9.4. Ecologie et répartition géographique

Le sapin de Numidie "*Abies numidica*" est une espèce de conifère endémique uniquement en Algérie, où il couvre seulement une superficie de 300 ha (Quezel, 1956). Il a une aire de répartition restreinte dans le massif des Babors, en Kabylie orientale entre 1300 et 2000m d'altitude dans l'étage montagnard humide et en mélange avec le chêne zeen (Bennadja et Tlili Ait Kaki, 2012).

Cet arbre se trouve dans les forêts mixtes des montagnes humides. Le climat est particulièrement humide et froid, avec des précipitations annuelles de 2500 mm, dont la grande partie tombe sous forme de neige pendant l'hiver. Les étés sont secs et le climat est typiquement méditerranéen avec une température moyenne de 18 °C et pendant l'hiver la température minimale est de -1 °C, avec des gelées extrêmes entre -8 à -10 °C (Ramdani *et al.*, 2014).

Le Sapin de Numidie a été essayé en dehors de son aire naturelle au niveau de certains arboretums dans la zone tellienne et semble avoir donné des résultats intéressants. Par exemples, dans l'arboretum de Djebel Ouahch, l'accroissement moyen annuel est de 5.28 m<sup>3</sup>/ha/an (Hadjadj, 1986). De même, la plantation de cette espèce d'arbre dans la région montagneuse de Seraidi (Annaba) a été réussie (Figure 5).



**Figure 5:** La plantation du sapin de Numidie à Seraidi (Bennadja et Tlili Ait Kaki, 2012)

### **9.5. Usage traditionnel et travaux scientifiques réalisés sur *Abies numidica***

Dans la médecine traditionnelle on retrouve la gomme de sapin, qui est l'un des remèdes essentiels de la médecine populaire, employée comme antiscorbutique, comme antiseptique dans les blessures et en cataplasmes sur les brûlures. En outre, cette plante est utilisée pour le traitement des voies respiratoires (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2013).

Ainsi, des études récentes montrent que l'huile essentielle des aiguilles du sapin de Numidie possède un effet antimicrobien (Tlili-Ait Kaki *et al.*, 2012; Ramdani *et al.*, 2014).

# *Matériel et méthodes*

## 1. Matériel

### ➤ Milieux de culture et réactifs chimiques

Les milieux de culture et les produits chimiques utilisés dans la présente étude proviennent de chez Sigma, Fluka, Conda et Prolabo.

### ➤ Souches microbiennes

Afin de tester l'activité antimicrobienne des extraits *in vitro*, douze bactéries, trois champignons et une levure ont été sélectionnés.

- **Bactéries** : Les souches bactériennes à Gram négatif sont : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Vibrio cholerae* ATCC 14035 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. Les souches bactériennes à Gram positif sont : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria innocua* CLMA 3030.
- **Champignons** : *Aspergillus niger* 2CA936, *Aspergillus flavus* NRRL3357 et *Fusarium oxysporum* CLMA.
- **Levure** : *Candida albicans* ATCC1024.

### ➤ Matériel végétal

La récolte des aiguilles de *Abies numidica* a été réalisée en novembre 2013 à Sétif. L'identification a été faite par Pr. Oudjih Bachir, Département des sciences agronomiques, Université Elhadj Lakhdar, Batna. Les aiguilles de la plante ont été séchées à l'abri de la lumière du soleil durant deux semaines. Le matériel végétal séché a été réduit en poudre puis soumis à l'extraction.

## **2. Méthodes**

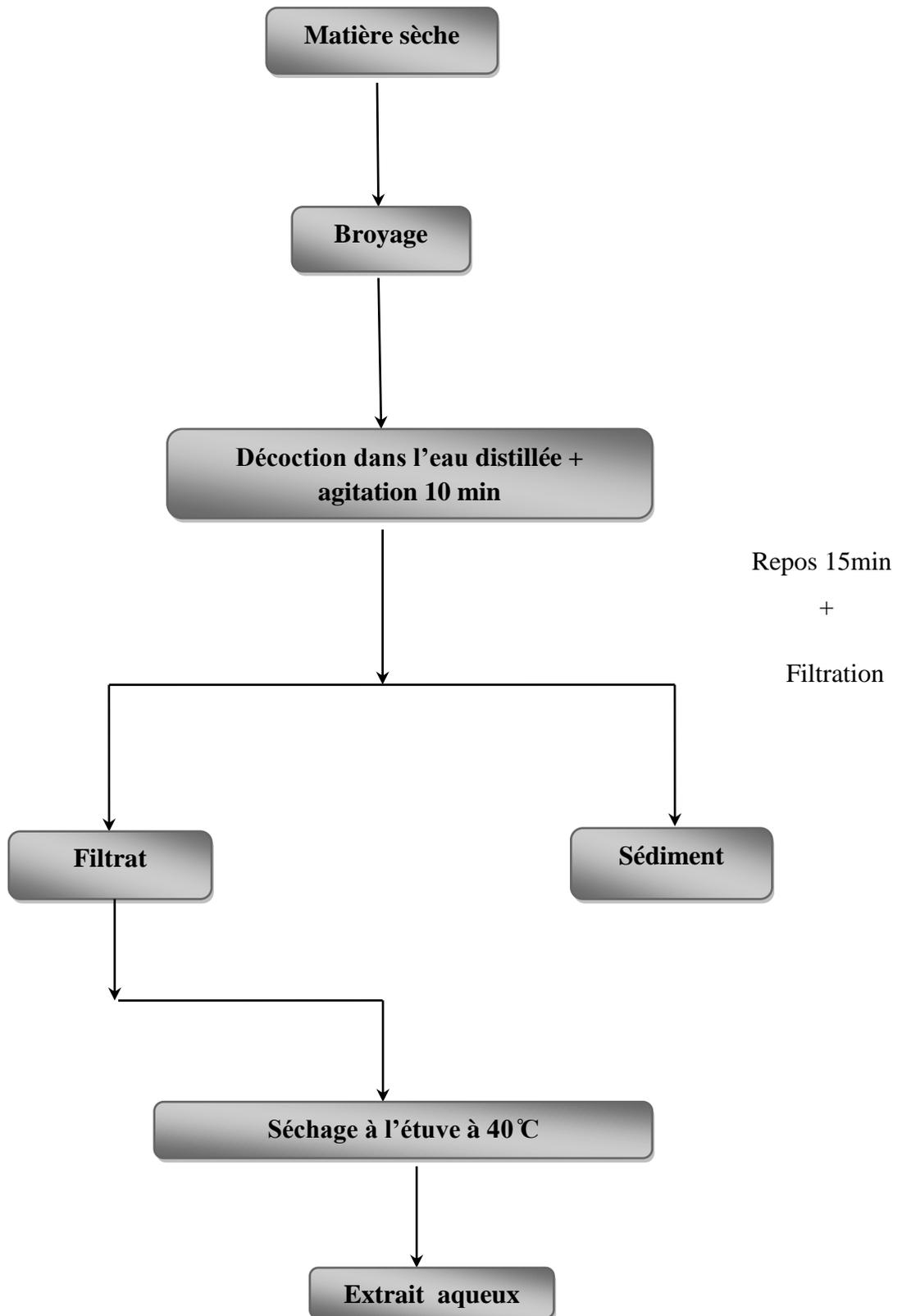
### **2.1. Extraction**

#### **2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux**

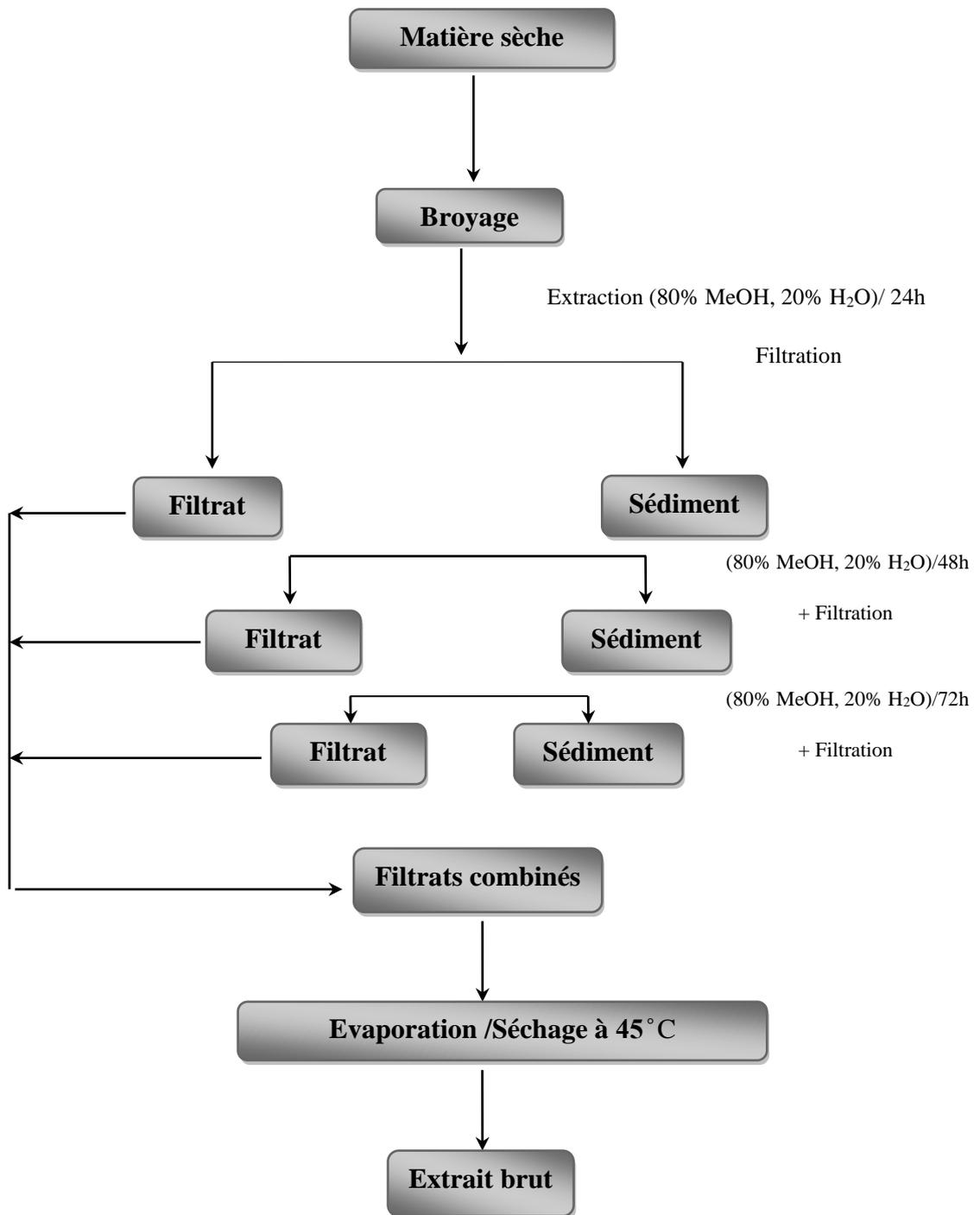
L'extrait aqueux de *A. numidica* a été obtenu par décoction de 20 g de broyat des aiguilles de la plante dans 500 mL d'eau distillée pendant 10 min sous agitation magnétique. La solution est laissée reposer sur la plaque chauffante pendant 15 minutes, le mélange est d'abord filtré sur compresses stériles et ensuite sur papier Whatman. Des aliquotes du filtrat sont séchées dans l'étuve à 40 °C (Figure 6). L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Belhattab *et al.*, 2004; Ben Ammar *et al.*, 2007).

#### **2.1.2. Préparation de l'extrait brut**

L'extrait brut (EBr) a été préparé par macération de 100g de broyat des aiguilles de *A. numidica* dans 1 litre de mélange méthanol et eau distillée (80%/20%) à l'ombre pendant 24 heures. Le filtrat a été récupéré par filtration, puis il a été conservé à l'ombre. Une deuxième et une troisième macération ont été réalisées en respectant les mêmes étapes que la première macération pendant 48 h et 72h, respectivement. Les filtrats recombinaés sont évaporés à 35 °C puis ils ont été mis à sécher dans l'étuve à 45°C (Figure 7). L'extrait sec est conservé au réfrigérateur (Lakiæ *et al.*, 2010).



**Figure 6:** Protocole de préparation de l'extrait aqueux de *A. numidica*.



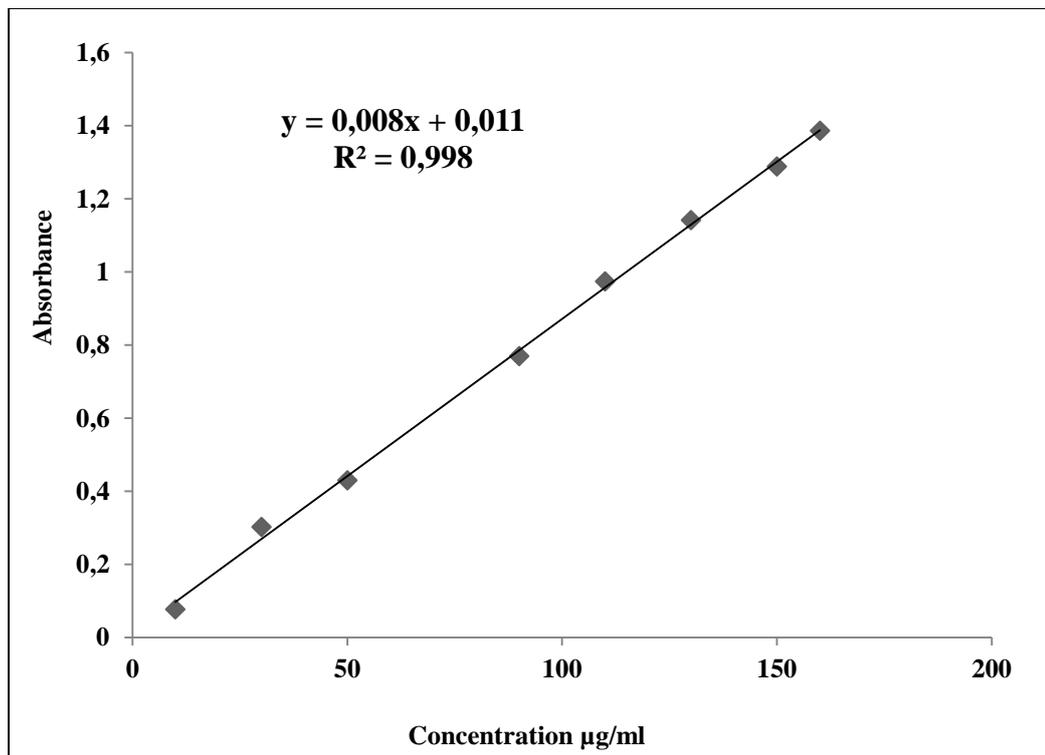
**Figure 7:** Protocole de préparation de l'extrait brut de *A. numidica*.

## 2.2. Teneur en polyphénols, flavonoïdes et tannins

### 2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits aqueux et brut de *A. numidica* est estimé par la méthode de Folin -Ciocalteu décrite par Li et ses collaborateurs (2007). Un volume de 200 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 1 mL de réactif de Folin -Ciocalteu (10%). Après 4 min, 800 µl de carbonates de sodium (75 g/l) sont additionnés. Après 2 h d'incubation à l'obscurité et à une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm.

L'acide gallique (0–160 µg/mL) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage (Figure 8) à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

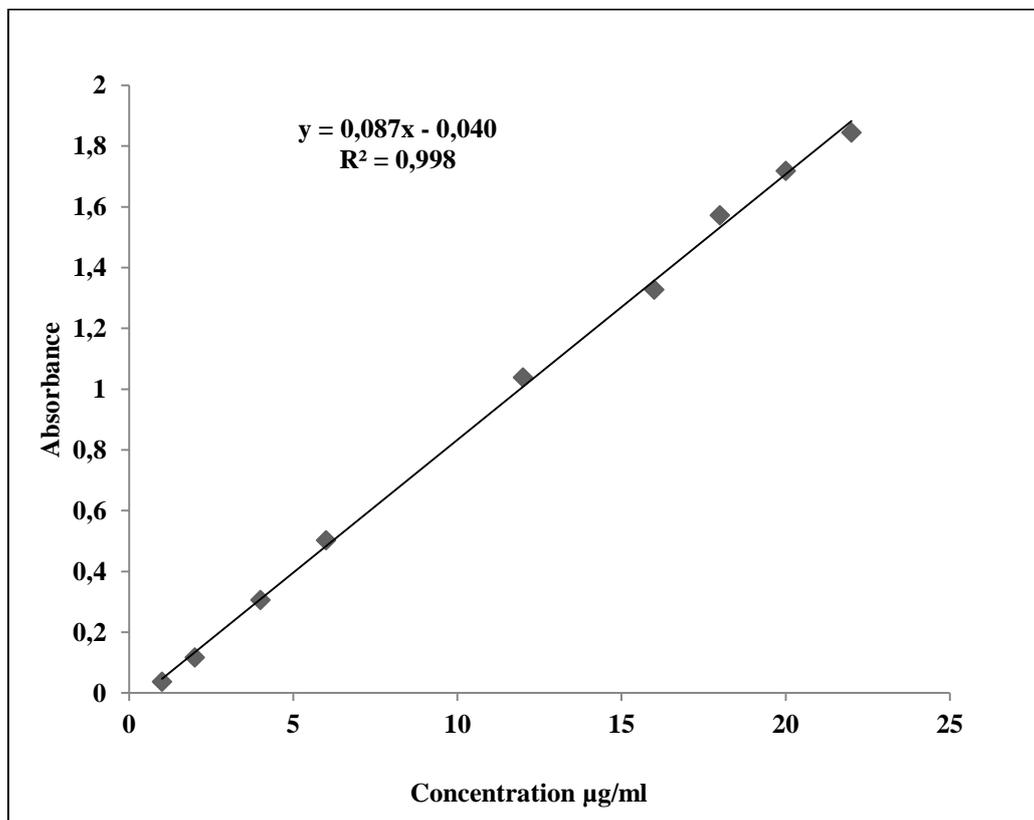


**Figure 8:** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

### 2.2.2 Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux et brut de *A. numidica*. Un millilitre de la solution d'ALCl<sub>3</sub> (2%) est ajouté à 1 mL de la solution de l'échantillon (extraits ou standard) contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 - 40 µg/mL) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) (Figure 9).

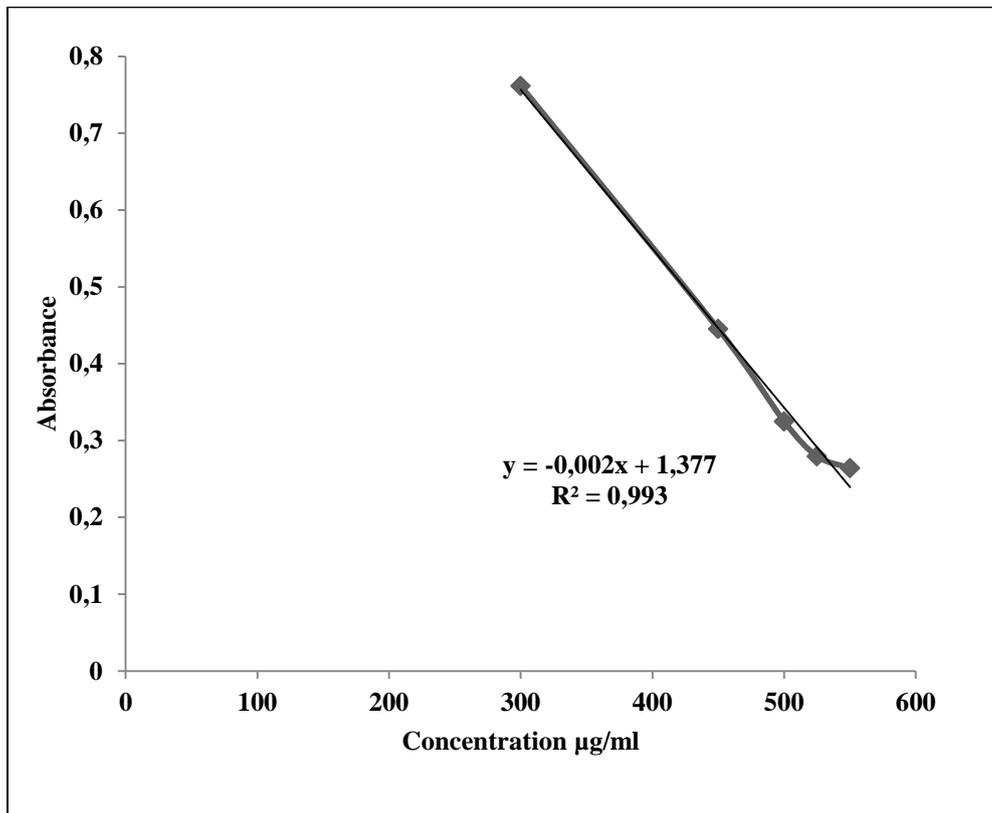


**Figure 9:** Droite d'étalonnage de la quercétine.

### 2.2.3. Dosage des tannins

La capacité de précipiter l'hémoglobine a été déterminée par l'hémoanalyse en utilisant le sang frais bovin selon la méthode décrite par Bate-smith (1973). Brièvement, un volume de sang hémolysé (absorbance =1.6) a été mélangé avec un volume d'extraits. L'absorbance de surnageant obtenu après centrifugation (4000 rpm pendant 10 min à 4°C) est mesurée à 576 nm contre une solution blanc.

La courbe d'étalonnage est construite avec l'acide tannique (0-600ug/mL) et l'efficacité de précipitation des solutions est exprimée par équivalent d'acide tannique (Figure 10).



**Figure 10:** Droite d'étalonnage de l'acide tannique.

## 2.3. Activité antioxydante

### 2.3.1. Test de DPPH

L'effet scavenger de l'extrait aqueux et l'extrait brut de *A. numidica* vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par Que et ses collaborateurs (2006). Un volume de 500  $\mu$ L de la solution de DPPH (0.1mM) est mélangé avec 500  $\mu$ L des solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à différentes concentrations. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

La valeur IC50 est définie comme étant la concentration d'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur). Les valeurs IC50 ont été calculées par la régression linéaire où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (I%) (Mensor *et al.*, 2001).

### 2.3.2. Test du blanchissement de $\beta$ -carotène/acide linoléique

Le test du blanchissement de  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été effectué selon la méthode d'Aslan et ses collaborateurs (2006). Un mélange en solution a été préparé comprenant 0,5mg de  $\beta$ -carotène (dissous dans 1 mL de chloroforme), 25 $\mu$ l d'acide linoléique et 200mg de tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. Par la suite 350  $\mu$ L de chaque extrait (2 g/L) ou de l'antioxydant standard (BHT) ont été ajoutés à 2500 $\mu$ l de la solution. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à différents intervalles de temps: 1h, 2h, 4h, 6h, 24h et 48 heures d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité. Le contrôle négatif est représenté par le méthanol et l'eau distillée. Le pourcentage d'inhibition des extraits antioxydant est mesuré comme suit:

$$AA\% = (At / Ac) \times 100$$

## **2.4. Activité antimicrobienne**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque selon Sokmen et ses collaborateurs (2004) pour l'activité antibactérienne et selon Yazdani et ses collaborateurs (2012) avec quelques modifications.

### **2.4.1. Préparation de l'inoculum et des solutions d'extraits**

Les souches microbiennes sont ensemencées sur gélose nutritive et gélose Sabouraud et incubées à 37°C pendant 18-24 h pour les bactéries et à 28°C pendant 7 jours pour les champignons. Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions bactériennes ayant une turbidité voisine à 0.5 McFarland et une suspension fongique ayant une DO entre 0.15 et 0.17 à 530 nm. Les deux extraits de la plante ont été dilués à raison de 200 et 100 mg par 1mL dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) puis filtrés sur une membrane de porosité 0.22 µm.

### **2.4.2. Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri contenant le milieu Muller-Hinton. Une fois l'ensemencement est effectué, des disques de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 µl de l'extrait (200 mg/mL, 100 mg/mL) sont déposés sur la surface de la gélose ensemencée. Des disques contenant l'antibiotique de référence (la gentamicine) et les disques imprégnés de DMSO (témoin négatif) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C pour les bactéries et pendant 48 à 72 pour les champignons.

### **2.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits ont été déterminées par une gamme des dilutions successives au demi allant de 200 jusqu'à 0.195 mg/mL. Par la suite, 10 µl de chaque dilution ont été versés dans les disques qui sont déjà déposés dans les boîtes contenant la gélose Mueller Hinton.

La détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) a été effectuée par des prélèvements à l'anse autour des disques ne présentant aucune culture visible. ces prélèvements ont été déposés en strie sur gélose Mueller Hinton. Les boîtes de Pétri sont incubées 24 heures à 37°C.

## 2.5. Toxicité aigue

Cette étude consiste à déterminer la toxicité aigue de l'extrait aqueux et l'extrait brut des aiguilles de *Abies numidica* administré par voie orale selon les lignes directrices de l'organisation de coopération et de développement économique pour les essais de produits chimiques (OCDE, 2001).

### 2.5.1. Animaux et alimentation

L'étude a porté sur 18 poussins de chair d'un jour (ISA HUBBARD F15), vaccinés au couvoir contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse.

Les poussins ont été élevés pendant 5 semaines (35 jours) où ils ont été nourris *ad libitum* avec un aliment démarrage au cours des 20 premiers jours, puis avec un aliment croissance jusqu'à la fin de l'essai. La formule alimentaire des deux types d'aliment est présentée dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Composition de l'aliment de démarrage et de croissance des poulets de chair.

Ingrédients	Quantité (g/kg)	
	Démarrage	Croissance
Mais	628	648
Tourteau de soja	290	270
Son de blé tendre	50	50
Phosphate bicalcique	10	10
Calcaire	12	12
C.M.V.	10	10

### 2.5.2. Traitement des animaux

Après trois semaines d'élevage les animaux ont été séparés en trois lots égaux (n=6): Le premier témoin (T) ces sujets ont reçu par gavage de l'eau distillée. Ceux du deuxième lot (EAq) et du troisième lot (EBr) ont reçu une seule dose (2000 mg.kg<sup>-1</sup> P.C.) d'une suspension de l'extrait aqueux et de l'extrait brut des aiguilles de *Abies numidica*, respectivement.

### 2.5.3. Enregistrement des performances

Après administration des extraits, les animaux ont été d'abord mis en observation pendant quelques heures (pour noter les cas de morts immédiates). L'observation a continué jusqu'à deux semaines pour déceler les effets tardifs du traitement ( la mortalité et les modifications comportementales des animaux).

**Gain du poids:** Les pesées des poulets ont été effectuées individuellement sur les animaux à l'âge de 21j, 28j et 35j sans mise à jeun et les gains moyens ont été calculés.

**Consommation alimentaire:** Les contrôles de consommation ont été effectués par lot. Ces mesures ont été effectuées chaque semaine.

**L'indice de consommation (IC)** a été calculé par lot selon la formule suivante :  
 $IC = \frac{\text{La quantité d'aliments consommée durant un période}}{\text{Gain de poids moyen durant cette période}}$ .

**Le taux de mortalité:** Les mortalités ont été relevées tous les jours au niveau de chaque lot durant toute la durée de l'élevage.

### 2.5.4. Prélèvement du sang, analyses biochimiques et hématologiques

Les prélèvements sanguins ont été effectués à partir de la veine jugulaire des poulets. Les échantillons du sang sont recueillis dans 2 tubes différents; un tube EDTA utilisé pour l'examen des paramètres hématologiques et un tube hépariné utilisé pour les analyses biochimiques. Les tubes contenant les échantillons de sang ont été transportés dans une glacière au laboratoire centrale du nouvel hôpital 120 lits de Khenchela.

- **Analyses hématologiques**

L'analyse de sang total a été effectuée à l'aide d'un automate d'hématologie. Les paramètres sanguins suivant ont été évalués:

- Globules blancs
- Globules rouges
- Hémoglobines
- Hématocrites

- Volume globulaire moyen
- Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- Taux corpusculaire moyen en hémoglobine

- **Analyses biochimiques**

Afin d'évaluer l'effet de l'administration de nos extraits sur le métabolisme hépatique et rénale du poulet de chair. Il nous a paru utile d'évaluer les paramètres biochimiques suivants :

- L'urée
- La créatinine
- Les transaminases (TGO et TGP)
- Gamma-glutamyl transférase (Gamma-GT)

### **2.5.5. Réalisation des coupes histologiques**

Les coupes histologiques des reins et de foie ont été réalisées au laboratoire d'anatomopathologie de CHU de Sétif.

Les segments des organes (foie et reins) fixés préalablement dans le formol (10%) ont été déposés dans des cassettes avant leur déshydratation dans des bains d'alcool. Ce dernier a été éliminé par le xylène avant l'immersion des cassettes dans des moules contenant de la paraffine fondue. Après refroidissement des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées par un microtome. Ces coupes sont déposées sur des lames, puis séchées dans une étuve pendant une nuit. Ensuite, elles ont été colorées par une solution d'hématoxyline-éosine et le montage se fait par l'eukitt placé entre lame et lamelle.

## 2.6. Etude de l'effet des extraits de *Abies numidica* sur les poussins de chair

### 2.6.1. Provenance des poussins et mise en place

Un effectif de 50 poussins chair de souche ISA HUBBARD F15 d'un poids moyen de 35,68 g ont été reçus à un jour d'âge en provenance du couvoir de Guellal, Sétif. Ils ont été numérotés sous leurs ailes et répartis en cinq groupes égaux en fonction de la supplémentation des régimes alimentaires. Tous les groupes expérimentaux ont été soumis aux mêmes conditions d'élevage et nourris pendant 21 jours par un aliment démarrage. Les poussins ont été vaccinés par pulvérisation au couvoir contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse.

### 2.6.2. Alimentation des animaux

Durant toute la période d'étude, les poussins ont été nourris avec un aliment démarrage. La formule alimentaire est présentée dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Composition de l'aliment utilisé durant l'expérience.

Ingrédients	Quantité (g/kg)
Mais	590
Tourteau de soja	350
Son de blé tendre	15
Phosphate bicalcique	20
Calcaire	15
C.M.V.	10

Vitamines par kg: 1000000 UI Vitamine A, 180000 UI Vitamine D3, 3295 mg Vitamine E, 200 mg Vitamine K, 120 mg Vitamine B1, 450 mg Vitamine B2, 900 mg Vitamine B3, 240 mg Vitamine B6, 1.5 mg Vitamine B12, 60 g Acide folique, 6 mg Biotine, 2000 mg Vitamine PP, 35000 mg Chlorure de choline.

Minéraux par kg: 9590 mg manganèse, 4920 mg fer, 7500 mg zinc, 2250 mg cuivre, 132620 mg calcium, 120 mg iode, 36 mg sélénium, 332000 mg chlorure de sodium.

Autres: 180000 mg/ kg DL méthionine, 2500mg/kg anti-oxydant.

### **2.6.3. Traitements**

Les différents traitements réalisés au cours de la période d'essai ont permis de répartir les poussins en cinq lots :

- Le premier lot ou lot témoin (T): poussins ayant reçu une ration de l'aliment sans additifs.
- Le deuxième lot (EAq2): poussins ayant reçu une ration contenant 2g extrait aqueux par kg de l'aliment
- Le troisième lot (EAq4) : poussins ayant reçu une ration contenant 4g extrait aqueux par kg de l'aliment
- Le quatrième lot (EBr2): poussins ayant reçu une ration contenant 2g extrait brut par kg de l'aliment
- Le cinquième lot (EBr4): poussins ayant reçu une ration contenant 4g extrait brut par kg de l'aliment

### **2.6.4. Suivi des performances zootechniques de croissance**

Au premier jour, le poids de chaque lot a été enregistré (équilibrage). Au j7, j14 et j21 les animaux ont été pesés individuellement sans mise à jeun et la consommation par lot a été enregistrée. L'indice de consommation a été calculé. La mortalité a été enregistrée chaque jour.

### **2.6.5. Effet sur les paramètres biochimique**

Les prélèvements sanguins des poussins (n=5) ont été récoltés selon la méthode précédemment décrite pour l'évaluation des paramètres biochimiques suivants:

- Le Glucose
- Le cholestérol
- Les triglycérides
- Les protéines totales

### **2.6.6. Effet sur le poids de quelques organes**

Tous les poussins sacrifiés après 3 semaines ont fait l'objet d'une dissection simplifiée. Le foie, le cœur et la rate ont été pesés séparément. La masse relative de chaque organe a été déterminée en calculant le rapport du poids de cet élément au poids vif avant abattage.

### **2.6.7. Effet sur la microflore caecale des poussins *in vivo***

#### **2.6.7.1. Echantillonnage**

Deux poussins par lot ont été sacrifiés à l'âge de 21 jours. Après dissection, le tractus intestinal de chaque poussin a été prélevé et les échantillons de contenu caecal (1g de digesta frais) ont été recueillis aseptiquement dans des tubes stériles en plastique de 15 mL et dilués dans l'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution initiale  $10^{-1}$ . Ensuite, une gamme de dilution décimale ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) a été réalisée avec de l'eau physiologique stérile avant l'inoculation dans les boîtes de Pétri contenant les milieux gélosés.

#### **2.6.7.2. Analyse microbiologique**

Le dénombrement de la microflore totale aérobie a été réalisé par étalement sur gélose PCA (Plate count agar), les entérobactéries ont été dénombrées sur le milieu Mac Conkey et les bactéries lactiques ont été dénombrées sur gélose MRS (Man, Rogosa et Sharpe)

Les boîtes de dénombrement de la microflore totale aérobie et des entérobactéries ont été mises à incuber dans des conditions d'aérobiose à 37 °C pendant 24 à 48 h, alors que les boîtes des bactéries lactiques ont été incubées à 37 °C pendant 48h à 72 h dans des conditions anaérobies. Les boîtes contenant de 8 à 300 colonies ont été retenues pour le dénombrement bactérien.

### **2.6.8. Effet sur la microflore caecale et fécale *in vitro***

#### **2.6.8.1. Isolement des souches bactériennes**

##### **2.6.8.1.1. Isolement à partir d'échantillons caeaux**

A partir des boîtes de dénombrement des entérobactéries sur milieu Mac Conkey, quelques souches bactériennes ont été prélevées et ensemencées à nouveau pour obtenir des colonies pures.

### **2.6.8.1.2. Isolement à partir d'échantillons fécaux**

Les échantillons de la matière fécale ont été prélevés par écouvillonnage cloacal. Ensuite, devant la flamme du bec Bunsen quelques gouttes d'eau physiologique ont été ajoutées à chaque écouvillon puis ces derniers ont été inoculés sur des géloses sélectives (Gélose Mac Conkey pour l'isolement des entérobactéries, gélose Chapman pour l'isolement des staphylocoques et gélose bile esculine pour l'isolement des entérocoques). Les boîtes inoculées ont été mises à incuber dans des conditions d'aérobiose à 37 °C pendant 24 h.

### **2.6.8.2. Conservation des isolats**

Les souches bactériennes isolées ont été repiquées dans des tubes contenant un milieu liquide (bouillon nutritif) additionné de glycérol (20%) et après croissance à 37°C, elles sont conservés à -20°C.

### **2.6.8.3. Identification des isolats**

- **Coloration de Gram et test KOH**

La coloration de Gram a été effectuée selon la méthode classique. Parallèlement, une colonie bactérienne a été émulsifiée dans une suspension de KOH (3%) sur une lame en verre. La suspension est mélangée à l'aide d'une anse de platine pendant 60 secondes. La solution de KOH devient visqueuse dans les 30 premières secondes en présence de bactéries à Gram négatifs (Jaya Chandra et Sobha Mani, 2011).

- **Test catalase**

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Levy *et al.*, 1992).

- **Test oxydase**

A partir d'une culture pure et fraîche, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse en plastique ou pipette Pasteur stérile puis frottées sur la zone test de la bandelette (papier filtre imprégné par le N,N-Diméthyl-1,4-phénylène diamine et le alpha-naphtol). Si le papier n'est pas devenu bleu foncé ou noir au bout d'une minute, la réaction est considérée comme négative.

- **Identification des bactéries par galeries API**

Les galeries API 20E et API Staph de BioMérieux (France) ont été utilisées pour l'identification des entérobactéries et des staphylocoques, respectivement.

Après avoir vérifié la pureté des souches, les colonies sont mises en suspension dans le milieu API Staph (dans le cas de staphylocoques) et dans l'eau physiologique stérile (dans le cas des entérobactéries) avec une opacité de 0.5 McFarland afin de remplir les microtubes des galeries API.

Les réactions produites pendant la période d'incubation ( $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 h) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

#### **2.6.8.4. Sensibilité aux antibiotiques**

- **Méthode de l'antibiogramme standard**

La résistance aux antibiotiques a été réalisée sur un ensemble des antibiotiques appartenant aux différentes familles par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2011).

A partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif (gélose nutritive), une suspension bactérienne équivalente au standard McFarland 0,5 (DO entre 0.08 et 0.10 à 625 nm) a été préparée en solution saline stérile (0.9 % NaCl).

Les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface du milieu Mueller Hintonensemencé préalablement par la culture bactérienne en utilisant la méthode d'écouvillonnage. La lecture est effectuée après 18-24 h d'incubation à  $35-37^{\circ}\text{C}$  par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques.

- **Antibiotiques utilisés**

Les antibiotiques ont été sélectionnés selon leur disponibilité et selon la liste des antibiotiques à tester définie par le CASFM (2011):

- Pour les entérobactéries: la céfixime, l'amoxicilline, l'oxacilline, la céfotaxime, la céfazoline, la colistine, la gentamicine, et le chloramphénicol.

- Pour les staphylocoques: La pénicilline G, la pristinamycine, l'amoxicilline, l'oxacilline, la céfazoline, la gentamicine, et le chloramphénicol.
- Pour les entérocoques : L'ampicilline, l'oxacilline, le chloramphénicol, La kanamycine, La streptomycine, La rifampicine, la pristinamycine.

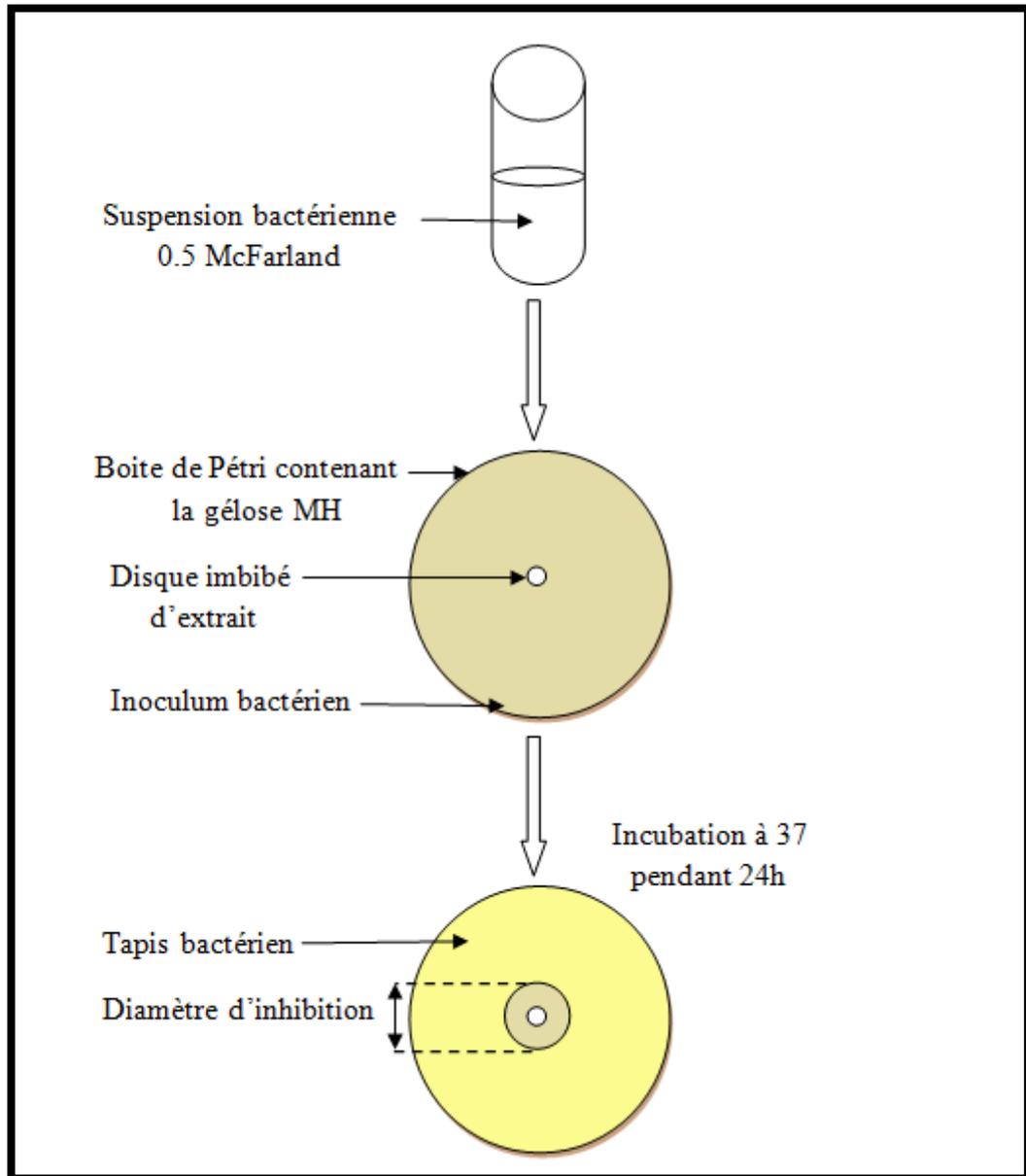
Les antibiotiques utilisés dans cette étude, la charge de chaque disque et leurs familles sont représentés dans le tableau 8.

**Tableau 8:** Liste des antibiotiques utilisés.

Antibiotique	Symbole	Charge du disque	Famille
Céfixime	<b>CFM</b>	5 µg	Céphalosporine
Céfotaxime	<b>CTX</b>	30 µg	
Céfazoline	<b>CZ</b>	30 µg	
Ampicilline	<b>Amp</b>	10 µg	Pénicillines
Pénicilline G	<b>P</b>	10UI	
Oxacilline	<b>OX</b>	1µg	
Amoxicilline	<b>AMX</b>	25 µg	
Gentamicine	<b>GEN</b>	10µg	Aminosides
Streptomycine	<b>S</b>	10 µg	
Kanamycine	<b>K</b>	30 UI	
Colistine	<b>CL</b>	15 µg	Polypeptide
Chloramphénicol	<b>C</b>	30 µg	Phénicoles
Pristinamycine	<b>RP</b>	15 µg	Streptogramines
Rifampicine	<b>RA</b>	5 µg	Divers

### 2.6.8.5. Activité antibactérienne des extraits

L'évaluation de l'activité des extraits contre les souches bactériennes isolées a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Figure 11) (Sokmen *et al.*, 2004).



**Figure 11:** Principe de la méthode de diffusion en milieu gélosé.

## Etude statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD et moyenne  $\pm$  SEM respectivement. la différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée suivi du test de Tukey. Pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 ( $P < 0.05$ ). Les dendrogrammes ont été construits selon la méthode de groupe paire non pondérée avec la moyenne arithmétique (UPGMA : Unweighted Pair Group Method with rithmetic Averaging) avec le logiciel Statistica 6 (Statsoft Italia, Padoue, Italie).

# *Résultats et discussion*

## 1. Rendements des extraits

Le rendement de la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps de macération, la température, le solvant d'extraction et la nature chimique de l'échantillon (Su *et al.*, 2006). Le taux d'extraction de deux extraits a été calculé par rapport à la masse de la matière végétale initiale. Le rendement correspond à  $25.27 \pm 1.77\%$  pour l'extrait brut alors que pour l'extrait aqueux est de  $23.15 \pm 1.59\%$ .

## 2. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des aiguilles du Sapin de Kabylie, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins a été effectué. La raison principale pour le choix de ces composés réside leur capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Hatano *et al.*, 1989). Ces composés phénoliques peuvent contribuer directement à l'action antioxydante. Les analyses quantitatives des phénols totaux, flavonoïdes et tannins sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage et les résultats sont représentés dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Teneurs des extraits de *Abies numidica* en phénols totaux, flavonoïdes et en tannins.

Extraits de <i>Abies numidica</i>	Polyphénols <sup>(a)</sup>	Flavonoïdes <sup>(b)</sup>	Tannins <sup>(c)</sup>
Extrait aqueux	$105.25 \pm 5.4$	$1.64 \pm 0.05$	$113.03 \pm 0.24$
Extrait brut	$148.74 \pm 1.73$	$3.28 \pm 0.3$	$89.22 \pm 1.39$

<sup>(a)</sup>  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

<sup>(b)</sup>  $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

<sup>(c)</sup>  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide tannique par millilitre d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  SD.

Les résultats de notre étude montrent que l'extrait brut est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait aqueux. En fait, la solubilité des polyphénols dépend du solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que de leur interaction avec les autres constituants et la formation de complexes insolubles. Le méthanol est le solvant le plus approprié pour une meilleure récupération de polyphénols (Fellah *et al.*, 2008).

Les tannins sont le seul groupe des composés phénoliques qui ont la capacité de précipiter les différentes protéines liées avec les acides phénoliques. Elles sont généralement trouvées dans les plantes médicinales et possèdent plusieurs vertus tels que les activités antimutagéniques, antimicrobiennes, anticarcinogéniques et antioxydantes (Chung *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2009). Les résultats de dosage des tannins montrent que les deux extraits sont très riches en tannins, cependant l'extrait aqueux contient une teneur plus élevée en ces composés que l'extrait brut car l'eau extrait particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins.

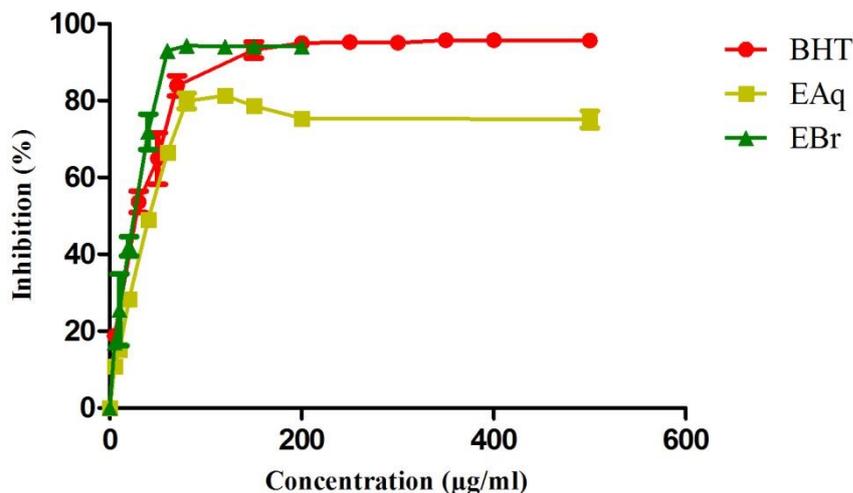
### **3. Pouvoir antioxydant des extraits**

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des deux extraits a été réalisée par deux techniques : le piégeage du radical libre DPPH et le blanchissement du  $\beta$ -carotène.

#### **3.1. Effet scavenger du radical DPPH**

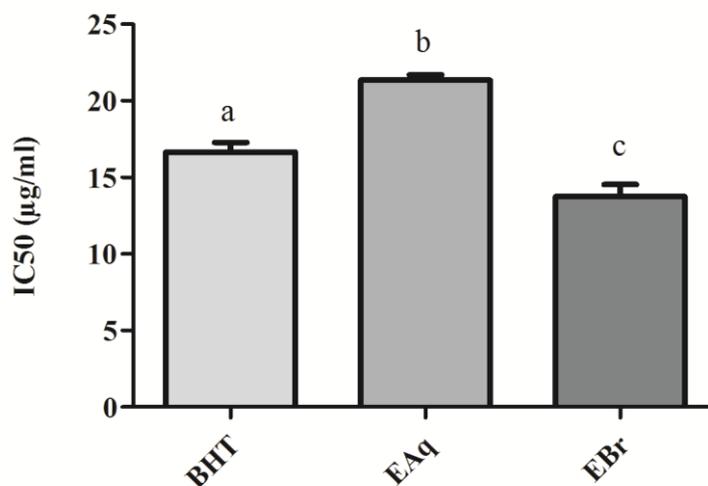
La technique de piégeage des radicaux libres du DPPH est une méthode spectrophotométrique appliquée pour mesurer l'activité antioxydant des extraits des plantes, en particulier qui ont assigné aux composés phénoliques. Elle est basée sur la réduction du radical stable (DPPH) par des antioxydants donneurs des protons d'hydrogène.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait brut piège le radical DPPH par effet dose dépendant (Figure 12) alors que l'extrait aqueux présente un profil d'activité biphasique ; dans la première phase il manifeste un effet scavenger dose dépendant jusqu'à atteindre un maximum d'activité de 81,28% pour une concentration de 120  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de cette concentration l'effet de l'extrait aqueux s'inverse et s'exprime par une diminution brusque de son effet scavenger. Ce phénomène peut être expliqué par un changement du comportement de l'extrait de l'effet antioxydant à l'effet prooxydant ou par le fait que le pourcentage de molécules prooxydantes dépasse largement celui des molécules antioxydantes à une certaine concentration d'extrait.



**Figure 12:** Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits étudiés. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD de trois essais.

Les différences des valeurs de l'IC50 entre les extraits et l'antioxydant standard (BHT) et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ) (Figure 13).



**Figure 13:** Représentation de l'inhibition du radical DPPH par l'estimation des valeurs de l'IC50 des deux extraits de *Abies numidica* et le BHT. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. Les colonnes ayant des lettres différentes sont statistiquement différentes ( $P < 0.05$ ).

Dans cette étude, l'extrait brut semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant sur le radical DPPH ( $P < 0.05$ ) en comparaison avec l'extrait aqueux et même avec l'antioxydant standard (BHT) avec une  $IC_{50}$  de l'ordre  $13.74 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ , indiquant l'efficacité de cet extrait.

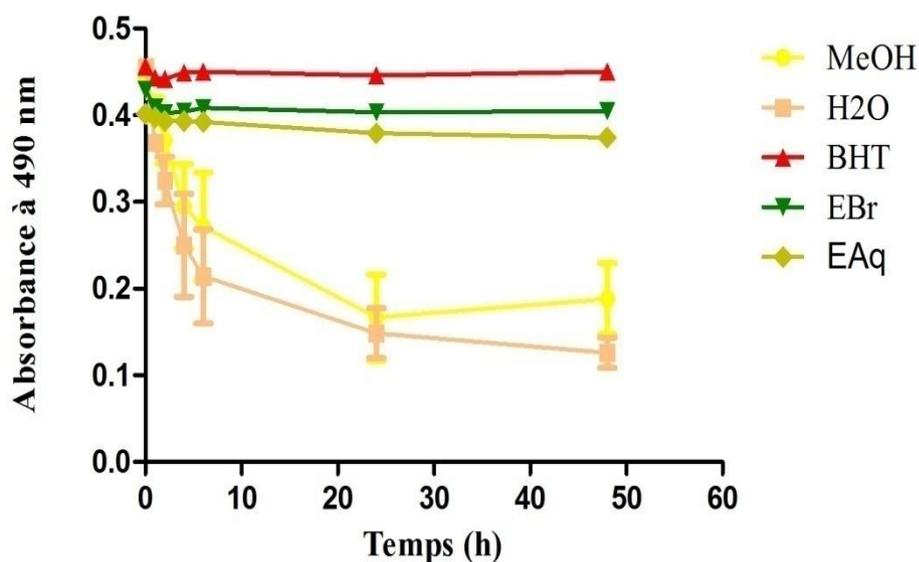
L'extrait aqueux de *A. numidica* a montré une activité prooxydante à une certaine concentration. Récemment, plusieurs travaux sur l'effet antioxydant/ prooxydant ont été effectués ; Zubia et ses collaborateurs (2007) ont rapporté que l'extrait de l'algue marine *Chondria baileyana* devient prooxydant au delà de  $1\text{mg/mL}$ . Santiago et Mayor (2014) ont trouvé aussi que l'extrait éthanolique des feuilles de *Ficus odorata* possède un effet scavenger mais lorsque la concentration dépasse une certaine concentration il se comporte comme prooxydant.

Cette activité prooxydante peut être utile dans le traitement du cancer. Le stress oxydant est induit par des agents prooxydant en produisant les ROS ou en inhibant les systèmes antioxydants (Puglia et Powell, 1984). Comme les cellules de cancer sont habituellement anaérobies, l'augmentation des ROS contribue à l'augmentation de stress oxydatif que la plupart des cellules cancéreuses ne peuvent plus tolérer. La surproduction des ROS peut conduire aux dommages oxydants qui peuvent causer des modifications dans la structure des protéines et des lipides aussi bien que des aberrations chromosomiques (Santiago et Mayor, 2014). L'extrait aqueux de *A. numidica* peut être utilisé pour des applications anticancéreuses à raison de sa nature prooxydante.

### **3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène/acide linoléique**

Un suivi de la réaction de l'oxydation du  $\beta$ -carotène en présence des témoins (négatif et positif) et des extraits, a été effectué en mesurant l'intensité de la couleur de  $\beta$ -carotène à une longueur d'onde de 490 nm et ce qui nous a permis de tracer une courbe (Figure 14).

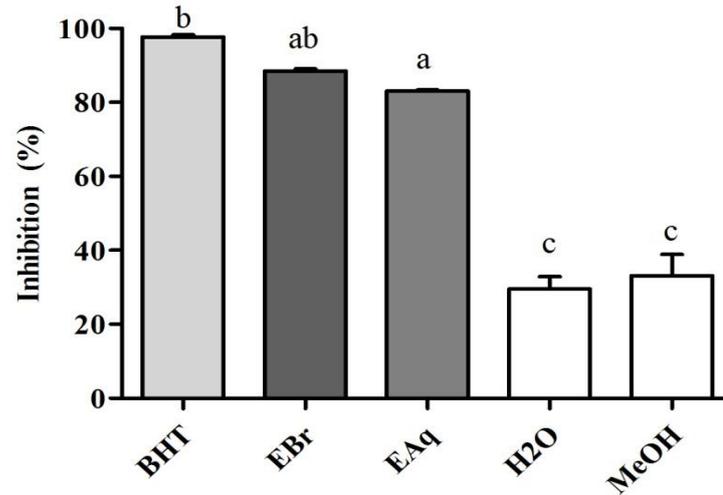
À partir de cette courbe on a remarqué que l'absorbance des mélanges a été diminuée, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle des témoins négatifs.



**Figure 14:** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en présence et en absence des extraits de *Abies numidica* et de BHT. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$ SD.

Les résultats obtenus révèlent que les deux extraits inhibent d'une manière efficace et significative ( $P < 0.05$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport aux contrôles négatifs ( $H_2O$  et MeOH).

L'activité de l'extrait aqueux est significativement inférieure ( $P < 0.05$ ) à celle de témoin positif BHT, alors que l'extrait brut présente une activité similaire à celle du BHT (Figure 15).



**Figure 15:** Activité antioxydante relative des extraits, du BHT, du MeOH et du H<sub>2</sub>O dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique à 48 h. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$ SD. Les colonnes ayant des lettres différentes sont statistiquement différentes ( $P < 0.05$ ).

Selon Frankel et Meyer (2000), le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Ils ont proposé aussi que les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène (Bouزيد *et al.*, 2011).

#### 4. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et l'extrait brut de *A. numidica* a été évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (Tableau 10).

**Tableau 10** : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de *A. numidica*

Les souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Extrait Aqueux		Extrait Brut		DMSO	GEN
	200 mg/mL	100 mg/mL	200 mg/mL	100 mg/mL		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	00	00	00	00	00	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	00	00	00	00	00	26
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	17.75 ± 0.35	23.5 ± 0.71	19.75 ± 0.35	00	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	00	00	9.20 ± 0.04	8.21 ± 0.01	00	10
<i>Listeria innocua</i> CLMA 3030	00	00	8.77 ± 0.21	8.12 ± 0.01	00	17
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	00	00	8.25 ± 0.43	8.2 ± 0.21	00	19
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	10.87±0.18	10.11±0.15	12.2±0.28	11.85±0.21	00	29
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	00	00	14.5±0.71	13	00	26
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	07	08	11	10	00	15
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	00	00	00	00	00	18
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14035	13.5±0.71	12	14.75±0.35	12.5±0.71		nd
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	12.83±0.29	10.33±0.58	15	12.5±0.71	00	24
<i>Aspergillus niger</i> 2CA936	00	00	00	00	00	nd
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	00	00	00	00	00	nd
<i>Fusarium oxysporum</i> CLMA	00	00	00	00	00	nd
<i>Candida albicans</i> ATCC1024	00	00	00	00	00	nd

GEN: gentamicine ; DMSO: Diméthyle sulfoxyde ; nd: n'est pas déterminé.

Au regard de ces résultats, on a observé que l'EBr a inhibé la croissance de la majorité des souches bactériennes testées alors que l'EAq a inhibé seulement la croissance des quatre souches. Ces extraits exercent une activité antibactérienne dose-dépendante.

La plus forte activité obtenue par l'EBr a été obtenue contre la souche *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de  $23.5 \pm 0.71$  mm (à la concentration de 200 mg/mL), suivie de *Bacillus cereus* avec un diamètre de 15mm, puis *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis* et *Acinetobacter baumannii* avec des diamètres d'inhibition de  $14.75 \pm 0.35$ ,  $14.5 \pm 0.71$  et 11 mm, respectivement. Cependant, cet extrait n'a montré aucune activité contre les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Citrobacter freundii*. Concernant les souches restantes, il a montré une activité antibactérienne modérée.

L'extrait aqueux a montré un effet antibactérien plus faible que celui de l'extrait brut. Il exerce une forte activité sur *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 20 mm et avec un diamètre de  $13.5 \pm 0.71$  et  $12.83 \pm 0.29$  mm contre *Vibrio cholerae* et *Bacillus cereus*, respectivement.

Les résultats de l'activité antifongique ont révélé l'inefficacité des deux extraits contre l'ensemble des souches testées.

Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides ont été déterminées pour les quatre souches qui ont présenté une forte sensibilité contre les deux extraits et les valeurs sont représentées dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'EAq et l'EBr de *A. numidica*.

Les souches	Extrait Aqueux		Extrait Brut	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14035	1.56	25	0.39	12.5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	25	50	25	50
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	-	12.5	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	50	12.5	25

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'EAq de la plante étudiée ont été de 1.56, pour *Vibrio cholerae* et 25 mg/mL pour *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. L'EBr de cette plante a présenté des CMI de l'ordre de 0.39 et 25 mg/mL sur *Vibrio cholerae* et *Bacillus cereus*, respectivement. En ce qui concerne les deux souches restantes la CMI estimée a été de l'ordre de 12.5 mg/mL.

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'EBr de *A. numidica* ont été de l'ordre de 12.5 mg/mL et 25 mg/mL pour *Vibrio cholerae* et *Staphylococcus aureus* respectivement, alors qu'ils ont été estimées de 50 mg/mL pour *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*. Concernant l'EAq, les CMB ont été de 25 mg/mL pour la souche *Vibrio cholerae* et de 50 mg/mL pour *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Selon Fauchere et Avril (2002), une substance est bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI est égale à 2 et bactériostatique lorsque ce rapport est  $> 2$ . La comparaison des CMI et CMB obtenues nous a permis de conclure que les extraits de *A. numidica* exercent un effet bactéricide sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* et un effet bactériostatique sur *Vibrio cholerae* et *Enterococcus faecalis*.

Les vertus antibactériennes des plantes médicinales est due à leur contenu en métabolites secondaires, principalement les composés phénoliques et les huiles essentielles (Bayoub *et al.*, 2010). Ces composés peuvent interférer avec les biomembranes en causant la lyse cellulaires (Mshvildadze *et al.*, 2000; Veldhuizen *et al.*, 2006).

La différence entre les activités antibactériennes est peut être due aux plusieurs facteurs : l'organe de la plante (Natarajan *et al.*, 2005), la sensibilité des bactéries, la préparation de l'extrait et le solvant utilisé (Loziené *et al.*, 2007). En médecine traditionnelle, on utilise principalement l'eau mais l'extraction à partir des solvants organiques donne une activité antimicrobienne plus importante (Parekh *et al.*, 2005). Dans cette étude on a confirmé que l'extrait brut (hydroalcoolique) est plus actif et concentrerait mieux les principes actifs antibactériens contenus dans la plante que l'extrait aqueux.

Dans cette étude, le profil d'activité antimicrobienne des extraits de *A. numidica* contre les souches testées a montré que *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible. Selon plusieurs études précédentes, les bactéries Gram positives sont plus sensibles que les bactéries Gram négatives (Cosentino *et al.*, 1999; Karaman *et al.*, 2003). La résistance des bactéries Gram négatives est en relation avec la nature de leurs membranes externes qui sont imperméables à la plupart des agents biocides (Fauchère et Avril, 2002).

## **5. Toxicité aigue**

### **5.1. Mortalité et comportement des animaux**

L'administration orale des deux extraits n'a pas entraîné des modifications comportementales chez les poulets de trois lots. Aucune mortalité due au traitement n'a été enregistrée.

## 5.2. Performances de croissance

L'effet toxique aigu des différents traitements sur la croissance des poulets de chair a fait l'objet de notre étude, le poids vifs des sujets des différents lots a été enregistré à 21, 28 et 35 jours d'âge. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Effet des extraits de *A. numidica* sur les paramètres zootechniques des poussins.

Paramètres	T	EAq	EBr	P
<b>Poids initial, g</b>				
21 j	296.6± 25.05	315.17±20.50	315.33±24.21	<i>ns</i>
<b>Gain de poids, g</b>				
21- 28 j	163.4± 25.51	117.33±18.37	136.33±15.49	<i>ns</i>
28-35 j	191.6± 37.21	143.33±10.73	184.33±26.36	<i>ns</i>
<b>Aliment consommé, g</b>				
21- 28 j	395.00	327.83	330.00	<i>ns</i>
28-35 j	586.00	575.00	556.67	
<b>Efficacité alimentaire (IC), g:g</b>				
21- 28 j	2.42	2.79	2.42	<i>ns</i>
28-35 j	3.06	4.01	3.02	

T: lot témoin; EAq: lot traité par l'extrait aqueux; EBr : lot traité par l'extrait brut Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM. *ns* : non significatif

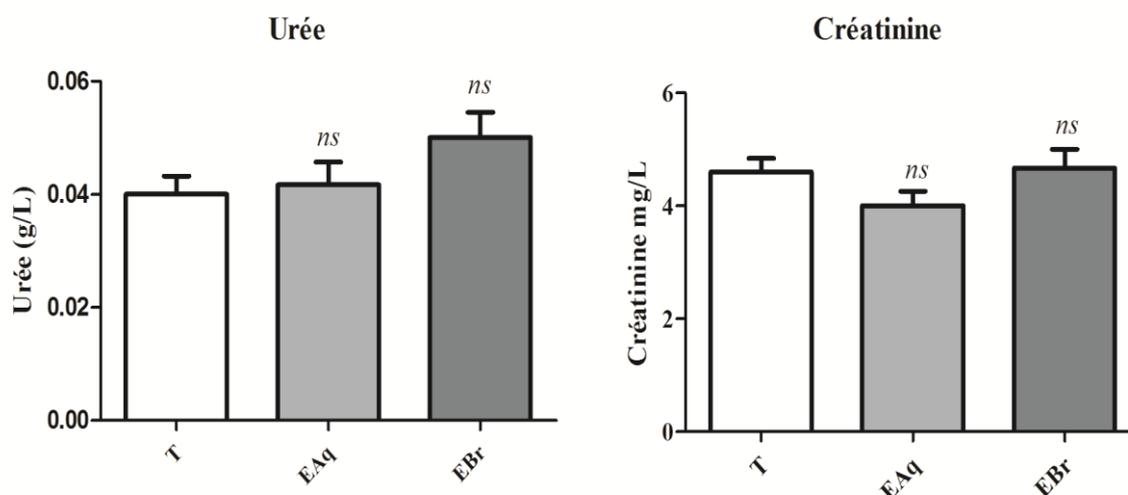
Durant toute la période d'étude, aucune différence significative entre les valeurs de tous les paramètres de croissance mesurés ( $P>0.05$ ) n'a été révélée entre les animaux des différents lots du traitement.

### 5.3. Analyse du sang

Le profil sanguin est un indice important de l'état physiologique des animaux (Khan et Zafar, 2005). Ainsi, le sang fournit beaucoup de renseignements sur leur état nutritionnel à long terme (Aderemi, 2004). Cependant, les composantes biochimiques et hématologiques du sang varie en fonction de certaines conditions telles que le stress, les infections et la toxicité (Khan et Zafar, 2005).

#### 5.3.1. Analyse biochimique

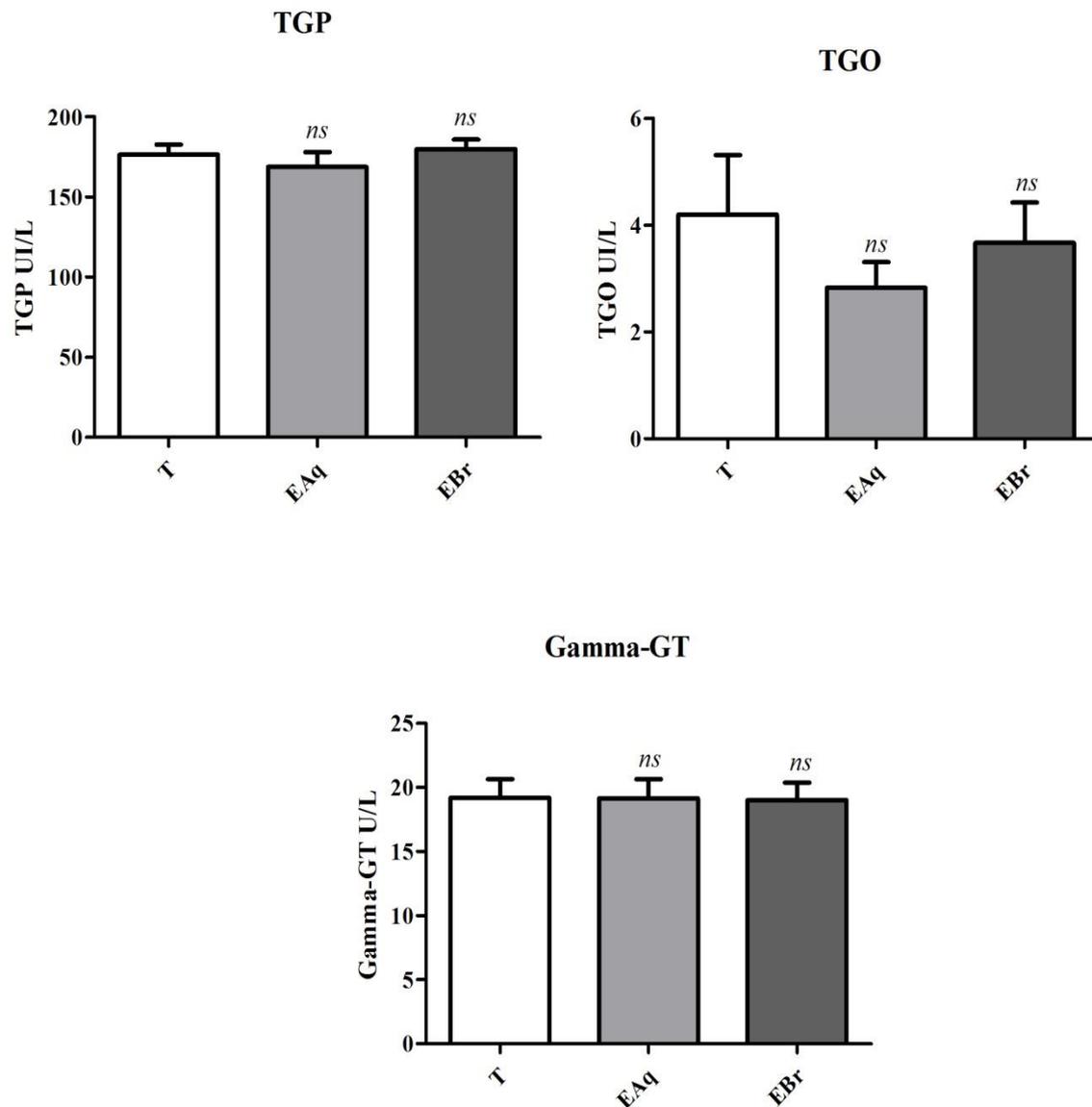
Les analyses biochimique sont des indicateurs important pour l'évaluation de la fonction rénale car la moindre perturbation des fonctions rénales se révèlent par une augmentation de la créatinine et l'urée. Les résultats biochimiques ne révèlent aucun effet significatif des deux traitements sur le profil rénal (Urée, Créatinine) (Figure 16).



**Figure 16:** Evaluation de la fonction rénale par le dosage de l'urée et la créatinine. T: lot témoin; EAQ: lot traité par l'extrait aqueux; EBr : lot traité par l'extrait brut Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM. *ns*: non significatif

Une grande partie de composés toxiques y compris les métabolites secondaires des plantes médicinales, s'accablent dans le foie où ils sont détoxifiés (Reichl, 2004). Les enzymes transaminases (TGO, TGP) et la Gamma-GT sont considérées comme indicateurs de la fonction hépatique.

Le dosage de ces paramètres a révélé qu'il n'y a aucune différence significative dans l'activité enzymatique du foie des poulets traitées par les extraits étudiés et les poulets qui n'ont rien reçu (Figure 17).



**Figure 17:** Evaluation de la fonction hépatique par le dosage de TGO, TGP et la Gamma-GT.

T: lot témoin; EAq: lot traité par l'extrait aqueux; EBr : lot traité par l'extrait brut. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM. *ns*: non significatif

### 5.3.2. Analyse hématologique

L'administration des extraits de *Abies numidica* n'a révélé aucune différence significative pour tous les paramètres hématologiques (Tableau 13).

**Tableau 13:** Résultats de l'analyse des paramètres hématologiques.

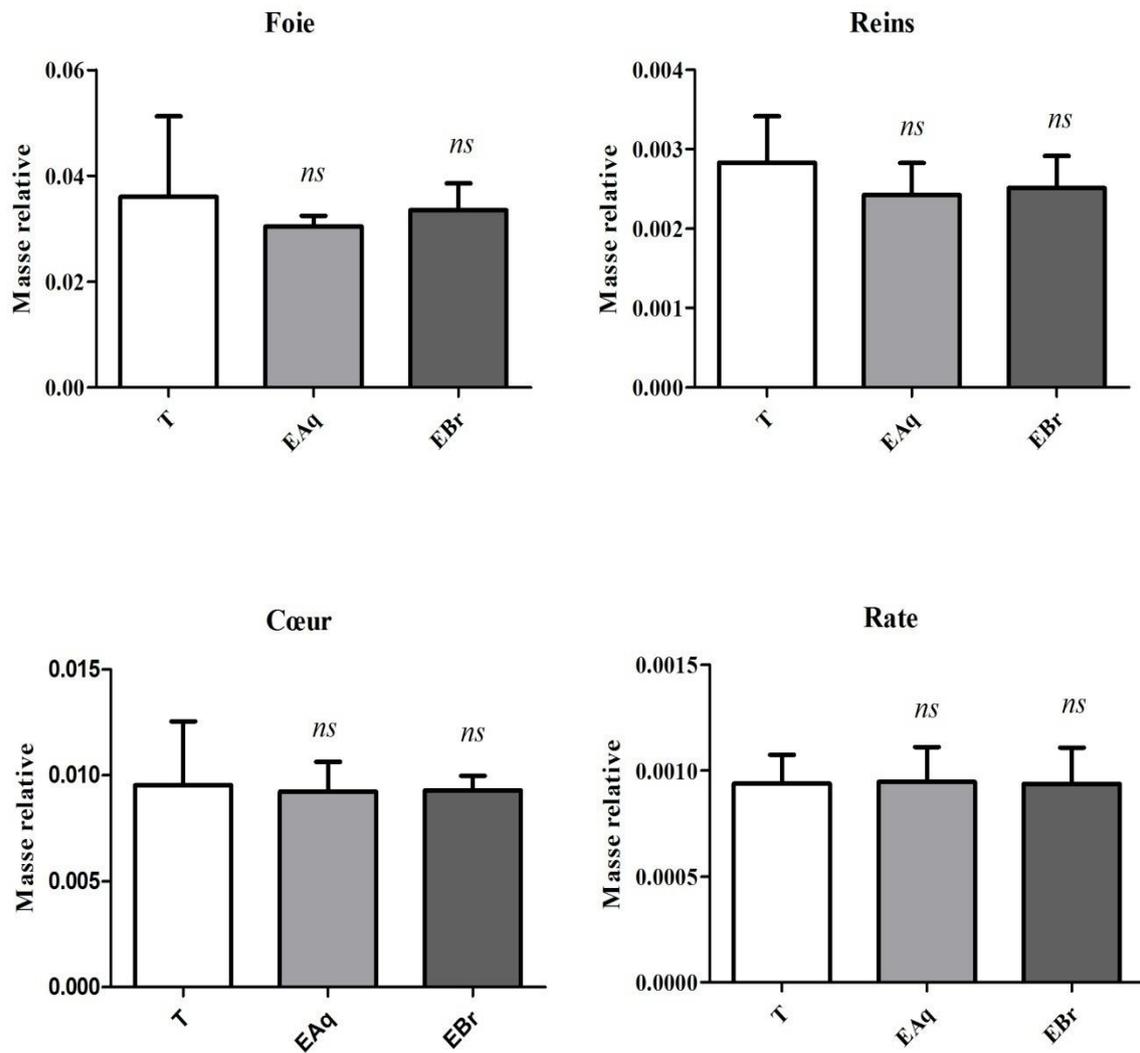
Paramètres	T	EAq	EBr	P
<b>GB (10<sup>9</sup>/L)</b>	36.95± 4.81	32.40± 2.94	30.30± 4.76	<i>ns</i>
<b>GR (10<sup>12</sup>/L)</b>	3.18± 0.11	3.47± 0.04	3.14± 0.15	<i>ns</i>
<b>HGB (g/dL)</b>	12.08± 2.80	15.68± 0.15	14.97± 0.88	<i>ns</i>
<b>HCT (%)</b>	1.40± 0.24	2.50± 0.34	2.33± 0.33	<i>ns</i>
<b>VGM (fl)</b>	137.05± 2,80	133.22± 1.65	137.15± 2.47	<i>ns</i>
<b>CCMH (g/dL)</b>	33.97± 0.77	33.97± 0.29	34.72± 0.27	<i>ns</i>
<b>TMH (pg)</b>	46.425± 0.75	45.23± 0.73	47.57± 0.60	<i>ns</i>

GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; HGB : hémoglobines, HCT : hématocrite ; VGM : volume globulaire moyen ; CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; TCMH : taux corpusculaire moyen en hémoglobine. T: lot témoin; EAq: lot traité par l'extrait aqueux; EBr : lot traité par l'extrait brut Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. *ns*: non significatif

### 5.4. Effet sur le poids des organes

La variation de la masse relative des différents organes (foie, cœur, rate et reins) est illustrée dans la figure 18.

Les résultats obtenus pendant la période de l'élevage ne révèlent aucune différence significative entre les différents lots.

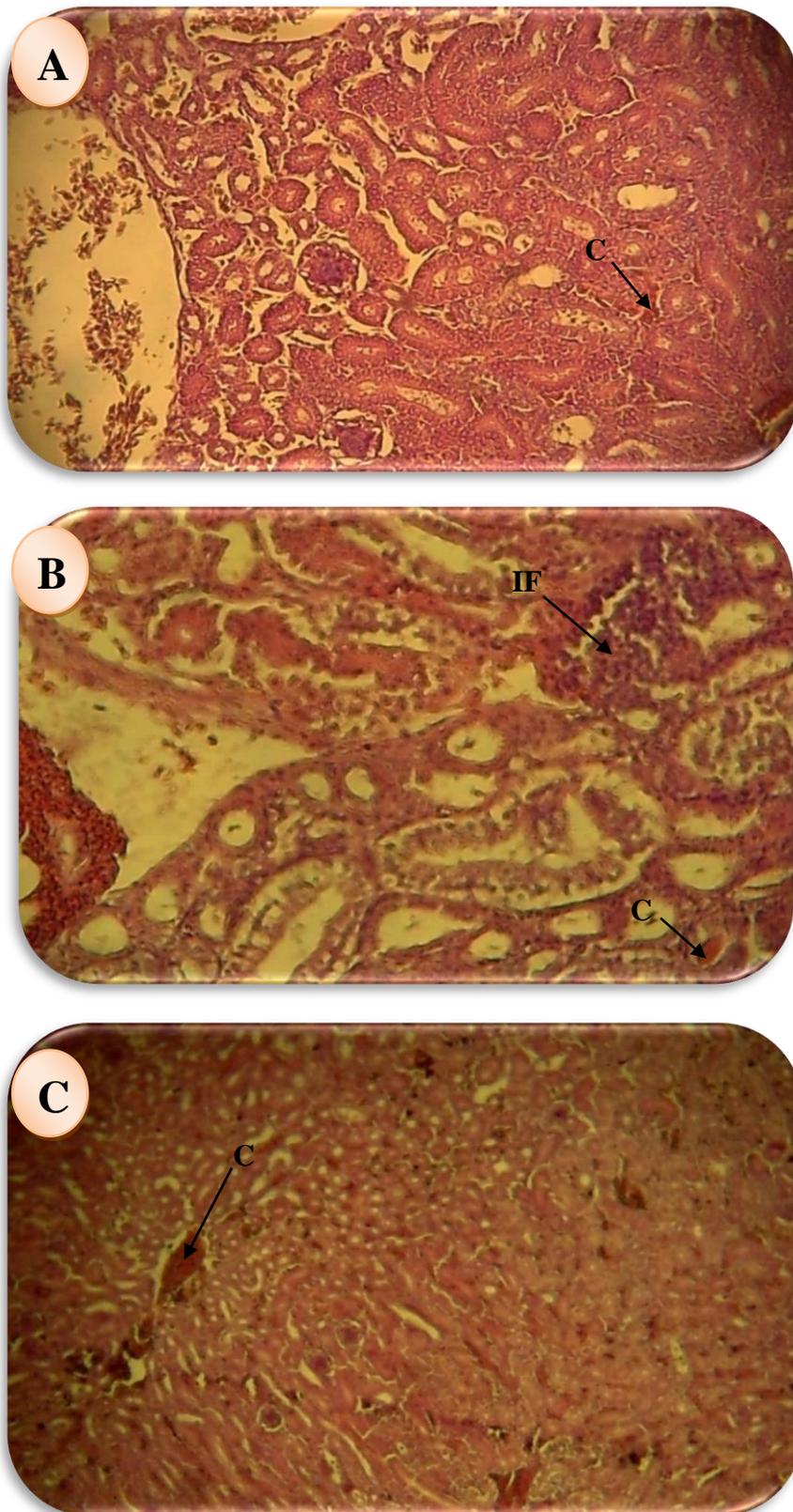


**Figure 18:** Variation des valeurs de la masse relative des organes. T: lot témoin; EAq: lot traité par l'extrait aqueux; EBr : lot traité par l'extrait brut. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM. *ns*: non significatif

## 5.5. Histopathologie des organes (foie et reins)

### 5.5.1. Etude histologique des reins

- Lot témoin (T) : Parenchyme rénal parcouru par des vaisseaux sanguins congestifs, quelques amas plasmocytaires.
- Lot traité par l'extrait aqueux (EAq) : Il s'agit d'un parenchyme rénal congestif remanié par des lymphoplasmocytes groupées en amas.
- Lot traité par l'extrait brut (EBr) : Parenchyme rénal remanié par la congestion vasculaire et par quelques amas lymphoplasmocytaires (Figure 19).

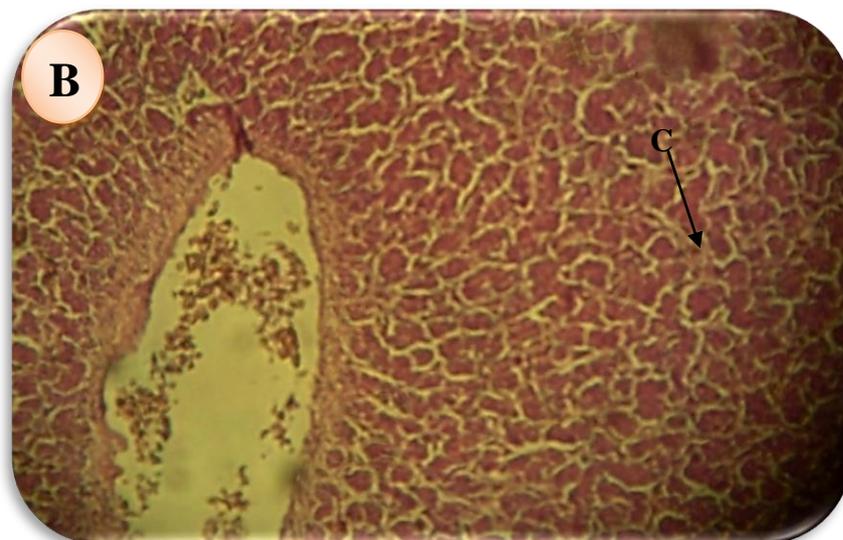
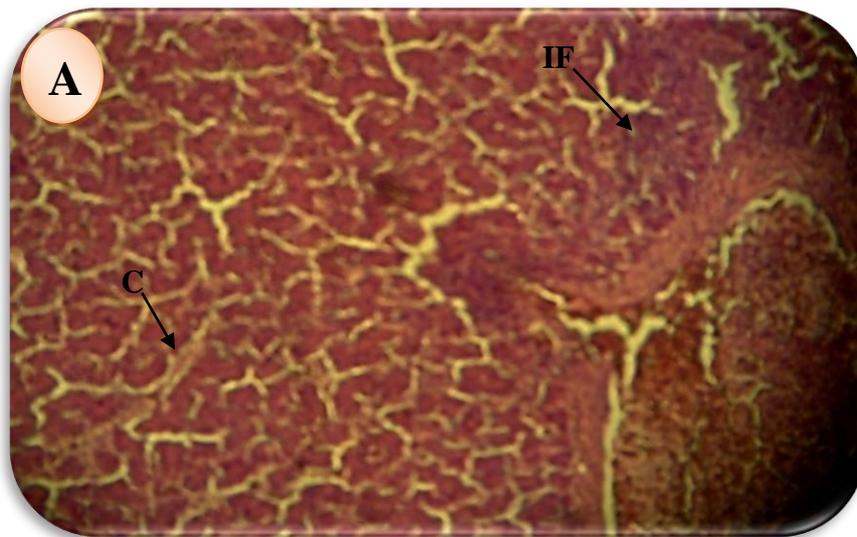


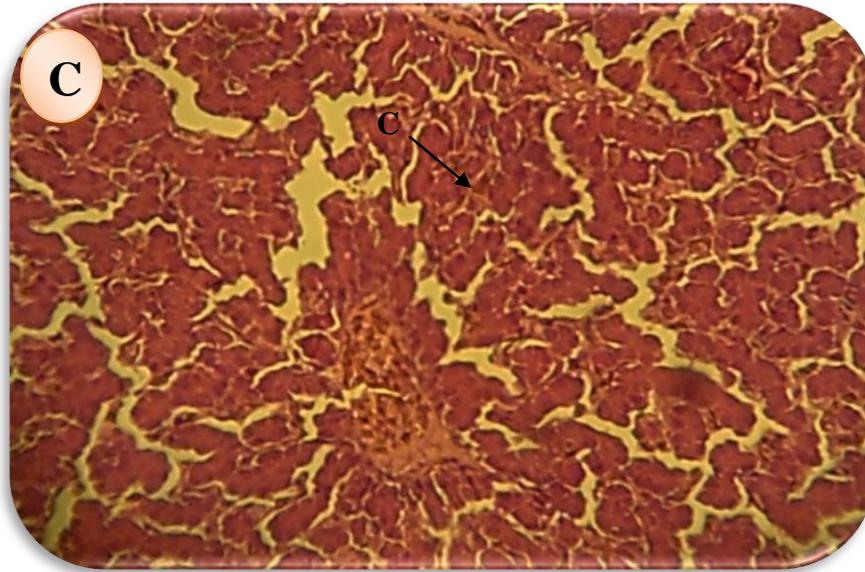
**Figure 19** : Photographies des coupes histologiques du tissu rénal des poulets. **A)** Lot témoin; **B)** Lot traité avec l'EAq; **C)** Lot traité avec l'EBr. IF: Infiltrat inflammatoire; C: Congestion. Coloration éosine hématoxyline/ Grossissement (X10).

### 5.5.2. Etude histologique de foie

L'observation des coupes histologiques de foie des trois lots expérimentaux à révélé que le parenchyme hépatique a une architecture grossièrement conservée, en effet, vers une veine centrolobulaire converge les travées radiaires de Remak. On note aussi:

- Une inflammation lobulaire subaigüe modérée représentée par des amas de lymphoplasmocytes.
- Les vaisseaux sont congestifs (Figure 20).





**Figure 20:** Photographies des coupes histologiques du tissu hépatique des poulets. **A)** Lot témoin; **B)** Lot traité avec l'EAq; **C)** Lot traité avec l'EBr. IF: Infiltrat inflammatoire; C: Congestion. Coloration éosine hématoxyline/ Grossissement (X10).

Les coupes histologiques du tissu hépatique et rénal des poulets traités n'ont pas montré de changements remarquables par rapport à ceux des poulets témoins. Ces résultats sont en conformité avec les analyses biochimiques effectuées.

Les résultats obtenus nous permettent de constater que le changement dans les tissus hépatiques et rénaux des poulets n'est pas dû à l'administration des deux extraits de la plante étudiée car il a été remarqué aussi au sein du lot témoin.

L'évaluation de la toxicité d'un extrait de plante était dans le but de déterminer ses effets néfastes sur le consommateur. Car certains composés phytochimiques peuvent interférer dans la toxicité des plantes médicinales. La toxicité peut être inhérente des composées de la plante ou elle se développe pendant le processus d'extraction (Barros *et al.*, 2005).

Récemment, beaucoup d'attention a été concentrée sur le développement des alternatives au test DL50 classique pour réduire le nombre des animaux utilisés ou améliorer les procédures pour rendre le test moins stressant. L'OCDE a adopté plusieurs méthodes alternatives pour déterminer la toxicité aiguë par voie orale. La procédure à dose fixe ne fournit pas une estimation ponctuelle de la DL50 mais elle permet d'identifier l'ampleur du danger des produits chimiques (Cunny et Hodgson, 2004).

L'incorporation des extraits de *Abies numidica* dans la ration alimentaire n'a pas eu d'effets négatifs sur l'état de santé général des poulets. Ce qui suggère que les deux extraits de la plante ne présentent aucune toxicité.

## 6. Effet de l'incorporation des extraits de *Abies numidica* sur la croissance des poussins chair (*in vivo*)

### 6.1. Les performances de croissance

Les résultats de l'effet de la supplémentation en extraits aqueux, et brut de *A. numidica* sur l'évolution des paramètres de croissance (gain de poids, la consommation alimentaire et l'indice de consommation) chez les poussins de chair sont présentés dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Effet de l'inclusion d'extraits de *A. numidica* sur les paramètres de croissance des poulets.

Paramètres	T	EAq2	EAq4	EBr2	EBr4	P
<b>Poids initial, g</b>						
1j	35.22±0.75	35.1±1.001	35.1±0.93	36.37±0.83	36.34±0.91	ns
<b>Gain de poids, g</b>						
1-7 j	44.49±2.5 <sup>ab</sup>	53.89±2.3 <sup>bc</sup>	40.98±3.3 <sup>a</sup>	52.06±2.3 <sup>abc</sup>	60.85±2.9 <sup>c</sup>	***
8-14 j	108.85±4.3 <sup>a</sup>	94.26±3.04 <sup>ab</sup>	90.34±5.4 <sup>b</sup>	108.38±3.4 <sup>a</sup>	105.58±3.7 <sup>ab</sup>	**
15-21 j	125.58±7.48	100.89±1.72	127.14±5.69	109.09±7.83	124.78±9.32	*
<b>Consommation alimentaire, g</b>						
1-21 j	591.37	611.26	571.04	575.98	597.36	ns
<b>Indice de consommation, g:g</b>						
1-21j	2.12	2.45	2.21	2.14	2.05	ns

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM

a, b, c: les valeurs d'une même ligne ayant des lettres différentes sont significativement différentes. ns: non significatif.

### **Gain de poids**

A la première semaine d'âge, seul le lot nourri avec la ration 4g/kg d'extrait brut de la plante (EBr4) présente une amélioration significative ( $P < 0.05$ ) du gain de poids par rapport au lot témoin, alors que pendant la deuxième et la troisième semaine, l'incorporation de cette concentration d'extrait ne présente pas un effet significatif.

### **Consommation alimentaire**

Au cours de trois semaines de l'expérimentation, une augmentation progressive de la consommation alimentaire pour les cinq lots a été notée. Les quantités totales d'aliments consommées par les poussins de différents lot est de 591.37 g pour le lot témoin, 611.26 g, 571.04 g pour les deux lots qui ont reçu 2 g/kg et 4 g/kg de l'extrait aqueux et 575.98 g, 597.36 pour les lots recevant des rations 2 g/kg et 4 g/kg de l'extrait brut, respectivement.

Les résultats obtenus ne révèlent aucun effet significatif des différents traitements sur la consommation alimentaire des différents lots expérimentaux durant toute la période de l'essai.

### **Indice de consommation**

L'indice de consommation correspond au ratio entre la consommation alimentaire et le gain de poids. Le calcul de l'IC nous a permis de remarquer que l'EBr4 a donné le meilleur indice de consommation par rapport aux autres lots mais cette différence n'est cependant pas significative.

### **Mortalité**

Durant l'expérimentation, aucune mortalité due au traitement n'a été détectée au niveau des cinq lots expérimentaux.

Cette étude a montré que la supplémentation de 4g/kg de l'extrait brut de *Abies numidica* dans l'aliment a un effet bénéfique sur le gain de poids des poussins pendant la première semaine d'âge par rapport à l'aliment témoin, ainsi qu'une légère amélioration dans la consommation alimentaire et l'indice de consommation mais ce changement n'est pas significatif ( $P > 0.05$ ).

## 6.2. Les paramètres biochimiques du sang

L'effet de l'incorporation des extraits de la plante sur quelques paramètres biochimiques du sang est représenté dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Paramètres biochimiques sanguins des poussins.

Traitements	Paramètres biochimiques du sang			
	Glucose (g/l)	Cholestérol (g/l)	Triglycéride (g/l)	Protéines totales (g/l)
T	2.41 ±0.061	1.72±0.06 <sup>ab</sup>	0.38±0.02 <sup>a</sup>	13.6±1.94 <sup>ab</sup>
EAg2	2.46 ±0.093	1.49±0.045 <sup>a</sup>	0.96±0.150 <sup>b</sup>	12.2±1.356 <sup>a</sup>
EAg4	2.47±0.052	1.76±0.104 <sup>b</sup>	0.46±0.024 <sup>a</sup>	18.8±1.463 <sup>b</sup>
EBr2	2.43±0.032	1.73±0.034 <sup>ab</sup>	0.46±0.024 <sup>a</sup>	12±1.095 <sup>a</sup>
EBr4	2.31±0.176	1.71±0.039 <sup>ab</sup>	0.4±0.032 <sup>a</sup>	14±1.643 <sup>ab</sup>
P	<i>ns</i>	*	***	*

Les valeurs sont exprimées en Moyenne ± SEM

a, b: les valeurs d'une même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes. *ns*: non significatif

La cholestérolémie et la glycémie n'ont pas été influencées par la supplémentation alimentaire en extraits de *A. numidica*, alors que le taux des triglycérides enregistré a été significativement élevé chez les poussins ayant reçu un régime alimentaire supplémenté de 2g/kg de l'extrait aqueux.

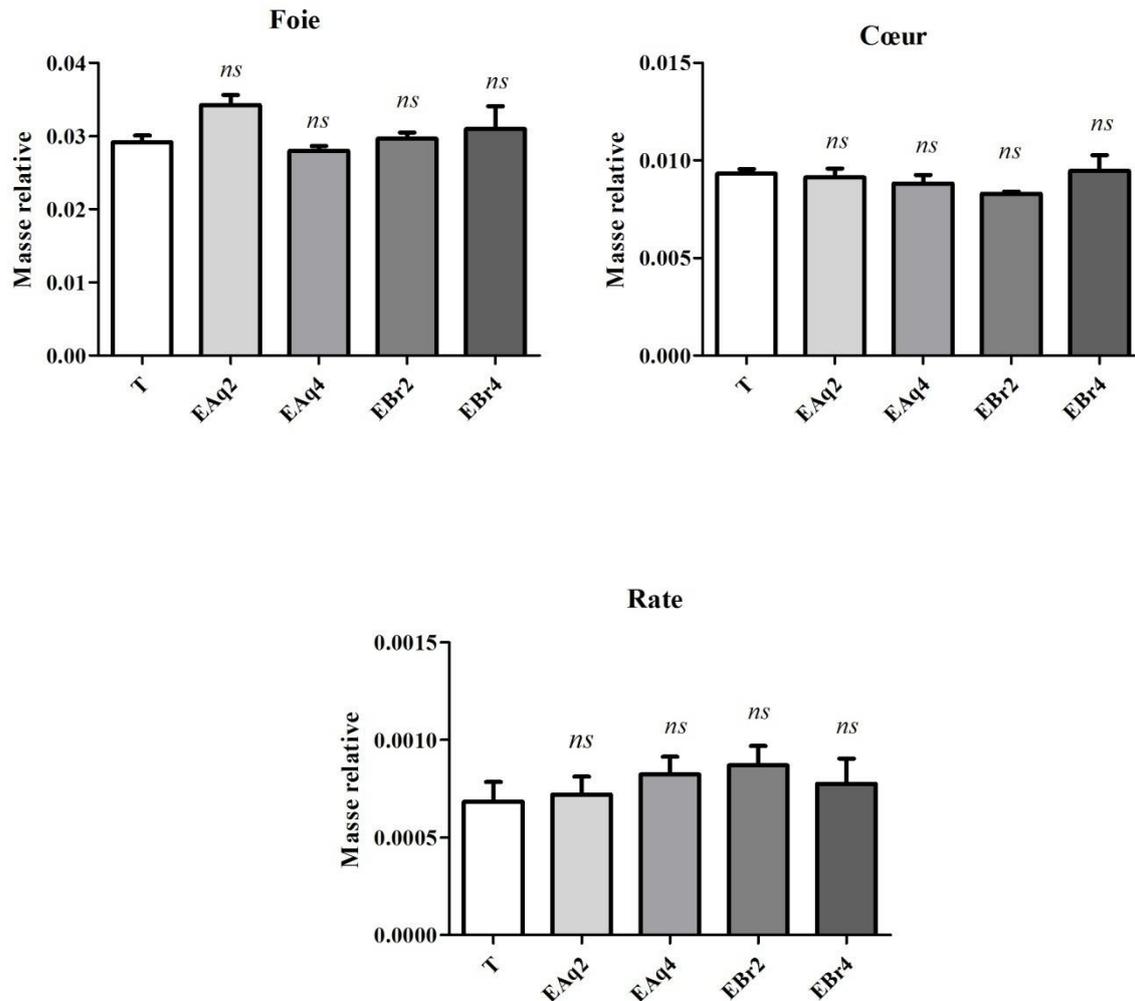
Une augmentation du taux des protéines totales a été enregistrée chez le lot EAg4 par rapport au lot EAg2 et le lot EBr2, cependant cette augmentation s'est révélée non significative ( $P > 0.05$ ) en comparaison avec le lot EBr4 et le lot témoin.

Les analyses biochimiques du sang ont montré que la glycémie et la cholestérolémie, n'ont pas été affectées par la supplémentation en extraits de plante. Alors que les concentrations de triglycéride et de protéines totales ont été augmentées par l'addition de 2 g/kg et 4 g/kg de l'extrait aqueux, respectivement.

### 6.3. La masse relative des organes

La figure 21 présente la variation de la masse relative des différents organes (Foie, reins et rate).

Les résultats de notre expérimentation ne révèlent aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) entre les masses relatives des organes prélevés des animaux.



**Figure 21:** Variation des valeurs de la masse relative des organes. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM. *ns*: non significatif

### 6.4. Effet sur la microflore caecale des poussins *in vivo*

Les bactéries sont dénombrées par les techniques classiques de dilutions décimales et ensemencement des dilutions adéquates dans des milieux gélosés puis dénombrement des colonies formées. L'effet de l'addition des extraits dans le régime alimentaire des poussins sur le nombre des bactéries est représenté dans le tableau 16.

**Tableau 16:** Nombre de population bactérienne caecale.

Traitements	Flore aérobie totale	Entérobactéries	Bactéries lactiques
T	7.06±0.36	6.33±0.06	8.37±0.16
EAq2	7.09±0.16	5.59±0.24	8.29±0.11
EAq4	6.81±0.06	5.71±0.31	8.36±0.17
EBr2	6.86±0.2	5.77±0.18	7.98±0.46
EBr4	6.75±0.15	6.11±0.2	8.02±0.09
P	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Les valeurs sont exprimées en (Moyenne ± SEM). (Log10 UFC/g). *ns*: non significatif

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que la supplémentation de différents traitements alimentaires n'a pas d'effet significatif sur le nombre de la microflore totale aérobie, des entérobactéries et des bactéries lactiques dans les caecums des poussins de chair.

Le principal mécanisme de régulation de l'écologie microbienne dans l'intestin des poulets est encore mal compris (Rubio *et al.*, 1998). Il ya eu un regain d'intérêt dans le rôle de la flore intestinale normale aérobies et anaérobies dans la protection contre l'infection par les salmonelles (Barnes *et al.*, 1980; Corrier *et al.*, 1995; Hollister *et al.*, 1999).

Une partie des composés phénoliques apportés par l'alimentation doit subir des processus de transformation bactériens avant d'être absorbé par l'animal. Ils sont généralement transformés en acides phénoliques ou lactones qui peuvent présenter des propriétés biologiques différentes, comme une activité antioxydante plus importante (Guardia, 2011). Il a été montré que le microbiote des caeca de poulet est capable d'effectuer ces biotransformations (Iqbal et Zhu, 2009a; Iqbal et Zhu, 2009b). Les lactobacilles possèdent la capacité de métaboliser les composés phénoliques qui fournissent de l'énergie aux cellules et exercent un effet positif sur le métabolisme bactérien (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008).

Comme les antibiotiques, les herbes et les produits phytogéniques pourraient contrôler et limiter la croissance et la colonisation de nombreuses espèces bactériennes pathogènes et non pathogènes dans le tractus intestinal des poulets.

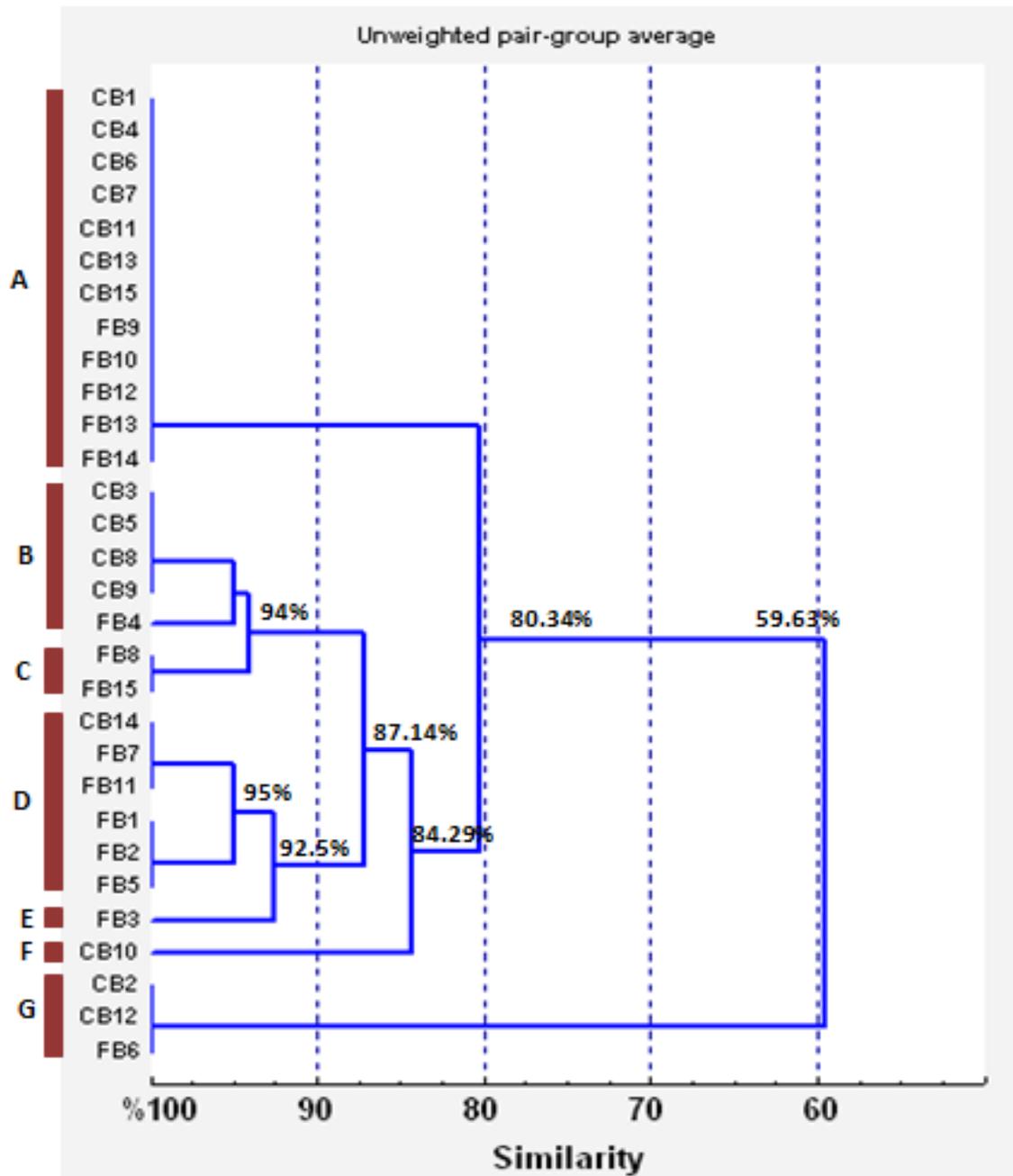
### **7. Analyse des critères phénotypiques des entérobactéries par UPGMA**

Dans cette étude, un total de 30 souches bactériennes a été isolé à partir de la matière caecale et fécale milieu Mac Conkey. L'identification préliminaire des espèces d'entérobactéries est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase. Les résultats obtenus ont révélés que l'ensemble de ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif, présentant l'activité catalasique et dépourvus d'oxydase.

L'identification biochimique des souches isolées à partir de la matière caecale et fécale des poulets a été réalisée par les galeries API 20 E, selon les recommandations de Biomerieux Marcy l'étoile France. Après incubation, la lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification ApiWeb (BioMérieux). Les résultats obtenus ont été traités par UPGMA, le dendrogramme qui en dérive est représenté par la figure 22. Les caractères biochimiques des souches d'entérobactéries contenues dans les clusters ont été représentés dans le tableau 17.

L'analyse de similarité à 80% a permis de regrouper les entérobactéries en trois clusters dominants (A, B et D) et quatre clusters mineurs (C, E, F et G).

Le cluster dominant A pour *E. coli* contient 40 % des isolats (12/30), suivi par les clusters D, B, C et E qui présentent 20% (6/30), 16.66% (5/30), 6.66% (2/30) et 3.33% (1/30), respectivement. Toutefois le cluster F qui contient une seule souche de *Kluyvera* spp. représente 3.33%. De plus, trois souches de *Klebsiella pneumoniae* (10%) ont été attribuées au cluster G.



**Figure 22:** Dendrogramme de similarité entre les trente souches d'entérobactéries pour l'ensemble des caractères phénotypiques (méthode UPGMA). A, B, C, D, E, F, G : clusters déterminés au coefficient de similarité 80%.

**Tableau 17** : Caractères biochimiques des entérobactéries de différents clusters.

	A	B		C	D		E	F	G
	<i>E. coli</i> CB1, CB4, CB6, CB7, CB11 CB13, CB15, FB9, FB10, FB12, FB13, FB14	<i>E. coli</i> CB3, CB5, CB8, CB9	<i>E. coli</i> FB4	<i>E. coli</i> FB8, FB15	<i>E. coli</i> CB14, FB7, FB11	<i>E. coli</i> FB1 FB2 FB5	<i>E. coli</i> FB3	<i>Kluyvera</i> spp. CB10	<i>K. pneumonia</i> CB2, CB12, FB6
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	+	-	+	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	-	+	+	+	+	-	-	+	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SOR	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	-	+	+	+	-	-	+	-	+
MEL	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-		+	-	-	-	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A,B,C,D,E,F,G : Les codes des clusters ; (+) : Résultat positif (-) Résultat négatif

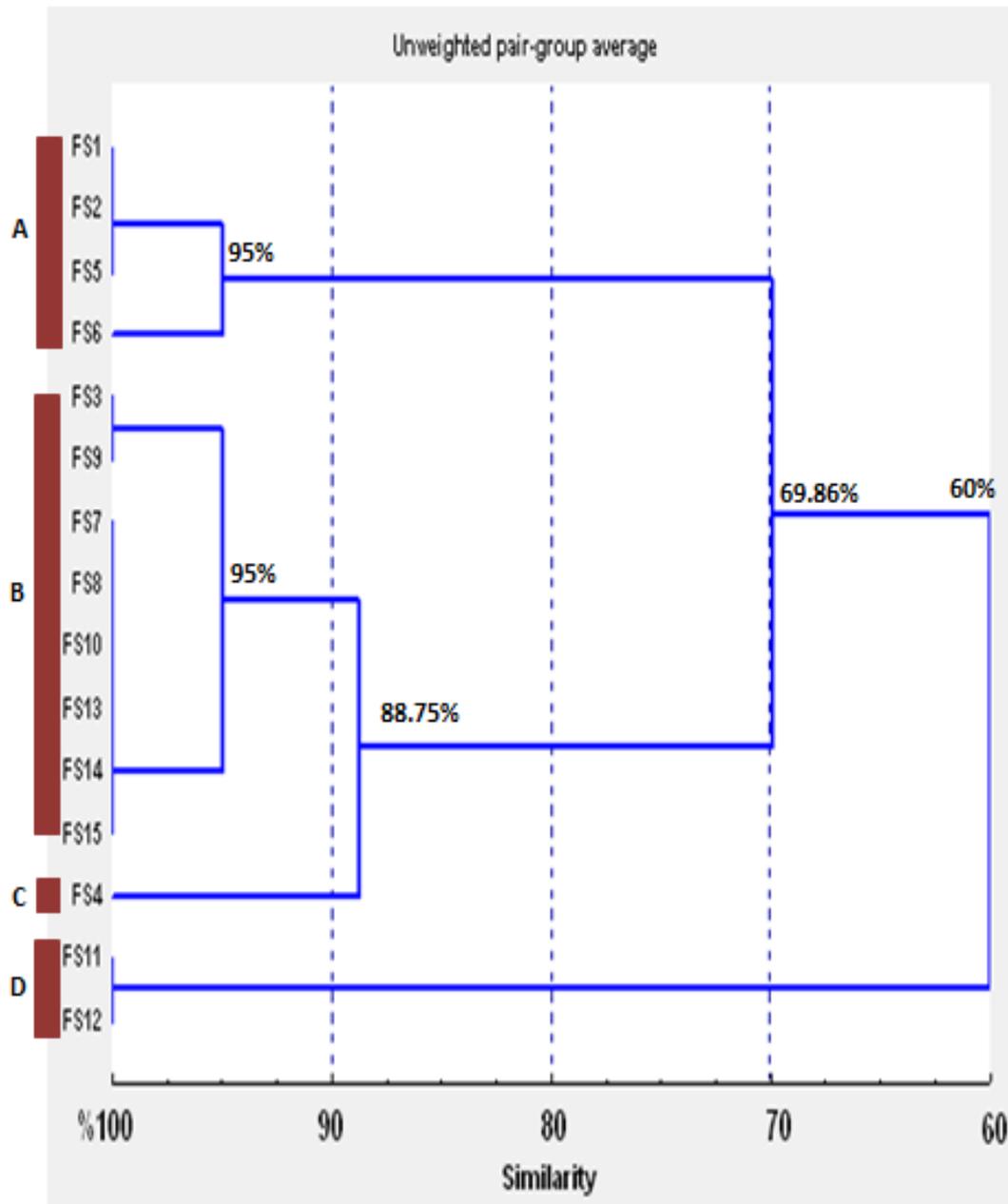
Toutes les souches isolées sont ONPG (+), lysine décarboxylase (+) et tryptophane désaminase (-). Elles ne produisent pas l'H<sub>2</sub>S et la gélatinase, et fermentent le glucose, le mannitol, le rhamnose et l'arabinose. De plus la majorité de ces souches sont urée (-) indole (+), ne produisent pas l'acétoïne et ne fermentent pas l'inositol à l'exception des souches *K. pneumoniae* (cluster G). La souche *Kluyvera* spp. appartenant au cluster F fermente la majorité des sucres sauf l'inositol et le sucrose.

### 8. Analyse des critères phénotypiques des staphylocoques par UPGMA

Quinze colonies de staphylocoques d'aspects différents ont été sélectionnées en se basant beaucoup plus sur les colonies suspectes d'être l'espèce *Staphylococcus aureus*. Sur le milieu de Chapman, les colonies de *Staphylococcus aureus* s'entourent d'un halo jaune dû à l'attaque du mannitol (Marchal *et al.*, 1987). Ce milieu permet seulement une orientation pour l'identification de *Staphylococcus aureus* et d'autres tests de confirmation sont nécessaires pour une meilleure identification. L'examen microscopique après la coloration de Gram montre des cocci à Gram positif et la disposition des cellules est soit en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Les souches de *S. aureus* isolées sont catalase positive et oxydase négative. La relation entre les souches staphylocoques identifiées par les galeries API Staph a été déterminée par l'analyse des clusters (Figure 23). A 70 % de niveau de similitude, les souches se trouvent réparties en quatre clusters:

Le premier cluster A, inclut quatre souches identifiées comme étant *Staphylococcus lentus* et qui représentent 26.66% des isolats; Le deuxième cluster B est le plus dominant (53.33%), il renferme huit souches de *Staphylococcus aureus*; Le troisième cluster C comprend une seule souche de *Staphylococcus chromogenes* (6.66%); Le dernier cluster D regroupe deux souches de *Staphylococcus xylosus* (13.33%).

Les caractères biochimiques des souches contenues dans les clusters sont représentés dans le tableau 18.



**Figure 23:** Dendrogramme de similarité entre les quinze souches de staphylocoques pour l'ensemble des caractères phénotypiques (méthode UPGMA). A,B,C,D : clusters déterminés au coefficient de similarité 70%.

**Tableau 18:** Caractères biochimiques des souches staphylocoques de différents clusters.

	A		B		C	D
	<i>S. lentus</i> FS1, FS2, FS5	<i>S. lentus</i> FS6	<i>S. aureus</i> FS3, FS9	<i>S. aureus</i> FS7, FS8, FS10, FS13, FS14, FS15	<i>S. chromogenes</i> FS4	<i>S. xylosus</i> FS11, FS12
<b>0</b>	-	-	-	-	-	-
<b>GLU</b>	+	+	+	+	+	+
<b>FRU</b>	+	+	+	+	+	+
<b>MNE</b>	+	+	+	+	+	-
<b>MAL</b>	+	+	+	+	+	-
<b>LAC</b>	+	+	+	+	+	-
<b>TRE</b>	+	+	+	+	+	+
<b>MAN</b>	+	+	+	+	+	-
<b>XLT</b>	-	-	-	-	-	-
<b>MEL</b>	+	+	-	-	-	-
<b>NIT</b>	+	+	+	+	+	+
<b>PAL</b>	+	+	+	+	+	+
<b>VP</b>	-	-	+	+	-	+
<b>RAF</b>	+	+	-	-	-	-
<b>XYL</b>	+	+	-	-	-	+
<b>SAC</b>	+	+	+	+	+	-
<b>MDG</b>	-	+	-	-	-	-
<b>NAG</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ADH</b>	-	-	+	+	+	-
<b>URE</b>	-	-	-	+	+	+

A,B,C,D : Les codes des clusters ; (+) : Résultat positif (-) Résultat négatif

Les souches staphylocoques des différents clusters possèdent les caractères communs suivants : fructose (+) tréhalose (+), xylitol (-), phosphatase alcaline (+), et la réduction des nitrates en nitrite. Les souches *S. lentus* FS1, FS2 et FS5 appartenant au cluster A permettent l'acidification de la majorité des sucres à l'exception de xylitol que les autres souches des clusters B, C et D ne peuvent pas le transformer, elles ne possèdent pas l'uréase et l'arginine dihydrolase. Les souches *S. aureus* (cluster B) ont les mêmes caractères à l'exception des souches FS3 et FS9 qui sont uréase (-). Les souches *S. xylosus* FS11 et FS12 (cluster D) sont incapables de transformer la plus part des sucres en comparaison avec les souches des autres clusters, elles sont aussi caractérisées par la présence de l'uréase. La souche FS4 (*S. chromogenes*, cluster C) présente le même profil que *S. aureus*, toutefois, elle est VP (-) et NAG (-).

### 9. Identification des souches d'entérocoques

Dix souches entérocoques ont été isolées et purifiées sur le milieu bile esculine. La tolérance à la bile et la capacité d'hydrolyser l'esculine à l'esculetine constitue un test fiable pour l'identification des entérocoques (Chuard et Reller, 1998). La couleur noire qui apparaît autour des colonies après 18 - 24 heures d'incubation à une température de  $35 \pm 2$  ° C indique une réaction positive (Figure 24). L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram a montré des cocci à Gram positif. Le test catalase révèle que ces isolats sont dépourvus de catalase.



**Figure 24** : Aspect des colonies entérocoques sur milieu bile esculine.

## **10. Sensibilité des souches isolées aux antibiotiques**

### **10.1. Croissance des entérobactéries en présence d'antibiotiques**

La résistance des souches des entérobactéries vis-à-vis 8 antibiotiques a été testée et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 19.

La majorité des souches sont fortement inhibées par la céphixime, la céphotaxime et la céfazoline à l'exception de trois souches isolées à partir de la microflore caecale qui présentent une résistance à la céfazoline et une sensibilité intermédiaire aux deux autres antibiotiques. La fréquence de résistance des entérobactéries à l'amoxiciline est très élevée.

Toutes les souches d'entérobactéries isolées gardent une forte sensibilité au chloramphénicol et à la gentamicine et présentent une résistance totale à l'oxacilline.

**Tableau 19.** Antibiogramme des entérobactéries isolées.

Isolats	CFM	C	AMX	CTX	OX	CL	CZ	GEN
CB1	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 2	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 3	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 4	S	S	R	S	R	R	S	S
CB 5	I	S	R	I	R	S	R	S
CB 6	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 7	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 8	I	S	R	I	R	S	R	S
CB 9	S	S	R	I	R	S	R	S
CB10	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 11	S	S	R	S	R	R	S	S
CB 12	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 13	S	S	R	S	R	S	S	S
CB 14	S	S	S	S	R	S	S	S
CB 15	S	S	R	S	R	S	S	S
FB1	S	S	R	S	R	S	S	S
FB2	S	S	R	S	R	S	S	S
FB3	S	S	R	S	R	S	S	S
FB4	S	S	R	S	R	S	S	S
FB5	S	S	R	S	R	S	S	S
FB6	S	S	R	S	R	S	S	S
FB7	S	S	R	S	R	S	S	S
FB8	S	S	R	S	R	S	S	S
FB9	S	S	R	S	R	S	S	S
FB10	S	S	R	S	R	S	S	S
FB11	S	S	S	S	R	S	S	S
FB12	S	S	R	S	R	S	S	S
FB13	S	S	R	S	R	S	S	S
FB14	S	S	R	S	R	S	S	S
FB15	S	S	R	S	R	S	S	S

(S) : sensible (R) : résistante (I) : intermédiaire. CFM : Céphixime; C : Chloramphénicol; AMX : Amoxicilline; CTX : Cephotaxime; OX : Oxacilline; CL: Colistine; CZ: Céfazoline; GEN : Gentamicine.

## 10.2. Croissance des staphylocoques en présence d'antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches staphylocoques isolées aux antibiotiques a montré des profils variables. Les résultats de l'antibiogramme sont représentés dans le tableau 20.

**Tableau 20:** Antibiogramme des staphylocoques isolées.

Isolats	P	RP	C	OX	GEN
FS 1	R	R	S	R	S
FS 2	R	R	S	R	S
FS 3	R	R	S	R	S
FS 4	R	R	S	R	S
FS 5	R	R	S	R	R
FS 6	S	R	R	R	S
FS 7	R	R	R	R	S
FS 8	R	S	S	R	S
FS 9	R	R	S	R	S
FS 10	S	S	S	S	S
FS 11	R	R	I	R	R
FS 12	R	R	I	R	R
FS 13	R	S	S	R	S
FS 14	R	S	S	R	S
FS15	R	S	S	R	S

(S) : sensible (R) : résistante (I) : intermédiaire

P : Pénicilline G ; RP : Pristinamycine ; C : Chloramphénicol; OX : Oxacilline; GEN : Gentamicine.

Les résultats obtenus des tests de résistance des souches des staphylocoques isolées aux antibiotiques montrent une forte résistance à la pénicilline G, la pristinamycine et l'oxacilline Par contre la gentamicine et le chloramphénicol ont une activité inhibitrice élevée et montrent une meilleure efficacité sur la majorité des souches.

### 10.3. Croissance des entérocoques en présence d'antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme de l'ensemble des souches entérocoques isolées sont présentés dans le tableau 21.

**Tableau 21:** Antibiogramme des entérocoques isolées.

Isolats	Amp	RP	S	OX	C	RA	K
FC1	R	R	R	R	S	R	R
FC2	R	R	R	R	S	R	R
FC3	R	R	R	R	S	R	R
FC4	R	R	R	R	S	R	R
FC5	R	R	R	R	S	R	R
FC6	R	R	R	R	S	R	R
FC7	R	R	R	R	S	R	R
FC8	R	R	R	R	S	R	R
FC9	R	R	R	R	S	R	R
FC10	R	R	R	R	S	R	R

(S) : sensible (R) : résistante

Amp : Ampicilline; RP : Pristinamycine ; S : Streptomycine; OX : Oxacilline; C: Chloramphénicol; RA: Rifampicine ; K: Kanamycine.

D'après ces résultats, on remarque que toutes les souches d'entérocoques isolées sont résistantes à l'oxacilline, la pristinamycine et aux aminosides et sont toutes sensibles au chloramphénicol.

### 11. Effet des extraits de *A. numidica* sur la microflore caecale et fécale *in vitro*

Les résultats de l'activité des extraits de *A. numidica* sur les souches des entérobactéries, des staphylocoques et d'entérocoques isolés à partir de la matière caecale et/ou fécale des poulets de chair sont représentés dans le tableau 22.

**Tableau 22:** Effet des extraits de *A. numidica* sur la microflore caecale et fécale *in vitro* (Diamètres des zones d'inhibition (mm), CMI et CMB).

Isolats	Extrait aqueux				Extrait brut			
	Zone d'inhibition		CMI mg/mL	CMB mg/mL	Zone d'inhibition		CMI mg/mL	CMB mg/mL
	100 mg/mL	200 mg/mL			100 mg/mL	200 mg/mL		
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kluyvera</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. xylosum</i>	11.53± 0.37	11.68± 0.71	12.5	50	11.96± 0.19	13.32± 0.56	6.25	50
<i>S. lentus</i>	10	12	1.56	25	11.00	12	1.56	25
<i>S. chromogenes</i>	9.16 ± 0.2	10.83± 0.41	-	-	10.00± 1.73	10.66± 1.15	-	-
<i>S. aureus</i>	10.73± 0.43	13.40± 1.21	12.5	25	12.80± 1.20	16.83± 0.55	6.25	25
<i>Enterococcus</i> sp.	-	-	-	-	9.53± 0.47	7.88± 0.12	-	-

(-) : Absence de la zone d'inhibition.

Les résultats de l'activité antibactérienne révèlent une résistance des entérobactéries isolées à l'extrait aqueux et l'extrait brut, où aucune zone d'inhibition n'a été détectée (tableau 22). Cependant, ils ont inhibé la croissance des souches staphylocoques (bactérie à Gram positif). Cette inhibition varie d'une espèce à une autre.

Malgré de nombreuses études *in vitro* ayant démontré les propriétés antimicrobiennes des polyphénols, de nombreux champignons, bactéries, et levures sont assez résistants à ces composés (Arunachalam *et al.*, 2003).

Le mécanisme de l'effet antimicrobien des polyphénols est peu connu actuellement. Ils peuvent avoir des actions bactéricides ou bactériostatiques, ou agir en inhibant l'adhésion des bactéries qui causent l'infection des cellules du tractus intestinal (Viveros *et al.*, 2011).

## DISCUSSION GENERALE

Ces dernières décennies, l'utilisation des plantes médicinales comme alternatives des substances chimiques a reçu un grand intérêt dans les divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et en industrie alimentaire. Cependant les données scientifiques sur les activités biologiques des plantes médicinales qui poussent en Algérie sont encore insuffisantes. De ce fait, le sapin endémique de l'Algérie a été choisi dans cette étude.

Dans ce travail, deux extraits ont été préparés à partir de la poudre des aiguilles de *A. numidica*, le premier est obtenu par décoction dans l'eau distillée (EAq) et l'autre par macérations successives dans un mélange méthanol et eau distillée (EBr). Le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange sont les meilleurs solvants pour la récupération des composés phénoliques (Bouزيد *et al.*, 2011), c'est la raison pour laquelle ces solvants ont été choisis. Le rendement des extraits a été de 23.15% et 25.27% pour l'EAq et l'EBr, respectivement. Cette différence de rendement est expliquée par le fait que le méthanol est capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction des composés polaires et aussi les composés de faible polarité (Seidel, 2005).

L'estimation quantitative des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu) et des flavonoïdes totaux (par la méthode au trichlorure d'aluminium) a montré que l'extrait hydroalcoolique des aiguilles de *Abies numidica* est plus riche en ces composés. Par contre, la teneur en tanins condensés est plus élevée dans l'extrait aqueux.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux techniques. La première technique était la méthode de DPPH, qui est très simple, facile et sensible pour la détermination de l'activité antioxydante des extraits des plantes (Koleva *et al.*, 2002). Cette étude a révélé que les extraits des aiguilles de *A. numidica* possèdent un effet piègeur vis-à-vis le radical DPPH. L'effet de l'extrait brut a été plus important que l'effet l'antioxydant de référence (BHT). Toutefois, l'extrait aqueux présente un effet prooxydant au-delà de 120 µg/mL. La deuxième technique était le test de blanchissement de la β-carotène/acide linoléique, qui est basée sur l'inhibition des composés organiques volatils et des hydroperoxydes à doubles liaisons conjuguées qui surviennent de l'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius *et al.*, 1998).

Les deux extraits ont donné une inhibition importante (83.13% et 88.46% pour l'EAq et l'EBr, respectivement) en comparant avec celle de BHT (97.7%). La différence entre les activités antioxydantes des extraits pourrait être due aux différentes polarités des solvants, et ainsi à l'extractibilité différente des composés antioxydants (Maisuthisakul *et al.*, 2007). Cette importante activité antioxydante de *A. numidica* peut être contribué à la protection des lipides alimentaires de l'oxydation. Cependant cette propriété n'a pas été bien identifiée dans l'alimentation des volailles. En outre, l'incorporation des extraits de plantes dotés de propriétés antioxydantes dans l'aliment de volailles à la place des antioxydants synthétiques demande des coûts plus élevés. Toutefois, avec les nouvelles techniques d'extraction ces coûts pourraient diminuer (Alloui, 2011).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *A. numidica* contre les souches bactériennes a révélé que les deux extraits ont présenté une activité intéressante contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Vibrio cholerae*. Alors qu'ils exercent une modeste activité voir nulle contre les souches restantes. Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits ont été évaluées pour les souches les plus sensibles et les résultats montrent que l'effet de l'EBr est plus important que l'EAq. En outre, aucune activité contre les souches fongiques testées n'a été détectée.

La microflore intestinale des volailles forment un écosystème complexe, qui varie en fonction de plusieurs facteurs, et dont il est nécessaire de le connaître pour pouvoir de l'orienter dans un but bénéfique pour l'animal et pour la santé de consommateur (Gabriel, 2005). L'alimentation est un facteur important influençant le microbiote du tractus digestif (Karasov *et al.*, 2011). Les antibiotiques facteurs de croissance ont été utilisés depuis longtemps pour accroître la rentabilité des élevages (Bories, 2001), mais face au risque potentiel de transfert de la résistance microbienne de microorganismes d'origine animale à des agents pathogènes humains, les chercheurs se sont intéressés de trouver autres alternatifs tels que les probiotiques et les phytobiotiques. Ces derniers sont des dérivés des plantes qui ont des effets positifs sur la croissance et la santé digestive des animaux (Jacela *et al.*, 2010). C'est dans cette optique que nous avons voulu étudier l'effet des extraits de *A. numidica* sur la croissance des poussins de chair, et en particulier sur la microflore caecale et fécale.

Avant d'incorporer les extraits des plants dans l'aliment, il est important d'établir qu'ils ne sont pas toxiques (Sofowara, 2010). De ce fait, la méthode décrite par l'OECD a été réalisée pour déterminer l'effet toxique des extraits étudiés. Les résultats obtenus ont montré que l'administration orale de la dose 2g. Kg<sup>-1</sup> P.C des extraits de *A. numidica* ne présente pas un effet toxique sur la santé des poulets. Cela a été confirmé par les analyses biochimiques et hématologiques, ainsi que l'examen anatomopathologique.

Afin d'évaluer l'effet de l'incorporation de l'extrait aqueux et l'extrait brut des aiguilles de *A. numidica* sur la croissance et la microflore caecale des poussins de chair âgés de 21 jours *in vivo*, un aliment témoin ne contenant aucun additif a été comparé à un aliment additionné de 2g/kg et 4g /kg de chaque extrait. Une légère amélioration dans les paramètres de croissance des poussins qui ont reçu 4g de l'extrait brut dans leur aliment a été notée. Les deux concentrations des extraits n'ont pas d'effet significatif sur le nombre de la microflore étudiée. Le manque de différence significative par rapport au régime de témoin pourrait être expliqué par le fait que les volailles ne réagissent pas à la saveur comme il a été suggéré par Moran (1982), bien qu'il ya une autre évidence qui suggère que les herbes, les épices et les divers extraits de plantes stimulent l'appétit (Kamel, 2001).

Les souches d'entérobactéries et de staphylocoques isolées à partir de la matière caecale et/ou de la matière fécale des poussins de chair ont été identifiées par les galeries biochimiques API 20E et API Staph, respectivement. Cependant, les entérocoques ont été isolés dans un milieu sélectif et d'autres tests de confirmation ont été réalisés. L'étude de la sensibilité des bactéries isolées aux antibiotiques a montrée des profils variables. Le chloramphénicol exerce un effet inhibiteur sur la totalité des souches Gram positif et Gram négatif. Néanmoins, ces souches ont montré une résistance aux pénicillines utilisées.

L'évaluation de l'activité de deux concentrations de l'extrait aqueux et de l'extrait brut de *A. numidica* (100 mg/mL et 200 mg/mL) contre les souches isolées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé a révélé que ces extraits n'ont pas d'effet contre les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *kluuvera* spp.) et les entérocoques isolées. Toutefois, ils ont présenté une activité inhibitrice contre les souches staphylocoques (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus*). Nos résultats sont en accord avec la majorité des études concernant l'effet antibactérien des extraits de plantes sur la microflore intestinale des volailles *in vitro*, et qui ont montré une grande sensibilité des bactéries à Gram positif en comparaison avec les

bactéries à Gram négatif (Zaika, 1988; Ceylan et Fung, 2004 ; Viveros *et al.*, 2011). Cela ne signifie pas que les extraits de plantes n'ont pas d'effet sur les bactéries à Gram négatif, mais peut être qu'il est nécessaire d'utiliser des doses plus élevées (Alloui, 2011).

*Conclusion*

## Conclusion

L'objectif de notre travail était triple. Dans un premier temps, nous voulions évaluer la teneur de l'extrait aqueux (EAq) et l'extrait brut (EBr) des aiguilles de *A. numidica* en polyphénols, en flavonoides et en tannins, ainsi de déterminer leur activité antioxydante et activité antimicrobienne contre des souches pathogènes *in vitro*. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la toxicité aigue de ces extraits. Enfin, nous voulions d'étudier les effets de l'EAq et l'EBr de cette plante sur la croissance des poussins de chair, ainsi que leur activité inhibitrice contre les souches caecales et fécales *in vivo* et *in vitro* en vue de leur utilisation comme phytobiotique dans l'alimentation des volailles.

Le dosage spectrophotométrique de l'extrait aqueux et l'extrait brut (hydroaloolique) a révélé que les aiguilles de cet arbre sont riches en polyphenols totaux, en flavonoides et en tannins.

L'extrait aqueux et l'extrait brut de *A. numidica* ont présenté une forte activité antioxydante en termes d'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et d'activité antiradicalaire vis-à-vis le DPPH. Cependant, l'EAq a montré une activité prooxydante à une certaine concentration.

De plus, les deux extraits de cet arbre possèdent un effet inhibiteur sur quelques souches bactériennes pathogènes. Cependant ils se sont révélés inactifs contre les souches fongiques.

L'incorporation de 4g de l'extrait brut dans l'aliment des poussins semble avoir un effet bénéfique sur le gain de poids moyen des poussins. Cette amélioration est due à l'augmentation de la consommation alimentaire, et par conséquent la diminution de l'indice de consommation. Toutefois, les deux concentrations d'extraits (2g/Kg et 4g/Kg) n'ont pas entraîné des changements significatifs sur le nombre de la flore aérobie mésophile, les entérobactéries et les bactéries lactiques qui résident dans les caecums.

Devant tous ces résultats, on peut conclure que l'extrait brut et l'extrait aqueux obtenus à partir des aiguilles de *A. numidica* pourront être impliqué dans le domaine alimentaire ou pharmaceutique.

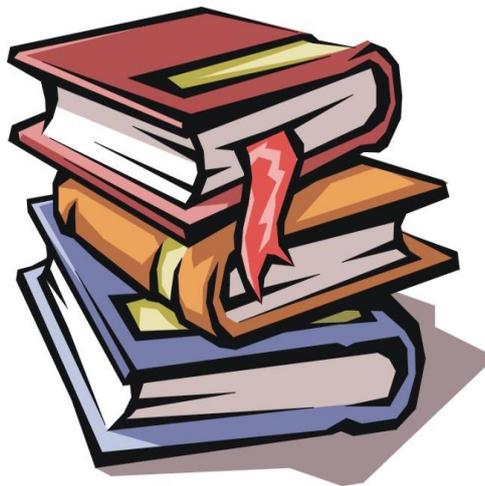
## Perspectives

La présente étude nous a permis de dégager les perspectives suivantes :

- L'activité antioxydante doit être prouvée par des études *in vivo*.
- La détermination des molécules actives qui sont responsables de ces effets.
- L'évaluation de l'activité inhibitrice des extraits de *A. numidica* doit être élargie à d'autres souches pathogènes telles que les salmonelles.
- Une identification moléculaire des souches sera plus fiable pour mieux caractériser la microflore intestinale des poulets.
- L'évaluation de l'effet des huiles essentielles des feuilles de *A. numidica* sur la microflore intestinale des volailles.

Finalement, il sera intéressant de poursuivre cette recherche sur une période plus importante et sur un effectif plus important de poulets de chair et avec d'autres concentrations d'extraits afin d'avoir des résultats plus précis sur l'effet de l'incorporation des extraits des aiguilles de *A. numidica* sur les paramètres de croissance et sur la microflore intestinale.

# *Références bibliographiques*



- Aderemi, F.A. 2004. Effects of replacement of wheat bran with cassava root sieviate supplemented or unsupplemented with enzyme on the haematology and serum biochemistry of pullet chicks. *Tropical Journal of Animal Science*, 7, 147-153
- Alamargot, J. 1982. L'appareil digestif et ses annexes. In: Manuel d'anatomie et d'autopsie aviaires. Le point vétérinaire. pp. 15-32
- Alan, L. & Miller, N.D. 1996. Antioxidant flavonoids : Structure, function and clinical usage. *Alternative Medicine Review*, 1, 103-111
- Alloui, M.N. 2011. Les phytobiotiques comme alternative aux antibiotiques promoteurs de croissance dans l'aliment des volailles. *Livestock Research for Rural Development*, 23,133
- Amaral, A.C.F., Kuster, R.M., Gonçalves, J.L.S., & Wigg, M.D. 1999. Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia*, 70, 293-295
- Angelovicova, M. 1996. The effect of *Streptococcus faecium* m-74 based probiotic on the performance of laying hens. *Zivocisna vyroba*, 41, 391-395
- Arunachalam, M., Raj, M.M., Mohan, N., & Mahadevan, A. 2003. Biodegradation of catechin. *Proceeding-Indian National Science Academy*, 69, 353-370
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adigüzel, A., Sahin, F., & özkan, H. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea.*, *Dermatocarpon miniatum.*, *Everinia divaricata.*, *Evernia prunastri.*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology*, 44, 247-252
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., inkas , M., uycky, M., & Gazin, M. 1996. Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-forschung.*, 46, 1086-1094
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaoma, M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food and chemical toxicology*, 46, 446-475
- Barnes, E. 1982. Salmonella colonisation of the chick. *Poultry World*, 135, 21

- Barnes, E.M., Impey, C.S., & Cooper, D.M. 1980. Competitive exclusion of salmonellas from the newly hatched chick. *Veterinary Record*, 106, 61
- Barouki, R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences*, 22, 266-272
- Barros, S., Ropke, C.D., Sawada, T.C.H., Silva, V.V.d., Pereira, S.n.M.M., & Barros, S.B.d.M. 2005. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 53-61
- Bate-smith, E.C. 1973. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12, 907-912
- Bayoub K., Baibai T., Mountassif D., Retmane A., & Soukri A. 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*, 9, 27
- Belhattab, R., Larous, L., Kalantzakis, G., Bouskou, D., & Exarchou, V. 2004. Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir*, 2, 63-69
- Ben Ammar, R., Kilani, S., Buhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben, S.M., Bhour, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., & Ghedira, K. 2007. Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*, 57, 453-460
- Bennadja, S. & Tlili Ait Kaki, Y. 2012. The Fir of Numidia: a Threatened Species. *Kastamonu University, Journal of Forestry Faculty*, 283-286
- Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., & Blanco, J. 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2953-2957
- Boisseau, J. 1993. Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. *Veterinary Microbiology*, 35, 187-192

- Bories, G. 2001. Bilan de l'utilisation des antibiotiques comme additifs dans l'alimentation animale. In : Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques. INRA, Paris. pp 123-124
- Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C., & Ayachi, A. 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of extract of *Crataegus monogyna* (hawthorn). *Lebanese Science Journal*, 12, 59-69
- Brenes, A. & Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 1-14
- Brielmann, H.L., Setzer, W.N., Kaufman, P.B., Kirakosyan, A., & Cseke, L.J. 2006. Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. In: Natural Products From Plants, CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 1-49.
- Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Techniques & Documentation. Lavoisier. Paris. 915p
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques & Documentation. Lavoisier. Paris. 1120p
- Cabuk, M., Bozkurt, M., Alçiçek, A., Akbab, Y., & Küçükyılmaz, K. 2006. Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. *South African Journal of Animal Science*, 36, 135-141
- Carman, R.J. & Woodburn, M.A. 2001. Effects of low levels of ciprofloxacin on a chemostat model of the human colonic microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33, 276-284
- Ceylan, E. & Fung, D. Y. C. 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 12, 1-55.
- Cheers, G. & Burnie, G. 2005. Botanica : encyclopédie de botanique & d'horticulture : plus de 10000 plantes du monde entier. Editions Place des victoires. Paris. 1020p
- Christopher, T.A., Lopez, B.L., Yue, T.L., Feuerstein, G.Z., Ruffolo R.R., J.r., & Ma, X.L. 1995. Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor blocker, vasodilator and free-radical scavenger,

exerts an anti-shock and endothelial protective effect in rat splanchnic ischemia and reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273, 64-71

Chuard, C. & Reller, L.B. 1998. Bile-Esculin Test for Presumptive Identification of Enterococci and Streptococci: Effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1135-1136

Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., & Lin, Y. 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 421-464

Corpet, D.E., Lumeau, S., & Corpet, F. 1989. Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 535-540

Corrier, D.E., Nisbet, D.J., Scanlan, C.M., Hollister, A.G., & Deloach, J.R. 1995. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poultry Science*, 74, 916-924

Cosentino, S., Tuberoso, C.I., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135

Crozier, A., Clifford, M.N., & Ashihara, H. 2006. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 384p

Cunny, H. & Hodgson, E. 2004. Toxicity Testing. In: A Textbook of Modern Toxicology. John Wiley & Sons, Inc. pp. 351-397

Cuppett, S.L. & Hall, C.A.I. 1998. Antioxidant activity of the *Labiatae*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 42, 245-271

Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van-Beek, T.A., & Linssen, P.H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedure from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the science of food and agriculture*, 77, 140-146

Delteil, L. 2012. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage. Educagri éditions. Dijon. pp. 86-87

- Denbow, D. M. 1999. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Sturkie's Avian Physiology. Academic Press. San Diego. pp. 299-325
- Dewdney, J.M., Maes, L., Raynaud, J.P., Blanc, F., Scheid, J.P., Jackson, T., Lens, S., Verschueren, C. 1991. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 29, 477-483
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L.K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.M., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G.B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., & Pillai, D.R. 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 48-54
- El Gharras, H. 2009. Polyphenols: Food sources, properties and applications- a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2512-2518
- Erener, G., Altop, A., Okak, N., Aksoy, H.M., Cankaya, S., & Ozturk, E. 2010. Influence of black cumin seed (*Nigella sativa* L.) and seed extract on broilers performance and total coliform bacteria count. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5, 128-135
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., & Boskou, D. 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5294-5299.
- 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. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- Fauchère, J.L. & Avril, J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses. 365p
- Fontaine, E. 2007. Radicaux libres. In: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer Paris. pp. 251-257
- Frank, C.L., Lhuguenot, L., & Rivière, R. 1992. Toxicologie: données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Masson. Paris. 361p

- Frankel, E.N., & Meyer, A.S. 2000. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1940.
- Fuller, R. 1977. The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, 18, 85-94
- Fuller, R. 1984. Microbial activity in the alimentary tract of birds. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 43, 55-61
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378
- Furuse, M. & Okumura, J. 1994. Nutritional and physiological characteristics in germ-free chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109, 547-556
- Gabriel, I., Mallet, S., & Sibille, P. 2005. La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal. *INRA Production Animal*, 18, 309-322
- Gadoud, R., Joseph, M.M., Jussiau, R., Lisberney, M.J., Mangeol, B., Montmeas, L., & Tarrit, A. 1992. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage. Fourcher. Paris. 286p
- Garcia-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martinez-Rodriguez, A.J., Pueyo, E., Martin-Alvarez, P.J., & Moreno-Arribas, M.V. 2008. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19, 835-841
- Gausсен, H. & Leroy H. F. 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs. Masson. Paris. 426p
- Gérard, P. & Bernalier-Donadille, A. 2007. Les fonctions majeures de microbiote intestinale. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 28-36
- Gournier-Château, N., Larpent, J.P., Castellanos, M.I., & Larpent, J.L. 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Techniques & Documentation. Lavoisier. Paris. 192p
- Guardia, S. 2011. Effets de phytobiotiques sur les performances de croissance et l'équilibre du microbiote digestif du poulet de chair. (Thèse de Doctorat). Université François – Rabelais de Tours.

- Hadjadjh, H. 1986. Contribution à l'étude de la croissance de quelques espèces résineuses introduites dans l'arboretum de Djebel Ouahch. (Thèse Ing). INA Alger
- Hakem, A., Titouche, Y., Houali, K., Yabrir, B., Malki, O., Chenouf, N., Yahiaoui, S., Labiad, M., Ghenim, H., Kechih-Bounar, S., Chirilă, F., Lapusan, A., Fit, N.I. 2013. Screening of Antibiotics Residues in Poultry Meat by Microbiological Methods. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 70, 77-82
- Harborne, J.B. 1998. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer. Netherlands. 302p
- Harris, N.D., Strong, D.H., & SUNDE, M.L. 1968. Intestinal Flora and Chicken Flavor. *Journal of Food Science*, 33, 543-457
- Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., & Drexler, H. 2003. Role of oxidative stress in arteriosclerosis. *American Journal of Cardiology*, 91, 7-11
- Hatano, D., Edamatsu, R., & Mori, A. 1989. Effects of interaction of tannins with coexisting substances. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3-6
- Hodges, R.D. 1974. The digestive System. In: *The histology of the fowl*. Academic Press Inc. pp. 35-108
- Hollister, A.G., Corrier, D.E., Nisbet, D.J., & Deloach, J.R. 1999. Effects of chicken-derived cecal microorganisms maintained in continuous culture on cecal colonization by *Salmonella typhimurium* in turkey poults. *Poultry Science*, 78, 546-549
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., & arris, C.C. 2003. Radical causes of cancer. *Nature*, 3, 276-285
- Iqbal, M.F. & Zhu, W.Y. 2009a. Bioactivation of flavonoid diglycosides by chicken cecal bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 295, 30-41
- Iqbal, M.F. & Zhu, W.Y. 2009b. Characterization of newly isolated *Lactobacillus delbrueckii*-like strain MF-07 isolated from chicken and its role in isoflavone biotransformation. *FEMS Microbiology Letters*, 291, 180-187

Iserin, P. 2001. Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins. Larousse. Paris. 335p

Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 444-450

Jacela, J.Y., DeRouchey, J.M., Tokach, M.D., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Renter, D.G. & Dritz, S.S. 2010. Feed additives for swine: Fact sheets – prebiotics and probiotics, and phytogenics. *Journal of Swine Health and Production*, 18, 132-136

Jaya Chandra, T. & Subha Mani, P. 2011. A study of 2 rapid tests to differentiate Gram positive and Gram negative aerobic bacteria. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1, 84-85

Kamel, C. 2001. Tracing methods of action and roles of plant extracts in non-ruminants. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press. Nottingham, UK. pp: 86-104

Karadas, F., Grammenidis, E., Surai, P.F., Acamovic, T., & Sparks, N.H. 2006. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*, 47, 561-566

Karaman, I., Sahin, F., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., & Adiguzel, A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 231-235

Karasov, W.H., Martinez del Rio, C., & Caviedes-Vidal, E. 2011. Ecological physiology of diet and digestive systems. *Annual Review of Physiology*, 73, 69-93

Kesteman, A.S. 2009. Influence des facteurs associés à une antibiothérapie de type métaphylactique sur les relations pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) des antibiotiques. Conséquences sur les schémas posologiques et sur l'émergence de résistance. (Thèse de Doctorat). Université de Toulouse.

Khan, T.A., & Zafar, F. 2005. Haematological study in response to varying doses of estrogen in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science*, 4, 748-751

Khanbabaee, K., & van Ree, T. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18, 641-649

- King, A., & Young, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of American Dietetic Association*, 99, 213-218
- Klasing, K. C. 1998. Anatomy and physiology of the digestive system. In Comparative avian nutrition. CAB International. Oxford, UK. pp. 16-19.
- Klaunig, J.E., & Kamendulis, L.M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267
- Ko, F.N., Cheng, Z.J., Lin, C.N., & Teng, C.M. 1998. Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Radical Biology and Medicine*, 25, 160-168
- Kohen, R. & Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620-650
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A. & Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochemical analysis*, 13, 8-17
- Lakić, N.S., Mimica-Dukić, N.M., Isak, J.M., & Božin, B.N. 2010. Antioxidant properties of *Galium verum* L. (Rubiaceae) extracts. *Central European Journal of Biology*, 5, 331-337
- Lan, P.T., Hayashi, H., Sakamoto, M., & Benno, Y. 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiology and Immunology*, 46, 371-382
- Lapointe, G. 2004. Notions de Toxicologie. Commission de la santé et de la sécurité du travail. Québec, Canada. pp. 16-20
- Larbier, M. & Leclercq, B. 1992. Nutrition et alimentation des volailles. INRA Paris. France. 355p
- LeBlanc, G. A. 2010. Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey. pp. 125-136

- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I., & Hochman, A. 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40, 163-171
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., & Jiang, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771-776
- Limdi, J. & Hyde, G.M. 2003. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal*, 79, 307-312
- Loziené, K., Venskutonis, P.R., Sipailiené, A., & Labokas, J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103, 546-559
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., & Lee, M.D. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6816-6824
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K., & Biro, L. 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47, 119-125
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., & Salunke, D.K. 1996. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. CRC Press. Boca Raton, Florida. 512p
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 4, 1409-1418
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49, 241-256
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79, 727-747
- Mangan, J.L. 1988. Nutritional Effects of Tannins in Animal Feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1, 209-231

- Marchal, N., Bourdon, J.L., Bimet, F. 1987. Le laboratoire de microbiologie médicale. Doin Editeurs. Paris. pp.19-23
- Marchall, W.J. & Bangert, S.K. 2004. Biochimie médicale: physiopathologie et diagnostic. Elsevier. France. pp 59-87
- Martínez-Cayuela, M. 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77, 147-161
- Maurice, N. 1997. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Lavoisier. Paris. pp. 12-14
- Maxwell, C.A. & Phillips, D.A. 1990. Concurrent Synthesis and Release of nod-Gene-Inducing Flavonoids from Alfalfa Roots. *Plant Physiology*, 93, 1552-1558
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., & Krause, D.O. 2001. Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 83-93
- Mead, G.C., Griffiths, N.M., Impey, C.S., & Coplestone, J.C. 1983. Influence of diet on the intestinal microflora and meat flavour of intensively reared broiler chickens. *British Poultry Science*, 24, 261-272
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., & Leitao, S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15, 127-130
- Middleton, E.J. & Kandaswami, C. 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1167-1179
- Mogenet, L. & Fedida, D. 2011. Rational Antibiotherapy in Poultry Farming. Ceva Santé animale. Libourne, France. 149p
- Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., & Natarajan, A. 1995. Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British Poultry Science*, 36, 799-803
- Moran, E.T.J. 1982. Comparative nutrition of fowl and swine: The gastrointestinal system. Office for Educational Practice, University of Guelph. Ontario, Canada. 235 p

- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234
- Mshvildadze, V., Favel, A., Delmas, F., Elias, R., Faure, R., Decanosidze, G., Kemertelidze, E., & Balansard, G. 2000. Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie*, 55, 325-326
- Natarajan, D., Britto, S.J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., & Perumal, G. 2005. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*--a rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 123-126
- Nijveldt, R.J., van, N.E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van, N.K., & van Leeuwen, P.A. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425
- Nowak, R. 1994. Hungary sees an improvement in penicillin resistance. *Science*, 264, 364
- Pal Yu, B. 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species . *Physiopathological Reviews*, 74, 139-155
- Pagana, K.D. Pagana, T.J. 2007. Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference. Mosby. Saint Louis. 1120p
- Panda, A.K., Reddy, M.R., Rao, S.V.R., Raju, M.V.L.N., & Praharaj, N.K. 2000. Growth, carcass characteristics, immunocompetence and response to *Escherichia coli* of broilers fed diets with various levels of probiotic. *Archiv Geflugelkunde*, 64, 152-156
- Parekh, J., Nair, R., & Chanda, S. 2005. Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. *Indian Journal of Pharmacology*, 37, 408-409
- Pengelly, A. 2004. Constituents of Medicinal Plants: An Introduction to the Chemistry and Therapeutics of Herbal Medicine. CABI. 172p
- Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., & Pagliaro, P. 2009. Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787, 781-793

- Perrin-Guyomard, A., Cottin, S., Corpet, D.E., Boisseau, J., & Poul, J.M. 2001. Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 34, 125-136
- Perrin-Guyomard, A., Poul, J.M., Laurentie, M., Sanders, P., Fernandez, A.H., & Bartholomew, M. 2006. Impact of ciprofloxacin in the human-flora-associated (HFA) rat model: comparison with the HFA mouse model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45, 66-78
- Puglia, C.D. & Powell, S.R. 1984. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environmental Health Perspectives*, 57, 307-311
- Que, F., Mao, L., & Pan, X. 2006. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, 39, 581-587
- Quezel, P. 1956. Contribution à l'étude des forêts à feuilles caduques d'Algérie. *Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, 1, 1-49
- Quezel, P. & Santa S. 1962-1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. C.N.R.S. Paris. 1170 p
- Radwan, N.L., Hassan, R.A., Qota, E.M., & Fayek, H.M. 2008. Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *International Journal of Poultry Science*, 7, 134-150
- Rajnerayanama, K., Reddy, M., Charluvadi, M.R., & Krishna, D.R. 2001. Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16
- Ramdani, M., Lograda, T., Chalard, P., & Figueredo, G. 2014. Chemical and antimicrobial properties of essential oils of *Abies numidica*, endemic species of Algeria. *International Journal of Phytopharmacology*, 5, 432-440
- Rasool Hassan, B.A. 2012. Medicinal Plants (Importance and Use). *Pharmaceutica Anal Acta*, 3, 139
- Read, M.A. 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *American Journal of Pathology*, 147, 235-237

- Reichl, F.X. 2004. Guide pratique de toxicologie. DeBoeck & Larcier. Bruxelles. pp. 4-16
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159
- Roberts, C.K. & Sindhu, K.K. 2009. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, 84, 705-712
- Rubio, L.A., Brenes, A., Setien, I., de la Asuncion, G., Duran, N., & Cutuli, M.T. 1998. Lactobacilli counts in crop, ileum and caecum of growing broiler chickens fed on practical diets containing whole or dehulled sweet lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal. *British Poultry Science*, 39, 354-359
- Saad, B., Aaizeh, H., Abu-Hijleh, G., & Said, O. 2006. Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-Based Complement and Alternative Medicine*, 3, 433-439
- Sanders, P. 2005. L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 158, 139-145
- Santiago, L. & Mayor, A. 2014. Prooxidant effect of the crude ethanolic leaf extract of *Ficus odorata* Blanco Merr. *in vitro*: It's Medical Significance. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8, 53-60
- Sari, M. 2011. Etude biologique et phytochimique de l'origan (*Origanum vulgare* L. ssp glandulosum (Desf.) Letswaart) espèce endémique d'Algérie - Tunisie. (Thèse de Doctorat). Université Ferhat Abbas-Sétif.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 13875-3883
- Scartezzini, P. & Speroni, E. 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 23-43
- Schrezenmeir, J. & DeVrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361-364
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavour compounds. *The Plant Journal*, 54, 712-732

- Seidel, V. 2005. Initial and Bulk Extraction. In: Natural products isolation. Humana Press. Totowa. pp: 27-37
- Serrano, J., Puupponen-Pimia, R., Dauer, A., Aura, A.M., & Saura-Calixto, F. 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 310-329
- Shi, R.X., Ong, C.N., & Shen, H.M. 2004. Luteolin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*, 23, 7712-7721
- Shi, R.X., Ong, C.N., & Shen, H.M. 2005. Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Research*, 65, 7815-7823
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V.K., & Shukla, S. 2009. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and chemical toxicology*, 47, 2338–2343.
- Smith, H.W. 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 89, 95-122
- Sofowara, A. 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique. Karthala. Paris. 384p
- Sokmen, A., Gulluce, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., & Sahin, F. 2004. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15, 627-634
- Sorg, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649-662
- Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Shi, J., & Kakuda, Y. 2006. Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 348-353
- Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N., & Mathe, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 200-207

- Tarloff, J.B. & Lawrence, H.L. 2004. Toxicology of the Kidney. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1200p
- Tlili-Ait Kaki, Y., Bennadja, S., & Abdelghani, D. 2012. The Therapeutic Importance of Products Extracted from the Fir Tree of Numidia (*Abies numidica*) and Research on its Antibacterial Activity. *Kastamonu University, Journal of Forestry Faculty*, 279-282
- Tlili-Ait Kaki, Y., Bennadja, S., & Chefrou, A. 2013. Revalorisation d'une essence endémique: le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Flora Mediterranea*, 23, 123-129
- Tortuero, F. & Fernandez, E. 1995. Effects of inclusion of microbial cultures in barley-based diets fed to laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 53, 255-265
- Trevoux, R., Arnal-Schnebelen, B., & Schnebelen, J. 2000. Interactions médicamenteuses Interactions entre les plantes médicinales et la médication traditionnelle. *Actualités reproduction humaine*, 8, 28-32
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84
- van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H., van der Vijgh, W., & Bast, A. 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70, 391-395
- Veldhuizen, E.J., Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L., Zweijter, C., Burt, S.A., & Haagsman, H.P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1874-1879
- Villate, D. 2001. Maladies des volailles (manuel pratique). France Agricole. 399p
- Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C., & Brenes, A. 2011. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Science*, 90, 566-578
- Watkins, B.A. & Kratzer, F.H. 1983. Effect of oral dosing of Lactobacillus strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poultry Science*, 62, 2088-2094

- Wei, A. & Shibamoto, T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1737-1742
- Windisch, W.M., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86, 140-148
- Yang, X.W., Li, S.M., Shen, Y.H., & Zhang, W.D. 2008. Phytochemical and biological studies of *Abies* species. *Chemistry and Biodiversity*, 5, 56-81
- Yazdani, D., Zainal Abidin, M.A., Tan, Y.H., amaruzaman, S., & Jaganath, I.B. 2012. Screening of phytochemical from ethnomedicinal plants in Malaysia for use against toxigenic *Aspergillus flavus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 5464-5468
- Zaika, L.L., 1988. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9, 97-118
- Zubia, M., Robledo, D., Freile-Pelegri, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the yucatan peninsula, Mexico. *Journal of applied phycology*, 19, 449-458.
- Zhu, M., Phillipson, J.D., Greengrass, P.M., Bowery, N.E., & Cai, Y. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein. *Phytochemistry*, 44, 441-447

# *Annexes*

---

## Annexe 1

### Composition des milieux de culture

#### ◆ Gélose Muller Hinton

Peptone de caséine.....	17.5 g/L
Infusion de viande de boeuf.....	2 g/L
Amidon .....	1.5 g/L
Agar .....	17 g/L
pH .....	7.4±0.2

#### ◆ Gélose bile esculine

Extrait de viande.....	3 g/L
Peptone de viande.....	5 g/L
Bile de bœuf.....	40 g/L
Citrate de fer.....	0.5 g/L
Esculine.....	1 g/L
Agar.....	15 g/L
pH .....	6.6±0.2

#### ◆ Milieu de Chapman :

Peptone bactériologique.....	10 g/L
Extrait de viande de bœuf.....	1 g/L
Chlorure de sodium.....	75 g/L
Mannitol.....	10 g/L
Rouge de phénol.....	0.025 g/L
Agar .....	15 g/L
pH.....	7.5

#### ◆ Milieu de Mac Conkey :

Peptone bactériologique.....	20 g/L
Sels biliaires.....	1.5 g/L
Chlorure de sodium .....	5 g/L
Lactose .....	10 g/L
Rouge neutre .....	0.075 g/L
Agar .....	15 g/L
pH .....	7.4±0.2

#### ◆ Gélose nutritive :

---

Peptone .....	5 g/L
Extrait de viande .....	1 g/L
Extrait de levure .....	2 g/L
Chlorure de sodium .....	5 g/L
Agar .....	15g/L
pH.....	7.4

◆ **Gélose Man Rogosa and Charp (MRS)**

Dextrose .....	20 g/L
Peptone bactériologique.....	10 g/L
Extrait de viande .....	8 g/L
Acétate de sodium .....	5 g/L
Extrait de levure .....	4 g/L
Phosphate dipotassique.....	2 g/L
Citrate d'ammonium .....	2 g/L
Tween 80 .....	1 mL
Sulfate de magnésium .....	0.2 g/L
Sulfate de manganèse .....	0.05 g/L
Agar bactériologique .....	10 g/L

## Annexe 2

**Tableau 1: Lecture des résultats de l'API 20 E.**

Test	Groupements active	Réactions/ Enzymes	Résultats	
			Positive	Négative
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényle-B-D- Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Positive	Négative
			incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orange
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
<b> CIT </b>	Sodium citrate	Utilisation de citrate	vert	Bleu-ver/orange
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H <sub>2</sub> S	incolore	Noir
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	incolore	Rose
<b> VP </b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
<b> GEL </b>	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	D-Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/vert jaune
<b>MAN</b>	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SOR</b>	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SAC</b>	D-Sucrose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	D-Mélibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	amygdalin	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	L-Arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>NO<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub></b>	GLU tube	Production de NO <sub>2</sub> réduction N <sub>2</sub> gaz	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge

## Annexe 3

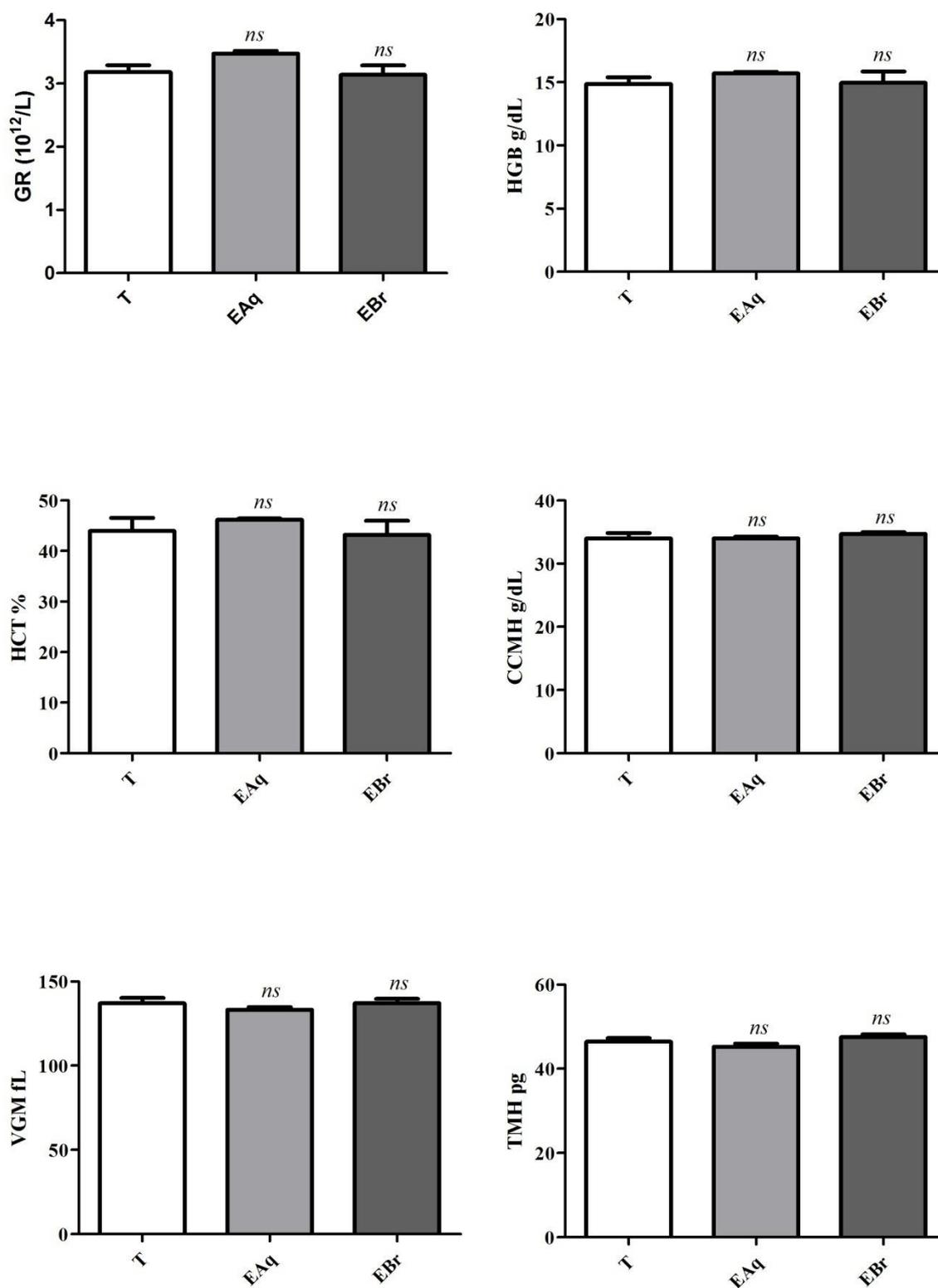
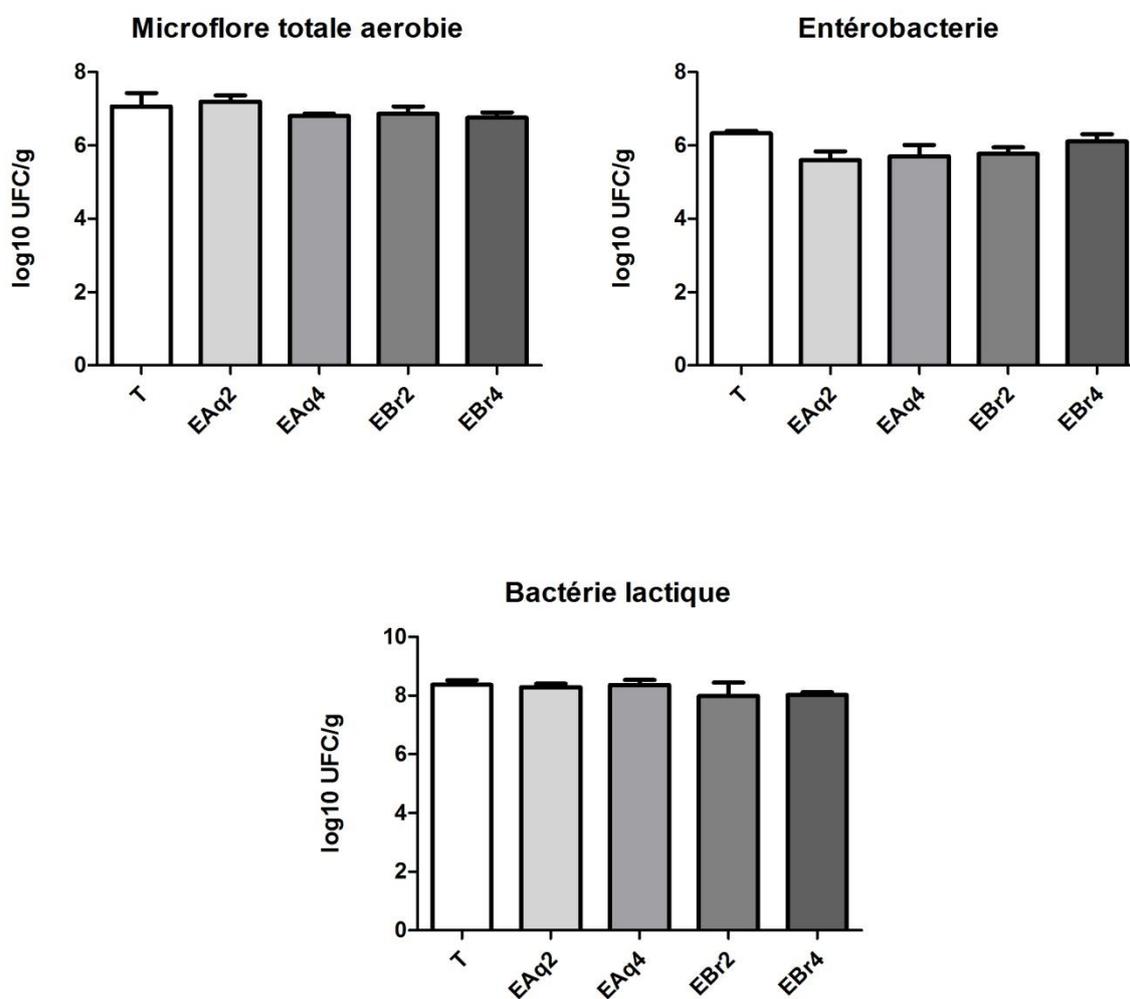


Figure : Variation des paramètres hématologiques du sang

## Annexe 4



**Figure :** Effet de l'incorporation des extraits de *A. numidica* sur le nombre de population caecale