



**HAL**  
open science

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

Angélique Travel, Rodrigo Guabiraba, Olivia Tavares, Denis Bellenot, Benjamin Lemaire, Hanh Dufat, Christine Filliat, Jean-Yves Ferré, Fabien Skiba, Margot Lamarque, et al.

### ► To cite this version:

Angélique Travel, Rodrigo Guabiraba, Olivia Tavares, Denis Bellenot, Benjamin Lemaire, et al.. Méthodologies pour choisir et caractériser des extraits de plantes et évaluer leurs activités biologiques sur l'immunité des poulets. INRAE Productions Animales, 2022, 35 (4), pp.369-390. 10.20870/productions-animales.2022.35.4.7337 . hal-03945601

**HAL Id: hal-03945601**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03945601>**

Submitted on 18 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

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

---

Angélique TRAVEL<sup>1</sup>, Rodrigo GUABIRABA<sup>2</sup>, Olivia TAVARES<sup>3</sup>, Denis BELLENOT<sup>4</sup>, Benjamin LEMAIRE<sup>4</sup>, Hanh DUFAT<sup>5</sup>, Christine FILLIAT<sup>6</sup>, Jean-Yves FERRE<sup>7</sup>, Fabien SKIBA<sup>8</sup>, Margot LAMARQUE<sup>8</sup>, Marion PERTUSA<sup>7</sup>, Laurence A. GUILLOTEAU<sup>9</sup>

<sup>1</sup>ITAVI, l'Orfrasière, 37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup>INRAE, Université de Tours, ISP, 37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup>ITAB, 75595 Paris, France

<sup>4</sup>ITEIPMAI, Melay, 49120 Chemillé-en-Anjou, France

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

<sup>6</sup>Cabinet Vétérinaire Vétopole 26, 26300 Châteauneuf-Sur-Isère, France

<sup>7</sup>SNGTV, Labovet Conseil Réseau cristal, 85505 Les Herbiers, France

<sup>8</sup>Nutricia, route de Saint Sever 40280 Haut Mauco

<sup>9</sup>INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly, France

Courriel : Laurence.Guilloteau@inrae.fr

## Résumé

Le potentiel des plantes connues pour leurs vertus médicinales suscite un grand intérêt dans un contexte mondial de réduction des risques d'antibiorésistance. Dans le cadre de la nutrition animale, l'usage des extraits de plantes se positionne dans une démarche de gestion intégrée de la santé des animaux dans le but de favoriser la construction de leur immunité et de limiter l'apparition des maladies. Le soutien des fonctions immunitaires par l'apport d'extraits de plantes est un moyen de renforcer les capacités d'adaptation des poulets, notamment chez le poussin. Pour mettre en œuvre leur usage, cela nécessite de disposer de méthodologies complémentaires, adaptées et fiables pour s'assurer de la qualité et de la valeur ajoutée fonctionnelle des extraits pour la santé des poulets. Les étapes décrites, indépendantes et complémentaires, ont permis d'élaborer et de valider une méthodologie globale, pertinente et

37 robuste pour sélectionner, caractériser et évaluer la qualité et les effets des extraits de plantes  
38 sur l'immunité des poulets en situation d'élevage. Des grilles d'analyse ont été rassemblées en  
39 un outil d'aide à la décision (CHECK'MEX). Les extraits de plantes sélectionnés comme la  
40 mélisse et le ginseng ont été testés pour évaluer leurs capacités à stimuler l'immunité innée des  
41 volailles dans des modèles cellulaires ou des modèles d'inflammation et de stress oxydant  
42 développés *ex vivo* sur cellules de poulet. Les extraits ont ensuite été évalués chez le poulet  
43 dans des conditions expérimentales proches du terrain permettant de valider leurs effets et de  
44 réaliser une analyse multicritère incluant des indicateurs de santé, de bien-être et de zootechnie.  
45 Cette démarche est applicable à tous types d'extraits de plantes et elle peut être adaptée pour  
46 d'autres espèces animales ou d'autres effets biologiques.  
47

## 48 **Abstract**

49 ***Methodologies for selecting and characterizing plant extracts and evaluating their biological***  
50 ***activities on the immunity of chickens.*** The potential of plants known for their medicinal  
51 virtues is of great interest in a global context of reducing the risks of antibiotic resistance. In  
52 the context of animal nutrition, the use of plant extracts is part of an integrated management  
53 approach to animal health, with the aim of promoting immunity and limiting the onset of  
54 disease. The support of immune functions by the contribution of plant extracts is a way to  
55 reinforce the adaptation capacities of chickens, especially in the chick. To implement their use,  
56 this requires adapted and reliable complementary methodologies to ensure the quality and the  
57 functional added value of the extracts for the health of the chickens. The described steps,  
58 independent and complementary, allowed to elaborate and validate a global, relevant and robust  
59 methodology to select, characterize and evaluate the quality and the effects of plant extracts on  
60 the immunity of chickens in rearing situation. Analytical grids were gathered in a decision  
61 support tool (CHECK'MEX). Selected plant extracts such as lemon balm and ginseng were  
62 tested for their ability to stimulate innate immunity in poultry in cell models or in *ex vivo* models  
63 of inflammation and oxidative stress in chicken cells. The extracts were then evaluated in  
64 chickens under experimental conditions close to the field to validate their effects and to perform  
65 a multicriteria analysis including health, welfare and zootechnical indicators. This approach is  
66 applicable to all types of plant extracts and can be adapted for other animal species or other  
67 biological effects.  
68

## 69 **Chapeau**

70 Les propriétés des plantes intéressent de plus en plus les entreprises de la nutrition animale pour  
71 soutenir les fonctions immunitaires des volailles dans un objectif de gestion intégrée de la santé.  
72 Cela nécessite de disposer de méthodologies et d'outils complémentaires, adaptés et fiables, qui  
73 restent encore limités dans la littérature scientifique, pour évaluer la qualité et la valeur ajoutée  
74 fonctionnelle des extraits de plantes pour la santé des poulets. Cet article présente une démarche  
75 applicable à tous types d'extraits végétaux.  
76

## 77 **Introduction**

78  
79 Les plantes sont utilisées depuis très longtemps dans toutes les cultures, notamment pour leurs  
80 vertus dites médicinales et constituant la base de la phytothérapie. Chez les volailles, les extraits  
81 de plantes introduits dans l'alimentation sont utilisés essentiellement pour améliorer leurs  
82 performances zootechniques et la qualité des produits (viande, œufs).

83 L'alimentation animale est très encadrée réglementairement (règlements R178/2002<sup>1</sup>,  
84 R183/2005<sup>2</sup>, R767/2009<sup>3</sup> et R1831/2003<sup>4</sup> et Directive 2002/32<sup>5</sup>). Les plantes et produits à base  
85 de plantes peuvent entrer dans l'alimentation des animaux en tant que matières premières  
86 (listées dans le catalogue du règlement R1017/2017<sup>6</sup>) ou additifs, et sont incorporés dans des  
87 aliments composés. Chaque additif utilisé en alimentation animale est évalué sur la base d'un  
88 dossier montrant son efficacité et son innocuité selon des conditions particulières (décrites dans  
89 le R429/2008<sup>7</sup>) et est autorisé dans une catégorie ou un groupe fonctionnel selon un règlement  
90 spécifique, par exemple certains extraits de plantes sont autorisés en substances aromatiques.  
91 En revanche, tout aliment pour animaux ayant une allégation de prévention, traitement ou  
92 guérison d'une maladie passe dans la catégorie médicament vétérinaire. Ce statut nécessite une  
93 Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) délivrée par l'Agence Nationale du Médicament  
94 Vétérinaire (ANMV), leur utilisation répond à une prescription vétérinaire. Les produits de  
95 nutrition fonctionnelle<sup>8</sup> relèvent de l'alimentation animale, les produits visant à réduire les  
96 risques sanitaires et/ou métaboliques peuvent également relever de ce cadre. Les plantes  
97 médicinales sont répertoriées dans la Pharmacopée<sup>9</sup> (certaines sont libérées du monopole  
98 pharmaceutique et sont donc utilisables en alimentation humaine et animale ; d'autres n'en sont  
99 pas libérées et leur utilisation n'est donc pas recommandée mais fait l'objet d'étude  
100 complémentaire – GBP AFCA-CIAL 2020<sup>10</sup>). Dans ce cadre, les produits à base de plantes  
101 intéressent de plus en plus les chercheurs et professionnels pour leurs propriétés sur le bien-être  
102 et le maintien des animaux en bonne santé comme en témoigne le recensement des alternatives  
103 aux antibiotiques conduit par l'Anses (Anses, 2018). Cet essor s'inscrit dans un contexte  
104 mondial de réduction des risques d'antibiorésistance liée en partie à l'utilisation massive des  
105 antibiotiques en élevage (Anses, 2020) et de l'interdiction de leur usage préventif depuis  
106 2006 en Europe. Une des voies, notamment soutenue par la création d'un axe dédié dans le plan  
107 Ecoantibio<sup>11</sup> est le « développement d'alternatives permettant d'éviter les recours aux  
108 antibiotiques » et de méthodes pour en évaluer le réel bénéfice. A ce titre, différentes approches  
109 alternatives thérapeutiques antimicrobiennes ont été mises en perspectives (Ducrot *et al.*, 2017).  
110 Dans le cadre de la nutrition animale, l'usage des préparations de plantes se positionne dans  
111 une démarche de gestion intégrée de la santé des animaux. Dans ce même numéro, Fortun-  
112 Lamothe *et al.* (2022) rappelle que « les principes de la gestion intégrée de la santé animale a  
113 pour finalité (i) de favoriser la construction de la santé des animaux afin qu'ils aient une  
114 trajectoire de vie harmonieuse et soient en état de bien-être et (ii) de limiter l'apparition des  
115 maladies pour pouvoir diminuer l'utilisation des intrants ». Il est rappelé également que « la

---

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

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

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

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

<sup>5</sup>[https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aca28b8c-bf9d-444f-b470-268f71df28fb.0007.02/DOC\\_1&format=PDF](https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aca28b8c-bf9d-444f-b470-268f71df28fb.0007.02/DOC_1&format=PDF)

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

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

<sup>8</sup> Il s'agit de produits à action spécifique qui participent au maintien ou au soutien des fonctions physiologiques

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

<sup>10</sup> Guide de bonnes pratiques pour l'utilisation des plantes et produits à base de plantes en alimentation animale <https://www.afca-cial.org/telechargements.php>

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

116 santé animale est à la fois un état d'homéostasie qui permet la réalisation optimale des fonctions  
117 biologiques, et un processus de maintien ou de restauration de cette homéostasie face aux  
118 évolutions du milieu de vie ». Ceci est d'autant plus vrai pendant la période de démarrage, au  
119 cours de laquelle les poussins sont très sollicités dans leurs capacités d'adaptation face aux  
120 changements d'environnement (physique, microbien, social) alors qu'ils sont en pleine  
121 construction de leur immunité et donc de leur santé présente et future. Les poulets sont ensuite  
122 exposés au cours de l'élevage à des périodes de transition alimentaire et des variations  
123 environnementales telles que des changements thermiques qui peuvent affecter leurs santé et  
124 performances (Goel, 2021). Le soutien des fonctions immunitaires, notamment par l'apport  
125 d'extraits de plantes, est un moyen de renforcer les capacités d'adaptation des poulets pendant  
126 ces périodes. Encore faut-il que le contrôle de qualité et la valeur ajoutée fonctionnelle des  
127 extraits de plantes pour la santé des poulets soient validés. Cela nécessite de disposer sur le  
128 terrain de méthodologies et d'outils complémentaires, adaptés et fiables qui restent encore  
129 limités dans la littérature scientifique. En élevage, face à une offre de préparations qui explose,  
130 comment faire le bon choix ?  
131 Dans le présent article, nous avons fait le choix de nous intéresser aux extraits de plantes (hors  
132 huiles essentielles) pouvant renforcer l'immunité des poulets, notamment l'immunité innée qui  
133 est le moyen de défense majeur chez le poussin. Cet article présente les différentes étapes et  
134 outils/méthodes associés, d'une démarche élaborée dans le cadre du projet Casdar RT  
135 MEXAVI<sup>12</sup>, pour identifier les extraits de plantes, les caractériser et évaluer leurs activités  
136 biologiques sur l'immunité des poulets en situation d'élevage.

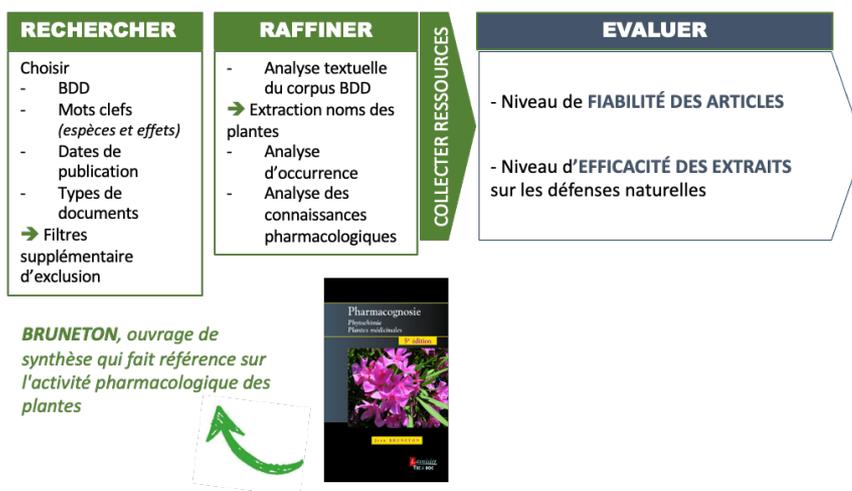
## 137 **1. Comment choisir des extraits de plantes d'intérêt pour renforcer** 138 **l'immunité des volailles ?** 139

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

---

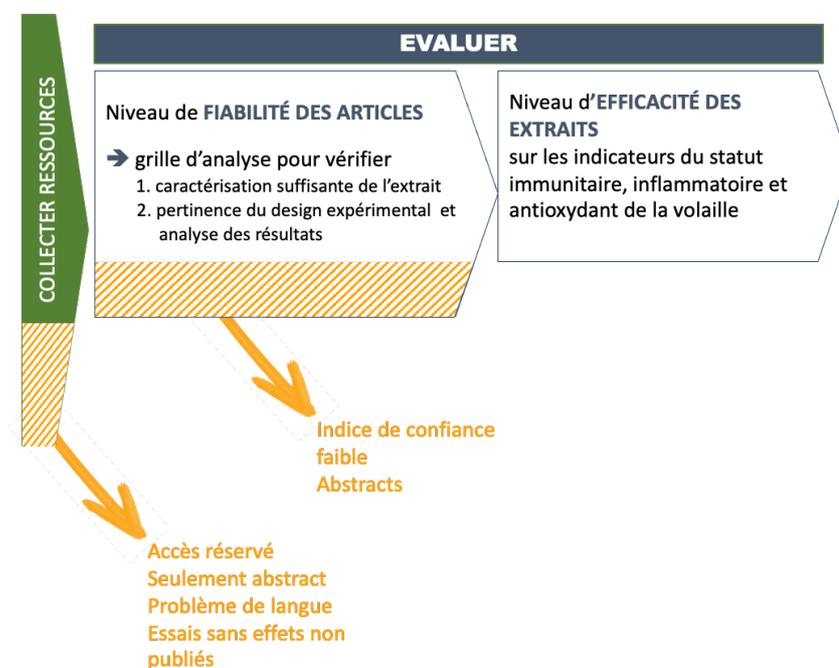
<sup>12</sup> Cas Dar RT MEXAVI (n° 1612 - 2017/2020)

A



150

B



151

152 Figure 1. Schéma général de la démarche de sélection des extraits de plante

153

154

155 **1.1. Étape 1. Sélection d'extraits de plantes d'intérêt à partir de données**  
 156 **bibliographiques : constitution du corpus bibliographique**

157

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

162

163 **a. Choix des bases de données**

164 Le recueil de publications scientifiques a été établi en utilisant les moteurs de recherche des  
165 bases de données (BDD) qui indexent largement les revues traitant de phytochimie  
166 (Horticultural scientific database, SciFinder®) et les revues traitant de zootechnie (Web of  
167 Science®, CabDirect®, PubMed®). La recherche a été effectuée dans ces bases  
168 complémentaires, spécialisées<sup>13</sup> et polyvalentes, afin de compiler les résultats et obtenir un  
169 corpus bibliographique le plus complet possible.  
170

171 **b. Choix des mots clefs et filtres d'exclusion**

172 Les mots clefs doivent être en anglais et doivent définir ou être fortement liés au concept à  
173 rechercher, pour permettre de faire ressortir les publications les plus pertinentes. Pour le projet  
174 MEXAVI, les trois champs thématiques étaient : 1. les VOLAILLES et particulièrement le  
175 poulet de chair (poultry, broilers, chicks/chickens, fowls, hen), 2. les EXTRAITS DE  
176 PLANTES (plant extracts, phylogenics, plants, herbs, herbal products, medicinal plants), 3. le  
177 RENFORCEMENT DES DEFENSES NATURELLES focalisée sur les notions d'immunité :  
178 (immunostimulants, immunostimulation, immune system, immune response, vaccines,  
179 vaccination). Ces termes ont ensuite été associés pour construire des équations de recherche  
180 spécifiques à chaque BDD. Des filtres d'exclusion ont permis d'éliminer les études *in vitro*  
181 (effet recherché *in vivo*), celles réalisées avec des huiles essentielles (hors champs du projet)  
182 ou encore les articles publiés avant 2005.  
183

184 **c. Sélection des plantes d'intérêt**

185 Lorsque la recherche génère une liste importante de références, l'utilisation d'un logiciel  
186 d'analyse textuelle adapté au traitement des publications scientifiques (VosViewer,  
187 IRaMuTeQ) ou des fonctions avancées du logiciel Excel, permet d'extraire les noms des plantes  
188 apparus dans notre corpus bibliographique. Les noms communs des plantes sont souvent  
189 imprécis et sont susceptibles de désigner des plantes différentes, la dénomination botanique,  
190 plus précise, a été privilégiée pour l'analyse. Les propriétés connues et attendues (immuno-  
191 stimulantes) des plantes identifiées ont été vérifiées dans un ouvrage de synthèse sur les  
192 connaissances pharmacologiques des plantes (Bruneton, 2016). Pour finir, les plantes à  
193 occurrences faibles (<5 publications/plante) et non cultivables en France métropolitaine  
194 (approvisionnement difficile) ont été retirées.  
195

196 **1.2. Étape 2. Évaluation du niveau de fiabilité de chaque publication**

197  
198 L'étape suivante vise à évaluer la qualité scientifique de chaque ressource avec un volet  
199 « phytochimie » et un volet « zootechnie ». Une grille de fiabilité a été élaborée et permet de  
200 vérifier que 1) l'extrait étudié est correctement caractérisé (nature, préparation, modalité  
201 d'usage) et 2) le dispositif expérimental est pertinent et les résultats analysés avec des méthodes  
202 statistiques adaptées pour conclure sur l'effet de l'extrait de plante testé (Figure 1B). Dans la  
203 section « Materials and Methods » de chaque publication, des critères d'intérêt sont relevés et  
204 les indicateurs sont notés selon une échelle de score, définie par le groupe d'experts en  
205 phytochimie et en zootechnie (Encadré 1). Après cette notation, un indice de confiance (IC) est  
206 attribué à chaque publication selon trois niveaux : IC élevé, modéré ou faible. L'IC prend en  
207 compte la somme des notes de chaque volet ainsi que leur dispersion pour définir des bornes

---

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

208 pour chaque seuil de confiance. Les IC des « Abstracts » sont systématiquement faibles, ils ne  
 209 sont pas suffisants pour caractériser l'extrait de plante et de juger de la fiabilité de la  
 210 méthodologie mise en œuvre, ils n'ont donc pas été considérés dans l'étape 3. Le volet  
 211 « zootechnie » est spécifique du couple « poulet – stimulation des défenses naturelles », mais il  
 212 est possible de l'adapter si on souhaite travailler sur un autre couple « espèce – fonction  
 213 ciblée ».  
 214 Cette grille de fiabilité constitue un guide pertinent pour vérifier les conditions nécessaires et  
 215 suffisantes à l'étude d'extraits de plante chez une espèce animale et pour une fonction définie.  
 216 Les indicateurs ont été choisis et sont décrits pour être simples à apprécier par des non  
 217 spécialistes<sup>14</sup>.  
 218

219 Encadré 1. Présentation des volets « Phytochimie » et « Zootechnie » de la grille de  
 220 fiabilité  
 221

	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <p><b>Volet Phytochimie</b> / 20 points</p> </div>	<p><b>Volet Zootechnie</b> / 20 points</p>
<p><b>OBJECTIF</b> : connaître parfaitement la nature du produit, sa préparation et ses modalités d'usage</p> <p><b>FINALITE</b> : permettre de reproduire un essai dans les mêmes conditions</p> <p><b>COMPOSITION</b> : 4 critères, 19 indicateurs pour caractériser :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> la plante</li> <li><input type="checkbox"/> l'extrait</li> <li><input type="checkbox"/> le produit</li> <li><input type="checkbox"/> Les conditions d'utilisation du produit</li> </ul>	<p><b>OBJECTIF</b> : évaluer la pertinence, la rigueur de la conduite de l'expérimentation et de la méthodologie d'analyse statistique</p> <p><b>FINALITE</b> : vérifier que les méthodes utilisées sont suffisantes pour conclure avec fiabilité</p> <p><b>COMPOSITION</b> : 5 critères, 15 indicateurs pour vérifier :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> La présence d'une épreuve sanitaire</li> <li><input type="checkbox"/> La présence de groupes contrôles</li> <li><input type="checkbox"/> Les conditions d'essai</li> <li><input type="checkbox"/> Le plan d'expérience</li> <li><input type="checkbox"/> Le plan d'analyse statistique</li> </ul>

222  
223

224 **1.3. Étape 3. Sélection des extraits de plantes sur leurs effets biologiques**  
 225

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

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

240  
 241 L'ensemble de ces étapes et grilles d'analyse ont été rassemblées en un outil d'aide à la décision  
 242 nommé CHECK'MEX. Cet outil est téléchargeable gratuitement sur le site de l'iteipmai  
 243 (institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et  
 244 industrielles) (<https://www.iteipmai.fr/71-nos-projets/266-mexavi>) au format Excel pour rendre  
 245 son utilisation accessible à tous et permettre de générer automatiquement les calculs des scores,  
 246 les indices de confiance et les graphiques. Tous les types de ressources peuvent passer au crible  
 247 de la grille de lecture, de l'article scientifique aux fiches techniques d'additifs commerciaux en  
 248 passant par les dires d'experts. Il est destiné aux acteurs de la recherche et du développement  
 249 pour faciliter la sélection d'extraits de plantes d'intérêt pour renforcer l'immunité des volailles.  
 250 C'est un outil générique et pérenne qui peut être adapté à d'autres couples « espèce animale –  
 251 fonction cible », ce qui nécessiterait une révision des grilles de fiabilité et d'évaluation.  
 252

#### 253 1.4. Mise à l'épreuve de la démarche de sélection et d'évaluation des 254 extraits de plantes à visée immunitaire chez le poulet 255

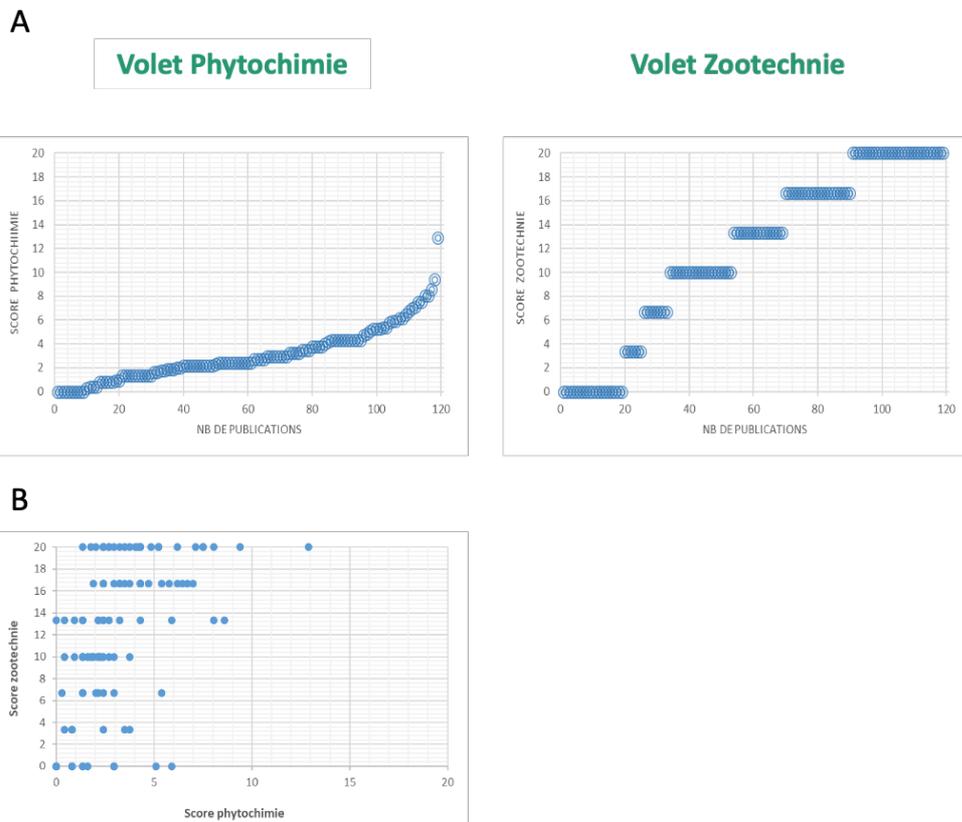
256 Le résultat des étapes de recherche, sélection et collecte bibliographique est résumé dans le  
 257 Tableau 1.  
 258

259 Tableau 1. Résultats de la mise à l'épreuve de la méthode pour l'identification de plantes  
 260 à visée immunitaire chez le poulet  
 261

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

262  
 263 L'étape de recherche bibliographie a permis d'identifier 917 publications qui concernaient 48  
 264 plantes. L'intégration des connaissances pharmacologiques, des occurrences et des possibilités  
 265 de culture sur le territoire français a raffiné la liste à 8 plantes. Le corpus de 244 références  
 266 bibliographiques a été réduit à 159 réellement utilisables, principalement par l'accès restreint  
 267 de certains articles, des articles en langues étrangères non maîtrisées (chinois...). Il y avait entre  
 268 10 et 40 articles utilisables par plante. L'analyse de la fiabilité des 159 publications a montré

269 une très forte hétérogénéité de résultats entre les volets. Pour le volet « phytochimie », les  
 270 scores s'étalent de 0 à 13/20 et de 0 à 20/20 pour le volet « zootechnie » (Figure 2A). Il n'existe  
 271 pas de corrélation entre les scores des volets « phytochimie » et « zootechnie » (Figure 2B).  
 272 Ces scores très variables entre les publications montrent bien la difficulté d'évaluation des  
 273 études utilisant des extraits végétaux (manque de reproductibilité et discordances de résultats).  
 274 La plupart des publications sont publiées dans des revues spécialisées pour les animaux  
 275 d'élevage et conduites par des zootechniciens, ce qui explique que le volet « zootechnie » soit  
 276 le mieux précisé (score supérieur). En revanche, le volet « phytochimie » est parfois inexistant  
 277 des publications, où même le nom botanique ou le type d'extrait utilisé peuvent ne pas  
 278 apparaître.  
 279



280  
 281

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

285  
 286 Malgré le peu d'informations disponibles sur les extraits de plantes utilisés, l'analyse des effets  
 287 positifs sur l'immunité des volailles a mis en évidence quatre plantes intéressantes : l'astragale,  
 288 l'échinacée, le ginseng et la nigelle. La nigelle n'a pas été retenue pour la suite du projet, de par  
 289 le risque de toxicité connue (Zaoui *et al.*, 2002) et du coût élevé de l'extrait. A contrario, la  
 290 mélisse a été ajoutée. Elle n'a pas été sélectionnée lors de la recherche bibliographique sans  
 291 doute par les mots clés choisis pour le champ thématique relatif à l'immunité. Cependant  
 292 connue pour ses effets antioxydant et anti-inflammatoire impliqués dans l'immunité innée  
 293 (Dhama *et al.*, 2014 ; Miraj *et al.*, 2017), elle a été ajoutée à la liste des extraits de plantes  
 294 retenus d'autant plus qu'elle est répandue en France et facilement cultivable. Lors de l'étape de  
 295 recherche bibliographique, il est très important de définir les mots clés recouvrant le plus le  
 296 champ thématique. Dans notre étude, l'intégration des mots clés « antioxydant », « oxidative

297 stress » and « inflammation » auraient été pertinents pour mieux définir l'immunité innée. Ainsi  
298 l'astragale, l'échinacée, la mélisse et le ginseng ont été sélectionnés pour la suite du projet et  
299 particulièrement la mélisse (*Melissa officinalis*) et le ginseng (*Panax ginseng*) étudiés dans  
300 toutes les étapes de caractérisation et d'évaluation des activités biologiques chez le poulet  
301 (Encadré 2).  
302

303 Encadré 2. *Melissa officinalis* et *Panax ginseng*, des plantes d'intérêt pour la santé des  
304 volailles  
305

**La mélisse, (*Melissa officinalis* L.)** de la famille des Lamiacées est réputée pour sa teneur en acide rosmarinique<sup>1</sup>. Facile à cultiver, elle produit aussi une huile essentielle riche en aldéhydes monoterpéniques : néral, géraniol, citronellal. On utilise les feuilles ou les parties aériennes.

Elle est réputée pour ses nombreuses propriétés antioxydante, antispasmodique, carminative, diaphorétique, immunostimulante, etc.



**Le ginseng (*Panax ginseng* Meyer)<sup>2</sup>** de la famille des Araliaceae bénéficie d'une très ancienne réputation de produit miracle ; « Panax », signifie d'ailleurs « panacée » c'est-à-dire de remède universel. Les composés réputés actifs sont des hétérosides triterpéniques (Ginsenosides). C'est la racine qui est utilisée.

La réputation du ginseng est d'être une plante « adaptogène » c'est-à-dire qu'elle augmenterait de manière non spécifique la résistance du corps au stress externe. Selon l'agence européenne du médicament, la racine ou des extraits peuvent être utilisés pour lutte contre la fatigue ou les états de faiblesse.

Référence générale : Bruneton, 2016

<sup>1</sup>Nadeem M., et al. 2014. Applied Sciences, 9, 3139. [doi.org/10.3390/app9153139](https://doi.org/10.3390/app9153139).

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

306

## 307 2. Caractérisation et traçabilité des extraits de plantes

### 308 2.1. Comment sont définis les extraits de plantes ?

309

310 Quelques normes donnent des définitions des différents types d'extraits, définitions basées le  
311 plus souvent selon leur état physique (Extraits de drogues végétales 04/2019:0765 de la

312 Pharmacopée Européenne<sup>15</sup> ; norme ISO 9235 :2013<sup>16</sup>). Le document de l'AFCA-CIAL<sup>17</sup>  
313 (AFCA-CIAL, 2020) ajoute un certain nombre de définitions et de précisions. Cependant, si  
314 certaines de ces définitions incluent des indications sur le mode de préparation (teinture,  
315 décoction, concrète, ...) ce n'est pas le cas général. En effet, selon le solvant utilisé, la  
316 composition de l'extrait pour une plante donnée pourra être différente. A cette variabilité, il faut  
317 ajouter les variations dues à la nature du matériel végétal, celles liées à la variété, à des effets  
318 saisonniers ou aux pratiques culturelles. Il faut encore ajouter l'impact de la méthode de dosage  
319 utilisée. En effet, selon la méthode utilisée, un même extrait peut afficher des teneurs en  
320 marqueurs différentes. Ces considérations sur les variations possibles de teneurs sur un même  
321 extrait soulignent la nécessité d'utiliser lors des dosages des méthodes standardisées. Rappelons  
322 que l'emploi de solvants lors de la fabrication d'un extrait peut rendre nécessaire la recherche  
323 des traces résiduelles de ce solvant mais aussi des éventuelles impuretés qu'il pourrait  
324 renfermer. Le séchage des extraits peut aussi nécessiter l'emploi d'adjuvants technologiques  
325 tels que la maltodextrine ou des poudres minérales. Ces auxiliaires peuvent aussi être utilisés  
326 pour ajuster par dilution le titre de l'extrait en marqueur.

## 327 2.2. Comment caractériser un extrait de plante ?

328  
329 La caractérisation des extraits végétaux répond à 2 objectifs principaux : 1) Connaître au mieux  
330 le plus grand nombre possible de composants, dans toute leur diversité chimique et de gamme  
331 de concentration, ce qui nécessite de les identifier et les quantifier, 2) Définir parmi les  
332 composants de l'extrait, des marqueurs (responsables ou pas, de tout ou partie de l'activité  
333 supposée de l'extrait) permettant le suivi tout au long de la chaîne de fabrication de l'extrait  
334 jusqu'au produit final qui sera consommé par l'animal.

335 Le premier objectif répond d'abord aux exigences réglementaires de plus en plus importantes  
336 (REACH<sup>18</sup> ; EFSA<sup>19</sup>) qui imposent la caractérisation la plus exhaustive possible des ingrédients  
337 utilisés en alimentation animale. Il répond aussi à des exigences de qualité par le suivi des  
338 recommandations de l'AFCA-CIAL (AFCA-CIAL, 2020). Il doit permettre aussi de comparer  
339 deux produits en apparence semblables (même appellation, mêmes caractéristiques générales)  
340 mais dont certains éléments sont suffisamment différents pour que l'on puisse raisonnablement  
341 supposer des activités différentes.

342 Le second objectif répond lui aussi à des exigences réglementaires (conformité à une norme ou  
343 *a minima* à un étiquetage) mais aussi à la nécessité de suivre l'incorporation de l'extrait tout au  
344 long de la chaîne de fabrication de l'aliment destiné à l'expérimentation ou la  
345 commercialisation. Le suivi de ces marqueurs pourra éventuellement se poursuivre chez  
346 l'animal (études pharmacocinétiques) et dans les produits destinés à la consommation humaine  
347 (viande, lait, œufs, ...). La ou les substances supposées être responsables de l'activité de  
348 l'extrait ne sont pas toujours connues avec certitude. Il est recommandé de suivre les indications  
349 des monographies de la Pharmacopée européenne qui précisent notamment la notion de  
350 marqueurs (Pharmacopée européenne, chapitre 04/2019 :0765).

351 Concernant le choix des méthodes d'analyse de la composition des extraits végétaux, il est  
352 nécessaire d'utiliser les méthodes normalisées quand elles existent, au moins pour qualifier les  
353 matières premières. La Pharmacopée européenne et l'ISO en propose : on peut distinguer des  
354 méthodes « globales » qui permettent d'évaluer la teneur en une famille de composés (les

---

<sup>15</sup> Pharmacopée européenne Ed. 10.4. [https://www.edqm.eu/fr/Pharmacopee\\_Europeenne\\_10e\\_Edition](https://www.edqm.eu/fr/Pharmacopee_Europeenne_10e_Edition)

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

<sup>17</sup> Association des Fabricants de Compléments et fournisseurs d'Additifs et ingrédients fonctionnels pour l'Alimentation Animale

<sup>18</sup> <https://reach-info.ineris.fr>

<sup>19</sup> <https://www.efsa.europa.eu/fr>

355 polyphénols, les tanins, ...) mais sans distinguer chacune des molécules et des méthodes  
 356 « spécifiques » (méthodes chromatographiques type CLHP/UV) qui permettent de doser  
 357 séparément différentes molécules identifiées. Seules ces méthodes spécifiques sont utilisables  
 358 pour suivre une molécule qualifiée de marqueur tout au long du processus de fabrication des  
 359 aliments supplémentés avec des extraits végétaux. Par exemple, l'acide rosmarinique (AR) est  
 360 considéré être un marqueur de la mélisse et ses extraits par la Pharmacopée Européenne. Il  
 361 n'existe pas de méthode spécifique pour doser toutes les molécules présentes dans les extraits  
 362 végétaux. La maltodextrine est un exemple typique de substance pour laquelle il n'existe pas  
 363 de méthode de dosage officielle alors qu'elle peut représenter jusqu'à 60 % d'un extrait sec.  
 364

### 365 2.3. Traçabilité des extraits de plantes dans l'aliment

366  
 367 Pour s'assurer de la qualité des extraits végétaux eux-mêmes ou intégrés dans des aliments, il  
 368 est important de disposer de marqueurs et de références. L'utilisation des profils  
 369 chromatographiques de référence combinée à la quantification des composés  
 370 pharmacologiquement actifs des extraits de plantes recommandés par la Pharmacopée sont  
 371 utiles quand ces molécules sont présentes dans une gamme de 0,1 à 10 mg/g d'extrait. Par  
 372 exemple, la proportion d'AR retrouvée entre 1 et 2 % (10 – 20 mg/g d'extrait) dans des extraits  
 373 de mélisse (Tableau 2) est en accord avec celle attendue, la teneur pouvant varier de 0,5 à 8 %  
 374 (Arceusz *et al.*, 2013), et elle est restée stable pendant 9 mois de stockage (Travel *et al.*, 2021).  
 375 Cette proportion est inférieure aux 5 % d'AR déclarés par le fournisseur parce que la méthode  
 376 utilisée est probablement une méthode spectrophotométrique qui détecte l'ensemble des  
 377 composés orthodiphénols présents et pas seulement l'AR comme le fait une méthode  
 378 chromatographique. Les analyses réalisées avec ces méthodes sur les aliments de poulets de  
 379 chair supplémentés avec 1 % d'extrait de mélisse montrent que l'on peut retrouver 60 à 80 %  
 380 d'AR dans l'aliment, ce taux restant stable au moins 3 mois après stockage (Travel *et al.*, 2021).  
 381 On peut supposer qu'il y ait des interactions entre les principes actifs et les composants de la  
 382 matrice qui perturbent la détection des principes actifs. Par exemple, les protéines comme les  
 383 protéines de soja de l'aliment peuvent former des complexes avec les orthodiphénols incluant  
 384 l'AR qui ne sont plus détectables lors de l'analyse (Krekora *et al.*, 2020). La sensibilité de ces  
 385 méthodes d'analyses ne permet pas de détecter des quantités inférieures au ppm. Le  
 386 développement de méthodes analytiques pour atteindre la gamme de ppm nécessiterait des  
 387 étapes de purification et de concentration. Le choix des marqueurs et des méthodes pour les  
 388 détecter devraient évoluer dans le futur en utilisant de nouvelles technologies pour mieux  
 389 caractériser la qualité d'extraits de plantes et leur traçabilité au cours du processus de production  
 390 d'aliments (Wei *et al.*, 2020 ; Klein-Junior *et al.*, 2021).  
 391

392 Tableau 2. Proportion d'acide rosmarinique dans des extraits de mélisse (MEL) stockés  
 393 ou non et dans l'aliment pour poulets supplémenté à différentes températures (d'après  
 394 Travel *et al.*, 2021)  
 395

Préparation	Acide Rosmarinique <sup>a</sup>	
	% MS <sup>b</sup>	ppm
Extrait MEL (T0)	1,44	14400
Extrait MEL T0+4 mois <sup>c</sup>	1,37	13700
Extrait MEL T0+9 mois <sup>c</sup>	1,38	13800

Farine d'aliment	0,015	149
Aliment granulé à 70 °C <sup>d</sup>	0,010	101
Aliment granulé à 85 °C <sup>d</sup>	0,009	92

396 <sup>a</sup>Quantification par HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography with diode  
397 array detection)

398 <sup>b</sup>MS = matière sèche

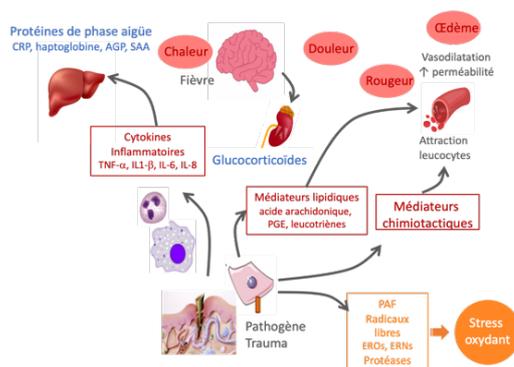
399 <sup>c</sup>Extraits conservés à température ambiante pour mimer les conditions réelles

400 <sup>d</sup>température de granulé à la sortie du conditionneur (appliquée quelques secondes)

### 401 3. Évaluation des activités biologiques des extraits de plantes sur 402 l'immunité innée des volailles

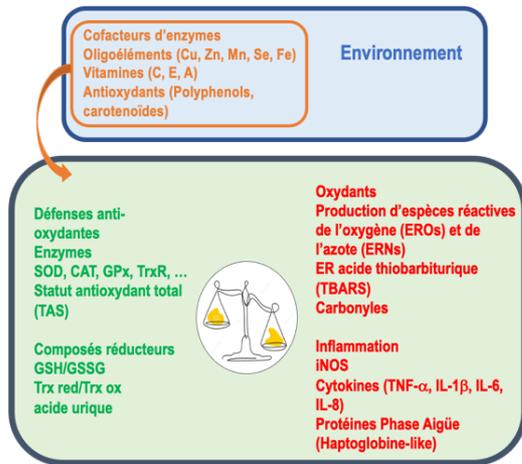
403  
404 L'immunité innée est la réponse immunitaire prédominante chez le poussin. En réponse à des  
405 facteurs de stress biotiques ou abiotiques l'organisme produit rapidement des substances  
406 impliquées dans l'inflammation et le stress oxydant telles que les cytokines et chimiokines,  
407 médiateurs lipidiques, substances réactives à l'oxygène et à l'azote (EROs/ERNs) (Figure 3A).  
408 Le stress oxydant est l'expression d'un déséquilibre du statut d'oxydoréduction cellulaire, entre  
409 les activités oxydantes et réductrices ou antioxydantes intracellulaires. Il s'agit d'un processus  
410 physiologique impliqué dans le maintien de l'intégrité cellulaire et dans de nombreuses  
411 fonctions comme l'inflammation et l'immunité. Naturellement le stress oxydant et  
412 l'inflammation sont régulés, cependant ces réactions peuvent persister et devenir chroniques,  
413 maintenir une inflammation à bas bruit ayant des effets délétères sur les cellules, les tissus et  
414 leurs fonctions (Cardoso Dal Pont, 2020). Pour équilibrer le statut redox, l'organisme dispose  
415 d'un système complexe d'antioxydants endogènes qui inclut des enzymes (glutathion  
416 peroxidase, catalase, superoxyde dismutase, thioredoxin reductase, etc.), protéines et des  
417 piègeurs de radicaux libres comme l'acide urique. Ce système endogène est complété par des  
418 molécules antioxydantes exogènes présentes dans l'alimentation et les compléments  
419 alimentaires (vitamine E, vitamine C, polyphénols, caroténoïdes) (Figure 3B).

A



420  
421

B



422

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

425

426 Pour évaluer les activités biologiques d'extraits de plantes, nous présentons dans cette section  
 427 des outils et méthodes pour évaluer leurs capacités à stimuler l'immunité innée des volailles  
 428 dans des modèles cellulaires ou des modèles d'inflammation et de stress oxydant développés  
 429 *ex vivo* sur cellules de poulet.

430

### 431 3.1. Tests de cytotoxicité et d'activités biologiques *in vitro* sur lignées 432 cellulaires aviaires

433

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

442 Pour évaluer les effets des extraits de plantes à la fois sur le métabolisme et l'immunité,  
 443 plusieurs tests cellulaires et biochimiques sont disponibles et bien maîtrisés. Nous avons fait le  
 444 choix de montrer des résultats reposant sur l'analyse de l'innocuité et de l'effet  
 445 immunostimulant des extraits de ginseng et de mélisse dans des lignées cellulaires d'hépatocyte  
 446 et de macrophage de poulet. La lignée cellulaire de macrophages HD11 (Beug *et al.*, 1979) est  
 447 largement utilisée en biologie cellulaire aviaire pour évaluer les mécanismes de la réponse  
 448 immunitaire innée (Peroval *et al.*, 2013). La lignée cellulaire hépatocytaire LMH (Kawaguchi  
 449 *et al.*, 1987) est également très utilisée pour des études portant sur le métabolisme au cours des  
 450 dernières décennies (Kolluri *et al.*, 1999 ; Qiao *et al.*, 2020). Pour évaluer l'innocuité et les  
 451 effets des extraits de plantes sur les lignées cellulaires, le sel de tétrazolium, ou MTT, est  
 452 largement utilisé par les biologistes cellulaires depuis les années 1980 pour dénombrer et  
 453 mesurer l'activité métabolique des cellules viables en culture (Mosmann, 1983). Simple dans  
 454 sa réalisation, cette méthode comprend l'utilisation de deux réactifs ajoutés en plaque de culture  
 455 sans étape de lavage et une lecture de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre. Des  
 456 approches alternatives avec une plus grande sensibilité de détection (e.g. MTS, Alamar Blue),  
 457 avec la capacité d'enregistrer des données à plusieurs reprises en temps réel et de tester plus

458 efficacement les cellules en culture 3D (e.g. CellTiter-Glo® 3D - Cell Viability Assay) a  
459 conduit à une diminution de l'utilisation du MTT, bien qu'il reste l'une des méthodes  
460 d'évaluation de la viabilité cellulaire les plus utilisées en biologie cellulaire.

461 En pratique, pour évaluer l'innocuité des extraits de ginseng et de mélisse, différentes  
462 concentrations (100 µg/ml à 10 ng/ml) diluées dans du milieu de culture ont été testées. Les  
463 cellules HD11 et LMH ont été distribuées à 5 x 10<sup>4</sup> cellules/puits dans une plaque de culture à  
464 96 puits et exposées à chacune des différentes concentrations de chaque extrait ou incubées en  
465 milieu de culture seul (groupe témoin). A 6 h, 24 h et 48 h après l'incubation, l'activité  
466 métabolique cellulaire a été déterminée à l'aide du MTT (Travel *et al.*, 2021). A titre  
467 d'illustration, nous présentons les résultats pour la lignée de macrophages HD11 avec lesquels  
468 nous avons également étudié d'autres paramètres ultérieurement. Les concentrations les plus  
469 élevées de mélisse et de ginseng (100 µg/mL) ont entraîné une augmentation du métabolisme  
470 cellulaire dès 6 heures (Figure 4A). Une cinétique similaire a été observée après 24 heures  
471 d'incubation. A 48 heures d'incubation, l'activité métabolique a fortement diminué (56 %) dans  
472 les cellules au contact de l'extrait de mélisse, suggérant un effet cytotoxique potentiel pour une  
473 concentration de 100 µg/mL de cet extrait (> 50 % de perte du métabolisme cellulaire<sup>20</sup>).  
474 L'extrait de ginseng ne présente lui aucun effet cytotoxique à ce même temps d'incubation pour  
475 la même concentration. A titre de comparaison, le peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), un  
476 contrôle positif dans ce type de test, induit une grande cytotoxicité > 60 % dans les cellules  
477 HD11, mettant ainsi en évidence la sensibilité du test (Figure 4B).

478 Pour évaluer l'activité pro/antioxydante et pro/anti-inflammatoire des extraits de plantes, des  
479 modèles d'inflammation et de stress oxydant sont développés sur cellules *in vitro* (Islam *et al.*,  
480 2018 ; Mengome *et al.*, 2014). Chez le poulet, ces modèles sont plus souvent réalisés *in vivo*  
481 (El-Senousey *et al.*, 2018 ; Lv *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2017). Pour réduire le  
482 recours à l'expérimentation animale, le développement de méthodologies alternatives sont  
483 encouragées (principe des 3R, Russell et Burch, 1959 ; Richmond, 2000). Les lignées cellulaires  
484 ayant intégré un gène reporteur de l'expression de gènes d'intérêt sont un puissant outil pour le  
485 criblage de molécules bioactives *in vitro*. Le facteur nucléaire kappa B (NFκB) est un facteur  
486 de transcription qui joue un rôle majeur dans de nombreux processus immunitaires, comme  
487 l'inflammation. Le suivi de l'expression de ce facteur de transcription permet une meilleure  
488 compréhension des phénomènes d'immunostimulation engendrés par différentes molécules.  
489 L'activation des voies de signalisation liées à NFκB par les extraits de ginseng et de mélisse a  
490 été évaluée avec la lignée cellulaire macrophagique HD11-NFκB luciférase, ayant intégré le  
491 gène de la luciférase en amont du gène NFκB (Garrido *et al.* 2018 ; Travel *et al.*, 2021), un outil  
492 unique dans la communauté de l'immunologie aviaire.

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

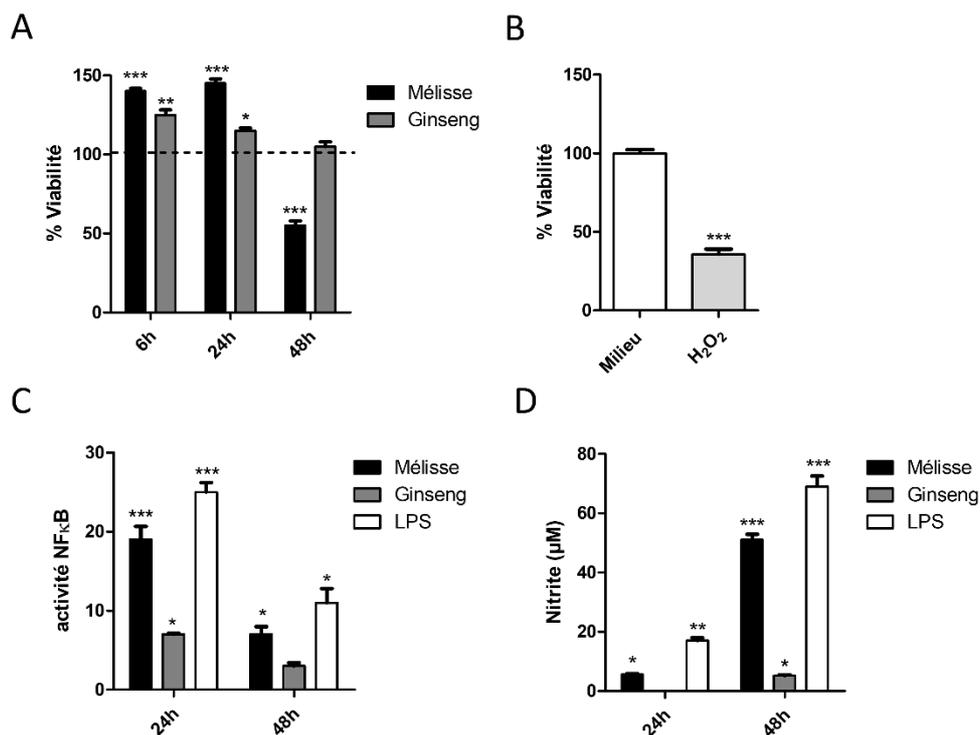
503 Les macrophages sont l'une des premières cellules effectrices réactives en situation de stress  
504 oxydant ou en présence d'agents pathogènes *via* la production de divers médiateurs pro-  
505 inflammatoires dont le monoxyde d'azote (en anglais NO), un radical libre de courte durée

---

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

506 (Moncada *et al.*, 1991). L'une des méthodes les plus anciennes et les plus simples pour mesurer  
 507 la production du NO est la méthode de Griess, qui est basée sur la réaction de l'ion nitrite  
 508 produit par l'auto-oxydation du NO, qui est facilement quantifié par spectroscopie. En pratique,  
 509 la production de nitrite est mesurée dans le milieu de culture à partir de 24 h d'incubation des  
 510 macrophages HD11 avec les extraits de plantes. A la concentration la plus élevée (100 µg/mL),  
 511 l'extrait de mélisse induit une augmentation de 10 fois de la production de NO entre 24 et 48 h  
 512 d'incubation (5 et 50 µM respectivement) (Figure 4D). En comparaison, le LPS induit une  
 513 production de NO de l'ordre de 16 µM à 24 h. Celle-ci a ensuite été multipliée par un facteur 4  
 514 à 48 heures (69 µM). L'extrait de ginseng n'induit pas ou peu la production du NO par les  
 515 macrophages HD11.

516 En résumé, l'extrait de ginseng présente une innocuité plus stable aux différentes concentrations  
 517 testées sur la lignée de macrophages aviaires en comparaison à l'extrait de mélisse. Il induit peu  
 518 ou pas d'effet immunostimulant sur les macrophages H11 alors que l'extrait de mélisse révèle  
 519 une activité immunostimulante à prendre en considération. Cette méthodologie simple et  
 520 rentable peut donc être réalisée en première intention pour évaluer l'innocuité et la bio-activité  
 521 d'extraits de plantes dans des cellules eucaryotes de l'espèce animale d'intérêt avant d'envisager  
 522 des tests *in vivo*, conformément au REACH et au principe des 3Rs (Richmond, 2000). Toutes  
 523 les méthodes utilisées ici sont accessibles et peuvent être facilement mises en œuvre dans des  
 524 laboratoires vétérinaires ayant une expertise en biologie cellulaire et en biochimie.  
 525



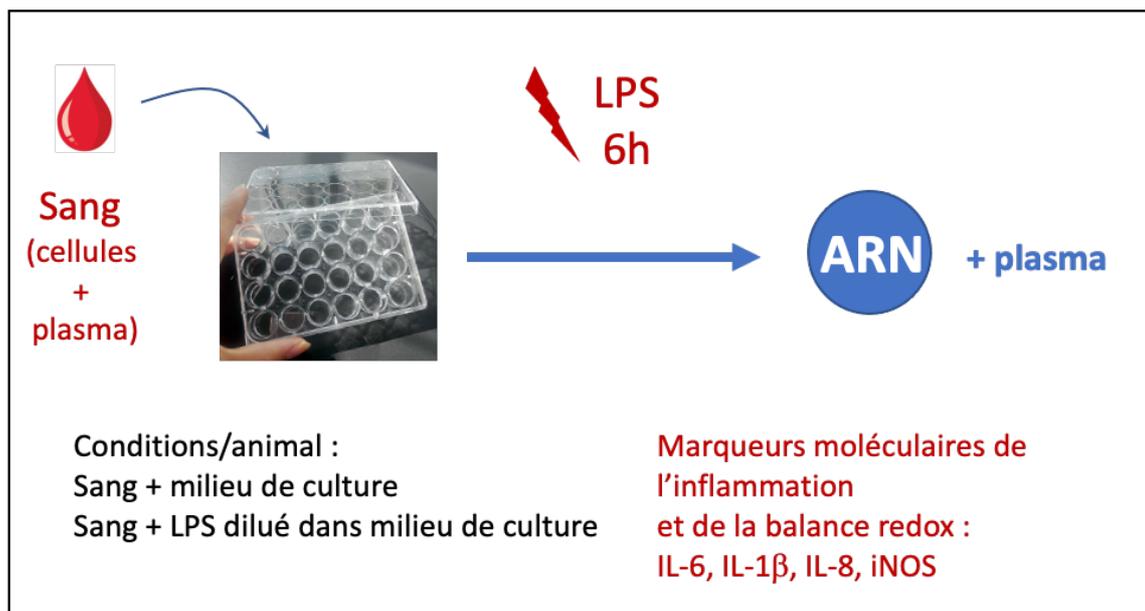
526  
 527 Figure 4. Effets des extraits de ginseng et de mélisse sur l'activité métabolique et la  
 528 réponse immunitaire dans une lignée de macrophages aviaires. *Activité métabolique des*  
 529 *cellules exposées à chaque extrait de plante à différents temps. Les cellules uniquement en*  
 530 *milieu de culture définissent le témoin à 100% de viabilité ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$ ) (A), *Activité*  
 531 *métabolique suite à l'exposition des cellules à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) pendant 24h ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$ )*  
 532 *(B), *Activité NFκB des cellules exposées à chaque extrait de plantes ou de LPS (1 µg/ml) à**  
 533 *différents temps (activité relative à celle de cellules en milieu de culture seul, normalisée à*  
 534 *une valeur de 1) ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$ ) (C), *Production de nitrite par les cellules exposées à chaque*  
 535 *extrait de plante ou de LPS (1 µg/ml) à différents temps ( $m \pm SEM$ ,  $n = 5$ ) (D). \*P<0.05,***

536 \*\*P<0.01 et \*\*\*P<0.001 par rapport aux témoins négatifs (milieu de culture seul) dans  
537 chaque expérience.  
538

### 539 3.2. Tests d'activités biologiques *ex vivo* sur cellules sanguines de poulet

540 La prochaine étape a consisté à développer une méthode pour mettre en évidence les potentielles  
541 propriétés antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de plantes chez le poulet. Le LPS est  
542 communément utilisé pour induire une inflammation expérimentale *in vivo* ou *in vitro* sur  
543 cellules. Dans cette étude (Travel *et al.*, 2021), nous avons développé une méthode *ex vivo* pour  
544 induire une réaction inflammatoire et un stress oxydant à partir de cellules sanguines de poulet  
545 incubées avec du LPS (Encadré 3).  
546  
547  
548  
549  
550

551 Encadré 3. Modèle *ex vivo* d'inflammation et de stress oxydant sur cellules sanguines de  
552 poulet (d'après Travel *et al.*, 2021)  
553



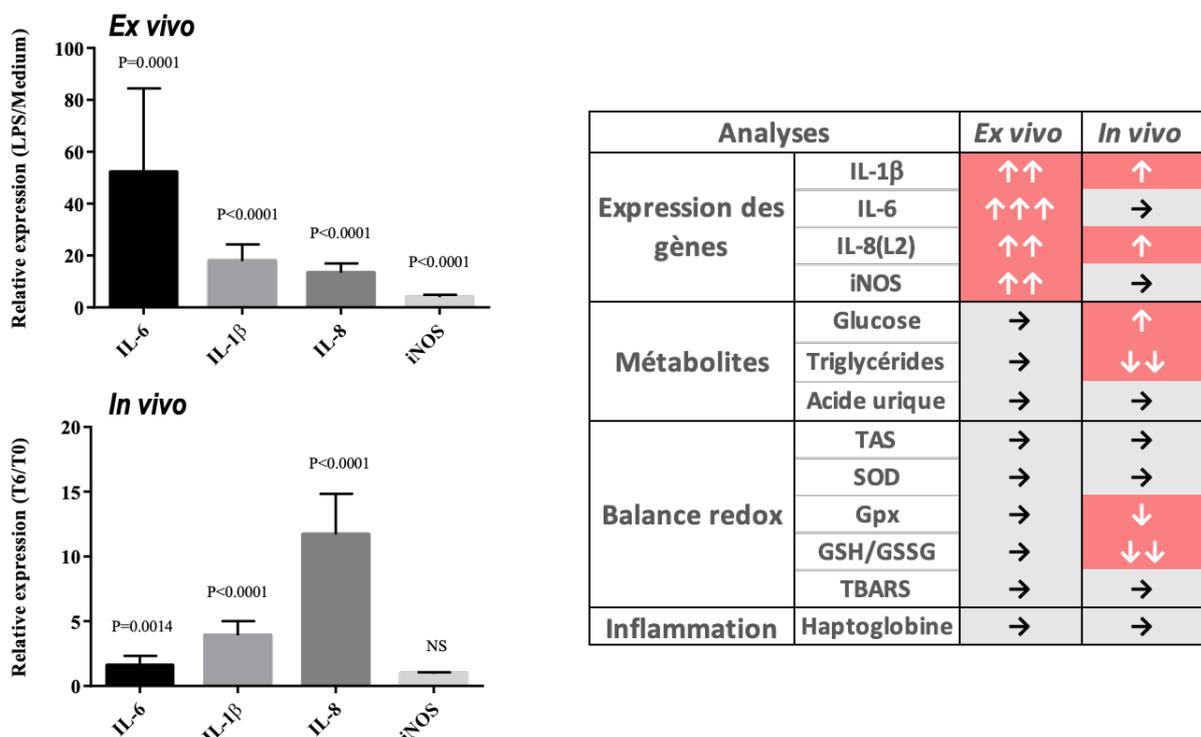
554  
555

556 Nous avons comparé cette méthode avec une méthode réalisée par une injection de LPS chez  
557 le poulet (Kaiser *et al.*, 2012). L'incubation des cellules sanguines totales fraîchement prélevées  
558 avec le LPS (10 µg/mL) pendant 6h induit une forte augmentation de l'expression des ARNm  
559 des gènes de cytokines pro-inflammatoires, principalement l'IL-6 et à un degré moindre l'IL-  
560 1β, IL-8, et l'enzyme iNOS impliquée dans la synthèse du NO (Figure 5). Ces résultats sont en  
561 accord avec des études réalisées précédemment sur des lignées de macrophages qui sont les  
562 acteurs principaux de ces réponses (Qi *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018). *In vivo*, l'injection du  
563 LPS (100 µg/kg) par voie sous-cutanée induit une augmentation de l'expression des gènes de  
564 l'IL-8 principalement, de l'IL-1β et l'IL-6 à un degré moindre mais pas de l'iNOS (Figure 5).  
565 Ces résultats sont complémentaires de ceux publiés sur cellules de rate de poulet (Kaiser *et al.*,  
566 2012). L'amplification de l'expression des gènes étudiés était remarquablement plus élevée  
567 dans la méthode *ex vivo* qu'*in vivo* (jusqu'à 25 fois plus). De ces deux méthodes, l'approche *ex*

568 *in vivo* réalisée sur cellules sanguines de poulet permet de reproduire une réaction inflammatoire  
 569 et un stress oxydant mesurable par l'analyse de biomarqueurs moléculaires de ces réactions  
 570 cellulaires. Elle a l'avantage d'utiliser le sang de poulet directement sans purification cellulaire  
 571 et d'éviter l'injection de LPS chez les animaux. Cependant, elle ne permet pas de reproduire  
 572 toutes les interactions cellulaires complexes qui ont lieu *in vivo* lors d'une injection de LPS  
 573 comme les modifications des métabolites sanguins (glucose et triglycérides) et de la balance  
 574 redox glutathion (GSH/GSSG, activité enzymatique Gpx) (Figure 5). Ces deux méthodes  
 575 apportent des indicateurs complémentaires d'inflammation et de stress oxydant qui peuvent être  
 576 utilisés pour évaluer les effets biologiques de la consommation d'extraits de plantes chez le  
 577 poulet. Pour rester dans la démarche d'éviter le recours à une méthode invasive chez l'animal,  
 578 la méthode *ex vivo* a été choisie pour évaluer les effets biologiques de la consommation des  
 579 extraits de plante chez le poulet.

580

581



582

583 Figure 5 : Modèle *ex vivo* et *in vivo* d'inflammation et de stress oxydant chez le poulet et  
 584 biomarqueurs (d'après Travel *et al.*, 2021). Expression relative des gènes des cellules  
 585 sanguines de poulet après stimulation pendant 6h avec du LPS (*ex vivo*) ou prélevées 6h  
 586 après injection de LPS au poulet (*in vivo*) ( $m \pm SEM$ ,  $n = 12$ ). Expression de différents  
 587 biomarqueurs du métabolisme, de la balance d'oxydo-réduction et de l'inflammation dans le  
 588 plasma des cellules sanguines dans les modèles *ex vivo* et *in vivo* (réponse grisée = stable,  
 589 réponse en rouge : augmentée ou diminuée).

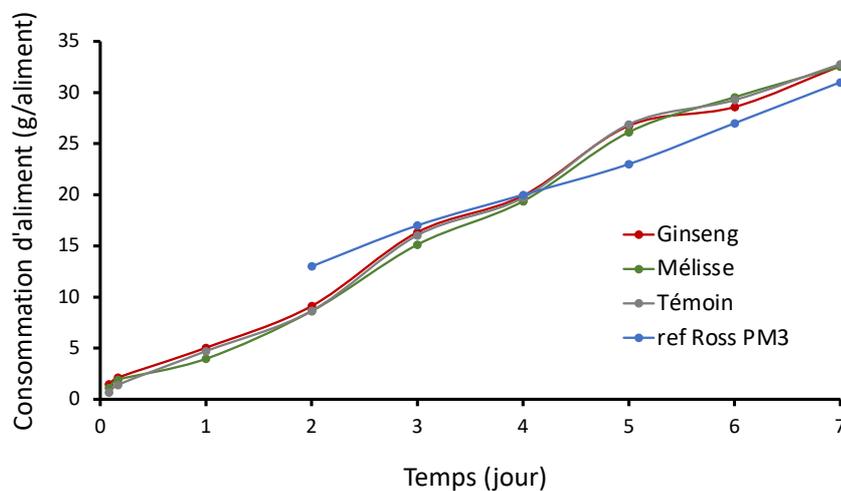
590

### 591 3.3. Évaluer les effets biologiques *in vivo* chez le poulet

592

593 Pour évaluer les effets biologiques de la consommation d'extraits de plante chez le poulet, il est  
 594 nécessaire de tester en préambule l'acceptabilité des aliments complémentés avec les extraits

595 de plante pour les animaux. La question du taux d'incorporation de l'extrait de plante est  
 596 essentielle à régler et doit se baser soit sur des travaux déjà publiés, soit sur un effet-dose à  
 597 réaliser chez l'animal. Par exemple, compte tenu des informations disponibles dans la  
 598 bibliographie pour les extraits d'échinacée, de mélisse et de ginseng, un taux d'incorporation  
 599 de 2 % a été retenu pour réaliser un test d'acceptabilité chez le poussin pendant la première  
 600 semaine de démarrage, ce taux a été volontairement choisi plus élevé que celui décrit pour ces  
 601 extraits. L'analyse de la consommation alimentaire de poussins vis-vis d'aliments incorporant  
 602 ces extraits a été testée en comparaison avec un aliment témoin sans ajout d'extrait. Nous  
 603 n'avons pas observé de différence de consommation alimentaire entre les groupes pendant la  
 604 première semaine de vie des poussins (Figure 6) ni sur la croissance des animaux. Nous avons  
 605 pu définir qu'un minimum de 6 parquets avec 4 poussins/parquet permettait de mettre en  
 606 évidence une différence de  $4g \pm 2g$  de consommation d'aliment. Ce protocole est une base pour  
 607 tester l'acceptabilité d'un nouvel aliment supplémenté avec un extrait de plante et peut être  
 608 aménagé selon les besoins.

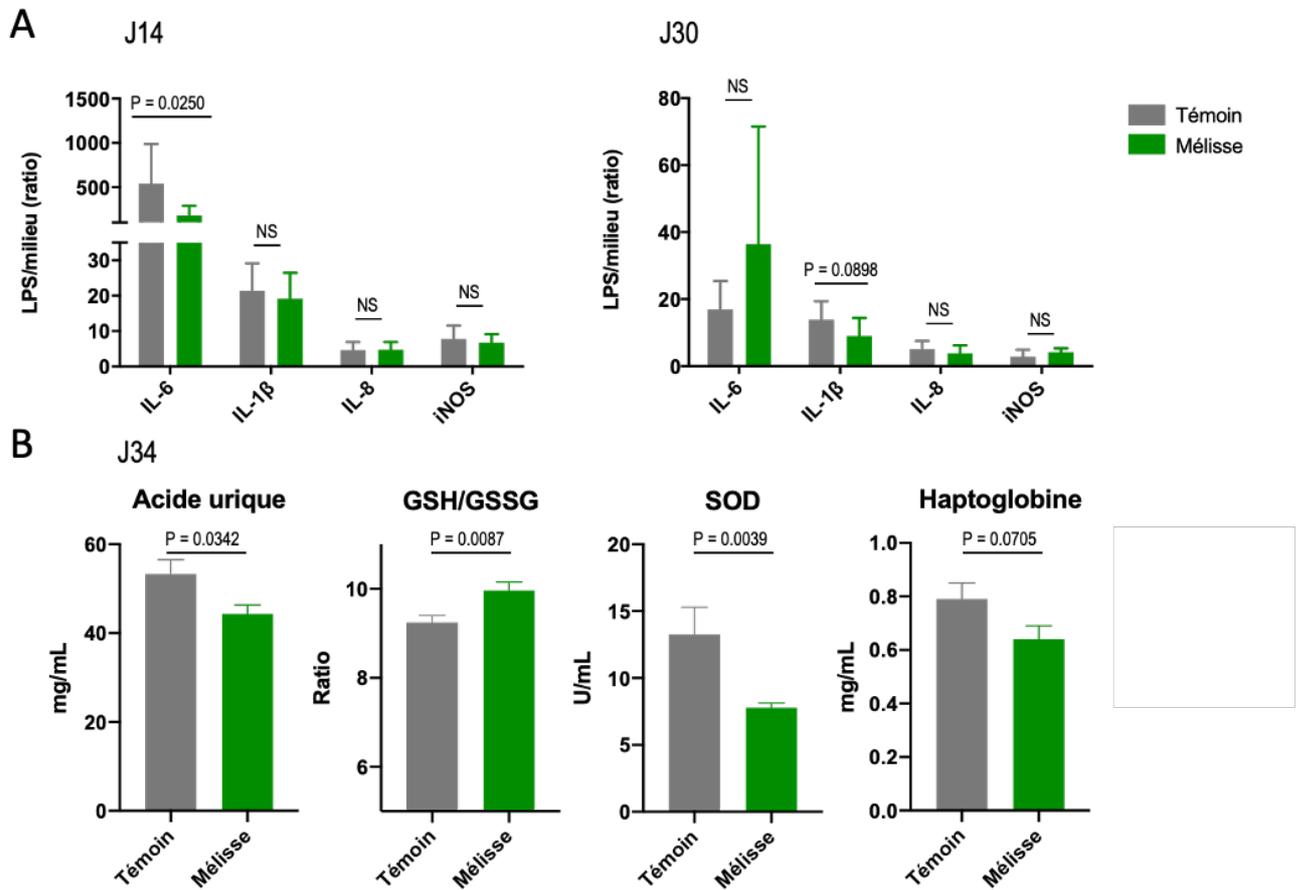


609  
 610  
 611 Figure 6. Consommation alimentaire d'aliments supplémentés en extraits de plantes par  
 612 des poussins ( $n=4 \times 6$  parquets = 24 poussins/traitement). Ginseng = aliment + ginseng ;  
 613 Mélisse = aliment + mélisse ; Témoin = aliment non supplémenté ; ref Ross PM3 = courbe de  
 614 référence de consommation alimentaire de poulets Ross PM3. Aucune différence significative  
 615 de consommation d'aliment n'est observée entre les différents aliments supplémentés quel  
 616 que soit le temps considéré ( $P > 0.5$ ).  
 617

618 La méthode d'induction d'inflammation et de stress oxydant *ex vivo* a ensuite été appliquée sur  
 619 le sang des poulets qui ont consommé un aliment supplémenté avec un extrait de ginseng ou de  
 620 mélisse jusqu'à l'âge d'abattage (J34). Les taux d'incorporation des extraits de plantes trouvés  
 621 dans la bibliographie sont parfois très variables selon les études. Par exemple le taux pouvait  
 622 varier de 0,005 % à 3 % pour le ginseng (Kim *et al.*, 2014 ; Zhai *et al.*, 2014), et de 0,2 à 2 %  
 623 pour la mélisse (Marcincakora *et al.*, 2011 ; Petrovic *et al.*, 2012 ; Kasapidou *et al.*, 2014). Pour  
 624 nos essais, nous avons choisi un taux de 0,05 % pour le ginseng et de 1 % pour la mélisse et  
 625 analysé leurs effets chez le poulet de chair à 2 âges, J14 et J30.

626 Nous avons pu observer que les cellules sanguines de poulets ayant consommé un aliment  
 627 supplémenté avec un extrait de mélisse exprimaient une réponse inflammatoire inférieure (IL-  
 628 6 à J14, IL-1 $\beta$  à J30) à celle des poulets témoins en réponse à une exposition à du LPS (Figure  
 629 7A). Nous avons observé des effets directs de la consommation d'extraits de mélisse sur

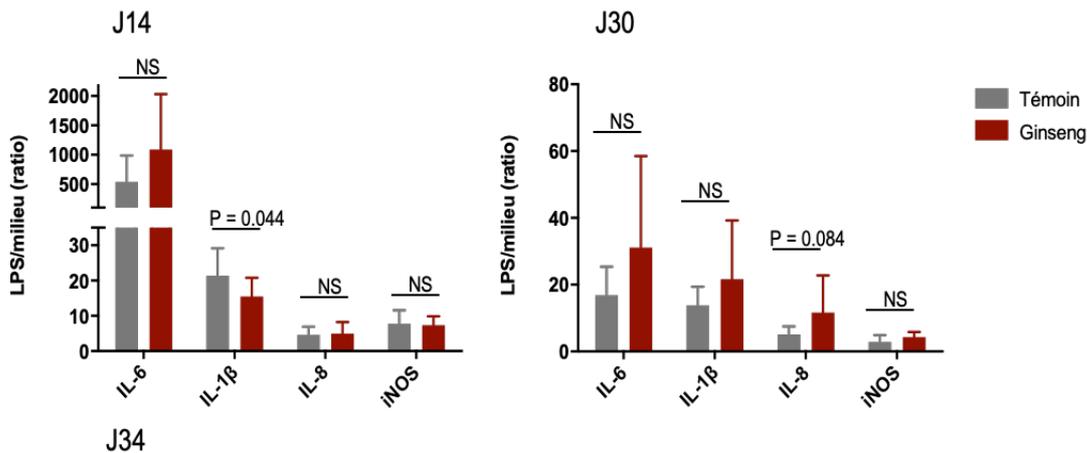
630 d'autres biomarqueurs complémentaires analysables dans le sang comme l'acide urique, le ratio  
 631 GSH/GSSG, l'activité SOD et la protéine de de phase aigüe haptoglobine like, montrant  
 632 respectivement une activité antioxydante et anti-inflammatoire jusqu'à l'âge d'abattage des  
 633 poulets (J34) (Figure 7B).  
 634  
 635



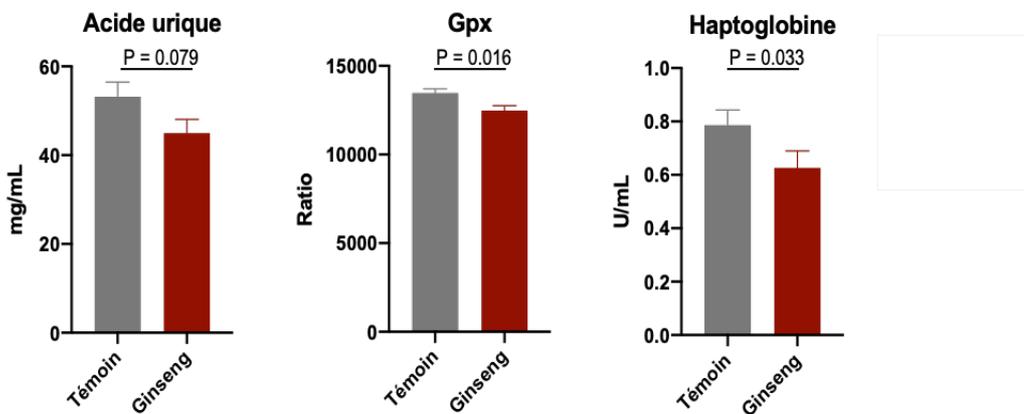
636  
 637  
 638 Figure 7. Evaluation des effets biologiques d'un aliment supplémenté en extrait de mélisse  
 639 sur les marqueurs d'inflammation et de stress oxydant (d'après Travel *et al.*, 2021).  
 640 L'expression des gènes est analysée par RT-PCR sur les ARN des cellules sanguines exposées  
 641 ou pas à du LPS (modèle *ex vivo*) ( $m \pm SEM$ ,  $n = 12$ )(A). Marqueurs analysés dans le plasma  
 642 des poulets à l'aide de kits commerciaux ( $m \pm SEM$ ,  $n = 12$ ) (B).

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

A



B



649

650 Figure 8. Evaluation des effets biologiques d'un aliment supplémenté en extrait de ginseng  
 651 sur les marqueurs d'inflammation et de stress oxydant. L'expression des gènes est analysée  
 652 par RT-PCR sur les ARN des cellules sanguines exposées ou pas à du LPS (modèle *ex vivo*) ( $m$   
 653  $\pm$  SEM,  $n = 12$ ) (A). Marqueurs analysés dans le plasma des poulets ( $m \pm$  SEM,  $n = 12$ ) (B).

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

#### 659 4. Evaluation des activités biologiques des extraits de plantes en 660 situation d'élevage

661  
 662 La dernière étape de la méthodologie a consisté à évaluer en conditions d'élevage plus proches  
 663 du terrain (grands groupes d'animaux) les effets des extraits végétaux sur une base plus large  
 664 d'indicateurs incluant ceux de l'immunité étudiés précédemment et également des indicateurs  
 665 de santé, de bien-être et de performances des animaux.  
 666

#### 667 4.1. Étape 1 : recréer expérimentalement des conditions de pré et post- 668 éclosion peu favorables 669

670 Les périodes pré- et post-éclosion sont essentielles pour la santé des poussins et leur démarrage.  
671 Les stress vécus pendant ces périodes, leur durée et leur nature peuvent avoir des impacts très  
672 importants et surtout durables sur les animaux (Ericsson, 2016). En élevage, les pratiques, les  
673 conditions environnementales, les contraintes logistiques et organisationnelles des élevages de  
674 reproducteurs et des couvoirs, peuvent induire des situations involontairement défavorables  
675 pour l'œuf, l'embryon et les poussins et donc entraîner des réactions de stress. Dans la période  
676 postnatale, ces situations défavorables reproduites expérimentalement peuvent provoquer des  
677 changements immédiats mais aussi durables (jusqu'à 34 jours d'âge) sur le métabolisme des  
678 poulets et sur leurs performances (Guilloteau *et al.*, 2019 ; Foury *et al.*, 2020). Dans le temps,  
679 le transcriptome sanguin des mâles est plus affecté que celui des femelles par le vécu postnatal  
680 des poussins, et cible l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant, la croissance et le  
681 métabolisme énergétique et osseux (Foury *et al.*, 2020). Cependant, la mise en évidence des  
682 effets de ces conditions périnatales défavorables sur la santé et le bien-être des poulets en  
683 situation d'élevage demeure peu fréquente sur le plan expérimental. Une des difficultés est de  
684 reproduire la dimension et l'écosystème présent en élevage (taille des bâtiments, taille des  
685 groupes d'animaux, la pression sanitaire, la densité...). Pour évaluer expérimentalement le  
686 potentiel sur l'immunité des poulets mais également l'effet plus global des extraits de plantes,  
687 il est nécessaire de recréer des conditions qui se rapprochent le plus des conditions d'élevage.  
688

689 Plusieurs facteurs connus peuvent y participer :

690 - **La durée de stockage des œufs à couvrir**, quand elle est supérieure à 7 j, peut impacter  
691 la viabilité embryonnaire, mais également la capacité de réponse au stress oxydant et la  
692 croissance des poussins (Elibol et Brake, 2008, Alsobayel et Al-Miman, 2010, Pertusa *et*  
693 *al.*, 2017). Une longue durée de stockage des œufs augmente également la fenêtre  
694 d'éclosion et allonge le délai d'accès à la première prise d'aliment et d'eau sur le site  
695 d'élevage (Boyner *et al.*, 2021).

696 - **La gestion des poussins au couvoir** (sexage, tri, vaccination,) et leur transport  
697 (chargement/déchargement, durée et température de transport) sont sources de stress et  
698 ajoute un délai supplémentaire pour l'accès à l'aliment et à l'eau. Ce jeûne peut durer  
699 jusqu'à 72 h après la sortie de l'éclosoir (Van de Ven *et al.*, 2013 ; Willemsen *et al.*, 2010).  
700 Les poulets de chair standards actuels ont un début de croissance très précoce, leur sac  
701 vitellin peut ne pas fournir les nutriments nécessaires pendant 72 heures (Tesseraud *et al.*,  
702 2003). **Un retard d'alimentation de 24 h** a des effets négatifs sur le développement du  
703 tractus gastro-intestinal (capacité de digestion d'aliment exogène riches en  
704 carbohydrates)(Lamot *et al.*, 2014, Ravindran, 2003), sur l'utilisation du sac vitellin  
705 (oxydation des réserves énergétiques)(Noy et Sklan, 2001) ce qui implique des  
706 répercussions sur la croissance de l'animal (Noy et Sklan, 1999 ; Sklan *et al.*, 2000).  
707 L'accès tardif à l'alimentation et à l'eau a également des effets négatifs sur l'activation du  
708 système immunitaire (Bar Shira *et al.*, 2004) induisant des risques de développement de  
709 maladies et voire la mort de l'animal (Boyner *et al.*, 2021).

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

716 Notre démarche pour évaluer l'intérêt global des extraits végétaux a été de cumuler ces  
 717 modalités défavorables fréquemment rencontrées en élevage (18 j de stockage des œufs,  
 718 alimentation retardée de 24 h, dose minimale de vitamine E dans l'aliment pour maximiser les  
 719 effets sur les indicateurs de stress oxydant et d'inflammation. Un effectif de 1440 poussins  
 720 mâles de souche Ross PM3 ont été mis en place à J0 à la station expérimentale de Nutricia  
 721 (Benquet, France). Trois groupes expérimentaux ont été constitués : le lot « Témoin » (sans  
 722 extrait de plante), le lot « Mélisse » incluant 1 % de mélisse dans tous les aliments distribués  
 723 de J0 à J34 et le lot « Ginseng » incluant 0,05 % de ginseng dans tous les aliments distribués de  
 724 J0 à J34 (Travel *et al.*, 2021) (Tableau 3). Les doses d'incorporation des extraits ont été choisies  
 725 à partir d'études montrant des effets sur les performances et/ou les marqueurs de santé (Astani  
 726 *et al.*, 2014; Kasapidou *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2015).

727

728 Tableau 3. Modalités expérimentales

				729
Groupes expérimentaux	Lot Mélisse	Lot Ginseng	Lot Témoin	
Extraits de plante	Mélisse (1 %)	Ginseng (0,05 %)	Sans	731 732
Conditions pré et post éclosion	18 j de pré-stockage des œufs avant incubation 24h d'attente des poussins à 20 °C avant mise en élevage 20 UI vitamine E /kg d'aliment Litière paille Densité d'élevage 39 kg/m <sup>2</sup>			
Nombre d'animaux/lot	360	360	360	733
Nombre de parquets/lot	9	9	9	738
Nombre d'animaux/parquet	40	40	40	739
				740

741

742

#### 743 4.2. Étape 2 : Réaliser une évaluation multicritère pour une vision globale 744 des effets des extraits de plantes

745

746 Pour répondre aux utilisateurs, l'évaluation de l'intérêt des extraits de plante dans l'alimentation  
 747 des volailles peut s'étendre au-delà des biomarqueurs de l'immunité en utilisant une approche  
 748 plus globale des impacts. La **méthode d'évaluation multicritère** repose sur la collecte de  
 749 plusieurs indicateurs de référence, mesurables, collectés tout au long de la période d'élevage et  
 750 à l'abattoir afin d'objectiver les conséquences économique, sanitaire et sur le bien-être des  
 751 extraits sur les animaux (Lairez *et al.*, 2017). Les indicateurs suivis sont listés dans le Tableau  
 752 4 et les résultats obtenus pour les extraits de mélisse et de ginseng synthétisés dans le Tableau  
 753 S1 (data supplémentaires).

754

755

756

757

758

759

760

761

762 Tableau 4. Liste et modalités de mesure des indicateurs technico-économiques,  
 763 sanitaires et de bien être  
 764

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

765

766

### 767 a. Les effets de la mélisse

768 Le poids vif et le gain moyen quotidien (GMQ) ont été augmentés pendant la phase de  
 769 croissance, grâce à une amélioration de l'efficacité alimentaire des animaux consommant un  
 770 aliment supplémenté avec un extrait de mélisse. Ces résultats renforcent les observations de

771 Kasapidou *et al.* (2014) et Poorghasemi *et al.* (2017) sur l'impact positif sur la croissance de  
772 l'incorporation de 1 % de mélisse dans la ration des volailles.  
773 La supplémentation avec l'extrait de mélisse n'a pas modifié le comportement des poulets, quel  
774 que soit le moment de l'observation. Bien que les pododermatites observées soient modérées,  
775 le score global proportionnel à l'intensité des lésions a augmenté significativement avec l'âge  
776 et en présence de l'extrait de mélisse dans l'aliment, à J11, 21 et 31. La mélisse est connue pour  
777 agir sur les enzymes digestives (Bilen *et al.*, 2020) et avoir des propriétés anti-spasmodiques et  
778 diurétiques, pouvant impacter la vitesse de transit et la constance des fientes (Miraj *et al.*, 2017).  
779 Une étude de l'effet dose ou du moment de distribution serait à conduire pour limiter les effets  
780 négatifs.  
781 Le taux de mortalité et l'état global de santé des animaux n'ont pas été modifiés par la  
782 supplémentation avec l'extrait de mélisse. Le nombre de filets atteints de défauts musculaires  
783 (white striping et wooden breast) avait tendance à être plus faible pour le lot supplémenté.  
784 L'effet bénéfique de la mélisse sur le statut antioxydant, non mesuré dans notre étude, a déjà  
785 été montré sur la qualité de la viande au travers l'oxydation plus faible des lipides (Kasapidou  
786 *et al.*, 2014). Le ratio hétérophile/lymphocyte (marqueur de l'immunité) était équivalent entre  
787 nos groupes. L'analyse des autres marqueurs sanguins (métabolisme, balance rédox et  
788 inflammation) a montré que seul le statut antioxydant total (TAS) exprimant l'activité  
789 antioxydante globale du sang était augmenté à J30 pour les animaux recevant la mélisse.  
790 L'alimentation retardée est connue pour avoir des effets négatifs sur les performances, avec des  
791 modifications immédiates et à moyen terme sur la balance redox (Guilloteau *et al.*, 2019 et  
792 Foury *et al.* 2020). Dans ce contexte, l'effet bénéfique de la consommation d'un extrait de  
793 mélisse sur la balance rédox a été confirmé par l'augmentation du statut antioxydant totale du  
794 sang plus marquée à la fin de la période d'élevage (J30).  
795

## 796 **b. Les effets du ginseng**

797 En phase de croissance, l'efficacité alimentaire des poulets consommant l'extrait de ginseng est  
798 meilleure mais sans effet significatif sur le poids vif des animaux.  
799 Quel que soit le moment de l'observation, la supplémentation de ginseng n'a pas modifié le  
800 comportement des poulets. Comme pour la mélisse, le score global de pododermatites  
801 augmentait significativement avec l'âge et en présence de ginseng dans l'aliment jusqu'à J21.  
802 Les différences n'étaient plus visibles en fin d'élevage.  
803 Le taux de mortalité et l'état global de santé (incluant les défauts musculaires) des animaux  
804 n'ont pas été modifiés par la supplémentation en ginseng. Les marqueurs sanguins du  
805 métabolisme, du stress oxydant, de la balance rédox n'ont pas été modifiés. En revanche,  
806 l'haptoglobine, marqueur de l'inflammation était présente en quantité plus réduite à J14, dans  
807 le sang des poulets consommant du ginseng. Ces résultats confirment l'effet anti-inflammatoire  
808 du ginseng, déjà montré sur les poulets (Lee et Lau, 2011 ; Bong *et al.* 2011). De nombreux  
809 auteurs ont également décrit des effets bénéfiques du ginseng sur l'immunité adaptative  
810 (Abdullahi, *et al.* 2016 ; Kallon et Abdullahi, 2015 ; Zhai *et al.*, 2011, 2014 ; Li *et al.*, 2012).  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819

820 Tableau S1. Evaluation de la distribution d'un aliment supplémenté en extrait de mélisse ou de  
 821 ginseng sur les indicateurs technico-économiques, sanitaires et de bien-être.  
 822

			Témoin	Mélisse (1 %)	<i>p</i> -value Mélisse	Témoin	Ginseng (0,05 %)	<i>p</i> -value Ginseng	
Technico-économique	Poids vif	J11	294	290	NS	294	294	NS	
		J21	767 <sup>b</sup>	780 <sup>a</sup>	0,0445	767	773	NS	
		J31	1847	1837	NS	1847	1851	NS	
	GMQ	J1-11	23	23	NS	23	23	NS	
		J12-21	47 <sup>b</sup>	49 <sup>a</sup>	0,0077	47	48	NS	
		J21-31	108	106	NS	108	108	NS	
	IC	J1-11	1,130	1,142	NS	1,130	1,138	NS	
		J12-21	1,601 <sup>b</sup>	1,542 <sup>a</sup>	0,001	1,601 <sup>b</sup>	1,570 <sup>a</sup>	0,001	
		J22-31	1,437	1,450	NS	1,437	1,445	NS	
Rendement	J32	75,20	75,90	NS	75,20	75,20	NS		
Sanitaire	Mortalité	J1-15	0,83	0,83	NS	0,83	0,28	NS	
		J1-31	2,22	3,06	NS	2,22	2,22	NS	
	White striping		44 <sup>b</sup>	38 <sup>a</sup>	0,0708	44	44	NS	
	Wooden breast	J32	18 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>	0,0517	18	15	NS	
	Muscle spaguetti		6	5	NS	6	11	NS	
	Hétérophiles		53,63	48,63	NS	53,63	47,63	NS	
	Lymphocytes	J31	46,13	51,38	NS	46,13	52,38	NS	
	Hétéro/Lympo		1,26	1,04	NS	1,26	1,03	NS	
	Haptoglobine	J14	1,30	1,29	NS	1,30 <sup>b</sup>	1,14 <sup>a</sup>	0,019	
		J31	2,12	1,98	NS	2,12	1,96	NS	
	TAS	J14	1,32	1,39	NS	1,32	1,27	NS	
		J31	1,22 <sup>b</sup>	1,36 <sup>a</sup>	0,0651	1,22	1,28	NS	
Bien-être	Intéraction	J15	Picage	0,33	0,78	NS	0,33	0,56	NS
			Exploration	0,11	0,33	NS	0,11	0,11	NS
			Etirements	2,44	2,33	NS	2,44	3,11	NS
			Etirements	4,11	3,78	NS	4,11	3,33	NS
	Intéraction	J28	Picage	0,11	0,22	NS	0,11	0,22	NS
			Exploration	0,00	0,11	NS	0,00	0,11	NS
			Etirements	0,56	0,22	NS	0,56	0,78	NS
			Etirements	4,00	3,78	NS	4,00	2,89	NS
	Pododermatites	J11	1,23 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	<0,0001	1,23 <sup>a</sup>	1,54 <sup>b</sup>	0,0056	
		J21	1,67 <sup>a</sup>	2,15 <sup>b</sup>	<0,0001	1,67 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	<0,0001	
		J31	2,08 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	<0,0001	2,08	2,14	NS	

823

### 824 4.3. Analyse multicritère

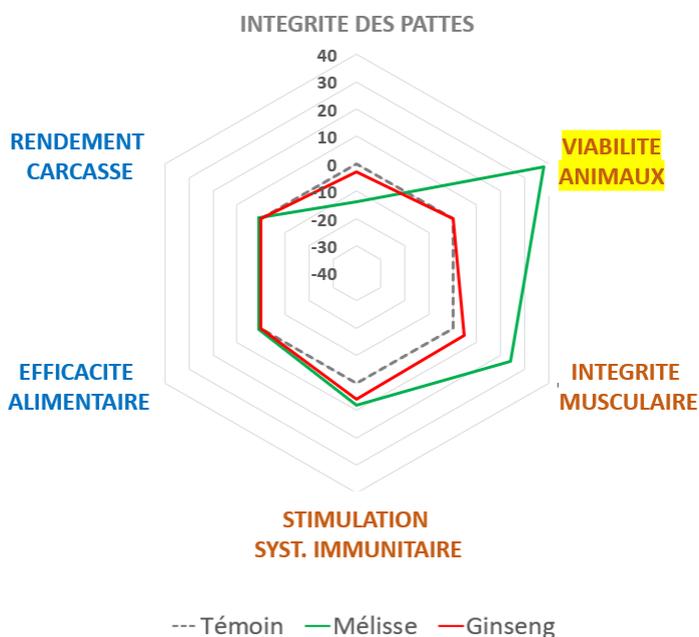
825

826 Pour illustrer l'impact des extraits végétaux sur chacun des objectifs économique, sanitaire et  
827 bien-être, une représentation graphique sous forme de radar multicritère a été réalisée (Figure  
828 9). Pour chaque objectif, la valeur en fin d'élevage, 2 à 3 indicateurs d'intérêt et/ou sensibles à  
829 l'incorporation d'extrait ont été sélectionnés. Les résultats sont exprimés en pourcentage  
830 d'amélioration ou de dégradation des indicateurs par rapport aux résultats du groupe témoin.  
831 Cette représentation montre clairement, qu'à résultats technico-économiques équivalents en fin  
832 d'élevage, l'incorporation de mélisse ou de ginseng, améliore les défenses immunitaires des  
833 poulets, et la mélisse aurait tendance à réduire l'apparition de troubles musculaires. Il faut  
834 toutefois être vigilant à l'impact sur l'apparition de pododermatites, plus marquée avec la  
835 mélisse.

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

847

848



849

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

852 *Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amélioration ou de dégradation des*  
853 *indicateurs technico-économiques (bleue), sanitaires (marron) et de bien-être (gris), par*  
854 *rapport aux résultats du groupe témoin.*  
855

## 856 Conclusion

857  
858 Les différentes étapes décrites, indépendantes mais complémentaires, ont permis d'élaborer et  
859 de valider une méthodologie globale, pertinente et robuste pour sélectionner, évaluer la qualité  
860 et les effets des extraits de plantes sur l'immunité des poulets en limitant autant que possible  
861 l'expérimentation sur les animaux. La caractérisation des extraits par des méthodes de référence  
862 est un préalable nécessaire pour connaître la qualité du produit et ajuster les taux  
863 d'incorporation. Les méthodes *in vitro* et *ex vivo* sont à privilégier, mais elles ne remplaceront  
864 pas les essais *in vivo* qui permettent une évaluation multicritère tenant compte des interactions  
865 fonctionnelles. Cette démarche est applicable à tous types d'extraits de plantes et elle peut être  
866 adaptée pour d'autres espèces animales ou d'autres effets biologiques. Cette boîte à outils  
867 méthodologiques est désormais disponible pour les firmes services, fabricants d'aliments,  
868 vétérinaires et organisations de production et ainsi guider leur choix.

869 Le projet a confirmé que des extraits de plantes, correctement sélectionnés, ont un réel impact  
870 bénéfique sur les animaux au niveau cellulaire et immunitaire. Leurs effets ne sont pas neutres,  
871 même à faible dose. Ce travail montre également qu'il est nécessaire de réviser les méthodes et  
872 protocoles pour évaluer les effets des plantes. Il est nécessaire de connaître les éventuelles  
873 suppléments des aliments distribués et d'en discuter avec ses conseillers avant d'ajouter  
874 des extraits de plante ou huiles essentielles via l'eau de boisson, il peut exister des interactions  
875 avec la matrice alimentaire, des interactions avec d'autres traitements, une inappétence ou  
876 encore une toxicité par doses cumulées. L'usage de plus en plus fréquent des préparations à  
877 base de plantes ou d'huiles essentielles pour gérer la santé des animaux d'élevage, a conduit  
878 l'Anses à s'autosaisir, en janvier 2022, afin de proposer une méthode d'évaluation adaptée aux  
879 médicaments vétérinaires à base de plantes. Leur usage doit bien sûr être raisonné, réservé à  
880 des cas d'usage spécifique comme les antibiotiques, les deux types d'approches à visée de la  
881 santé étant complémentaires. Il pourrait en être de même pour les extraits de plantes qui font  
882 partie des additifs alimentaires.

883 La construction de cette méthode globale est le fruit d'un partenariat inter-filière et inter-  
884 disciplinaire, riche d'enseignement et nécessaire pour intégrer tous les pans de la question de  
885 l'incorporation des extraits de plantes dans l'aliment des volailles dans un objectif de  
886 renforcement de l'immunité. L'organisation d'un colloque dédié<sup>21</sup> a permis d'ouvrir le dialogue  
887 entre chercheurs, producteurs d'extraits, firmes services, fabricants d'aliments, vétérinaires et  
888 organisations de production. Le nouveau guide d'aide à la classification réglementaire des  
889 produits à base de plantes et la démarche MEXAVI y ont été présentés et discutés avec les  
890 utilisateurs pour envisager les mises en œuvre directes et les pistes à poursuivre.  
891

## 892 Contribution des auteurs

893

---

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

894 Laurence Guilloteau et Angélique Travel ont coordonné la réflexion globale et rédigé le  
895 manuscrit. Rodrigo Guabiraba, Denis Bellenot, Hanh Dufat, Margot Lamarque et Marion  
896 Pertusa ont contribué à la rédaction et aux illustrations. Tous les auteurs ont relu et approuvé  
897 la version finale du manuscrit.

## 898 Remerciements

899  
900 Ce travail a été conduit dans le cadre du projet Cas Dar RT MEXAVI (n° 1612 - 2017/2020) et  
901 réalisé dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD). Il a  
902 bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Agriculture et de l'interprofession poulets de  
903 chair (CIPC). Nous remercions le personnel de l'Unité d'expérimentation aviaire (PEAT,  
904 INRAE, 2018, 37380 Nouzilly, France ; <https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12>) et  
905 de l'installation expérimentale avicole (NUTRICIA, Haut Mauco, France) pour la conduite des  
906 essais poulets et pour leur aide. Nous remercions également Pharmanager Ingrédients (Angers,  
907 France) pour avoir fourni les extraits de plantes et les techniciens de l'iteipmai (Melay Chemillé-  
908 en-Anjou, France) pour avoir effectué les analyses sur les extraits de plante et les aliments.  
909 Nous remercions Géraldine Chanu (AFCA-CIAL) pour son expertise sur le statut réglementaire  
910 des plantes et produits à base de plantes.

## 911 Références

- 912  
913 Abdullahi A.Y., Kallon S., Yu X., Zhang Y., Li G., 2016. Vaccination with astragalus and  
914 ginseng polysaccharides improves immune response of chickens against H5N1 avian  
915 influenza virus. *BioMed Res. Int.*, ID 1510264, 8p. [doi.org/10.1155/2016/1510264](https://doi.org/10.1155/2016/1510264).  
916 AFCA-CIAL, 2020. Guide des bonnes pratiques pour l'utilisation des plantes et produits à base  
917 de plantes en alimentation animale. Octobre 2020.  
918 Alsobayel A.A., Al-Miman S.S., 2010. Effect of pre-incubation storage of hatching eggs on  
919 subsequent post-hatch growth performance and carcass quality of broilers. *Int. J. Poult.*  
920 *Sci.*, 9(5), 436-439. doi: 10.3923/ijps.2010.436.439.  
921 Anses, 2018. AVIS et RAPPORT relatif à l'état des lieux des alternatives aux antibiotiques en  
922 vue de diminuer leur usage en élevage. Saisine n° 2013-SA-0122, Saisines liées n° 2011-  
923 SA-0071 et 2012-SA-0067. France, février 2018, rapport, 208p.  
924 Anses, 2020. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en  
925 France en 2019, Anses-ANMV, France, novembre 2020, rapport, 97 pp.  
926 Arceusz A., Wesolowski M., 2013. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L.  
927 commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *J.*  
928 *Pharm. Biomed. Anal.*, 83:215–220. doi:10.1016/j.jpba.2013.05.020.  
929 Astani A., Heidary N., Schnitzler P., 2014. Attachment and penetration of acyclovirus-resistant  
930 herpes simplex virus are inhibited by *Melissa officinalis* extract: *Melissa officinalis* inhibits  
931 herpes simplex virus. *Phytother. Res.*, 28, 1547-1552. doi:10.1002/ptr.5166  
932 Bar Shira E., Sklan D., Friedman A., 2004. Impaired immune response in broiler hatchling  
933 hindgut following delayed access to feed. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 105, 33–45. doi:  
934 10.1016/j.vetimm.2004.12.011.  
935 Beug H., von Kirchbach A., Döderlein G., Conscience J.F., Graf T., 1979. Chicken  
936 hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses  
937 display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 18, 375–390. doi:10.1016/0092-  
938 8674(79)90057-6.

- 939 Bignon, L., Mika, A., Mindus, C., Litt, J., Souchet, C., Bonnaud, V. et al. (2017). A shared and  
940 practical tool for welfare assessment in poultry and rabbit: EBENE. X<sup>th</sup> European  
941 Symposium on Poultry Welfare. Ploufragan, France.
- 942 Bilen S., Altief T.A.S., Özdemir K.Y., Salem M.O.A., Terzi E., Güney K., 2020. Effect of  
943 lemon balm (*Melissa officinalis*) extract on growth performance, digestive and antioxidant  
944 enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish*  
945 *Physiol. Biochem.*, 46, 471–81. doi: 10.1007/s10695-019-00737-z.
- 946 Bong M.H., Ji S.Y., Park J.C., Moon H.K., Lee S.C., Lee J.H., Hong J.K., 2011. Effect of  
947 Feeding Plum and Red Ginseng Marc on Vital Reaction in Broiler Stress. *Korean J. Poult.*  
948 *Sci.*, 38(3), 213-223. doi.org/10.5536/kjps.2011.38.3.213.
- 949 Bourin (2017). Les défauts de carcasse du poulet de chair : Référentiel visuel d'identification.  
950 Leaflet, 5 pages. [https://www.itavi.asso.fr/content/les-defauts-de-carcasse-du-poulet-de-](https://www.itavi.asso.fr/content/les-defauts-de-carcasse-du-poulet-de-chair)  
951 [chair](https://www.itavi.asso.fr/content/les-defauts-de-carcasse-du-poulet-de-chair)
- 952 Boyner M., Ivarsson E., Andersson Franko M., Rezaei M., Wall H., 2021. Effect of hatching  
953 time on time to first feed intake, organ development, enzymatic activity and growth in  
954 broiler chicks hatched on-farm. *Animal*, 15 (2), doi.org/10.1016/j.animal.2020.100083.
- 955 Bruneton J., 2016. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Tec & Doc, Lavoisier  
956 Paris.
- 957 Cardoso Dal Pont G., Farnell M., Farnell Y., Kogut M.H., 2020. Dietary Factors as Triggers of  
958 Low-Grade Chronic Intestinal Inflammation in Poultry. *Microorganisms*, 8(1):139. doi:  
959 10.3390/microorganisms8010139. PMID: 31963876; PMCID: PMC7022292.
- 960 Dhama K., Tiwari R., Khan R., Chakraborty S.M.G., Karthik K, *et al.*, 2014. Growth Promoters  
961 and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles  
962 and Beneficial Applications: The Trends and Advances: A Review. *Int. J. Pharmacol.*,  
963 10:129–159.
- 964 Ducrot C., Fric D., Lalmanach A.-C., Monnet V., Sanders P., & Schouler C., 2017. Perspectives  
965 d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage. *INRAE Prod.*  
966 *Anim.*, 30(1), 77–88. doi.org/10.20870/productions-animales.2017.30.1.2234.
- 967 Elibol O., Brake J. 2008. Effect of Egg Weight and Position Relative to Incubator Fan on  
968 Broiler Hatchability and Chick Quality. *Poult. Sci.*, 87(9), 1913-1918.  
969 doi.org/10.3382/ps.2008-00014
- 970 El-Senousey H.K., Chen B., Wang J.Y., Atta A.M., Mohamed F.R., Nie Q.H., 2018. Effects of  
971 dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant  
972 defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress  
973 by dexamethasone. *Poult Sci.*, 97:30–38. doi:10.3382/ps/pex298.
- 974 Ericsson M., Henriksen R., Bélteky J., Sundman A.-S., Shionoya K., Jensen P., 2016. Long-  
975 Term and Transgenerational Effects of Stress Experienced during Different Life Phases in  
976 Chickens (*Gallus gallus*). *PLoS ONE*, 11(4). doi.org/10.1371/journal.pone.0153879.
- 977 Fortun-Lamothe L, Collin A, Combes S, Ferchaud S, Germain K, Guilloteau LA, GUNIA M,  
978 LeFloc'h N, MANOLI C, Montagne L, Saviotto D. Principes, cadre d'analyse et leviers  
979 d'action à l'échelle de l'élevage pour une gestion intégrée de la santé chez les animaux  
980 monogastriques. *INRAE Productions Animales* (soumis).
- 981 Foury A., Collin A., Helbling J.-C., Leterrier C., Moisan M.-P., Guilloteau L.A., 2020.  
982 Spontaneous intake of essential oils after a negative postnatal experience has long-term  
983 effects on blood transcriptome in chickens. *Sci. Rep.*, 10:20702. doi:10.1038/s41598-020-  
984 77732-5.
- 985 Garrido D., Alber A., Kut E., Chanteloup N.K., Lion A., Trotureau A., Dupont J., Tedin K.,  
986 Kaspers B., Vervelde L., Trapp S., Schouler C., Guabiraba R., 2018. The role of type I  
987 interferons (IFNs) in the regulation of chicken macrophage inflammatory response to

988 bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.*, 86:156-170. doi: 10.1016/j.dci.2018.04.025.  
989 Epub 2018 May 2. PMID: 29729283.

990 Goel A., 2021. Heat stress management in poultry. *J Anim Physiol Anim Nutr.*,105(6), 1136-  
991 1145. doi: 10.1111/jpn.13496. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33417275.

992 Guilloteau L.A., Collin A., Koch A., Leterrier C., 2019. Spontaneous Intake and Long-Term  
993 Effects of Essential Oils After a Negative Postnatal Experience in Chicks. *Front Vet. Sci.*  
994 6:72. doi:10.3389/fvets.2019.00072.

995 Gross WB, Siegel HS. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in  
996 chickens. *Avian Dis* (1983) 27:972–979.

997 Islam S.U., Lee J.H., Shehzad A., Ahn E.-M., Lee Y.M., Lee Y.S., 2018. Decursinol Angelate  
998 Inhibits LPS-Induced Macrophage Polarization through Modulation of the NFκB and  
999 MAPK Signaling Pathways. *Molecules*, 23: doi:10.3390/molecules23081880.

1000 Kaiser M.G., Block S.S., Ciraci C., Fang W., Sifri M., Lamont S.J., 2012. Effects of dietary  
1001 vitamin E type and level on lipopolysaccharide-induced cytokine mRNA expression in  
1002 broiler chicks. *Poult. Sci.*, 91, 1893–1898. doi:10.3382/ps.2011-02116.

1003 Kallon S., Abdullahi A.Y., 2015. Immunity against avian influenza virus panax ginseng  
1004 polysaccharide (GPS) can improve immunity against H9N2 avian influenza virus in  
1005 chickens. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, 5(3), 715-722.

1006 Kasapidou E., Giannenas I., Mitlianga P., Sinapis E., Bouloumpasi E., Petrotos K., *et al.*, 2014.  
1007 Effect of *Melissa officinalis* supplementation on growth performance and meat quality  
1008 characteristics in organically produced broilers. *Br. Poult. Sci.*, 55, 774–784.  
1009 doi:10.1080/00071668.2014.974140.

1010 Kawaguchi T., Nomura K., Hirayama Y., Kitagawa T., 1987. Establishment and  
1011 characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res.*,  
1012 47(16), 4460-4. PMID: 3607775.

1013 Kim Y.J., Lee G.D., Choi I.H., 2014. Effects of dietary supplementation of red ginseng marc  
1014 and  $\alpha$ -tocopherol on the growth performance and meat quality of broiler chicken. *J. Sci.*  
1015 *Food Agric.*, 94, 1816-1821. doi.org/10.1002/jsfa.6497.

1016 Klein-Junior L.C., de Souza M.R., Viaene J., Bresolin T.M.B., de Gasper A.L., Henriques A.T.,  
1017 Heyden Y.V., 2021. Quality Control of Herbal Medicines: From Traditional Techniques to  
1018 State-of-the-art Approaches. *Planta Med.*, 87(12-13), 964-988. doi: 10.1055/a-1529-8339.  
1019 Epub 2021 Aug 19. PMID: 34412146.

1020 Kolluri S., Elbirt K.K., Bonkovsky H.L., 1999 Heme biosynthesis in a chicken hepatoma cell  
1021 line (LMH): comparison with primary chick embryo liver cells (CELC). *Biochim. Biophys.*  
1022 *Acta.*, 1472(3), 658-67. doi: 10.1016/s0304-4165(99)00159-2. PMID: 10564780.

1023 Krekora M., Szymanska-Chargot M., Niewiadomski, Z., Miś A., & Agnieszka N., 2020. Effect  
1024 of cinnamic acid and its derivatives on structure of gluten proteins – A study on model  
1025 dough with application of FT-Raman spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 107, 105935.  
1026 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105935>.

1027 Lairez J., Feschet P., Botreau R., Bockstaller C., Fortun-Lamothe L., Bouvarel I., Aubin J.,  
1028 2017. L'évaluation multicritère des systèmes d'élevage pour accompagner leurs évolutions  
1029 : démarches, enjeux et questions soulevées. *INRA Prod. Anim.*, 30 (3), 255-268.

1030 Lamot D.M., Van de Linde I.B., Molenaar R., Van der Pol C.W., Wijtten P.J.A., Kemp B., Van  
1031 den Brand H., 2014. Effects of moment of hatch and feed access on chicken development.  
1032 *Poult. Sci.*, 93, 2604–2614. doi: 10.3382/ps.2014-04123.

1033 Lee D.C., Lau A.S., 2011, Effects of *Panax ginseng* on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated  
1034 Inflammation: A Mini-Review. *Molecules*, 16(4), 2802-2816.  
1035 doi.org/10.3390/molecules16042802.

- 1036 Li Y., Yan X., Hu S.H.F., 2012. Ginseng Stem-Leaf Saponins and Oil Adjuvant Synergistically  
1037 Promote the Immune Responses to Newcastle Disease in Chickens. *J. Anim. Vet. Adv.*, 11  
1038 (14), 2423-2428.
- 1039 Liu L., Shen J., Zhao C., Wang X., Yao J., Gong Y., Yang X., 2015. Dietary Astragalus  
1040 polysaccharide alleviated immunological stress in broilers exposed to lipopolysaccharide.  
1041 *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 624–632. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.057.
- 1042 Lv Z.-P., Peng Y.-Z., Zhang B.-B., Fan H., Liu D., Guo Y.-M., 2018. Glucose and lipid  
1043 metabolism disorders in the chickens with dexamethasone-induced oxidative stress. *J*  
1044 *Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 102:e706–e717. doi:10.1111/jpn.12823.
- 1045 Marcinčáková D., Čertík M., Marcinčák S., Popelka P., Šimková J., Klemková T., Petrovič V.,  
1046 Tučková M. & Bača M., 2011. Effect of dietary supplementation of *Melissa officinalis* and  
1047 combination of *Achillea millefolium* and *Crataegus oxyacantha* on broiler growth  
1048 performance, fatty acid composition and lipid oxidation of chicken meat. *Ital. J. Anim.*  
1049 *Sci.*, 10, 4, doi:10.4081/ijas.2011.e43.
- 1050 Mengome L.E., Voxeur A., Akue J.P., Lerouge P., 2014. In vitro proliferation and production  
1051 of cytokine and IgG by human PBMCs stimulated with polysaccharide extract from plants  
1052 endemic to Gabon. *Molecules*, 19, 18543–18557. doi:10.3390/molecules191118543.
- 1053 Miraj S., Rafieian-Kopaei null, Kiani S., 2017. *Melissa officinalis* L: A Review Study With an  
1054 Antioxidant Prospective. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 22, 385–394.  
1055 doi:10.1177/2156587216663433.
- 1056 Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to  
1057 proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1-2), 55-63. doi:  
1058 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.
- 1059 Nadeem M., Imran M., Aslam Gondal T., Imran A., Shahbaz M., Muhammad Amir R., Wasim  
1060 Sajid M., Batool Qaisrani T., Atif M., Hussain G., Salehi B., Adrian Ostrander E., Martorell  
1061 M., Sharifi-Rad J., C. Cho W., Martins N., 2019. Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid:  
1062 A Comprehensive Review. *Appl. Sci.*, 9, 3139. doi.org/10.3390/app9153139.
- 1063 Noy Y., Sklan D., 1999. Energy utilization in newly hatched chicks. *Poult. Sci.*, 78, 1750–1756.  
1064 doi: 10.1093/ps/78.12.1750.
- 1065 Noy Y., Sklan D., 2001. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. *Poult. Sci.*,  
1066 80, 1490–1495. doi: 10.1093/ps/80.10.1490.
- 1067 Peroval M.Y., Boyd A.C., Young J.R., Smith A.L., 2013. A critical role for MAPK signalling  
1068 pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One.*, 8(2):e51243.  
1069 doi: 10.1371/journal.pone.0051243.
- 1070 Pertusa M., Skiba F., Godfrain B., Guilloteau L., Cailleau Audouin E., Chartrin P., Travel A.,  
1071 Quentin M., 2017. Comparaison de l'effet de différents additifs alimentaires en production  
1072 de poulets label rouge. *Douzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie*  
1073 *Gras*, Tours, 05 et 06 avril 2017.
- 1074 Petrovic V., Marcincak S., Popelka P., Simkova J., Martonova M., Buleca J., Marcincakova D.,  
1075 Tuckova M., Molnar L., Kovac G., 2012. The effect of supplementation of clove and  
1076 agrimony or clove and lemon balm on growth performance, antioxidant status and selected  
1077 indices of lipid profile of broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 96(6), 970-977.  
1078 doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01207.
- 1079 Poorghasemi M., Seidavi A., Mohammadi M., Simões J., Laudadio V., Tufarelli V., 2017.  
1080 Effect of Dietary Inclusion of Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.) Extract on  
1081 Performance, Gut Microflora, Blood Parameters, Immunity and Carcass Traits of Broilers.  
1082 *J. Poult. Sci.*, 54, 263–270. doi:10.2141/jpsa.0170001.
- 1083 Qi T., Li H., Li S., 2017. Indirubin improves antioxidant and anti-inflammatory functions in  
1084 lipopolysaccharide-challenged mice. *Oncotarget*, 8, 36658–36663.  
1085 doi:10.18632/oncotarget.17560.

- 1086 Qiao Y., Wang Z., Han Z., Shao Y., Ma Y., Liang Y., Chen Z., Wu H., Cui L., Zhang Y., Liu  
 1087 S., Li H., 2020. Global exploration of the metabolic requirements of gallid  
 1088 alphaherpesvirus 1. PLoS Pathog., 16(8):e1008815. doi: 10.1371/journal.ppat.1008815.  
 1089 PMID: 32833996; PMCID: PMC7470321.
- 1090 Ravindran V. 2003. Development of digestive function in neonatal poultry: physiological  
 1091 limitations and potential. Proceedings of the Australian Poultry Science symposium, (10–  
 1092 12 February 2003), Sydney, Australia, 1-7.
- 1093 Richmond J., 2000. The 3Rs-Past, present and future. Scand. J. Lab. Anim. Sci., 27, 84-92.
- 1094 Russell W.M.S., Burch R.L., 1959. The principles of humane experimental technique.  
 1095 Wheathampstead: Universities Federation for Animal Welfare. Russell W.M.S., Burch  
 1096 R.L.(Eds), London, UK:Methuen, 238 pp.
- 1097 Sklan D., Noy Y., Hoyzman A., Rozenboim L., 2020. Decreasing weight loss in the hatchery  
 1098 by feeding chicks and poults in hatching trays. J. Appl. Poult. Res., 9, 142–148.  
 1099 doi.org/10.1093/japr/9.2.142.
- 1100 Tesseraud S., Pym R.A., Le Bihan-Duval E., Duclos M.J., 2003. Response of broilers selected  
 1101 on carcass quality to dietary protein supply: live performance, muscle development, and  
 1102 circulating insulin-like growth factors (IGF-I and -II). Poult. Sci., 82, 1011-1016.
- 1103 Travel A., Petit A., Barat P., Collin A., Bourrier-Clairat C., Pertusa M., Skiba F., Crochet S.,  
 1104 Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Guillory V., Bellenot D., Guabiraba R., Guilloteau L.A.,  
 1105 2021. Methodologies to Assess the Bioactivity of an Herbal Extract on Immunity, Health,  
 1106 Welfare and Production Performance in the Chicken: The Case of *Melissa officinalis* L.  
 1107 Extract. Front Vet Sci., 8:759456. doi: 10.3389/fvets.2021.759456.
- 1108 Van de Ven L.J.F., Van Wagenberg A.V., Decuypere E., Kemp B., Van den Brand H., 2013.  
 1109 Perinatal broiler physiology between hatching and chick collection in 2 hatching systems.  
 1110 Poult. Sci., 92(4), 1050-1061. doi.org/10.3382/ps.2012-02534.
- 1111 Wei X.-C., Cao B., Luo C.-H., Huang H.-Z., Tan P., Xu X.-R., *et al.*, 2020. Recent advances of  
 1112 novel technologies for quality consistency assessment of natural herbal medicines and  
 1113 preparations. Chin. Med., 15, 56. doi:10.1186/s13020-020-00335-9.
- 1114 Willemsen H., Debonne M., Swennen Q., Everaert N., Careghi C., Han H., Bruggeman V.,  
 1115 Tona K., Decuypere E., 2010. Delay in feed access and spread of hatch: importance of  
 1116 early nutrition. World's Poult. Sci. J., 66, 177-188. doi.org/10.1017/S0043933910000243.
- 1117 Wu Q.J., Wang Y.Q., Qi Y.X., 2017. Influence of procyanidin supplementation on the immune  
 1118 responses of broilers challenged with lipopolysaccharide. Anim. Sci. J., 88, 983–990.  
 1119 doi:10.1111/asj.12729.
- 1120 Yu J., Chen Y., Zhai L., Zhang L., Xu Y., Wang S., Hu S., 2015. Antioxidative effect of ginseng  
 1121 stem-leaf saponins on oxidative stress induced by cyclophosphamide in chickens. Poult.  
 1122 Sci., 97, 927-933. doi: 10.3382/ps/pev055.
- 1123 Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., Hassar M., 2002. Acute and  
 1124 chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. Phytomedicine, 9(1), 69-74. doi: 10.1078/0944-  
 1125 7113-00084. PMID: 11924767.
- 1126 Zhai L., Li Y., Wang W., Hu S., 2011. Enhancement of humoral immune responses to  
 1127 inactivated Newcastle disease and avian influenza vaccines by oral administration of  
 1128 ginseng stemand-leaf saponins in chickens. Poult. Sci., 90, 1955–1959. doi:  
 1129 10.3382/ps.2011-01433.
- 1130 Zhai L., Wang Y., Yu J., Hu S., 2014. Enhanced immune responses of chickens to oral  
 1131 vaccination against infectious bursal disease by ginseng stem-leaf saponins. Poult. Sci.,  
 1132 93(10), 2473-2481. doi.org/10.3382/ps.2014-04056.