

Université de Montréal

Étude de l'impact de deux traitements, dont un sans antibiotiques, sur la santé digestive et les populations de *Clostridium perfringens* dans des élevages de poulets de chair

Par

Marie-Lou Gaucher

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D.)

en sciences vétérinaires

Mai 2015

© Marie-Lou Gaucher, 2015

RÉSUMÉ

Le problème grandissant de l'antibiorésistance remet en question plusieurs pratiques reliées à l'utilisation des antibiotiques, dont l'usage à grande échelle pour des fins de promotion de la croissance chez les animaux de consommation. Depuis 2006, le retrait des antibiotiques dans les élevages de poulets de chair en Europe a été associé à la résurgence d'entérite nécrotique, une maladie intestinale causée par la bactérie *Clostridium perfringens*. Alors que la pathogénie de la maladie semblait bien comprise, le retrait des antibiotiques a montré que peu de solutions de remplacement sont disponibles afin de prévenir cette maladie. Très peu d'études se sont intéressées à mieux caractériser la dynamique des populations de *C. perfringens* dans les élevages avicoles et l'effet que pouvait avoir le retrait des antibiotiques sur l'évolution de ces populations.

La présente étude a évalué l'impact du remplacement des antibiotiques promoteurs de croissance et des anticoccidiens pendant une période de 14 mois, dans huit élevages commerciaux de poulets de chair au Québec. Un protocole d'élevage alternatif, combinant des stratégies telles que des produits à base d'huiles essentielles, des acides organiques et inorganique, une vaccination contre la coccidiose ainsi qu'une amélioration des conditions de démarrage des poussins, a été utilisé en remplacement des antimicrobiens. Les performances zootechniques, la santé digestive ainsi que l'occurrence d'entérite nécrotique pour les lots de poulets soumis au protocole d'élevage alternatif ont été comparées avec celles de lots de poulets de chair recevant

une ration conventionnelle. Des analyses moléculaires basées sur la PCR et le PFGE ont été utilisées afin de documenter l'impact de la mise en place du protocole d'élevage alternatif sur les populations de *C. perfringens*.

Les résultats obtenus montrent qu'aucune différence entre les groupes soumis aux deux types de protocoles n'est observée en ce qui a trait à la viabilité en élevage, à l'âge d'abattage et aux taux de condamnations à l'abattoir. Toutefois, les lots soumis au traitement alternatif ont eu des performances moindres pour le poids moyen à l'abattage, le gain moyen quotidien et la conversion alimentaire. Un peu plus de 27% des lots soumis au protocole alternatif ont connu un épisode d'entérite nécrotique clinique. Les analyses ont aussi montré que l'un ou l'autre des protocoles ne semble pas exercer d'influence particulière sur la dynamique temporelle des populations de *C. perfringens*. Pour les lots soumis au protocole d'élevage alternatif, une forte diversité génétique pour *C. perfringens* a été liée à un risque augmenté de vivre un épisode d'entérite nécrotique. À l'opposé, les lots alternatifs ayant vécu des épisodes récurrents de la maladie ont montré une diminution significative de la diversité génétique, ainsi qu'une augmentation marquée du nombre de souches de *C. perfringens* transportant plusieurs gènes de virulence.

La présente étude a permis de mieux documenter, d'un point de vue économique et scientifique, la production de poulets de chair élevés sans antibiotiques ni anticoccidiens au Québec. Cette étude est la seule du genre s'étant intéressée à la caractérisation et à la comparaison dans le temps des flores de *C. perfringens* retrouvées dans les deux types d'élevages. Elle a révélé que la production à grande

échelle de poulets de chair élevés sans antibiotiques ni anticoccidiens est possible au Québec, mais que celle-ci présente des impacts sur les performances zootechniques des oiseaux, sur leur santé digestive et sur la dynamique des populations de *C. perfringens*.

Mots-clés : poulets de chair, antibiotiques, huiles essentielles, acides organiques, vaccination coccidieuse, performances zootechniques, santé digestive, entérite nécrotique, *Clostridium perfringens*, dynamique populationnelle

ABSTRACT

In view of the increasing problem of antibiotic resistance, the large-scale use of growth promoting antibiotics in food-producing animals is being questioned. The voluntary ban of these compounds since 2006 in Europe, has been associated with a resurgence of necrotic enteritis, an intestinal disease of broiler chickens caused by *Clostridium perfringens*. Unfortunately, few alternatives are available and the pathogenesis of necrotic enteritis is yet to be fully understood. Surprisingly, there is a paucity of scientific papers on *C. perfringens* population diversity in broiler chicken flocks as well as on the effects of antimicrobial withdrawal on this bacterial population dynamics.

The current study evaluated the impact of replacing antibiotic growth promoters and anticoccidials, over a 14-month period, on eight commercial broiler chicken farms in Québec. A drug-free rearing protocol, combining essential oil-based products, organic and inorganic acids, anticoccidial vaccination and chick brooding conditions improvement, was used in place of antimicrobials. Zootechnical performances, digestive health parameters and necrotic enteritis occurrence were compared between conventional and drug-free flocks involved in this study. Molecular approaches such as PCR and PFGE were used to monitor the impact of both rearing protocols on *C. perfringens* populations.

Results show that livability, age at time of slaughter and total condemnations were not affected by the drug-free program. However, the drug-free flocks showed a

decrease in mean live weight and in the daily weight gain, while feed conversion ratio was increased for drug-free flocks. Nearly 27% of the drug-free flocks experienced a clinical necrotic enteritis outbreak. Molecular analysis showed that *C. perfringens* temporal dynamics seems to be little affected by both rearing protocols. For the drug-free flocks, an initially greater genotypic diversity was linked with an increased risk of experiencing necrotic enteritis. On the other hand, recurring outbreaks of the disease in affected flocks caused a significant decrease of this genotypic diversity, as well as an increase in the number of *C. perfringens* strains carrying multiple virulence genes.

The current study allowed us to better document the economical and scientific aspects of a drug-free broiler chicken production in Québec. A limited number of scientific papers relative to the comparison of the influence of different rearing protocols on *C. perfringens* populations have been published so far. Results showed that drug-free broiler chicken production in Québec is economically feasible, though impacting the zootechnical and health performances, as well as *C. perfringens* population temporal dynamics.

Key words : broiler chickens, antibiotics, essential oils, organic acids, anticoccidial vaccination, zootechnical performances, digestive health, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, population dynamics

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES SIGLES ABBRÉVIATIONS.....	xviii
DÉDICACE.....	xix
REMERCIEMENTS.....	xx
Chapitre 1.	
INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2.	
RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	7
2.1 Revue générale des infections à <i>C. perfringens</i>	8
2.1.1 Caractéristiques générales, classification et identification du microorganisme.....	8
2.1.2 Infections et maladie chez la volaille.....	11
2.2.2.1 L'entérite nécrotique aviaire.....	11

2.2.2.2	Incidence de l'entérite nécrotique et prévalence de <i>C. perfringens</i>	17
2.2.2.3	Distribution, sources de contamination et persistance dans l'environnement...	22
2.2	Virulence de <i>C. perfringens</i>	24
2.2.1	Toxines et Enzymes.....	24
2.2.1.1	La toxine alpha.....	25
2.2.1.2	La toxine bêta.....	28
2.2.1.3	La toxine epsilon.....	30
2.2.1.4	La toxine iota.....	33
2.2.1.5	La toxine bêta-2.....	34
2.2.1.6	L'entérotoxine.....	36
2.2.1.7	La toxine NetB.....	40
2.2.1.8	La toxine TpeL.....	41
2.2.2	Bactériophages et bactériocines.....	43
2.2.3	Plasmides.....	47
2.2.4	L'adhésion bactérienne, le pilus de type IV et la motilité.....	50
2.3	Principaux facteurs de risque associés à l'entérite nécrotique.....	55
2.3.1	Coccidiose.....	55
2.3.2	Composition de la diète.....	60

2.3.3	Immunosuppression.....	64
2.3.4	Dommmages à la muqueuse intestinale.....	66
2.3.5	Arrêt des antimicrobiens promoteurs de croissance et des anticoccidiens.....	67
2.3.6	Souches de <i>C. perfringens</i>	67
2.4	Méthodes de prévention et de contrôle de la maladie.....	74
2.4.1	Approche conventionnelle.....	74
2.4.1.1	Antimicrobiens.....	74
2.4.1.2	Anticoccidiens ionophores.....	76
2.4.2	Approches alternatives.....	76
2.4.2.1	Acides organiques.....	77
2.4.2.2	Huiles essentielles.....	80
2.4.2.3	Prébiotiques, probiotiques et produits d'exclusion compétitive.....	87
2.4.2.4	Enzymes et formulation de la diète.....	94
2.4.2.5	Vaccination contre la coccidiose.....	100
2.4.2.6	Vaccination contre <i>C. perfringens</i>	102
2.5	Caractérisation génétique de <i>C. perfringens</i>	110

Chapitre 3.

Matériels, méthodes et résultats.....	117
ARTICLE 1, publié, Poultry Science 2015.....	118
Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, <i>C. perfringens</i> and <i>Campylobacter jejuni</i> occurrences at farm level.....	118
3.1 Abstract.....	119
3.2 Introduction.....	122
3.3 Materials and Methods.....	124
3.3.1 Study design.....	124
3.3.2 Farm selection.....	124
3.3.3 Conventional rearing protocol.....	125
3.3.4 Drug-free program.....	125
3.3.4.1 Coccidiosis vaccination.....	126
3.3.4.2 Feed and feed supplements.....	126
3.3.4.3 Water quality.....	126
3.3.4.4 Optimized brooding conditions.....	126
3.3.5 Study conduct and data collection.....	127
3.3.5.1 Data collection.....	127

3.3.5.2 Farm visits.....	128
3.3.6 Laboratory analysis.....	129
3.3.6.1 Moisture content analysis.....	129
3.3.6.2 Microscopic analysis of digestive tracts.....	129
3.3.6.3 Isolation and identification of <i>C. perfringens</i> strains.....	130
3.3.6.4 Isolation and identification of <i>Campylobacter</i> strains.....	131
3.3.7 Statistical analysis.....	131
3.4 Results.....	132
3.4.1 Farm study summary.....	133
3.4.1.1 Water quality.....	133
3.4.1.2 Performance data.....	133
3.4.1.3 Subclinical enteritis incidence and clinical necrotic enteritis outbreaks.....	134
3.4.1.4 Litter and fecal moisture content.....	135
3.4.1.5 Microscopic intestinal lesion score.....	135
3.4.1.6 Isolation and identification of <i>C. perfringens</i> and <i>Campylobacter</i> strains.....	135
3.5 Discussion.....	135
3.6 Acknowledgments.....	143
3.7 References.....	144
3.8 Tables.....	159

Chapitre 4. Matériels, méthodes et résultats.....	163
ARTICLE 2, en préparation.....	164
<i>C. perfringens</i> population dynamics in commercial broiler chicken flocks submitted to two different farm rearing protocols.....	164
4.1 Abstract.....	166
4.2 Introduction.....	169
4.3 Materials and Methods.....	171
4.3.1 Sampling protocol.....	171
4.3.2 Isolation of <i>C. perfringens</i> strains.....	173
4.3.3 <i>C. perfringens</i> reference strains.....	174
4.3.4 Toxinotyping by multiplex PCR.....	174
4.3.5 Pulsed-field gel electrophoresis.....	175
4.3.6 Statistical analyses.....	177
4.3.6.1 Diversity analysis.....	177
4.3.6.2 Toxinotyping analysis.....	179

4.4 Results.....	179
4.4.1 Sampling and <i>C. perfringens</i> isolation and typing.....	179
4.4.2 Genotypic diversity.....	181
4.4.3 Toxinotyping by multiplex PCR.....	183
4.5 Discussion.....	184
4.6 Acknowledgments.....	190
4.7 References.....	191
4.8 Tables and figures.....	196
Chapitre 5. Matériels, méthodes et résultats.....	207
ARTICLE 3, en préparation.....	208
Recurring necrotic enteritis outbreaks in commercial broiler chicken flocks strongly influence <i>Clostridium perfringens</i> population diversity evolution.....	208
5.1 Abstract.....	210
5.2 Introduction.....	212
5.3 Materials and Methods.....	214
5.3.1 Sample selection.....	214
5.3.2 Isolation of <i>C. perfringens</i> strains.....	215

5.3.3 <i>C. perfringens</i> reference strains.....	216
5.3.4 Toxinotyping by multiplex PCR	216
5.3.5 Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis.....	217
5.3.6 Statistical analyses.....	219
5.3.6.1 Diversity analysis.....	219
5.3.6.2 Toxinotyping analysis.....	220
5.4 Results.....	220
5.4.1 <i>C. perfringens</i> isolation and typing.....	220
5.4.2 <i>C. perfringens</i> genotypic diversity.....	221
5.4.3 <i>C. perfringens</i> toxinotyping by multiplex PCR.....	222
5.5 Discussion.....	223
5.6 Acknowledgments.....	230
5.7 References.....	231
5.8 Tables and figures.....	238

Chapitre 6.

DISCUSSION GÉNÉRALE.....	245
6.1 Design expérimental.....	247
6.1.1 Sélection des fermes participantes.....	247
6.1.2 Amélioration des conditions de démarrage du poussin.....	249
6.1.3 Vaccination contre la coccidiose.....	251
6.1.4 Stratégies alternatives administrées via l'aliment ou l'eau.....	255
6.2 Performances zootechniques.....	259

6.3 Entérite nécrotique clinique et sous-clinique.....	262
6.4 Gestion de la litière.....	266
6.5 Santé digestive.....	269
6.5.1 Isolement de <i>C. perfringens</i> et de <i>Campylobacter jejuni</i>	269
6.5.2 Analyses histologiques.....	271
6.6 Typage de <i>C. perfringens</i>	273
6.6.1 Étude de la diversité de <i>C. perfringens</i>	273
6.7 Impact du protocole d'élevage sur l'évolution de la diversité génétique de <i>C. perfringens</i>	274
6.8 Existence d'un possible lien entre la diversité génétique de <i>C. perfringens</i> et la récurrence d'épisodes d'entérite nécrotique clinique.....	277
Chapitre 7.	
CONCLUSIONS	280
7.1 Perspectives.....	284
Chapitre 8.	
BIBLIOGRAPHIE.....	286
ANNEXES.....	xxii

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

I.	Toxinotypes, toxines et maladies associées, <i>C. perfringens</i>	10
----	---	----

Chapitre 3

II.	Nutritional guidelines pertaining to feed composition for all participating farms.....	159
III.	Summary of the results relative to the study conduct.....	160
IV.	Impact of the drug-free program on the performance parameters and health status.....	161

Chapitre 4

V.	Attribution of the three essential oil-based products to the participating farms respecting a random distribution over time during field trial.....	196
VI.	Antimicrobial rotation in conventional barns over time during field trial.....	197
VII.	Number of isolates positive for <i>C. perfringens</i> initially planned to be used for rarefaction curve generation and the number of these isolates actually used due to untypability by PFGE.....	198

- VIII.** Number of isolates genotyped *C. perfringens* strains and corresponding number of genotypes identified between farm rearing protocols, sampling time points and isolation methods.....199
- IX.** Distribution of *C. perfringens* strains positive for the toxin genes screened between alternative and conventional protocols, and initial and final timepoints of the study.....200

Chapitre 5

- X.** Estimates (standard deviation) of performance parameters in drug-free farm categorization according to flock health status.....238
- XI.** Summary of health status and numbers of strains and genotypes associated with each drug-free farm.....239
- XII.** Distribution of *C. perfringens* strains positive for the toxin genes screened between healthy and diseased farms, and initial and final timepoints of the study.....240

XIII. LISTE DES FIGURES

Chapitre 4

1. Species richness estimates in drug-free (red) and conventional barns (blue) at the start (A) and at the end of the experiment (B). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 200 samples with 95% confidence intervals.....201
2. Species richness estimates in drug-free (A) and conventional barns (B) at the start (blue) and at the end of the experiment (red). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 200 samples with 95% confidence intervals.....202
3. Dendrogram showing the distribution of the 146 genotypes from the 275 *C. perfringens* isolates obtained by unweighted pair group method using arithmetic averages clustering with a Dice coefficient and 1% position tolerance. Informations to the right of dendrogram correspond to farm identification, rearing protocol, isolation media, sampling timepoint and genotype number.....203

Chapitre 5

4. Species richness estimates in farms that would experience disease (red) and farms that did not experience disease (blue) at the start of (A) and at the end of the experiment (B). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 100 samples with 95% confidence intervals.....241
5. Species richness estimates in farms that would stay healthy (A) and farms that would experience disease (B) at the start (blue) and at the end of the experiment (red). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 100 samples with 95% confidence intervals.....242
6. Dendrogram showing the distribution of the 71 genotypes from the 134 *C. perfringens* isolates obtained by unweighted pair group method using arithmetic averages clustering with a Dice coefficient and 1% position tolerance. Informations to the right of dendrogram correspond to farm identification, sampling timepoint, farm health status and genotype number.....243

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACIA : Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

CDC : Centre for Disease Control

CM : Cooked Meat broth

FSIS : Food Safety and Inspection Service

G: Gramme

ml : Millilitre

MLEE : Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST : Multilocus Sequence Typing

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Platelet Agglutinating Factor

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed-field Gel Electrophoresis

TSC: Tryptose Sulphite Cycloserine

µg: Microgramme

µl: Microlitre

UPGMA: Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Averages

USDA: United States Department of Agriculture

WHO: World Health Organization

**Pour Élizabeth, Flavie, Abigaëlle
et Patrick, vous êtes à la fois ma
force et ma fragilité...**

REMERCIEMENTS

La rédaction de cette thèse représente l'étape finale d'un long cheminement, autant professionnel que personnel. Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces années, et qui ont contribué non-seulement à la réalisation de cet ouvrage, mais qui ont aussi beaucoup apporté à ma vie. Un merci tout spécial aux personnes suivantes :

Mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Quessy, qui a toujours cru en moi, qui m'a encouragée à repousser mes limites, et qui a fait de moi la personne que je suis devenue aujourd'hui

Mes co-directrices, la Dre Ann Letellier et la Dre Martine Boulianne, vous avez été pour moi une inspiration, et un modèle de réussite féminine

Tous les étudiants de la CRSV et de la CRA, merci pour ce milieu de travail si stimulant. Une pensée toute spéciale pour Alex, pour toutes ces discussions enrichissantes, et pour Nicole, tu me manqueras tellement

Julie Arsenault, pour ses précieux conseils et son dévouement à ma réussite

Chapitre 1. INTRODUCTION

Au cours des dernières années, la consommation de viande et de produits de viande n'a cessé de montrer une tendance à la hausse, autant aux États-Unis, que pour tous les pays industrialisés, incluant l'Union Européenne (1). La viande de volaille en est une des plus populaires puisqu'elle représente une excellente source de protéines, est faible en gras, et contrairement à la viande rouge, n'est pas reconnue pour être associée à des risques augmentés de certaines maladies, dont les maladies cardiovasculaires, néoplasiques, ou même métaboliques (2-4). Considérant que les spécialistes estiment que la population mondiale se situera à près de 10 milliards d'habitants d'ici 2050, et afin de répondre à la demande grandissante pour cette denrée alimentaire, la production avicole devra continuer de progresser, et sera confrontée à plusieurs défis de taille : l'évolution des changements climatiques, la gestion de la sécurité alimentaire globale, l'émergence de maladies infectieuses, l'augmentation des densités de production afin de répondre à la demande grandissante, ainsi que la gestion des déjections animales reliée à cette intensification (5, 6). Des mesures législatives visant à interdire ou à réduire l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance ne viendront que rajouter à la complexité du défi (7). L'amélioration de plusieurs aspects reliés à l'élevage avicole, tels que la conception des bâtiments, en passant par l'équipement, la prévention des maladies infectieuses, la génétique des oiseaux, ainsi que leur alimentation, a largement contribué à optimiser le rendement des élevages (8). L'utilisation des antibiotiques est aussi fortement associée à l'essor de la production. En effet, depuis plus de cinquante ans, les antibiotiques, que l'on nomme facteurs de croissance, sont ajoutés à la ration des animaux d'élevages industriels afin de favoriser le maintien d'une santé globale, de prévenir certaines maladies infectieuses, mais aussi

à des fins économiques pour promouvoir la croissance et améliorer l'efficacité alimentaire (9, 10). Cet aspect représente un avantage économique considérable pour les producteurs agricoles.

Cependant, depuis plus d'une dizaine d'années, l'utilisation répandue des antibiotiques chez les animaux de consommation, non seulement comme promoteurs de croissance, mais aussi pour des fins de prévention ou de traitement est devenue une préoccupation majeure des gouvernements, consommateurs et professionnels de la santé. En effet, les élevages industriels sont souvent blâmés comme étant les principaux responsables de l'augmentation de la résistance des bactéries aux agents antimicrobiens (8, 11, 12). Par exemple, l'utilisation des antibiotiques en continu via l'alimentation pour des fins de promotion de la croissance des animaux ainsi que pour la prévention de certaines maladies à incidence économique, contribuerait à la persistance et à la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques, en favorisant la sélection de bactéries porteuses de ces gènes. L'humain serait ainsi exposé via son alimentation lors de la consommation de produits de viande contaminés par ces microorganismes résistants (13-16) (12). L'industrie de la volaille est aussi interpellée par l'utilisation des antibiotiques. Par exemple, la virginiamycine, un antibiotique de la famille des streptogramines présentant des analogies avec des antibiotiques utilisés en thérapie chez l'humain, est utilisée comme facteur de croissance chez les volailles. Autre exemple, l'usage pour fins de promotion de la croissance de l'avoparcine, un analogue de la vancomycine, antibiotique d'importance majeure en médecine humaine, a été interdit par les pays européens suite à l'augmentation marquée du nombre de souches d'entérocoques résistantes (17). Dans le même ordre d'idée, l'utilisation de

l'enrofloxacin, une fluoroquinolone, a été interdite aux États-Unis suite à l'augmentation secondaire de la prévalence de souches de *Campylobacter* résistantes aux fluoroquinolones (18). De la même façon, la corrélation identifiée entre l'utilisation du ceftiofur dans les couvoirs et l'augmentation de la prévalence de souches de *Salmonella* et d'*Escherichia coli* résistantes à cet antibiotique a entraîné le retrait de l'usage de celui-ci en dehors des directives de l'étiquette, interdisant ainsi de façon définitive son utilisation chez le poussin au Canada et aux États-Unis (19). Dans cet ordre d'idées, l'Union Européenne a décidé en 2006 de bannir l'usage des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance chez les animaux destinés à la consommation humaine, évoquant le principe de précaution (9). Les autorités gouvernementales de plusieurs autres pays remettent aussi en doute cette pratique et songent aussi à bannir l'utilisation des antimicrobiens comme promoteurs de croissance en production animale (9). Avec le retrait des antimicrobiens utilisés comme promoteurs de croissance dans plusieurs pays, il apparaît évident que la microflore intestinale des oiseaux a été modifiée, permettant ainsi non seulement à certaines maladies, dont l'entérite nécrotique aviaire, de faire résurgence, mais laissant aussi sans réponse les questions relatives à la possible augmentation de l'incidence de cas de maladies associés aux pathogènes alimentaires chez l'humain (20). Parmi celles-ci, la campylobactériose est parmi les plus préoccupantes. En effet, dans les pays industrialisés, la plupart des infections humaines à *Campylobacter* résultent de l'ingestion d'aliments contaminés, la volaille et ses produits de viande représentant la source d'infection principale (350, 366). Sur le plan de la santé animale, la Norvège a été le premier pays à bannir l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de

croissance dans l'alimentation des animaux de consommation en 1995. À ce moment, dans des troupeaux de poulets de chair, des taux d'incidence pour l'entérite nécrotique allant jusqu'à 40% ont été observés (21). En France, les taux d'incidence de l'entérite nécrotique sont passés de 4% en 1995 à 12,4% en 1999, à la suite du retrait des promoteurs de croissance dans l'alimentation des volailles (20). Sur le plan mondial, les pertes économiques associées à la maladie, ainsi qu'à son contrôle sont estimées à plus de 2 milliards de dollars annuellement (5, 22). L'entérite nécrotique se présente sous deux formes cliniques distinctes, soit sa forme clinique aiguë, soit une présentation plus discrète que l'on nomme sous-clinique. La maladie clinique est associée à des mortalités soudaines et importantes pouvant affecter près de 50% des oiseaux d'un même troupeau, ainsi qu'à des lésions intestinales caractéristiques allant d'ulcères localisés multifocaux jusqu'à une nécrose extensive de la muqueuse digestive. Dans sa présentation sous-clinique, la maladie n'est pas associée à des taux de mortalités augmentés ni aux lésions décrites ci-haut, mais se traduit plutôt par des pertes au niveau des performances zootechniques telles qu'une diminution du gain de poids, une augmentation du taux de conversion alimentaire, celles-ci découlant d'une capacité de digestion et d'absorption altérées par la présence de dommages chroniques causés par la bactérie à la muqueuse intestinale (22). Toutes les conditions favorisant une croissance excessive de *C. perfringens* au niveau intestinal et conséquemment la production de toxines par la bactérie représentent des facteurs de risques pour l'apparition de l'entérite nécrotique (23). La majorité de ces facteurs de risque ont été identifiés, mais leur contrôle seul ne suffit pas à prévenir l'apparition d'épisodes d'entérite nécrotique. Plusieurs chercheurs ont travaillé à élucider la pathogénie de

l'entérite nécrotique ainsi que le rôle du développement de l'immunité chez les oiseaux dans le contrôle de la maladie (5, 24-27). Parallèlement, la communauté scientifique a déployé beaucoup d'efforts au cours des dernières années afin d'identifier des stratégies alternatives pouvant être utilisées en remplacement des promoteurs de croissance afin d'assurer le contrôle de la maladie dans les élevages de poulets de chair (9, 28, 29) (30, 31) (32, 33). Cependant, les études évaluant l'impact de la mise en place de ces stratégies dans des troupeaux de poulets de chair demeurent rarissimes dans la littérature scientifique. Ainsi, peu nombreuses sont les études s'étant intéressées à quantifier les effets, tant sur le plan économique que scientifique, de l'application de méthodes alternatives en remplacement des antibiotiques facteurs de croissance en conditions commerciales. De plus, la majorité des travaux ayant porté sur la caractérisation génétique de souches de *C. perfringens* a été réalisée sur des souches provenant de troupeaux affectés par l'entérite nécrotique. Pour le moment, aucune étude n'a décrit l'impact qu'aurait le retrait des antimicrobiens pendant plusieurs lots consécutifs de poulets de chair dans un même bâtiment, sur la population résidente de *C. perfringens*.

Cette thèse étudiera l'effet de l'application d'un traitement conventionnel à base d'antibiotiques et d'anticoccidiens, comparé à celui d'un traitement alternatif sans antibiotiques ni anticoccidiens composé de diverses stratégies alternatives, incluant une amélioration des conditions de démarrage, l'ajout d'additifs alimentaires à base d'huiles essentielles, l'acidification de l'eau d'abreuvement ainsi qu'une vaccination contre la coccidiose, dans huit élevages industriels de poulets de chair au Québec. Il sera donc possible de mesurer l'impact de chacun des traitements d'un point de vue

économique, mais aussi sur la santé digestive des oiseaux, ainsi que sur les populations de *C. perfringens* résidant dans les différents bâtiments suivis. Il sera aussi possible de voir de quelle façon des épisodes d'entérite nécrotique peuvent influencer la dynamique populationnelle de ce pathogène associé à l'entérite nécrotique.

Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Revue générale des infections à *C. perfringens*

2.1.1 Caractéristiques générales, classification et identification du microorganisme

Anciennement connu sous le nom de *Bacillus aerogenes capsulatus*, puis par la suite de *Clostridium welchii*, la bactérie aujourd'hui connue sous le nom de *C. perfringens* a été identifiée pour la première fois par Welch et Nuttal en 1891 (34). Le genre *Clostridium*, dont le nom est dérivé du mot grec "kloster" et appartenant au phylum des firmicutes, est un des genres les plus divers, tant pour les nombreuses espèces qui le composent que pour le large éventail de conditions pathologiques qui lui sont associées, autant chez les animaux que chez l'homme. Malgré le fait que, pour plusieurs de ces conditions, des approches prophylactiques et thérapeutiques efficaces soient identifiées, les infections à *Clostridium* demeurent parmi les infections bactériennes les plus souvent diagnostiquées et fatales (34, 35). Les clostridies sont des bactéries positives à la coloration de Gram, anaérobies, ubiquitaires et possédant la capacité de former des spores, cette caractéristique leur conférant une plus grande résistance. Le botulisme associé à *Clostridium botulinum*, le tétanos impliquant *Clostridium tetani*, la colite pseudomembraneuse reliée à *Clostridium difficile* et la gangrène gazeuse causée par les souches de *C. perfringens* de type A ne sont que quelques exemples de maladies impliquant *Clostridium*. Le séquençage complet du génome de trois souches de *C. perfringens* a permis de découvrir une importante diversité, avec plus de 300 îlots génomiques identifiés, et contribuant certainement au

vaste éventail de conditions pathologiques causées par la bactérie (24, 36). La plupart des signes et lésions retrouvés lors des infections causées par ce microorganisme sont généralement la conséquence de l'action de plusieurs enzymes ou toxines produites par la bactérie. Parmi celles-ci, on retrouve la toxine bêta-2, l'entérotoxine, la perfringolysine A, la collagénase A, la toxine lambda, la hyaluronidase, la neuraminidase et la DNase (37). *Clostridium perfringens*, l'agent numéro un des infections entériques à clostridies chez les animaux, est aussi reconnu pour produire plusieurs toxines. Chez la volaille, la bactérie est associée à différentes conditions telles que l'entérite nécrotique, l'entérite ulcéralive, la dermatite nécrotique et le botulisme, conditions que l'on nomme aussi clostridioses aviaires. Même si plus de 17 toxines ont été identifiées jusqu'à aujourd'hui chez *C. perfringens*, seul un faible nombre est reconnu comme étant à l'origine de maladies spécifiques. Classiquement, quatre toxines sont utilisées pour le classement de la bactérie en cinq toxinotypes allant de A jusqu'à E. Cette méthode de classification fut développée en 1931 à partir de tests effectués sur des souris, et est basée sur le pouvoir de létalité du surnageant de cultures pures de chacun des toxinotypes ainsi que sur la capacité de séroprotection d'anticorps neutralisants isolés de ce même surnageant (35, 38). Alors que les toxinotypes B, C, D et E sont toujours reliés à des processus pathologiques, les souches de *C. perfringens* appartenant au type A peuvent tout aussi bien faire partie de la flore normale du tractus intestinal, qu'être à l'origine de conditions pathologiques. La gangrène gazeuse, l'intoxication alimentaire, l'entérite nécrotique aviaire, l'entérocolite du poulain, l'entérite du porcelet ainsi que l'entérite hémorragique chez la vache sont parmi les maladies dont l'agent causal est *Clostridium pefringens* de type A (39, 40).

Tableau 1. Toxinotypes, toxines et maladies associées à *C. perfringens* (Songer, 2010)

Toxinotype	Principales maladies	Toxines
A	toxi-infections alimentaires, entérite nécrotique aviaire, entérotoxémie de l'agneau, entérocolite nécrosante néonatale porcine, entérite hémorragique néonatale bovine	alpha
B	dysenterie de l'agneau, entérite chronique ovine, entérite hémorragique bovine/équine	alpha, bêta, epsilon
C	entérite nécrotique du poulain, entérotoxémie du porcelet/agneau/veau/chevreau/poulin, entérotoxémie aiguë du mouton	alpha, bêta
D	enterotoxémie ovine, entérocolite caprine, entérotoxémie bovine	alpha, epsilon
E	entérotoxémie néonatale bovine	alpha, iota

Au cours des dernières années, plusieurs travaux portant sur *C. perfringens* ont permis l'identification de nouvelles toxines telles que les toxines NetB, TpeL et cpb2, permettant à plusieurs spécialistes d'affirmer que la méthode actuelle de classification de la bactérie devrait être revue (41).

C. perfringens est une bactérie anaérobie, protéolytique et glucidolytique, à Gram positif, dont la croissance est parmi celle des bactéries se divisant le plus rapidement, un temps de doublement inférieur à 10 minutes ayant été rapporté dans des conditions optimales (42). Sa croissance peut cependant s'effectuer à des températures variant entre 15°C et 50°C. La bactérie possède la capacité de produire des endospores pouvant résister à une exposition à la chaleur à plus de 100°C pour deux heures, représentant ainsi une forme de résistance efficace pour le microorganisme (5). La

bactérie possède aussi une grande tolérance à l'oxygène, en plus d'une croissance rapide dans des milieux de culture complexes, avec un temps de génération d'aussi peu que 8 à 20 minutes dans des conditions optimales (43).

2.1.2 Infections et maladie chez la volaille

2.2.2.1 L'entérite nécrotique aviaire

L'entérite nécrotique aviaire a pour la première fois été observée par Bennetts en 1930 en Australie, puis décrite par Parish en 1961 en Angleterre (44, 45). Plus tard, les chercheurs ont réussi à reproduire la maladie en inoculant des poussins avec des souches de *C. perfringens*, associant ainsi hors de tout doute, la bactérie à la maladie (20). Avec l'utilisation des antibiotiques à faible dose dans l'alimentation des poulets de chair, *C. perfringens* était une menace que l'on croyait bien comprise et contrôlée. Jusqu'en 1997, dans un manuel international répertoriant les maladies d'importance chez la volaille, l'entérite nécrotique n'occupait pas une place prédominante (45). Ce n'est que quelque temps après, suite au retrait des promoteurs de croissance dans plusieurs pays, que la maladie est devenue un problème mondial émergent, tant sur le plan économique, que celui du bien-être animal. Les travaux de recherche réalisés au cours des dernières années ont permis de constater que plusieurs éléments du casse-tête étaient manquants pour décrire la pathogénie de l'entérite nécrotique. Entre autres, les chercheurs se sont rendu compte que toutes les souches de *C. perfringens* ne possédaient pas le même pouvoir à causer l'entérite nécrotique. La majorité des épisodes sont attribuables aux souches de type A, puis dans une moins grande proportion, à celles de type C (39, 46). Alors que certaines souches, lorsqu'utilisées

seules pour inoculer des oiseaux, vont provoquer l'apparition de lésions caractéristiques de l'entérite nécrotique, d'autres souches nécessiteront la présence de facteurs prédisposants (37). Pour plusieurs des souches de *C. perfringens*, même pour celles isolées de cas cliniques d'entérite nécrotique, des conditions optimales de dose, de voie et de fréquence d'administration ne réussiront pas à reproduire la maladie chez l'oiseau dans un modèle d'infection expérimentale (5).

Chaque année, les experts estiment que l'entérite nécrotique coûte près de 2,6 milliards de dollars US à l'industrie avicole mondiale, ces coûts étant principalement attribuables au traitement et à la prévention de la maladie, mais aussi aux pertes de production y étant associées (41, 47). La manifestation de la maladie dans sa forme sous-clinique serait la plus dévastatrice tant sur le plan économique, que dans un aspect de bien-être animal. D'ailleurs, cette forme est le plus souvent sous-diagnostiquée par les éleveurs (47). Lors de présentation sous-clinique, les pertes sont principalement associées à une diminution de l'efficacité alimentaire ainsi qu'aux retards de croissance provoqués par l'altération de la fonction digestive due aux dommages causés à la muqueuse intestinale par *C. perfringens*. La maladie dans sa forme sous-clinique peut se manifester chez des oiseaux de différents âges, mais est le plus souvent rencontrée lorsque les volailles atteignent trois semaines d'âge (47). Cette forme sous-clinique n'est pas reconnue pour évoluer vers une forme clinique plus sévère (36). Parmi les éléments caractérisant cette forme, on retrouve des dommages à la muqueuse intestinale et des comptes caecaux de *C. perfringens* dépassant les 10^6 ufc/g. Des éléments favorisant l'apparition de la condition tels que des diètes végétales, la présence de dommages intestinaux causés par d'autres maladies, et des changements à

la litière seraient impliqués. De plus, la présence de souches de *C. perfringens* produisant des toxines spécifiques serait requise, bien qu'aucune signature génétique précise n'ait été attribuée à celles-ci pour le moment (325). Dans les pays où les antibiotiques administrés à faibles doses en prévention de l'entérite nécrotique ont été bannis, on rapporte que les élevages de poulets de chair confrontés à des épisodes sévères d'entérite nécrotique enregistrent des profits de 33% inférieurs à ceux des élevages sains aussi non-médicamentés (48). À l'opposé, un épisode d'entérite nécrotique clinique se traduit par une multiplication rapide de la bactérie au niveau intestinal, entraînant la production de gaz, de toxines et secondairement, des dommages aux cellules intestinales. Dans certains cas, on parle même de toxicose entérique, où la production de toxines provoquera entre autres l'hydrolyse de la lécithine des membranes cellulaires intestinales, la formation de diacylglycérol, suivi de l'activation secondaire de la protéine kinase C, stimulant ainsi la cascade de l'acide arachidonique. De nombreux médiateurs inflammatoires tels que les leucotriènes, le thromboxane et le facteur PAF seront alors libérés. Ces médiateurs seront à leur tour responsables de la contraction des vaisseaux sanguins et de l'aggrégation plaquettaire conduisant à une dysfonction du myocarde et à la mort suraiguë le plus souvent observée comme premier signe lors de ces épisodes (37, 49). Lors de maladie clinique, des mortalités importantes affectant près de 1% des oiseaux d'un troupeau par jour, pour plusieurs jours consécutifs, peuvent être observées. Dans certains cas, si aucune mesure corrective n'est utilisée, entre 10% et 40% des oiseaux d'un même troupeau peuvent en mourir (49). Les oiseaux sont généralement atteints par la maladie entre deux et six semaines d'âge, mais la maladie peut aussi être observée chez des oiseaux âgés de plus

de six mois (45). Les principaux signes cliniques observés sont de la déshydratation, de l'abattement, de la somnolence, des plumes ébouriffées, une diarrhée profuse qui n'est par contre pas toujours présente, ainsi qu'une diminution de la consommation alimentaire. Ces signes sont généralement de très courte durée et précèdent généralement la mort de l'oiseau (20, 37, 41, 45, 50). La mort peut survenir aussi rapidement qu'en une à deux heures, ce qui fait que les oiseaux n'ont pas le temps de montrer une perte de poids. D'un point de vue macroscopique, les lésions sont généralement confinées au petit intestin, quoique les caeca, les reins et le foie peuvent être atteints. Le jéjunum et l'iléon sont les sites de prédilection pour la bactérie. Ils seront distendus par du gaz, présenteront des parois très amincies et friables et pourront être remplis d'un liquide brunâtre malodorant. Leur muqueuse présentera des ulcères focaux à confluents, et pourra même être recouverte d'une pseudomembrane, souvent bien adhérente. À l'observation microscopique, cette membrane diphtérique de couleur vert-jaunâtre ou brun-orangé correspond à des villosités intestinales nécrotiques, à une accumulation de cellules épithéliales intestinales dégénérées, à de gros bâtonnets à Gram positif ainsi qu'à un mélange de cellules inflammatoires et de fibrine. Les oiseaux survivant à un épisode de maladie débiteront une régénération des villosités intestinales qui seront alors plus courtes (37, 45, 50).

Le nom d'entérite nécrotique vient du fait que la bactérie provoque, dans les stades plus avancés de l'infection, une nécrose extensive des villosités intestinales caractérisée par une nécrose de coagulation, cette nécrose atteignant la sous-muqueuse

et la musculature. Il est aussi possible d'observer la congestion des vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse, ainsi qu'une lamina propria hyperémique et infiltrée par de nombreuses cellules inflammatoires, principalement des hétérophiles granulocytaires (10, 22). Des études récentes s'étant intéressées aux changements histopathologiques survenant initialement ont permis de mettre en lumière de nouveaux aspects quant à l'évolution de la maladie. Entre autres, les changements pathologiques aux villosités intestinales surviendraient initialement à la membrane basale ainsi qu'au domaine latéral des entérocytes à travers toute la lamina propria, la surface apicale des entérocytes n'étant affectée que plus tardivement dans le processus. Ainsi, Olkwski et coll. ont conclu que ces changements morphologiques impliqueraient des facteurs affectant la matrice extracellulaire et les jonctions cellulaires (51). Pour expliquer ce phénomène, les auteurs laissent sous-entendre que le processus pathologique impliquerait des collagénases libérées par la bactérie, mais aussi des protéinases de la matrice extracellulaire de l'hôte, protéinases dont l'action serait accrue par les interactions hôte-pathogène (51, 52). La bactérie n'envahit pas les cellules intestinales, mais peut toutefois prendre la circulation sanguine, atteindre la circulation porte ainsi que les canaux biliaires et former des foyers hépatiques d'infection. De multiples foyers de nécrose de coagulation sont alors visibles à l'évaluation microscopique (20). À l'abattoir, autant dans les cas d'entérite nécrotique clinique que sous-clinique, *C. perfringens* est reconnu pour entraîner des condamnations pour hépatite et cholangiohépatite pouvant affecter entre 0,02% et 0,2% d'un lot (48, 53). Ces lésions peuvent aussi être observées dans la forme sous-clinique de la maladie (35). On peut observer de nombreux foyers pâles et une nécrose fibrinoïde des cellules hépatiques

ainsi qu'une hyperplasie des canaux biliaires. Lors de manifestation sous-clinique, l'amincissement généralisé de la muqueuse digestive qui permet à *C. perfringens* de prendre la circulation serait responsable des quelques foyers de nécrose mineure observés dans le foie (48, 53).

La reproduction de l'entérite nécrotique dans des conditions expérimentales est un incontournable pour différentes raisons. Que ce soit pour comparer l'efficacité d'antimicrobiens, pour mesurer la capacité de protection de vaccins ou de stratégies de contrôle alternatives contre *Clostridium perfringens*, pour évaluer le rôle de certains facteurs de virulence ou de facteurs prédisposants dans le développement de la maladie, ou même pour décrire l'évolution des processus pathologiques associés à la maladie, toutes ces situations justifient l'utilisation d'un modèle expérimental fiable et hautement reproductible (41, 54). Alors que certains facteurs tels que des diètes riches en protéines animales, des céréales à forte teneur en fibres non-digestibles, une infection concomitante par *Eimeria*, ainsi que des conditions d'immunosuppression, sont reconnus pour favoriser l'apparition de la maladie, d'autres semblent essentiels. Des travaux réalisés au cours des dernières années et faisant appel à la génomique comparée, ont permis d'identifier de nouvelles toxines dont la toxine NetB, largement retrouvée chez les isolats de *C. perfringens* provenant de cas cliniques d'entérite nécrotique, et semblant jouer un rôle crucial dans l'apparition de la maladie (44, 55-57). Les chercheurs ont aussi pu démontrer que les souches associées à l'entérite nécrotique possédaient trois îlots de pathogénicité caractéristiques, dont un de ceux-ci contenant le gène *netB*. Deux de ces îlots seraient aussi portés sur de gros plasmides. Plus encore, le séquençage complet de ces plasmides laisse croire que les isolats de *C.*

perfringens causant l'entérite nécrotique appartiendraient à deux groupements clonaux possédant un ancêtre commun et s'étant adaptés à l'espèce aviaire afin de provoquer l'entérite nécrotique (41, 58, 59).

2.2.2.2 Incidence de l'entérite nécrotique et prévalence de *C. perfringens*

Les références de la littérature scientifique rapportant des taux d'incidence de l'entérite nécrotique sont relativement rares, et souvent très peu récentes (60, 61). La prévalence d'épisodes d'entérite nécrotique varierait entre 1% et 40% selon les auteurs (49, 62). Pour plusieurs pays européens où les antibiotiques ajoutés à la ration en tant que promoteurs de croissance ont été bannis en 2006, une augmentation de l'incidence d'entérite nécrotique est rapportée, sans que des chiffres précis soient avancés (63). En 2007, Hermans et Morgan ont réalisé une étude, par le biais d'un questionnaire, impliquant plus de 72% des lots de poulets de chair élevés sur une période d'environ 6 mois au Royaume-Uni. Ils rapportent une prévalence moyenne de 12,3% pour les épisodes d'entérite nécrotique (60). Kaldhusdal et Skjerve rapportent quant à eux des incidences variant entre 0% et 34,8%. Leurs chiffres se basent sur une évaluation trimestrielle du nombre de cas soumis à un laboratoire de diagnostic animal en Norvège sur une période de 20 ans (60). Comme rapporté dans chaque étude du genre, une évaluation précise du nombre de cas d'entérite nécrotique pour un temps ou une région donnés demeure ardue. La raison principale est, dans un premier temps, que ce ne sont pas tous les éleveurs qui sont aptes à reconnaître un épisode de maladie, certains épisodes pouvant passer sous silence. Aussi, les éleveurs aux prises avec un

épisode d'entérite nécrotique ne feront pas nécessairement tous appel à des services vétérinaires. On rapporte dans quelques enquêtes épidémiologiques réalisées principalement dans les pays de l'Union Européenne, que les éleveurs soupçonnent une augmentation soudaine de l'humidité de la litière comme un signe précurseur d'un épisode imminent d'entérite nécrotique. Dans plusieurs de ces cas, un traitement antibiotique est alors immédiatement instauré sans l'établissement d'un diagnostic précis. Selon la juridiction en place, il est possible que des éleveurs aient accès à des antimicrobiens sans prescription vétérinaire, permettant ainsi à ceux-ci d'effectuer un diagnostic par thérapie (45). Ces pratiques peuvent ainsi fausser le nombre réel de cas d'entérite nécrotique rapportés par les vétérinaires lors d'enquêtes épidémiologiques, mais aussi empêcher l'identification de la cause réelle de maladie. De la même manière, dans les études réalisées à partir de cas soumis à un laboratoire de référence, il peut être difficile d'évaluer la population desservie par ce laboratoire et donc la population de référence à laquelle comparer le nombre de cas d'entérite nécrotique (45).

Même si la prévalence d'entérite nécrotique semble très variable et difficilement évaluable dans des populations avicoles données, *C. perfringens* est quant à lui largement retrouvé dans le tractus intestinal des volailles (46). On le considère comme un habitant normal du tractus intestinal des volailles, quoique la charge bactérienne pour *C. perfringens* semble très différente d'un individu à un autre. Chez les oiseaux sains, il est normal de retrouver des comptes variant de 0 jusqu'à 10^5 ufc / g de contenu intestinal (22). Il semble cependant exister une corrélation positive entre le nombre de bactéries de cette espèce présentes dans le tractus intestinal des volailles et

l'âge de celles-ci, du moins jusqu'à ce qu'elles atteignent environ cinq semaines d'âge (45). Les méthodes de culture traditionnellement utilisées afin d'isoler les microorganismes présents dans le tractus digestif des volailles sont toutefois longues et fastidieuses. Par comparaison avec des techniques plus récentes, on rapporte aussi que la proportion de microorganismes cultivables serait très variable ou pourrait être aussi faible que 10% de toutes les bactéries présentes (63). Parmi les nouvelles approches disponibles, le PCR en temps réel présente l'avantage de pouvoir évaluer de manière quantitative les différents groupes bactériens composant la microflore intestinale. Ainsi, les Lactobacilli, les entérocoques, les Bactéroïdes, *C. perfringens* et les autres membre du groupes des Clostridies représentent les principaux phylums bactériens retrouvés dans le caecum des volailles (64). On rapporte que lors de l'analyse du contenu digestif, ce sont plus de 75% à 95% des oiseaux qui sont positifs pour la présence de *C. perfringens* (65). En se basant sur les méthodes de culture traditionnelles, la flore bactérienne du caecum des oiseaux serait composée d'environ 10^{11} bactéries anaérobies obligatoires / g de contenu intestinal (66-68). Les oiseaux atteints d'entérite nécrotique présenteront quant à eux des comptes de *C. perfringens* avoisinant les 10^8 - 10^9 par g (41, 69). Certains auteurs rapportent même des corrélations entre les comptes de *C. perfringens* et la sévérité des lésions intestinales observées (70). Cependant, une multiplication de la bactérie dans l'intestin n'entraîne pas nécessairement l'apparition de lésions d'entérite nécrotique, laissant supposer que des facteurs intrinsèques à la bactérie, ainsi que la présence de conditions favorisantes contribueraient à l'apparition des lésions observées lors d'épisodes de maladie (20, 71, 72).

Les résultats sont contradictoires quant à l'influence de divers facteurs sur la prévalence et le nombre de *C. perfringens* retrouvés dans la microflore digestive. Dans une étude menée en 2007 par Wise et Siragusa, l'évaluation par PCR quantitatif de l'évolution de la communauté intestinale bactérienne chez des oiseaux soumis à un traitement conventionnel à base de promoteurs de croissance, en comparaison avec des oiseaux élevés sans l'ajout de ces additifs, a démontré que les proportions de *C. perfringens* ne semblaient pas être affectées par un traitement ou un autre. Ces résultats sont à l'inverse de ce que Engberg et coll. rapportaient en 2000 (63, 73). De plus, ces auteurs ont rapporté que contrairement à ce qui est observé lors d'épisodes d'entérite nécrotique, *C. perfringens* semblait demeurer en quantités relativement faibles à mesure que les oiseaux avançaient en âge, peu importe le traitement, soulignant de nouveau le fait que les facteurs propres à la bactérie menant à sa multiplication lors d'épisodes d'entérite nécrotique demeurent peu connus (63). À l'opposé, Feng et coll., dans une étude menée en 2010, ont noté que les populations iléales d'*Enterobacteriaceae*, d'*Enterococcus* et de *Clostridium coccoïdes* n'étaient pas modifiées de manière significative lors d'épisodes d'entérite nécrotique (74). À l'inverse, les auteurs ont démontré que deux jours post-infection, la multiplication de *C. perfringens* au niveau intestinal était corrélée avec une diminution significative de l'abondance de *Lactobacillus aviarius*. Non seulement les épisodes d'entérite nécrotique influencent la dynamique populationnelle de *C. perfringens*, d'autres facteurs semblent aussi faire varier les comptes du microorganisme au niveau intestinal. Bjerrum et coll., ont démontré que chez des poulets soumis à une diète conventionnelle contenant des promoteurs de croissance, dans 7 à 9 fois sur 10, il

n'était pas possible de cultiver *C. perfringens* à partir de contenu soit du jabot, de l'iléon, des ceaca ou même du rectum, laissant présumer des comptes inférieurs à la limite de détection d'environ 10^2 bactéries / g d'échantillon. Dans cette même étude, des oiseaux élevés de manière biologique et donc nourris d'une diète sans antibiotiques présentaient quant à eux des comptes de *C. perfringens* variant plutôt de 10^4 à 10^7 bactéries / g d'échantillon de contenu intestinal pour ces mêmes structures anatomiques (64).

Knarreborg et coll. rapportaient, dans une étude réalisée sur l'effet de l'âge ainsi que sur l'effet de la composition de la diète incluant ou non l'ajout de promoteurs de croissance, une augmentation d'environ 3 logs de la population intestinale de *C. perfringens* chez les oiseaux entre 7 et 35 jours d'âge (75). Cette augmentation était d'autant plus marquée pour les oiseaux de 35 jours d'âge, nourris d'une diète à base de gras animal et dépourvue d'antibiotiques. Les auteurs rapportaient même que l'effet de ces deux facteurs était additif, selon la composition en lipides des composés utilisés. Cette étude laissait même sous-entendre que les antibiotiques auraient un effet limitant quant à la diversité observée au sein même de la population de *C. perfringens*, cet effet tendant à disparaître à mesure que les oiseaux se rapprochent de 35 jours d'âge. Ainsi, les fragments obtenus par DGGE montrent deux fragments correspondants aux amplicons obtenus pour le gène *plc* codant pour la toxine alpha chez les oiseaux de 14 et 21 jours d'âge, soumis au traitement à base de gras animal, sans antimicrobiens, alors qu'un seul fragment était reconnaissable chez les oiseaux soumis à tout autre traitement. Le séquençage subséquent des fragments a permis d'identifier une variation

nucléotidique pour le gène *plc* entre les différents groupes, suggérant la présence, chez ces oiseaux, de différentes souches de *C. perfringens* au niveau intestinal (76).

2.2.2.3 Distribution, sources de contamination et persistance dans l'environnement

C. perfringens est un microorganisme ubiquitaire, largement retrouvé dans l'environnement, le sol, l'eau, les eaux usées ainsi que la flore digestive normale des humains et des animaux (65, 77, 78). On rapporte même que des poussins pourraient éclore en ayant un tractus digestif déjà colonisé, la transmission verticale à partir de la mère semblant être possible (45, 79). Selon les différents travaux réalisés sur le sujet, la colonisation des volailles surviendrait très tôt dans leur vie. En effet, dans des études menées par Craven et coll. en 2001 et 2003, les coquilles d'œufs destinés à l'incubation, le duvet des poussins peu après l'éclosion ainsi que les papiers déposés dans le fond des boîtes de transport pour les poussins au couvoir ont tous été rapportés être positifs à la présence de *C. perfringens*. Le couvoir représente donc une source de contamination considérable pour les poussins (65, 80, 81). Des méthodes de caractérisation génétique ont même réussi à démontrer que des souches isolées de troupeaux reproducteurs pouvaient être retrouvées, au moment de l'abattage, chez les poulets de chair originant de ces troupeaux, démontrant ainsi l'importance du contrôle de la dissémination de *C. perfringens* au sein d'un système de production (72, 80). De par sa capacité à produire des spores, *C. perfringens* peut persister très longtemps dans l'environnement et représenter une source de contamination pour des oiseaux nouvellement arrivés. Les murs et planchers des poulaillers, la poussière des

ventilateurs, les équipements d'abreuvement des volailles, les rubans servant au contrôle des insectes ainsi que les insectes eux-mêmes, le dessous des bottes attribuées au poulailler ainsi que l'environnement souillé à l'entrée extérieure du bâtiment représentent les sources les plus importantes de la bactérie (45, 65, 81). La voie féco-orale est privilégiée pour la transmission de la bactérie et autant l'eau, la nourriture, que les insectes et l'équipement contaminés représentent des sources importantes de contamination pour les volailles. Les oiseaux représenteraient alors des amplificateurs et des excréteurs du microorganisme pour leurs congénères. Même si Craven et coll. rapportaient qu'ils n'étaient pas parvenus à isoler *C. perfringens* de la moulée destinée aux oiseaux dans les différents élevages échantillonnés, la ration servie aux poulets semble être régulièrement contaminée par la bactérie (65). Dans deux études distinctes réalisées par Henry et coll. et par Köhler, ce serait environ 10% des échantillons de moulée analysés qui seraient déjà positifs pour *C. perfringens*, avant même d'être consommés par les oiseaux (45). Puisque les spores de *Clostridium* peuvent tolérer des températures aussi élevées que 100°C pour plus de deux heures, même les procédés de cubage et d'extrusion des grains utilisés dans la fabrication de la moulée ne parviennent pas à détruire ces spores, les températures et temps de chauffage étant largement insuffisants. La litière représenterait aussi une source considérable de contamination pour les oiseaux, ceux-ci étant reconnus pour consommer cette litière, même lorsqu'elle est souillée. (82). Les épisodes d'entérite nécrotique clinique et sous-clinique contribueraient non seulement à la survie de *C. perfringens* dans un environnement donné, mais aussi à l'augmentation de la prévalence de souches

pathogènes de *C. perfringens* à l'intérieur d'un milieu affecté en exerçant un effet d'amplification (20).

2.2 Virulence de *C. perfringens*

2.2.1 Toxines et enzymes

Les membres du genre *Clostridium* sont reconnus pour causer une variété de maladies en sécrétant des toxines qui agissent localement, ou qui dans certains cas, vont aussi être absorbées afin d'emprunter la voie systémique. Le nombre de facteurs de virulence reconnus ou présumés chez *C. perfringens* est aussi élevé que diversifié, et les manifestations cliniques associées à l'infection prennent différentes formes chez une variété d'espèces animales(35). Au-delà de 17 exotoxines ont été identifiées à ce jour chez *C. perfringens*, mais un rôle clair et définitif dans la pathogénie des maladies n'a pas été établi pour toutes ces toxines. Quatre toxines parmi cet éventail, soit les toxines alpha, bêta, epsilon et iota, sont depuis longtemps reconnues pour être des toxines majeures, et celles-ci servent à la classification des souches de *C. perfringens* en toxinotypes. Ainsi, le type A est reconnu pour produire la toxine alpha. Le type B produit quant à lui les toxines alpha, bêta et epsilon (voir tableau 1). Seules les toxines alpha et bêta sont produites par les bactéries de type C, tandis que les toxines alpha et epsilon sont associées au type D. La production des toxines alpha et iota caractérise le type E (35). À l'exception des souches de type A reconnues pour faire partie de la flore

digestive normale, les souches de type B à E sont moins communément rencontrées dans l'intestin, sauf lors de cas de maladie (35). Le portage du gène codant pour l'entérotoxine est aussi souvent ajouté à l'information relative au type et a été reconnu chez tous les types. La localisation de ce gène peut parfois être plasmidique, parfois chromosomale. À l'exception de la toxine alpha et de certaines souches entérotoxigènes porteuses du gène *cpe*, les gènes codant pour ces toxines majeures sont retrouvés sur de gros plasmides ayant en commun une région centrale où est retrouvé le « transfer of clostridial plasmid locus (tcp) », nécessaire à la conjugaison de ces plasmides (58). Avec les nombreuses études de caractérisations génétique et moléculaire réalisées au cours des dernières années, de nouvelles toxines ont été identifiées, remettant en question le schéma actuellement utilisé pour la classification des souches de *C. perfringens* (41).

2.2.1.1 La toxine alpha

La toxine alpha (CPA), aussi définie comme une zinc-métallo enzyme, est produite par toutes les souches de *C. perfringens* (76). Elle est cytotoxique puisqu'elle possède les fonctions d'une phospholipase C, d'une sphingomyélinase, d'une lécithinase, en plus d'hydrolyser les phospholipides de la membrane de plusieurs cellules dont les érythrocytes, les plaquettes, les leucocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires (83). Elle est donc hémolytique, nécrotique et donc potentiellement létale. Elle est, entre autres, reconnue pour ses effets sur les cellules eucaryotes chez lesquelles elle peut provoquer une activation de la cascade de l'acide arachidonique ainsi que la synthèse de protéine kinase K (76). Elle a, pendant plus de

vingt ans, été considérée comme étant le principal facteur de virulence associé au développement de l'entérite nécrotique chez la volaille, les cas d'entérite nécrotique étant presque exclusivement associés à des souches de types A (52). De plus, chez des oiseaux ayant présenté un épisode d'entérite nécrotique, de hauts taux d'anticorps envers cette toxine sont détectables (84). On supposait que par son action lécithinase, elle hydrolysait la lécithine des membranes cellulaires, promouvant ainsi la désorganisation tissulaire caractéristique observée lors d'entérite nécrotique (41, 52). Les scientifiques se basaient aussi sur sa réputation de toxine majeure impliquée dans la gangrène gazeuse, ainsi que sur les rares recherches effectuées sur le sujet (40, 85). Les éléments laissant croire à son implication dans la maladie découlaient des résultats de quelques études d'infection expérimentale d'oiseaux (86). Ainsi, en infusant, soit directement dans le duodénum ou soit par gavage, des bouillons de culture de *C. perfringens*, ou tout simplement le surnageant contenant la toxine pure, les chercheurs parvenaient à reproduire la maladie (87). Dans ce cas, les chercheurs ne tenaient pas compte du fait que d'autres enzymes ou toxines présentes dans ces bouillons ou surnageants pouvaient aussi se retrouver dans l'intestin des oiseaux inoculés, et ainsi exercer leur action. L'immunisation d'oiseaux avec la toxine inactivée assurait une protection complète ou partielle de ces oiseaux face au développement de la maladie (86), et des oiseaux récupérant d'un épisode d'entérite nécrotique présentaient aussi des niveaux beaucoup plus élevés d'anticorps face à la toxine alpha que des oiseaux n'ayant pas exprimé la maladie (84). Des études subséquentes ont par contre soulevé plusieurs doutes quant au rôle de la toxine alpha (88). Entre autres, des études ont démontré que les niveaux de toxine alpha produits par des souches virulentes ne

différait pas de ceux présentés par des souches avirulentes (89). Aussi, aucune corrélation ne pouvait être établie entre les quantités de toxine alpha produites et la sévérité des lésions observées lors d'infection expérimentale. La description histologique de l'évolution des lésions a pu démontrer que les changements pathologiques retrouvés dans le stade initial de la maladie ne correspondaient pas aux activités de lécithinase et de sphingomyélinase de la toxine. Finalement, c'est Keyburn et coll. qui, par la construction d'un mutant de *C. perfringens* déficient pour le gène *plc* codant pour la toxine alpha (CPA), ont prouvé hors de tout doute l'implication de d'autres facteurs de virulence dans le développement de la maladie (87). Ce mutant, lorsqu'utilisé dans un modèle d'infection expérimentale, parvenait toujours à reproduire l'entérite nécrotique chez les oiseaux inoculés, et était associé avec le développement d'immunité protectrice (87, 88). De plus, Coursodon et coll. ont par la suite démontré que l'intestin des oiseaux infectés avec ce mutant CPA contenait tout de même la toxine, celle-ci provenant probablement des souches résidentes de l'intestin. La réaction inflammatoire marquée causée par la migration de granulocytes à travers la paroi digestive jusque dans la lumière intestinale est un signe caractéristique de l'entérite nécrotique et contraste totalement avec l'absence de réaction inflammatoire secondaire à l'action de la toxine alpha dans les cas de gangrène gazeuse (10). Ainsi, le rôle de CPA dans le développement de l'entérite nécrotique fut largement remis en question. Cependant, puisque le surnageant de culture de *C. perfringens* était en mesure de causer la maladie chez des oiseaux inoculés, il demeure légitime de croire que d'autres facteurs de virulence pourraient être sécrétés par la bactérie et ainsi intervenir dans l'apparition de la maladie.

2.2.1.2 La toxine bêta

Le portage du gène *cpb* codant pour la toxine bêta est une caractéristique des souches de *C. perfringens* appartenant aux types B et C. Quoique les souches de type C peuvent être retrouvées comme membre de la flore normale de certains animaux, il est aussi rapporté que pour certains hôtes, la bactérie n'est retrouvée que lors d'infections. En présence d'un environnement intestinal favorable, la bactérie pourra se multiplier et ainsi produire la toxine bêta. Cette toxine est une protéine thermolabile et susceptible à l'action de la trypsine et de la pepsine. Elle est responsable de la nécrose de plusieurs muqueuses et possiblement de manifestations cliniques attribuables à l'infection du système nerveux central chez les animaux domestiques. Le clonage et séquençage de la toxine bêta de *C. perfringens* a permis de démontrer que celle-ci possède des homologies avec les toxines alpha, gamma et la leucocidine de *Staphylococcus aureus* (90). La toxine bêta est portée sur de gros plasmides et des analyses par southern blot et PCR confirment que seules les souches de type B et C sont porteuses du gène *cpb* (35). Bien que les souches de type C soient reconnues pour toutes posséder les gènes *plc* et *cpb*, elles peuvent néanmoins être porteuses de gènes codant pour d'autres toxines telles que CPE, TpeL, PFO et CPB2. Chez les souches porteuses, le gène *cpb* code pour une prototoxine de 336 acides aminés incluant une séquence signal de 27 acides aminés. Un clivage de cette courte séquence au moment où la toxine est sécrétée par la bactérie résulte en la forme active de 35 kDa. Les souches de *C. perfringens* appartenant aux types B et C sont reconnues pour causer des dysenteries, entérites et

entérotoxémies chez plusieurs espèces animales dont les espèces ovine, porcine et équine. Chez l'humain, les souches de type C et donc la toxine bêta, sont associées à une entérite nécrosante, aussi connue sous le nom de Pigbel. Cette maladie, auparavant endémique en Papouasie Nouvelle-Guinée, survient maintenant de manière sporadique à cet endroit, tout comme dans le sud-est de l'Asie (90, 91). L'évolution clinique de cette forme d'entérite nécrosante chez l'humain est généralement fulgurante et la mort du patient est souvent constatée moins de 48 heures après le début des symptômes. La maladie est aussi plus fréquemment rapportée chez des personnes diabétiques. La toxine bêta semble, selon plusieurs évidences, être le facteur de virulence prédominant lors de ces infections, et les principaux facteurs de risque associés à l'apparition de la maladie sont une diète pauvre en protéines ainsi qu'une affection du pancréas. Des souches mutantes déficientes pour le gène *cpb*, lorsqu'utilisées dans des modèles d'infections expérimentales, ne parviennent pas à causer les signes cliniques typiques observés lors d'infection chez la plupart des espèces animales. Selon que la maladie se manifeste sous sa forme sur-aiguë, aiguë ou chronique, la toxine sera responsable d'une douleur et d'un gonflement intenses à l'abdomen, de dépression, de diarrhée persistante à hémorragique, et de déshydratation, de détresse respiratoire, de signes neurologiques et même la mort (91). Chez les animaux comme chez l'humain, les signes cliniques associés à la toxine bêta sont reliés aux dommages causés à l'intestin. Ces dommages affectent principalement le jejunum et l'iléon et vont d'une entérite fibrinonécrotique à une entérite nécrosante et hémorragique. La toxine bêta agit en formant des pores dans la membrane de différentes cellules, créant ainsi une sortie massive d'ions potassium et l'entrée, à l'intérieur de la cellule, d'ions tels que le

sodium, le calcium et le chlore. Cet échange d'ions, ainsi que les changements osmotiques secondaires provoquent alors la lyse des cellules atteintes (91).

2.2.1.3 La toxine epsilon

Seules les souches appartenant aux groupes B et D sont porteuses du gène *etx* codant pour la toxine epsilon. Chez les animaux, les souches de type B sont associées à la dysenterie des agneaux, une condition principalement rencontrée au Royaume-Uni, tandis que les souches de type D causent plutôt des entérites et entérotoxémies d'importance économique mondiale, généralement chez le mouton et la chèvre, quoique les bovins peuvent aussi être affectés. La toxine epsilon, codée par le gène *etx*, est non seulement reconnue comme un facteur de virulence majeur pour ces deux conditions, mais aussi comme une des toxines les plus puissantes produites par *Clostridium*, après les toxines causant le botulisme et le tétanos (92). Dans l'étude de Garcia et coll., il a d'ailleurs été démontré hors de tout doute, que la toxine epsilon était le facteur de virulence responsable de l'apparition des signes cliniques, des lésions macroscopiques et microscopiques, ainsi que des mortalités observées chez les animaux inoculés avec des souches de *C. perfringens* de type D (92). Epsilon fait partie de la famille des toxines heptamériques bêta formant des pores. Comme d'autres toxines produites par *Clostridium*, elle possède, tel que son nom l'indique, la capacité à former des pores de forme heptamérique dans la membrane de lignées cellulaires spécifiques (93). Les souches de *C. perfringens* de type D sont retrouvées principalement dans l'environnement, c'est-à-dire le sol, la poussière, la litière. Même

si elles ne sont pas reconnues comme des habitants normaux du tractus intestinal, les souches de type D peuvent être retrouvées en faibles nombres (moins de 10^3 bactéries par g de contenu intestinal) dans l'intestin d'animaux sains, principalement chez les ruminants et plus spécifiquement les moutons (38). Chez cette espèce, la maladie est associée principalement à des signes systémiques, comme de l'œdème pulmonaire et cérébral, et dans de rares occasions, il y aura atteinte intestinale. On parle alors d'entérotoxémie, puisque la toxine quitte l'intestin pour gagner la circulation sanguine et aller créer les dommages ci-haut mentionnés à d'autres organes. À l'inverse, les souches de type D provoquent chez les chèvres des entérocolites sévères dues à l'action locale d'épsilon (92). La toxine sera produite lors de multiplication rapide et massive de la bactérie dans l'intestin. La maladie est aussi nommée « pulpy kidney disease » ou maladie du rein pulpeux. Même si certaines lignées cellulaires humaines sont susceptibles à l'action de la toxine epsilon, les infections à *C. perfringens* type D demeurent extrêmement rares chez les humains et seuls deux cas d'entérite ont déjà été rapportés.

La toxine epsilon est produite par les souches de *C. perfringens* en phase exponentielle de croissance et est d'abord libérée sous la forme d'une prototoxine inactive de 32,9 kDa devant être activée. Cette activation a lieu suite au clivage des 14 acides aminés du bout C-terminal, par l'action de diverses protéases telles que la trypsine de l'hôte ou la λ -protéase de *C. perfringens*. La toxine active provoque une augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, permettant le passage de la toxine dans le sang. Epsilon serait aussi responsable d'un ralentissement de la motilité intestinale, augmentant ainsi l'exposition des cellules intestinales à la toxine. La toxine

lie aussi facilement les cellules épithéliales des tubules rénaux et provoque congestion et hémorragie de la médulla rénale en affectant l'endothélium des vaisseaux sanguins présents. Au niveau du cerveau, la toxine affecte l'intégrité ainsi que la perméabilité de la barrière sang-cerveau et lie spécifiquement certaines lignées cellulaires afin de provoquer un œdème périvasculaire et une nécrose subséquente du parenchyme cérébral (92). Pour cette raison, la toxine epsilon est aussi qualifiée de neurotoxine. Le rein, le cerveau ainsi que les poumons sont les organes les plus susceptibles à l'action de la toxine epsilon. Son activité létale est cependant beaucoup plus puissante que celle des autres toxines. Par exemple, epsilon possède une activité létale 100 fois plus puissante que celle de la toxine alpha de *Clostridium septicum*. Par contre, seules quelques lignées cellulaires sont susceptibles à l'action de la toxine epsilon, un récepteur spécifique reconnaissant la forme active de la toxine étant présent chez ces lignées. Chez ces cellules, la toxine provoque un gonflement de la cellule, jusqu'à sa rupture. En effet, epsilon forme des pores dans la membrane cellulaire, permettant ainsi la sortie d'ions potassium et l'entrée d'ions sodium et chlore de la cellule atteinte. Quoique le mode d'action précis de la toxine reste à être élucidé, on sait qu'epsilon provoque une augmentation de la perméabilité des cellules épithéliales et endothéliales, entraînant leur mort (92).

C. perfringens est reconnu pour porter, le plus souvent, plus d'un gros plasmide. C'est d'ailleurs sur ces plasmides que plusieurs des toxines produites par *C. perfringens* sont retrouvées. La plupart des souches de type B sont porteuses d'un plasmide de 65 kbp sur lequel est retrouvé le gène *etx* et un second plasmide, cette fois-ci de 90 kbp, portant le gène *cpb* codant pour la toxine bêta. Deux plasmides sont

régulièrement identifiés sur les souches de type D, celui de 65 kbp et un second, plus petit, portant le gène de la toxine bêta-2. Le transfert horizontal contribue quant à lui à l'échange de ces plasmides entre différentes souches de *C. perfringens* et est donc en partie responsable de la grande diversité et plasticité génétique observée chez ce microorganisme (94).

2.2.1.4 La toxine iota

Iota, tout comme les toxines alpha, bêta et epsilon, fait partie des quatre toxines majeures produites par *C. perfringens*. La toxine iota est produite exclusivement par les souches de type E, celles-ci représentant une faible proportion de la population des *C. perfringens*. C'est en 1943 que la toxine iota fut décrite pour la première fois par Bosworth. Toutefois, sa vraie nature n'a été révélée que 45 ans plus tard. À ce moment, il a été possible de décrire la nature binaire de cette protéine. Deux polypeptides distincts composent donc la toxine iota, soit Ia et Ib. Lorsque considérés seuls, ces deux polypeptides ne possèdent aucun effet toxique. Ce n'est que lorsqu'ils sont réunis qu'iota peut exercer ses propriétés cytotoxique, dermonécrotique et létale. Ia, d'un poids moléculaire de 47,5 kDa, est codée par le gène *iap* d'une longueur de 454 acides aminés, et représente la composante enzymatique active ayant des propriétés glycohydrolase et ribosyltransférase (95). La portion Ib possède un poids moléculaire de 71,5 kDa, est codée par le gène *ibp* d'une longueur de 875 acides aminés et joue plutôt un rôle associé à l'attachement et à la translocation de la toxine à l'intérieur du cytosol de la cellule hôte (40, 96). Chez les souches de *C. perfringens* de type E, les

gènes codant pour les polypeptides Ia et Ib sont retrouvés, organisés sous forme d'opéron, sur un gros plasmide. Les deux gènes sont séparés par 40 paires de bases et seraient transcrits à partir d'un seul promoteur situé en amont du gène *iap*. Le rôle précis de la toxine iota dans la virulence des souches de *C. perfringens* de type E reste encore à être élucidé, mais on suggère que cette toxine soit impliquée dans des épisodes de diarrhée sporadiques chez des veaux et des agneaux ainsi que lors d'épisodes d'entérotoxémie associés à la prise d'antibiotiques chez le lapin (40, 95).

2.2.1.5 La toxine bêta-2

À l'origine, les chercheurs croyaient que la toxine bêta-2 représentait un produit de dégradation de la protéolyse de la toxine bêta. Ce n'est que tout récemment, en 1997, que la toxine bêta-2 fut purifiée et identifiée à partir d'une souche de *C. perfringens* de type C isolée d'un porc atteint de la forme typique d'entérite nécrotique hémorragique néonatale (97). La toxine bêta-2 est une protéine de 28 kDa dont la séquence en acides aminés ne présente aucune similarité avec celle de la toxine bêta, ou de toute autre toxine produite par *C. perfringens*. Le gène codant pour la toxine bêta-2 est retrouvé la plupart du temps sur un gros plasmide, laissant supposer un fort potentiel de transfert du gène *cpb2* entre diverses souches de *C. perfringens*. Dans une étude réalisée par Parreira et coll., il a même été démontré que le gène codant pour la toxine bêta-2 pouvait être retrouvé sur deux plasmides distincts retrouvés chez une même souche de *C. perfringens* (59). Puisque plusieurs études rapportent une association entre la présence du gène *cpb2* et l'occurrence de maladies entériques chez

diverses espèces animales, telles que des cas d'entérite chez des porcelets, des cas de typhlocolites chez le cheval, des cas d'entérotoxémie néonatale bovine, ou même lors de cas de toxi-infections alimentaires ou de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques chez l'humain, certains chercheurs ont été tenté de supposer un tel rôle pour cette toxine dans les cas d'entérite nécrotique (98-100).

Les souches de *C. perfringens* porteuses du gène *cpb-2* sont identifiées de différentes sources. En effet, une forte proportion des souches isolées d'animaux domestiques et sauvages, d'humains et même de nourriture, du sol ou de boues usées sont porteuses du gène. Le portage de *cpb2* par les souches de *C. perfringens* aviaires varie selon les études. Dans une étude réalisée en Géorgie aux Etats-Unis, tout près de 96% des souches étaient porteuses du gène, alors qu'une étude suédoise n'a pu détecter le gène que chez 9% des souches. En Belgique, des chercheurs ont trouvé des prévalences similaires variant entre 11% et 15% des souches porteuses du gène. Finalement, dans une étude réalisée par Bueschel et coll., c'est un peu plus de 37% des 3270 souches analysées qui étaient porteuses du gène *cpb2* (97). Dans toutes ces études, la capacité de causer l'entérite nécrotique chez la volaille pour les différentes souches de *C. perfringens* ne semblait pas être corrélée avec la présence du gène codant pour la toxine bêta-2, le gène étant également distribué entre les souches associées à des profils cliniques distincts (101). Chalmers et coll. ont même rapporté n'avoir identifié aucune souche de *C. perfringens* isolée d'oiseaux vivant un épisode d'entérite nécrotique et porteuse de la toxine bêta-2, ce qui vient supporter le fait que la toxine ne représenterait pas un facteur de virulence essentiel au développement de la maladie chez les oiseaux (72, 88, 102, 103). Il n'y a pour le moment que chez le porc

où la présence du gène codant pour la toxine bêta-2 semble être fortement corrélée avec la capacité de la souche à provoquer des maladies entériques (100). Ainsi, le gène *cpb2* a été retrouvé chez 85,8% des souches de *C. perfringens* associées à des cas d'entérite chez l'espèce porcine. Cette corrélation est encore plus forte lors de cas de diarrhée néonatale chez le porcelet où on a détecté le gène chez tout près de 90,9% et 97,2% des souches de type A et C respectivement (97). Même si les souches de *C. perfringens* porteuses du gène *cpb2* sont largement retrouvées, certains aspects les différencient. Ainsi, les souches porteuses du gène se distinguent par leur distribution géographique et par la présence de nombreux variants alléliques. Cette variabilité influencerait même leur capacité à produire la toxine (101, 104, 105).

2.2.1.6 L'entérotoxine

Bien qu'elle ne fasse pas partie des quatre toxines majeures utilisées pour la classification des souches de *C. perfringens* en cinq principaux toxinotypes, l'entérotoxine (CPE) représente tout de même, du point de vue de la santé publique, une des toxines les plus importantes produites par la bactérie (106). La présence de souches de *C. perfringens* porteuses du gène *cpe* codant pour l'entérotoxine et associées aux toxi-infections alimentaires chez l'humain représente un risque considérable pour la santé publique. Ces souches sont parmi les principales causes de toxi-infections alimentaires dans les pays industrialisés (43, 107-109). En effet, dans son rapport de surveillance émis en juin 2013, le CDC rapporte *C. perfringens* parmi les quatre principaux agents étiologiques identifiés et impliqués lors d'épisodes de

toxi-infections alimentaires. Parmi ces cas, la viande de volaille fut le plus souvent associée aux épisodes de maladie. Selon les publications, *C. perfringens* se retrouve fréquemment en tête de liste des agents responsables de toxi-infections alimentaires (107). Bien que son importance pour la santé publique n'ait plus à être démontrée, plusieurs inconnues demeurent pour les souches entérotoxigènes de *C. perfringens*. En effet, les études rapportent que seule une faible proportion de la population de *C. perfringens*, soit entre 1% et 5%, serait porteuse du gène codant pour l'entérotoxine (43, 107, 110). De plus, la plupart sinon la totalité de ces souches entérotoxigènes seraient déficientes pour le gène *pfoA* codant pour la toxine thêta (ou perfringolysine) et étant responsable de la zone de lyse interne observée lors du phénomène de double hémolyse associé à la croissance de la bactérie sur gélose sang. Compte tenu du fait que les souches de *C. perfringens* sont généralement isolées sur la base de leur capacité à produire cette double hémolyse sur gélose sang, les réservoirs, les routes de transmission ainsi que les prévalences réelles de ces souches entérotoxigènes demeurent probablement mal connus ou sous-estimés (107, 111).

Alors que la plupart des toxines produites par *C. perfringens* sont codées par des gènes retrouvés sur de gros plasmides, le gène *cpe* peut être localisé autant sur un plasmide que sur le chromosome bactérien (110). Jusqu'à tout récemment, selon qu'elles portent *cpe* sur un plasmide ou sur le chromosome, les souches de *C. perfringens* étaient reconnues pour causer des conditions cliniques distinctes. Ainsi, les épisodes de toxi-infections alimentaires étaient plutôt associés aux souches portant le gène sur leur chromosome, alors qu'on attribuait les cas de diarrhées sporadiques ou secondaires à la prise d'antibiotiques aux souches présentant une localisation

plasmidique pour *cpe* (110). Les souches portant le gène *cpe* sur leur chromosome ainsi que leurs spores sont aussi associées à une plus grande résistance à plusieurs éléments utilisés dans le traitement des produits de viande tels que la chaleur, le chlorure de sodium, les variations du pH, ainsi que les nitrites, concordant ainsi avec leur implication dans des cas de toxi-infections alimentaires (107, 111). La présence de *C. perfringens* sur la viande de volaille ne semble cependant pas être constante. Selon les études, les taux de contamination varieraient de 84%, 94% jusqu'à 100% des carcasses ou portions de carcasses analysées (65, 112, 113). Les études récentes visant à mieux comprendre l'épidémiologie des souches entérotoxigènes de *C. perfringens* ont par contre démontré qu'autant les souches porteuses du gène *cpe* sur leur chromosome que celles le portant sur un plasmide pouvaient être isolées de produits de viande. Des souches possédant *cpe* sur un plasmide ont de plus été isolées dans près de 30% des cas de toxi-infection alimentaires survenus en Europe et au Japon (107, 110, 114-116). Même si l'intestin des animaux destinés à la consommation humaine est considéré comme étant le réservoir principal pour les souches porteuses de l'entérotoxine et que certaines études rapportent des prévalences de contamination allant jusqu'à 12% pour certains produits de viande d'origine animale, l'isolement de ces souches entérotoxigènes à partir du tractus digestif des animaux demeure ardu peu importe la technique d'isolement utilisée (43). Les quelques études de prévalences réalisées à partir du tractus intestinal d'humains en santé ont permis d'isoler avec succès des souches entérotoxigènes de *C. perfringens*, permettant ainsi à certains chercheurs de supposer que l'humain pourrait servir de réservoir et ainsi être responsable de la

contamination des produits de viande destinés à la consommation humaine lors de la manipulation de ceux-ci (43, 107, 110).

Les chercheurs ont longtemps considéré l'entérotoxine comme étant la seule toxine de *C. perfringens* à être produite pendant la phase de sporulation de la bactérie et à être libérée suite à la lyse de la cellule, toutes les autres toxines étant sécrétées par la bactérie lors de la phase exponentielle de croissance (38, 117). Les travaux réalisés par Paredes-Sabja et coll. ont cependant permis de démontrer une réalité semblable pour la toxine TpeL (118). La synthèse de l'entérotoxine et la sporulation de la bactérie semblent être des phénomènes étroitement liés puisque la seule mutation du gène *spo0A* codant pour une protéine majeure dans la régulation de la sporulation vient du même coup arrêter la sporulation et la synthèse de l'entérotoxine. Lors de la sporulation, la toxine est accumulée dans de larges corps d'inclusion paracrystallins à l'intérieur de la cellule-mère. L'entérotoxine est un polypeptide de 319 acides aminés et possédant un poids moléculaire de 35 kDa (108). Elle possède deux domaines fonctionnels. Un domaine C-terminal dépourvu d'activité cytotoxique, capable de lier les protéines claudines 3 et 4 des jonctions serrées et permettant à la toxine d'être intégrée à la membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales et ainsi, par l'entremise d'un changement de conformation. La formation de ce complexe ainsi que son incorporation transmembranaire permettent une modulation temporaire et réversible de l'ouverture des jonctions serrées, modulant ainsi la perméabilité intercellulaire. La toxine possède aussi une activité cytotoxique, principalement médiée par son domaine N-terminal et causant ultimement la destruction des cellules épithéliales intestinales en provoquant l'apparition de pores transmembranaires (108,

109). On rapporte que l'action cytotoxique de la toxine permettrait à celle-ci, par l'entremise de la destruction cellulaire, d'avoir accès aux protéines des jonctions serrées afin d'en altérer la conformation (119, 120).

2.2.1.7 La toxine NetB

La toxine NetB est une toxine formant des pores et représente, selon les plus récentes études, un élément important de la virulence des souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique (47, 56, 121). En effet, la toxine a été identifiée chez plusieurs souches de *C. perfringens* provenant d'épisodes d'entérite nécrotique et est maintenant reconnue comme un attribut de virulence important chez ces souches (86). Cependant, NetB ne serait pas la seule responsable de l'apparition d'entérite nécrotique puisque des souches clairement associées à des épisodes cliniques de la maladie ont été identifiées comme ne possédant pas le gène *netB* (44, 72). C'est l'équipe de Keyburn et coll. qui fut la première à démontrer que la délétion ciblée du gène *plc* codant pour la toxine alpha chez une souche de *C. perfringens* virulente n'affectait en rien la capacité de cette souche à pouvoir provoquer la maladie (87). Ces mêmes chercheurs ont aussi été les premiers à démontrer l'existence de la toxine NetB chez une souche de *C. perfringens* isolée d'un oiseau souffrant d'entérite nécrotique. Les auteurs ont aussi démontré que la délétion du gène *netB* codant pour la toxine entraînait la perte de virulence pour la souche mutante (56). La production de cette toxine par *Clostridium* est sous la gouverne du système de régulation à deux composantes VirSR, potentiellement dépendant du quorum-sensing. La toxine semble présenter une

spécificité de cellules envers lesquelles elle exerce ses effets cytotoxiques, les cellules LMH (Leghorn male hepatoma cell line) étant particulièrement sensibles à son action (47). Ainsi, NetB est une toxine formant des pores d'environ 1,6 à 1,8 nm dans la membrane cellulaire. Lors de l'analyse de la séquence en acides aminés, les auteurs ont identifié 30% et 38% d'homologie avec l'alpha-hémolysine de *Staphylococcus aureus* et la toxine bêta de *C. perfringens* respectivement. Tout récemment, il a été démontré que le gène *netB* était retrouvé sur un îlot de pathogénicité (NELoc-1), à son tour porté sur un gros plasmide, chez des souches virulentes de *C. perfringens* (58). Par contre, autant les travaux de Keyburn et coll. que ceux de Lepp et coll. ont pu démontrer que les souches isolées de cas cliniques d'entérite nécrotique ne possédaient pas toutes le gène codant pour la toxine NetB, ni le plasmide portant l'îlot de pathogénicité 1 (NELoc-1) (57, 58). NetB contribuerait donc à la capacité de certaines souches de *C. perfringens* à causer l'entérite nécrotique, mais ne serait pas l'unique facteur responsable (41).

2.2.1.8 La toxine TpeL

Ce n'est que tout récemment que la toxine TpeL fut identifiée lorsque des protéines retrouvées dans le surnageant d'une culture de *C. perfringens* ont été soumis à une électrophorèse et mises en contact avec le sérum d'oiseaux immuns pour l'entérite nécrotique. En fractionnant par HPLC le surnageant d'une culture de *C. perfringens* type C, des chercheurs ont identifié un produit présentant un poids moléculaire de 191 kDa ainsi qu'une activité létale envers des souris et les cellules

Vero (118). Le gène *tpeL* fut par la suite séquencé avec succès (122). Puisqu'elle partage plusieurs caractéristiques communes avec les toxines appartenant à cette famille, TpeL est classée dans la famille des « Large Clostridial Cytotoxins » (LCT), une famille d'exotoxines dont les poids moléculaires varient de 250 à 308 kDa (123). Avant la découverte de TpeL, ce groupe comportait cinq toxines, soit les toxines A (TcdA) et B (TcdB) de *Clostridium difficile*, les toxines hémorragique (TcsH) et létale (TcsL) de *Clostridium sordellii* ainsi que la toxine alpha (Tcna) de *Clostridium novyi* (124). Ces cytotoxines sont des protéines à chaîne unique et possèdent trois domaines, soit un domaine responsable de la liaison de la toxine à son récepteur, un domaine responsable de la translocation de la toxine à l'intérieur du cytoplasme de la cellule-cible, puis finalement, un domaine responsable de l'activité enzymatique cytotoxique reconnue pour les différentes toxines associées à ce groupe (124).

Initialement identifiée sur une souche de *C. perfringens* de type C, le gène *tpeL* a aussi été retrouvé chez des souches de *C. perfringens* appartenant à d'autres toxinotypes. Plusieurs études ont été réalisées sur la distribution du gène *tpeL* chez diverses populations de *C. perfringens* depuis sa découverte et ont identifié le gène chez tout près de 18% des souches de type A associées à des épisodes d'entérite nécrotique, chez près de 2% des souches isolées de viande de volaille au détail, puis finalement chez 100% et 75% des souches de type B et C respectivement (72, 125-127). Puisque l'entérite nécrotique est associée principalement aux souches de type A, mais aussi dans une plus faible proportion aux souches de type C, Coursodon et coll. ont évalué si la présence du gène *tpeL* sur des souches de *C. perfringens* pouvait jouer un rôle dans la pathogénie de l'entérite nécrotique (128). Les auteurs ont identifié des

lésions macroscopiques et microscopiques plus sévères chez les oiseaux inoculés avec les souches de *C. perfringens* positives pour la présence de *tpeL* lorsque comparés à ceux inoculés avec des souches négatives pour la présence de ce gène. De plus, la présence de *tpeL* a semblé être associée à l'apparition plus hâtive des signes cliniques de la maladie tout comme une mortalité précoce chez ces oiseaux. Quant à eux, Chalmers et coll. ont rapporté une présence variable du gène *tpeL* autant chez différents clones de *C. perfringens* provenant de troupeaux affectés par l'entérite nécrotique, que sur des souches semblant appartenir à une même lignée clonale (72). Le rôle précis de TpeL dans la pathogénie de l'entérite nécrotique reste donc à être identifié.

2.2.2 Bactériocines et bactériophages

Les bactériocines sont des protéines ou des peptides de faible poids moléculaire et possédant des propriétés antimicrobiennes pouvant être soit bactériostatiques, soit bactéricides. Leur production a été observée autant chez des espèces bactériennes à Gram positif dont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, que chez des bactéries à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli*, *Shigella*, *Serratia*, *Klebsiella* et *Pseudomonas* (129). Même si certaines bactériocines sont reconnues pour avoir un large spectre d'action, ces molécules n'expriment en général leur pouvoir antimicrobien qu'envers des bactéries étroitement liées et appartenant généralement à la même espèce bactérienne que celle des bactéries productrices de la substance (129, 130). La structure ainsi que le poids moléculaire de

ces composés antimicrobiens servent de base pour leur classement en quatre catégories distinctes allant de I à IV et regroupant respectivement les lantibiotics ou peptides thermostables d'un poids moléculaire inférieur à 5kDa, les non-lantibiotics ou peptides thermostables dont le poids moléculaire est inférieur à 10kDa, les bactériocines de poids moléculaire supérieur à 30kDa et instables à la chaleur, puis les molécules thermostables dont la présence d'une portion lipidique ou d'hydrates de carbone est essentielle à leur activité (129). Divers modes d'action ont jusqu'à présent été décrits pour les différentes classes de bactériocines, et se traduisent par la liaison à des molécules cibles interférant avec la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, par l'insertion dans la membrane cellulaire bactérienne causant la formation de pore, ou même entraînant une perméabilisation et une dépolarisation responsables de la mort cellulaire. Plusieurs facteurs influenceraient l'activité antimicrobienne des bactériocines, ces facteurs incluant la dose, le niveau de pureté, l'état physiologique de l'hôte, ainsi que des facteurs environnementaux (130).

La production de bactériocines par *C. perfringens* a été rapportée il y a de ça plusieurs années déjà, mais depuis, très peu de travaux se sont intéressés à mieux identifier et caractériser les diverses molécules produites par la bactérie, mise à part le fait que certaines souches de *C. perfringens* présentaient un avantage compétitif pour croître et inhiber la croissance de souches de la même espèce (71, 131-133) (134, 135). Higa et coll. ont démontré qu'une même souche de *C. perfringens* pouvait produire plus d'une bactériocine, et que chacun de ces peptides présentait un spectre d'action différent (133). Watson et coll. ont aussi rapporté des résultats semblables, mais pour des souches entérotoxigènes de *C. perfringens* (136). D'autres espèces bactériennes

ont aussi été reconnues pour produire des bactériocines capables d'inhiber *C. perfringens* : *Carnobacterium divergens*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidolactici*, *Pediococcus pentosaceus* et *Ruminococcus gnavus* (137). En conditions *in vivo*, certaines bactériocines ont montré des effets positifs sur les performances de croissance lorsqu'utilisées comme additif alimentaire chez des oiseaux infectés par *C. perfringens* et soumis à des diètes riches en blé, en orge ou en farine de poisson (137). Ces bactériocines agiraient possiblement en inhibant la croissance de *C. perfringens*. Une étude récente réalisée par Timbermont et coll. rapporte des informations semblables, où une culture de la souche de *C. perfringens* pouvait inhiber la croissance de plus de 41 isolats de la même espèce bactérienne sur 50 testés, tandis que le surnageant et les bactériocines purifiées de cette culture ne montraient une activité inhibitrice qu'envers un nombre réduit de souches (15/50). De plus, la mise en évidence d'une nouvelle bactériocine représentant potentiellement un facteur de virulence additionnel associé aux souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique a été rapportée (131). La Perfrin, un peptide de 11,5 kDa associé à la portion C-terminal d'une nouvelle protéine de 23 kDa ne présentant aucune homologie avec des bactériocines actuellement connues, a été mis en évidence chez des souches de *C. perfringens* et s'est révélée capable d'induire l'entérite nécrotique chez des poulets (131). Le gène *perfrin*, associé à la production de cette bactériocine, a été identifié chez 9 isolats de *C. perfringens* isolés de cas cliniques d'entérite nécrotique et aussi porteurs du gène codant pour la toxine NetB, ainsi que sur un isolat porteur de *netB* mais provenant d'un oiseau sain. À l'opposé, aucune des 45 souches isolées de diverses origines telles que de vaches, de moutons, de porcs ainsi

que d'humains n'a été trouvée positive pour la présence du gène *perfrin*. Puisqu'il a été démontré que certaines souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique étaient capables, lors d'épisodes de la maladie, de sécréter des facteurs inhibant la croissance de souches de la bactérie faisant partie de la flore intestinale normale, la Perfrin pourrait faire partie des facteurs fournissant un avantage compétitif aux souches virulentes afin de causer la maladie (132).

Tout comme la production de bactériocines par certaines souches de *C. perfringens*, la capacité lysogénique d'isolats appartenant à cette espèce a aussi été reconnue dans des travaux effectués il y a plusieurs années (135). Les bactériophages sont des virus qui par leur réplication à l'intérieur des cellules bactériennes ainsi que la production d'enzymes lytiques, vont entraîner la lyse bactérienne (137). Ils ont pour la première fois été rapportés en 1915 par Fredrick William Twort (138). Les bactériophages ont longtemps été utilisés comme thérapie antibactérienne, puis sont tombés pratiquement dans l'oubli après la Seconde Guerre mondiale suite à l'arrivée des antibiotiques. Les bactériophages ont alors été principalement considérés pour des fins de recherche (139, 140). La majorité des bactériophages sont formés d'un génome à ADN linéaire double brin d'une taille variant entre 11 et 500 kb. Des études suggèrent qu'une importante diversité génomique existerait même entre des bactériophages étroitement reliés tels que certains bactériophages de *C. perfringens* (139). La variabilité de séquences des gènes codant entre autres pour les endolysines associées à la fonction lytique des bactériophages serait en partie responsable du spectre d'action étroit de certains bactériophages envers des isolats bactériens spécifiques (139). Ceci expliquerait possiblement aussi la résistance d'autres isolats

face à un même bactériophage, la résistance étant un phénomène largement observé, même dans des conditions expérimentales (135, 138). Jusqu'à aujourd'hui, les résultats de séquençage de 12 phages de *C. perfringens* ont été publiés, la taille du génome de ces phages variant de 16,75 kb à 39,59 kb (141). La plupart des études publiées sur le sujet se sont intéressées à l'activité lytique de ces bactériophages, ou de leurs enzymes lytiques en conditions *in vivo* (138, 142, 143). Chez les volailles, très peu d'études sont disponibles quant à l'effet d'une thérapie à base de phage sur les maladies associées à *C. perfringens*, dont l'entérite nécrotique (137, 144, 145). Une étude rapporte un effet bénéfique de la thérapie phagique sur le gain de poids, sur la conversion alimentaire ainsi que sur le taux de mortalité chez des poulets infectés simultanément avec *Eimeria maxima* et *C. perfringens* (146). Dans une seconde étude en conditions expérimentales, l'administration de bactériophages à des poulets de chair a été associée à une amélioration de l'efficacité alimentaire dans les 14 premiers jours d'élevage ainsi qu'à un développement hépatique plus marqué, potentiellement relié à une fonction immunitaire bonifiée. L'analyse des excréta des groupes traités avec des bactériophages a aussi révélé une augmentation des comptes de *Lactobacillus*, ainsi qu'une diminution du nombre d'*Escherichia coli* et de *Salmonella* (147).

2.2.3 Plasmides

Le pouvoir pathogène de *C. perfringens* est largement attribuable à sa capacité remarquable à produire un éventail de toxines puissantes (148). En plus des quelques gènes de virulence associés à des toxines que l'on retrouve sur le chromosome

bactérien de *C. perfringens*, de larges plasmides renfermant des gènes spécifiquement associés à certaines toxines chez des isolats de *C. perfringens* sont aussi reconnus pour leur contribution à la virulence de ce microorganisme (141). Identifiés il y a près de 30 ans, il est maintenant clairement établi qu'un vaste pool de plasmides serait maintenu au sein de la population de *C. perfringens*, et que ces plasmides pourraient être échangés d'une souche bactérienne à une autre par conjugaison. Les plasmides de *C. perfringens* sont reconnus pour porter les gènes codant pour les toxines bêta2, bêta, epsilon, iota, TpeL, NetB et quelques fois CPE. La taille de ces plasmides varie d'environ 45 kb à 140 kb et le nombre de copies de chacun de ces plasmides est généralement très faible chez un même isolat bactérien (149). Jusqu'à aujourd'hui, quelques uns des plasmides contenant les gènes *cpb2*, *etx*, *cpe*, *netB*, *ia* et codant pour la résistance à la tétracycline ont été complètement séquencés (125, 127, 150-152). On rapporte que plus de 3 plasmides différents peuvent être à la fois portés par une même souche de *C. perfringens*, et que les gènes de jusqu'à trois toxines différentes peuvent être localisés sur un même plasmide. Plusieurs de ces plasmides semblent être étroitement reliés, suggérant une origine commune. En effet, en comparant le degré d'homologie des différentes séquences associées à chacun de ces plasmides, certains chercheurs supposent que pratiquement tous les plasmides actuellement séquencés seraient le résultat de l'évolution de deux plasmides ancestraux, soit pCPF5603 et pCPF4969. Il est suggéré que ceci pourrait avoir un impact sur la capacité d'une souche de *C. perfringens* à porter une combinaison spécifique de plasmides, ainsi qu'à la possibilité pour un même plasmide de porter des combinaisons précises de gènes codant pour des toxines. De plus, pour la majorité sinon la totalité de ces plasmides,

ainsi que pour certains plasmides associés à un phénotype de résistance aux antibiotiques chez *C. perfringens*, une région d'environ 35 kb renfermant un locus de conjugaison (Tn916) nommé *tcp* ou « *transfer of clostridial plasmids* » et formée de 11 gènes est retrouvée, et semble présenter une séquence hautement conservée. Ces caractéristiques assureraient ainsi un transfert hautement efficace de ces plasmides, et confèreraient à *C. perfringens* une plasticité et une adaptabilité notables (149, 153).

Les résultats de séquençage de plusieurs souches de *C. perfringens* ont démontré que le matériel génétique essentiel à la biosynthèse de plusieurs acides aminés était absent chez la bactérie. *C. perfringens* doit donc avoir recours à un système de régulation bien structuré de l'expression des gènes codant pour des toxines afin de s'assurer de produire les toxines et enzymes lui permettant d'obtenir les nutriments provenant de la dégradation des tissus de son hôte essentiels à sa croissance (154). Deux systèmes de transduction à deux composantes sont reconnus chez *C. perfringens* afin de réguler l'expression de gènes de virulence en réponse à la présence de stimuli environnementaux. Le système de régulation à 2 composantes VirS/VirR initialement associé à la régulation de gènes codant pour des toxines et retrouvés sur le chromosome de la bactérie serait impliqué dans la production de toxines. Plus récemment, des chercheurs ont démontré que ce système était aussi impliqué dans la régulation de certains gènes retrouvés sur des plasmides et codant pour des toxines comme c'est le cas pour *netB* et *cpb*. De plus, le contact étroit entre la bactérie et certaines lignées cellulaires serait associé à une production accrue de toxine, où une régulation positive du système VirS/VirR serait impliquée, contribuant ainsi à la pathogénicité de la bactérie (148, 155, 156). Ce système ne semble cependant pas

essentiel pour l'expression des gènes plasmidiques codant pour toutes les toxines, puisque des souches mutantes de *C. perfringens* pour le système VirS/VirR étaient toujours capables de produire des quantités normales de la toxine epsilon (157). VirS est une histidine kinase située dans la membrane cellulaire bactérienne qui servirait de senseur à la surface de la bactérie et qui aurait pour rôle, en s'autophosphorylant, d'indiquer à VirR, le régulateur interne, qu'il est opportun d'augmenter la production de toxines lorsque les conditions environnementales sont favorables (148). La densité de la population bactérienne peut être un de ces facteurs qui influence positivement la production de toxines et agirait en libérant des molécules extracellulaires, appelées « auto-inducteurs », qui lieraient des récepteurs tels que l'histidine kinase (VirS). Ce phénomène est appelé « quorum sensing » (154, 158). Le système *agr* (pour accessory gene regulator) semble aussi jouer un rôle important dans le phénomène de « quorum sensing » chez *C. perfringens*. En effet, le système *agr* serait impliqué dans la régulation de l'expression de gènes de virulence se retrouvant autant sur le chromosome bactérien que sur des plasmides (154). Une certaine variabilité existerait cependant entre diverses souches de *C. perfringens* quant à l'importance du système *agr* dans la régulation de gènes codant pour une même toxine, la raison de cette différence restant à être élucidée (154). Finalement, ce même système *agr* interviendrait aussi lors de contact étroit entre *C. perfringens* et les cellules de son hôte afin d'augmenter l'expression de gènes codant pour diverses toxines (148, 155, 157).

2.2.4 L'adhésion bactérienne, le pilus de type IV et la motilité

C. perfringens est un habitant normal de la flore digestive commensale des humains et des animaux (20). Même si la bactérie est présente en grand nombre dans le tube digestif, les comptes pouvant atteindre 10^4 ufc par g de contenu intestinal, *C. perfringens* n'est pas reconnu pour adhérer à l'épithélium intestinal sain de son hôte (35). Cependant, des études suggèrent que lors d'entérite nécrotique chez la volaille, une importante couche de bactéries à Gram positif recouvrirait la surface épithéliale intestinale, ainsi que les villosités intestinales nécrotiques, laissant supposer que les souches virulentes de *C. perfringens* présenteraient un avantage compétitif par rapport aux souches commensales sur cet aspect (37, 159). Pour plusieurs bactéries entéropathogènes, la capacité d'adhérer à la muqueuse intestinale représente une étape cruciale dans l'établissement de l'infection (160). Pour *C. perfringens*, il a été démontré que certaines souches possédaient des propriétés d'adhésion supérieures, dû au fait qu'elles produisaient des protéines liant le collagène de type I (type I collagen binding protein ou CpCna), ainsi que la fibronectine (fibronectin binding protein ou FbpA et FbpB), des glycoprotéines constituant la matrice extracellulaire des cellules intestinales. Cette caractéristique jouerait un rôle important dans l'établissement d'une entérite en favorisant l'adhésion de la bactérie (104, 161, 162). *C. perfringens* exerce son action pathogène en sécrétant de puissantes toxines. Cette libération de toxines nécessiterait l'adhésion préalable de la bactérie à des tissus endommagés reconnus pour être riches en collagène et en fibronectine (163). Dans une étude comparant la capacité d'adhésion de 16 souches de *C. perfringens* à plus de 9 molécules de la matrice extracellulaire de lignées cellulaires épithéliales intestinales Caco-2, Martin and Smyth ont démontré qu'il existait, pour certaines souches, indépendamment de

leur capacité à causer l'entérite nécrotique, une habileté supérieure à lier certaines molécules de la matrice extracellulaire. Cependant, les souches virulentes associées à des cas d'entérite nécrotique ont montré une capacité supérieure à lier ces molécules telles que les collagènes de type I, III, IV et V, le fibrinogène, la laminine et la vitronectine. Cette particularité pourrait favoriser les souches virulentes au détriment des souches non-pathogènes, en leur permettant d'adhérer préférentiellement à la membrane basale des cellules intestinales, endroit riche en collagène de type IV devenant exposé lors de dommages intestinaux causés par des facteurs prédisposant à l'entérite nécrotique (37, 45, 164).

C. perfringens a longtemps été considéré comme une bactérie non-motile puisque contrairement aux autres clostridies, aucun matériel génétique codant pour des protéines flagellaires ou pour des molécules impliquées dans un quelconque phénomène de chimiotactisme n'avait été identifié lors du séquençage de souches appartenant à l'espèce (36, 165). La motilité est une propriété utilisée autant par des bactéries non-pathogènes que pathogènes pour différents objectifs, tels que coloniser de nouveaux environnements, acquérir des nutriments, ou même pour former des structures complexes comme des biofilms (166). Alors que le déplacement des bactéries dans des milieux liquides requiert généralement la présence de flagelle, le mouvement de ces bactéries ou leur association à des surfaces solides nécessitent l'utilisation de mécanismes divers tels que le « swarming », ressemblant à la formation de nuages et généralement associé à la présence d'un flagelle, le « twitching », un mouvement saccadé et intermittent faisant appel à la présence du pilus de type IV, puis finalement le « gliding », une forme de motilité s'effectuant par glissement et faisant

aussi intervenir le pilus de type IV chez certaines espèces bactériennes (167). Le pilus de type IV est en fait de longs filaments flexibles qui font protrusion à la surface cellulaire bactérienne. Il joue non seulement un rôle dans les phénomènes de « twitching » et de « gliding motility », mais interviendrait aussi dans l'établissement d'un contact étroit entre la bactérie et une surface hôte, dans l'absorption de bactériophages, ainsi que dans l'acquisition d'ADN, dans l'activation de la réponse cellulaire de l'hôte, dans les phénomènes de cytotoxicité, tout comme dans la formation de biofilm (166, 168, 169). Ce n'est que tout récemment qu'un phénomène inhabituel de « social gliding motility » a été observé chez certaines souches de *C. perfringens* cultivées sur milieux solides. Des analyses par microscopie électronique ont alors démontré que ce phénomène serait attribuable à la présence de pilus de type IV à la surface de ces bactéries et subséquemment, plusieurs gènes associés à la synthèse ainsi qu'à la fonction du pilus de type IV tels que *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilD* et *pilT* ont aussi été identifiés. La construction de mutants pour certains de ces gènes dont *pilT* et *pilC* a révélé que ceux-ci étaient essentiels à la synthèse et fonction du pilus (42). Contrairement à d'autres bactéries pathogènes, plusieurs des gènes associés à la biosynthèse et au fonctionnement du pilus de type IV restent à être identifiés et leur fonction précise à être définie quant à l'implication du pilus dans le phénomène de « social gliding motility » pour *C. perfringens* (170). Cependant, tout porte à croire que le pilus de type IV serait un facteur de virulence ayant été, jusqu'à aujourd'hui, sous-estimé chez *Clostridium*, puisque des gènes codant pour plusieurs structures associées au pilus de type IV ont été identifiés chez les neuf espèces de *Clostridium* pour lesquelles le séquençage du génome a été effectué (42). Une étude menée par Mendez

et coll. a montré que la totalité des 17 souches pathogènes de *C. perfringens* de diverses origines et milieux d'isolement présentaient un comportement de « social gliding motility », suggérant que cette propriété serait une caractéristique intrinsèque à des souches ayant un pouvoir pathogène. Cette capacité des souches à exprimer le phénotype de motilité serait influencée par des facteurs environnementaux encore largement inconnus. Dans l'étude menée par Mendez et coll., différents sucres simples tels que le glucose, le fructose, le lactose, le sucrose et le galactose, lorsqu'ajoutés au milieu de culture, avaient un effet répressif sur le phénomène de « social gliding motility ». Ce phénotype serait attribuable à la répression des gènes *pilT* et *pilC* ainsi qu'au rôle répressif de la protéine CcpA (carbone catabolite protein A) sur les gènes associés au phénomène de «social gliding motility » (166).

Le contact étroit avec les cellules de l'hôte comme élément déclencheur provoquant la régulation positive de gènes associés à la virulence est un phénomène qui a été documenté pour d'autres bactéries pathogènes telles que *Salmonella* et *Escherichia coli*. Des études *in vitro* récentes rapportent que pour *C. perfringens*, l'établissement d'un contact étroit entre la bactérie et des cultures cellulaires d'origine humaine, de chien et de rat serait responsable d'une production accrue de toxines extracellulaires, phénomène qui n'est pas observé pour des cultures bactériennes en milieu liquide (148). Les raisons expliquant ceci, et les mécanismes moléculaires à l'origine de ces observations restent cependant à être élucidés. L'hypothèse la plus plausible serait que le contact étroit entre la bactérie et des facteurs spécifiques localisés à la surface des cellules de son hôte provoquerait l'activation de la cascade de

signalement impliquant les systèmes à deux composantes Agr et VirS / VirR (148, 155, 156, 171).

2.3 Principaux facteurs de risque associés à l'entérite nécrotique

Suite au retrait complet des promoteurs de croissance dans l'alimentation des volailles pour différents pays de l'Union Européenne en 2006, il y a eu une augmentation marquée de l'incidence des cas d'entérite nécrotique dans les troupeaux de poulets de chair (22, 37). En s'inspirant de cas cliniques rapportés sur le terrain ainsi que des infections à *C. perfringens* reproduites en conditions expérimentales, les chercheurs ont pu identifier des facteurs favorisant l'apparition de la maladie. Alors que certains sont reconnus pour être essentiels lorsque vient le temps de reproduire l'entérite nécrotique, d'autres semblent plutôt influencer la sévérité des signes cliniques et lésions observés. Puisque plusieurs de ces facteurs de risque sont reliés de près ou de loin à une modification de l'environnement intestinal, il est bien de se rappeler que *C. perfringens* est auxotrophe pour treize acides aminés essentiels à sa croissance, la bactérie ne possédant pas le bagage génétique nécessaire à la synthèse de ces acides aminés (22). Ainsi, tout facteur créant un environnement favorable entraînera une croissance extensive et anarchique de la bactérie ainsi, que la production de toxines et enzymes provoquant les changements pathologiques que l'on connaît (20).

2.3.1 Coccidiose

La coccidiose est une maladie entérique parasitaire des volailles, causée par le protozoaire *Eimeria*, membre de l'ordre des Apicomplexes. Tout comme l'entérite nécrotique, la coccidiose est une maladie répandue chez la volaille, et est associée à des pertes financières majeures. On rapporte que mondialement, cette maladie coûte à l'industrie avicole plus de 800 millions de dollars annuellement, les coûts étant principalement associés aux baisses de performances zootechniques, ainsi qu'à la médication administrée en prophylaxie (172). Les pratiques d'élevage modernes telles que le confinement et l'augmentation de la densité animale favorisent la transmission et l'accumulation d'*Eimeria* dans les poulaillers (173, 174). On retrouve d'ailleurs ce parasite partout dans l'environnement où l'on fait l'élevage des volailles. Sept espèces peuvent infecter les poulets, et selon l'espèce en cause, des régions distinctes de l'intestin seront affectées (172). L'infection des poulets implique généralement plus d'une espèce d'*Eimeria* à la fois, et la pathogénicité du parasite est souvent corrélée avec l'espèce en cause. Certaines espèces telles que *brunetti*, *maxima*, *necatrix* et *tenella*, sont associées à des lésions intestinales plus sévères, tandis que l'impact d'autres espèces serait plutôt d'affecter les performances zootechniques en altérant les capacités digestives de l'intestin (41).

Les volailles se contaminent en ingérant des oocystes sporulés hautement résistants aux conditions adverses de l'environnement. Par les actions mécaniques et chimiques de différentes composantes du tractus digestif, huit sporozoïtes, une forme infectieuse mobile du parasite, sont libérés de l'oocyste et s'attachent aux cellules intestinales de l'hôte avant de les envahir. Un nombre limité de cycles de reproduction asexuée aura lieu et entraînera la formation de mérozoïtes, une seconde forme

infectieuse mobile associée à des dommages aux cellules épithéliales intestinales. Les mérozoïtes évoluent ainsi jusqu'à l'atteinte d'un stade de reproduction sexué aboutissant ultimement à la formation d'un oocyste. En faisant éclater la cellule intestinale à l'intérieur de laquelle il se trouve, l'oocyste sera expulsé dans l'environnement, par le biais des déjections des oiseaux. Les cycles répétés d'entrée et de sortie des cellules intestinales effectués par les différents stades de développement du parasite lors de sa réplication sont responsables de l'altération de la fonction digestive chez les oiseaux infectés. Les différentes manifestations de la maladie vont d'une destruction locale de la muqueuse intestinale et des tissus sous-jacents pour les cellules intestinales parasitées, jusqu'à des effets systémiques tels qu'une réduction du gain de poids et de l'efficacité alimentaire, la perte de sang dans la lumière intestinale accompagnée d'une diarrhée hémorragique, un syndrome de choc et même la mort (45, 175). La coccidiose clinique ou même sous-clinique, par les modifications de l'environnement intestinal qu'elle engendre, représente un des facteurs prédisposants majeurs pour l'apparition d'entérite nécrotique (21). Dans plusieurs cas cliniques rapportés sur le terrain, des lésions de coccidiose sont décrites juste avant ou au moment même où il y a déclenchement d'un épisode d'entérite nécrotique (20, 176).

Plusieurs hypothèses sont avancées quant au rôle d'*Eimeria* comme facteur prédisposant. Les stades asexués et sexués de son cycle de reproduction provoqueraient une réaction inflammatoire. Ainsi, dans les travaux réalisés par Collier et coll., l'infection par *Eimeria* provoquait, à différents temps suite à l'infection, une augmentation de la régulation des gènes codant pour des cytokines inflammatoires, telles que IL-4, IL-10, INF γ , ainsi que du gène codant pour la synthèse de mucine

(78). Ce changement serait d'autant plus marqué chez les oiseaux co-infectés par *Eimeria* et par *C. perfringens*. Chez les oiseaux infectés, le nombre de cellules à Goblet retrouvées dans les villosités intestinales était augmenté, tout comme un élargissement de la zone correspondant à l'accumulation de la mucine à l'intérieur des cellules à Goblet était observable, autant dans les cryptes que dans les villosités intestinales de l'iléon. Les auteurs ont aussi démontré que l'induction de cette mucogénèse par *Eimeria* était positivement corrélée avec une multiplication intestinale des bactéries mucolytiques telles que *C. perfringens*, ce mucus servant alors de substrat pour la croissance de la bactérie. Lors de la reproduction de la maladie en conditions expérimentales, les oiseaux co-infectés par *Eimeria* vont généralement présenter des lésions intestinales plus sévères et des dénombrements de *C. perfringens* plus élevés (20). La coccidiose pourrait aussi favoriser l'apparition d'entérite nécrotique en contribuant à la mise en place d'un environnement intestinal favorable à la multiplication des souches de *C. perfringens*. Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce cas-ci. Les dommages causés à la muqueuse intestinale, principalement par les stades sexués de développement du parasite, entraînent une augmentation de sa perméabilité et une fuite des protéines plasmatiques à l'intérieur de la lumière intestinale. Des études rapportent aussi que lors de coccidiose, on observe une altération généralisée de la digestion des protéines par l'intestin. *C. perfringens* étant dépendant d'un apport externe pour treize des acides aminés essentiels à son métabolisme, ces protéines lui servent donc de substrat (22, 45). L'infection par certaines espèces d'*Eimeria* est aussi associée à une diminution du pH intestinal avec pour effet secondaire, un ralentissement du transit digestif par modification de la perméabilité de la membrane

des cellules des muscles lisses. En conditions *in vitro*, une augmentation du pH est associée à une diminution de la croissance de *C. perfringens* tandis qu'une augmentation de l'acidité est corrélée avec une production de toxines plus marquée par la bactérie (45). Puisque les dommages causés par *Eimeria* affectent aussi la bordure en brosse des cellules intestinales, une réduction de l'activité d'enzymes digestives est observée. Une augmentation du temps de transit intestinal ainsi qu'une diminution de l'activité enzymatique digestive sont aussi corrélée avec une augmentation du temps et de la quantité de nutriments servant à la multiplication des souches de *C. perfringens*.

Afin de contrer les effets négatifs de la maladie, les anticoccidiens sont inclus en prophylaxie dans la formulation des diètes destinées aux poulets de chair depuis plus de 60 ans (177). Ces additifs alimentaires ont largement contribué à l'expansion de l'industrie avicole. On distingue deux catégories d'anticoccidiens, soit les chimiques, qui agissent directement sur le métabolisme du parasite et causent ainsi sa mort, soit les composés ionophores, qui vont plutôt agir sur le transport d'ions et entraîner une rupture de la balance osmotique, provoquant la rupture du parasite par accumulation d'eau. C'est aussi par ce même mode d'action que les ionophores exercent leur action antibactérienne sur plusieurs bactéries à Gram positif dont *C. perfringens* (45). Avec l'augmentation grandissante de souches d'*Eimeria* résistantes envers les deux classes d'anticoccidiens, la gestion de la coccidiose doit faire partie intégrante de la régie d'élevage moderne d'un éleveur de volailles (178-180). De plus, avec les préoccupations grandissantes des gouvernements et consommateurs face à la possibilité de la présence de résidus dans la viande de volaille, plusieurs demandent le bannissement de l'utilisation de ces additifs dans l'alimentation des volailles, tout

comme c'est le cas pour les promoteurs de croissance (181). Pour le moment, l'utilisation des différents produits disponibles en rotation ou en combinaison permet de prolonger la durée de vie des anticoccidiens (173). D'autres moyens de contrôle tels que des vaccins à base d'oocystes vivants sont aussi disponibles commercialement, quoique leur utilisation n'est pour le moment pas largement répandue dans le secteur de l'élevage de poulets de chair. Le manque de données scientifiques quant au rôle que pourraient jouer ces oocystes vivants dans l'apparition d'épisodes d'entérite nécrotique est en partie responsable de cet usage limité (45). En effet, puisque l'application de ces vaccins empêche l'utilisation d'anticoccidiens, il n'est pas encore bien démontré si ces oocystes vivants ne contribuent pas à l'exacerbation des lésions d'entérite nécrotique observées lors d'épisodes de maladie (22) (45, 172).

2.3.2 Composition de la diète

Différents éléments entrant dans la composition de la diète des volailles sont reconnus pour favoriser la multiplication de *C. perfringens*, et donc la possible apparition d'un épisode d'entérite nécrotique. Parmi ceux-ci, le type de céréales, la présence de sous-produits d'origine animale, ainsi que certains oligo-éléments semblent être les plus influents. Différentes céréales peuvent être utilisées dans l'alimentation du bétail. En se basant sur des observations faites à partir de cas cliniques d'entérite nécrotique rapportés en élevages, mais aussi d'essais commerciaux, certaines de ces céréales prédisposeraient à la maladie. Ainsi, le blé, l'orge, le seigle et l'avoine seraient les céréales dont le taux d'incorporation dans la moulée devrait être

contrôlé. Dans un modèle d'infection expérimentale, des oiseaux nourris d'une diète à base de l'une ou l'autre de ces céréales présentaient, de façon significative, des lésions d'entérite nécrotique plus sévères que les oiseaux alimentés d'une moulée faite de maïs. Les mortalités associées aux céréales riches en ces polysaccharides étaient aussi deux fois plus élevées lorsque comparées à celles des groupes soumis à la diète majoritairement composée de maïs (41, 45, 182). Il a aussi été démontré que certaines de ces céréales, telles que le seigle, augmentait l'adhésion de la bactérie à la muqueuse intestinale. Leur effet s'explique par le fait que les céréales mentionnées ci-haut sont riches en polysaccharides non-amidonés solubles dans l'eau et faiblement digestibles, tels que les β -glucans et les arabinoxylans. Une fois rendus dans l'intestin, ces polysaccharides pauvrement digérés vont modifier l'environnement intestinal, entre autres en interagissant avec des glycoprotéines de la surface épithéliale intestinale et provoqueraient une augmentation de la production de mucine (41, 183). Puisque *C. perfringens* possède plus de 6 hydrolases capables de dégrader ces muco-oligosaccharides, cette situation devient avantageuse pour la bactérie (41). Ainsi, on observe comme conséquences une augmentation du temps de transit intestinal et une augmentation de la viscosité du digesta permettant ultimement une prolifération accrue de la bactérie (45). C'est ce qu'a démontré Craven en associant des comptes de *C. perfringens* significativement plus élevés à l'intestin d'oiseaux alimentés d'une diète à base de seigle lorsque comparés aux oiseaux nourris de maïs (184). En conditions *in vitro*, il a été démontré que la croissance de *C. perfringens* était significativement favorisée dans des milieux de culture contenant du blé ou de l'orge digérés, tandis que l'augmentation de cette croissance n'était pas observée dans des milieux composés de

maïs (182). L'influence de la taille des particules retrouvées dans la moulée comme facteur de risque pour le développement d'entérite nécrotique demeure quant à elle controversée. En se basant sur la physiologie digestive normale d'un oiseau où le gésier a pour fonction de broyer les particules ingérées afin qu'elles aient une taille uniforme au moment où elles arrivent dans le petit intestin, la taille des particules alimentaires ne devrait pas être identifiée comme facteur de risque pour le développement d'entérite nécrotique. Par contre, plusieurs études rapportent des résultats divergents sur ce sujet. Alors que certains auteurs indiquent qu'une moulée de type farine, lorsque comparée à une moulée cubée, serait associée à une plus grande incidence d'entérite nécrotique, d'autres ne sont pas parvenus aux mêmes résultats. Même situation quant au rôle que jouerait la taille des particules de blé. Riddell et Kong n'ont pas identifié de corrélation entre la taille des particules de blé et le taux de mortalités associées à l'entérite nécrotique, tout comme Engberg et coll. qui ont conclu que la taille des particules alimentaires n'avait aucun impact sur les comptes de *C. perfringens* (185, 186). À l'inverse, Branton et coll. ont plutôt démontré qu'une moulée texture, lorsque comparée à une moulée cubée, favorisait la croissance de *C. perfringens* (187). Alors que certaines études ont démontré que le fait d'ajouter du blé entier à la ration des oiseaux avait pour effet d'augmenter l'incidence d'entérite nécrotique et de coccidiose, d'autres ont conclu que l'ajout de ce même type de blé avait plutôt comme effet de faire diminuer les comptes de *C. perfringens* dans l'intestin (45, 188). Finalement, il est rapporté qu'une moulée contenant des particules de tailles variables et inégales serait aussi associée à un risque augmenté d'entérite nécrotique (22).

Tout comme plusieurs autres facteurs, l'inclusion de sous-produits d'origine animale est positivement corrélée avec l'apparition d'entérite nécrotique. Ces sous-produits sont riches en protéines animales, certaines d'entre elles étant pauvrement digestibles et représentent un substrat idéal pour la croissance d'une bactérie auxotrophe comme *C. perfringens*. De hauts niveaux de protéines animales dans la diète sont aussi corrélés avec une production augmentée d'alpha toxine dans l'intestin (22, 189, 190). Les farines de poissons sont particulièrement reconnues comme étant un important facteur de risque. Drew et coll. ont d'ailleurs démontré que cette source de protéines était positivement associée à une augmentation des comptes de *C. perfringens* et des niveaux de toxine alpha au niveau de l'iléon et du caecum en plus d'exacerber les manifestations de la maladie. En comparant la composition en acides aminés, les farines de poissons présentaient des taux plus élevés pour la glycine et la méthionine qu'une farine à base de soya (41, 191). Dahiya et coll. (189) en sont venus à la même conclusion puisqu'ils ont observé qu'en soumettant des oiseaux à une alimentation contenant des concentrations croissantes de glycine, l'augmentation de la population intestinale de *C. perfringens* était proportionnelle à l'augmentation des niveaux de glycine dans l'aliment (41, 189). À l'inverse, les hauts taux de glycine présentaient un effet négatif sur les comptes de *Lactobacillus* retrouvées dans l'intestin (189). Les diètes riches en protéines animales n'ont pas seulement un effet sur l'intestin, mais font aussi augmenter le pH du gésier, favorisant la croissance de *Clostridium*. La source de gras semble aussi représenter un facteur de risque important. En effet, Knarreborg et coll. ont soumis des oiseaux à différentes diètes. Une

contenant une source de gras végétal, et l'autre contenant du gras animal, et pour chacune d'entre elles, deux formulations étaient effectuées, soit avec ou sans antibiotiques. Les résultats ont conclu que la présence de gras animal ou l'absence d'antibiotiques avaient pour effet de faire augmenter les comptes de *C. perfringens* dans l'intestin. De plus, les analyses statistiques ont démontré que l'influence de ces deux facteurs, lorsque combinés, était additive (75). En plus de ces effets sur *C. perfringens*, la source de gras influence aussi la viscosité du digesta, le temps de transit intestinal, et par conséquent, la fonction digestive du petit intestin (192).

Parmi les autres composantes de la ration des volailles, on retrouve des produits riches en inhibiteurs de la trypsine. Puisque la trypsine joue un rôle important dans la destruction des toxines de *C. perfringens*, les inhibiteurs de la trypsine sont positivement associés à l'apparition d'entérite nécrotique. Dans ce cas-ci, la fève soya non-rôtée, reconnue comme un puissant inhibiteur de la trypsine, contribue à l'augmentation de la sévérité des lésions d'entérite nécrotique (35).

2.3.3 Immunosuppression

L'immunosuppression représente un facteur prédisposant important. Dans les cas cliniques d'entérite nécrotique observés sur le terrain, différents éléments peuvent provoquer une baisse de l'immunité. Des changements au niveau de la régie des oiseaux tels que des variations subites de température ou de composition de la diète, une chaleur extrême, une dégradation de la qualité de la litière, un manque de moulée ou d'eau, et une densité animale élevée sont parmi les causes fréquentes rencontrées en

élevage et pouvant provoquer un stress suffisamment important chez les oiseaux pour causer une immunosuppression (22). Des agents infectieux peuvent aussi être responsables d'une baisse de l'immunité. Certains virus tels que le virus de l'anémie infectieuse du poussin, le virus de la maladie de Marek et celui de la maladie de Gumboro sont tous rapportés comme favorisant l'apparition d'entérite nécrotique (41, 45). Lors de la reproduction de l'entérite nécrotique à l'aide d'un modèle d'infection expérimentale, les chercheurs ont principalement recours au vaccin contre la maladie de Gumboro afin de provoquer l'immunosuppression, ce vaccin étant administré aux oiseaux avant leur inoculation avec *C. perfringens* (41, 71, 176, 193).

Dans la littérature scientifique, très peu d'attention a été accordée à la différence de susceptibilité des différentes races de volailles commercialement disponibles face à l'entérite nécrotique. Dans une étude menée par Cheema et coll., la comparaison des réponses immunitaires observées chez des oiseaux de race Ross 308 et chez des oiseaux d'une race présente dans les années '50, la Athens Canadian Randombred Control a démontré que les oiseaux de race Ross 308 semblaient être issus d'une sélection génétique visant l'amélioration des performances de production, au détriment de la branche adaptative de la réponse immunitaire. En contrepartie, les races modernes bénéficieraient d'une réponse inflammatoire à médiation cellulaire bonifiée (194). En soumettant trois races actuelles, Cobb, Ross et Hubbard, à une infection expérimentale impliquant à la fois *Eimeria maxima* et *C. perfringens*, Jang et coll. ont quant à eux évalué la capacité de ces oiseaux à réagir à une telle infection en mesurant leur gain de poids, leurs scores lésionnels intestinaux, ainsi que leurs taux d'immunoglobulines G dirigées contre la toxine alpha ainsi que la toxine NetB. D'un

point de vue statistique, la race Cobb a semblé être la plus affectée par l'infection expérimentale, montrant la plus grande réduction dans le gain de poids, ainsi que le score lésionnel le plus élevé. Toutes les races ont cependant montré le développement d'une immunité face aux deux toxines évaluées, quoique les taux d'anticorps dirigés contre NetB étaient supérieurs chez la race Cobb (195).

2.3.4 Dommages à la muqueuse intestinale

Les dommages à la muqueuse intestinale sont reconnus pour être le facteur prédisposant principal pour l'apparition d'entérite nécrotique (20). Et puisqu'*Eimeria*, le microorganisme responsable de la coccidiose aviaire, est ubiquitaire dans les élevages avicoles, les scientifiques définissent l'infection par *Eimeria* comme étant le facteur de risque prédominant. Tel que mentionné précédemment, ce sont principalement les formes mobiles du développement du parasite, qu'on appelle les sporozoïtes et les mérozoïtes, ainsi que l'oocyste, qui sont responsables des dommages causés aux cellules intestinales. Les espèces d'*Eimeria* telles qu'*E. acervulina* et *E. maxima*, qui colonisent préférentiellement le petit intestin, sont particulièrement reconnues pour prédisposer les oiseaux à l'entérite nécrotique (37). Les dommages causés à la muqueuse intestinale agiraient de deux manières, soit en favorisant un meilleur attachement de *C. perfringens*, soit en étant responsables d'une augmentation de la quantité de substrats disponibles pour la croissance de la bactérie (20, 22).

2.3.5 Arrêt des antimicrobiens promoteurs de croissance et des anticoccidiens

Dans les élevages intensifs, les antibiotiques sont ajoutés à des doses sous-thérapeutiques à l'alimentation du bétail afin d'améliorer le gain de poids et la conversion alimentaire de ces animaux. De plus, ces antibiotiques utilisés à faible doses auraient pour effet de réduire la morbidité et la mortalité associées aux manifestations sous-cliniques et cliniques de certains pathogènes bactériens tels que *C. perfringens* (37). Ainsi, en contrôlant le nombre de bactéries au niveau intestinal, les additifs augmenteraient la disponibilité des nutriments disponibles par l'animal. Un nombre réduit de bactéries intestinales signifie aussi une production diminuée de toxines pouvant avoir des effets négatifs sur l'intégrité de la paroi digestive (10). Dans une étude réalisée par Knarreborg et coll., il a été démontré que les populations intestinales de *C. perfringens* étaient sensiblement les mêmes chez des oiseaux de sept jours d'âge, peu importe le traitement auquel ils étaient soumis. Par contre, la bactérie a présenté une croissance significativement plus élevée dans l'intestin des oiseaux ne consommant pas d'antibiotiques à mesure que ceux-ci vieillissaient (75). Il a été démontré dans quelques études que les anticoccidiens peuvent agir pour prévenir des épisodes d'entérite nécrotique (37).

2.3.6 Souches de *C. perfringens*

À l'opposé des oiseaux sains qui vont présenter des comptes de *C. perfringens* variant entre 0 et 10^5 ufc / g de contenu intestinal, ce sont plutôt des comptes aux alentours de 10^8 - 10^9 ufc / g qui seront retrouvés dans l'intestin des oiseaux affectés

d'entérite nécrotique (22). Cependant, des comptes élevés pour *C. perfringens* ne signifient pas pour autant qu'un oiseau présente ou présentera un épisode d'entérite nécrotique. En effet, quelques études publiées récemment montrent que ce ne seraient pas toutes les souches de *C. perfringens* qui soient aptes à provoquer l'entérite nécrotique et que des facteurs spécifiques propres à certaines souches associées à la maladie seraient en cause (22, 86). Avec l'augmentation de l'incidence des cas d'entérite nécrotique suite au retrait des promoteurs de croissance dans plusieurs pays, la communauté scientifique s'est largement questionnée quant à la pathogénie de l'entérite nécrotique ainsi que sur les divers facteurs pouvant intervenir dans l'apparition de la maladie. Puisque la majorité des cas cliniques de la maladie est associée aux souches de type A, et dans quelques rares occasions à des souches de type C, les scientifiques attribuaient la maladie à l'action de la toxine alpha (46). Les études ont cependant démontré que d'autres facteurs, tels que la toxine NetB, interviendraient dans l'apparition d'entérite nécrotique (56, 87). Par contre, dès l'identification de NetB, certains auteurs ont retrouvé des souches capables de causer l'entérite nécrotique et déficientes pour le gène *netB*. En effet, seulement 77% des souches virulentes possédaient le gène (56). Des études subséquentes ont révélé qu'entre 60% et 90% des souches de *C. perfringens* isolées de cas cliniques d'entérite nécrotique possédaient le gène codant pour la toxine (44, 47, 57, 72, 196). À l'échelle mondiale, ce serait tout près de 70% des souches de *C. perfringens* qui seraient positives pour le gène (57). Quoique la nouvelle toxine NetB semble être largement retrouvée chez les isolats associés à l'entérite nécrotique, et qu'elle soit identifiée comme une toxine majeure dans le développement de la maladie, elle est absente de certaines souches pathogènes

de *C. perfringens* isolées du contenu digestif ou mêmes d'organes de poulets atteints d'entérite nécrotique, comme rapporté dans différents travaux (44, 47, 56, 57, 72, 196, 197). De la même manière, entre 8% et 25% des souches de *C. perfringens* provenant de troupeaux de poulets sains ou de troupeaux présentant des signes légers d'entérite non-spécifique, étaient porteuses du gène codant pour la toxine (44, 196). Lepp et coll. ont identifié positivement la présence du gène codant pour NetB chez seulement 60% des souches provenant d'épisodes d'entérite nécrotique, tandis que 20% des souches commensales isolées de la flore normale d'oiseaux sains étaient porteuses du gène (58). Parmi les nombreux travaux réalisés sur l'entérite nécrotique depuis ce temps, une grande attention a été dirigée sur la caractérisation des souches impliquées dans des épisodes d'entérite nécrotique. Différentes techniques de caractérisation génétique ont été utilisées afin d'identifier des traits spécifiques aux souches pathogènes. Dans un premier temps, il a été démontré que seules les souches de *C. perfringens* isolées de cas de maladie chez la volaille étaient en mesure de reproduire la maladie chez cette même espèce. Ainsi, des souches provenant de cas cliniques chez les espèces bovine, porcine, canine et même chez l'humain étaient inoffensives lorsqu'utilisées dans un modèle d'infection expérimentale chez la volaille. Plus encore, des souches provenant de la flore digestive normale de poulets en santé étaient tout aussi avirulentes dans ce même modèle (84). Alors que les souches virulentes étaient retrouvées de manière localisée au niveau de l'iléon, les souches dites de la flore normale étaient plutôt retrouvées tant dans le contenu de l'iléon que du cecum (79, 84). Puisque *C. perfringens* est un habitant normal du tractus intestinal des volailles, et que d'après les résultats d'études réalisées à partir de cas cliniques d'entérite nécrotique, seulement quelques souches

seraient en mesure de causer la maladie, l'équipe de Barbara et coll.(132) a reproduit l'entérite nécrotique, en conditions expérimentales, en inoculant des poulets avec un mélange de souches de *C. perfringens*, certaines d'entre elles provenant de cas cliniques d'entérite nécrotique, d'autres étant plutôt reconnues comme des souches commensales. Les résultats de cette étude confirment ce qui avait préalablement été observé lors d'études de cas cliniques en élevage, c'est-à-dire que les souches associées à l'entérite nécrotique semblent posséder un avantage compétitif face aux souches de la flore normale quand vient le temps de coloniser l'intestin et de s'y multiplier (46, 198). À l'inverse des études ayant tenté d'associer certains clones spécifiques de *C. perfringens* à l'entérite nécrotique, les études de caractérisation par MLST ont réussi à démontrer que les souches de *C. perfringens* associées à des cas cliniques d'entérite nécrotique pouvaient être classifiées en deux groupes clonaux distincts, soit le regroupement clonal 4 et le profil de typage 31. Puisque des souches isolées de la flore digestive normale ne présentent pas ces mêmes profils, il est alors possible de supposer que des gènes spécifiques retrouvés sur le chromosome bactérien pourraient avoir un rôle à jouer dans la pathogénie de la maladie (58).

Puisque la toxine NetB ne semble pas être l'unique facteur de virulence responsable du déclenchement de la maladie, mais qu'elle semblerait plutôt faire partie d'un ensemble de facteurs de virulence agissant de concert dans la pathogénie de la maladie, plusieurs des études récentes se sont intéressées à vérifier si les souches causant la maladie chez la volaille possédaient une signature génétique distinctes des souches commensales, et si un clone particulier pouvait être associé à la maladie (24, 57). De nouvelles techniques de séquençage à haut débit et de génomique comparée

ont été utilisées afin d'identifier des séquences d'ADN propres aux souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique, et ainsi pouvoir mieux expliquer l'origine pathogénétique de la maladie. En comparant huit souches de *C. perfringens* associées à l'entérite nécrotique, des auteurs ont démontré que plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence chez les souches pathogènes étaient regroupés en loci et que ces loci étaient portés sur de gros plasmides. Chez ces souches, on a identifié la présence de trois îlots de pathogénicité distincts, soit par ordre décroissant de taille, NELoc-1, NELoc-2 et NELoc-3, chacun de ces loci comprenant plusieurs gènes dont les produits partageraient une forte similarité avec certains facteurs de virulence déjà reconnus chez d'autres espèces bactériennes (24). L'îlot de pathogénicité 2 est retrouvé sur le chromosome bactérien. Cependant, l'îlot ne semble pas être retrouvé chez toutes les souches virulentes, tout comme sa présence ne semble pas exclusivement réservée à ces souches pathogènes. Lepp et coll. ont d'ailleurs démontré que NELoc-2 pouvait être retrouvé chez 84% des souches causant l'entérite nécrotique alors que 41,4% des souches provenant de tractus digestifs d'oiseaux sains portaient aussi ce locus sur leur chromosome. Dans tous les cas, ce locus est retrouvé dans son intégralité lorsque présent (58). Les îlots 1 et 3 sont quant à eux situés sur de gros plasmides semblant être conjugatifs de par la présence du « transfer of clostridial plasmids locus » sur chacun d'eux (24).

Compte tenu que la présence de *netB* semble être fortement corrélée avec la capacité de certaines souches à induire la maladie, les auteurs ont évalué le bagage génétique commun partagé par ces deux groupes clonaux. L'analyse pour la présence des trois îlots de pathogénicité chez des souches positives et négatives pour la présence

du gène *netB* a démontré que chez des souches *netB* négatives isolées d'oiseaux sains, les îlots 1 et 3 étaient absents. Le gène codant pour la toxine NetB serait quant à lui localisé sur un plasmide au sein du premier îlot de pathogénicité, et la perte de cet îlot chez les souches pathogènes serait corrélée avec une diminution de la virulence. Chez les souches pathogènes, NELoc-1 est apparu hautement conservé, alors que NELoc-3 a semblé montrer une plus grande variabilité en ce qui a trait à sa taille. NELoc-3 était pratiquement absent de certaines souches pathogènes, laissant ainsi supposer un rôle moindre de cet îlot dans la pathogénicité des souches (59). Selon les études, les chercheurs ont identifié la présence de NELoc-3 chez 71% et 65% des souches isolées de cas cliniques d'entérite nécrotique, alors que 52% et 36% des souches commensales étaient positives pour la présence de ce locus (58, 59). Alors que la présence concomitante de NELoc-1 et NELoc-3 ne semble pas être un gage de virulence pour les souches associées à l'entérite nécrotique, la présence de NELoc-2 semble être positivement corrélée avec la présence de NELoc-1 chez les souches virulentes, ce qui suggère un rôle prédominant pour NELoc-2 dans la pathogénie de la maladie (58). Les auteurs ont aussi noté une grande uniformité en comparant l'alignement des séquences pour ces trois îlots de pathogénicité et ce, pour les sept différentes souches. Cependant, les auteurs ont aussi remarqué que le matériel génétique porté par ces îlots pouvait être retrouvé tantôt sur des séquences génomiques uniques et identiques, tantôt sur de multiples séquences distinctes en fonction de la souche virulente analysée (24). En comparant le nombre et la grosseur de ces plasmides pour des souches virulentes et avirulentes de *C. perfringens*, il a pu être démontré qu'entre un et quatre gros plasmides étaient retrouvés, peu importe la virulence de la souche. Par contre, les

souches positives pour la toxine NetB semblaient porter significativement un plus grand nombre de plasmides, mais aussi des plasmides de plus grande taille (59). Des techniques d'hybridation génomique comparée réalisées à l'aide de puce à ADN ont aussi permis de mettre en lumière des différences génomiques significatives chez des souches isolées d'épisodes d'entérite nécrotique. En effet, en comparant 29 souches isolées de cas cliniques d'entérite nécrotique à 25 souches provenant du tractus digestif d'oiseaux sains, 241 gènes ont été associés de manière statistiquement significative aux souches provoquant l'entérite nécrotique. Plus encore, 99 de ces gènes, la majorité codant pour des phages ou reliés à des plasmides, étaient tout simplement absents des souches commensales (58). Dans cette même étude, les auteurs ont voulu évaluer quelle proportion de ces gènes pouvait être associée à une plus grande virulence des souches. Ainsi, puisque la présence du gène codant pour la toxine NetB s'est avérée être un bon indicateur de la capacité des souches de *C. perfringens* à causer l'entérite nécrotique, les souches pathogènes porteuses de ce gène ont été sélectionnées afin de les comparer avec des souches virulentes négatives pour la toxine NetB. La présence de 128 gènes a été identifiée comme étant positivement corrélée avec la présence de *netB*, dont 63 de ces gènes étant associés de manière statistiquement positive à NELoc-2. La majorité des gènes identifiés sont reconnus pour coder pour des séquences d'insertion ainsi que des protéines hypothétiques. Le rôle immunogène et protecteur de certaines de ces protéines a d'ailleurs déjà été démontré (199). Parmi ces gènes, 48 ont été identifiés dans des régions variables du chromosome et comme étant spécifiques aux souches virulentes positives pour le gène *netB*. Ces gènes ont aussi été associés à des fonctions métaboliques telles que l'acquisition de nutriments et la conservation de

plasmides. La présence de ces gènes pourrait potentiellement expliquer l'avantage compétitif observé au niveau intestinal pour les souches pathogènes (58, 59).

2.4 Méthodes de prévention et de contrôle de la maladie

2.4.1 Approche conventionnelle

2.4.1.1 Antimicrobiens

Les effets bénéfiques de l'inclusion d'antibiotiques à faibles doses dans l'alimentation des volailles afin de stimuler leur croissance ont été rapportés il y a de ça plusieurs années (200). Depuis, ceux-ci sont utilisés dans l'alimentation des volailles afin d'optimiser les performances de croissance et prévenir certaines maladies. Ainsi, les antibiotiques ont longtemps joué un rôle accessoire dans le contrôle de l'entérite nécrotique (45). Et même si certaines études rapportent qu'un pourcentage relativement élevé de souches de *C. perfringens* seraient résistantes à différents antibiotiques couramment utilisés en prévention de l'entérite nécrotique, l'inclusion d'une telle médication à la diète serait tout de même associée à une réduction des comptes de *C. perfringens*, à une diminution des scores lésionnels et de la mortalité reliée à la maladie lors d'essais en conditions expérimentales ou en conditions « terrain » (37).

On soupçonne les promoteurs de croissance d'avoir un effet protecteur direct contre les bactéries pathogènes telles que *C. perfringens*, mais aussi de manière indirecte en agissant sur la microflore bactérienne intestinale (201). Cette microflore assurerait plusieurs fonctions dont celles de modifier la morphologie intestinale, de moduler la capacité digestive ainsi que de combattre les infections digestives en occupant une niche écologique dans l'intestin et en stimulant la réponse immunitaire (202). Certains auteurs avancent que la relation observée entre l'hôte et sa microflore digestive en serait en fait une d'équilibre entre le mutualisme et la pathogénicité (203, 204). Des hypothèses sont avancées afin d'expliquer l'action des antibiotiques sur l'amélioration des taux de croissance des animaux chez lesquels ils sont utilisés. Leur effet bénéfique résiderait, entre autres, dans le fait qu'ils agiraient en contrôlant les infections sous-cliniques, limitant ainsi le coût associé au travail du système immunitaire afin de garder ces infections sous contrôle. Les promoteurs de croissance réduiraient aussi la production de métabolites microbiens tels que l'ammoniac et certains produits de dégradation de la bile ayant un effet dépresseur sur la croissance des animaux. Leur effet sur les bactéries composant la microflore digestive assurerait une utilisation contrôlée des nutriments par celle-ci, rendant ces nutriments suffisamment disponibles pour la croissance des animaux. Finalement, divers changements sont rapportés quant à la micro-architecture digestive en lien avec l'utilisation des promoteurs de croissance. Parmi ceux-ci, l'amincissement de la paroi intestinale serait directement relié à une absorption des nutriments améliorée (9, 205-207).

Devant les restrictions grandissantes face à l'utilisation des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance, plusieurs efforts ont été déployés afin d'identifier des stratégies de contrôle alternatives, la recherche de nouvelles approches de contrôle étant souvent limitée par le manque de connaissances quant au véritable mécanisme derrière l'action des promoteurs de croissance. Jusqu'à aujourd'hui, aucune des stratégies alternatives développées en remplacement des promoteurs de croissance n'a su donner des résultats aussi constants et reproductibles (208).

2.4.1.2 Anticoccidiens ionophores

Les anticoccidiens sont utilisés pour le contrôle de la coccidiose aviaire depuis plus de cinquante ans. En plus de leur pouvoir sur *Eimeria*, les ionophores possèdent une activité antibactérienne sur les bactéries à Gram positif dont *C. perfringens* (20, 21, 45). Dans les pays de l'Union Européenne, l'utilisation des anticoccidiens ionophores combinée à des conditions d'élevage de haut statut sanitaire semble, pour le moment, représenter l'approche la plus fiable pour contrôler les impacts négatifs liés à l'entérite nécrotique (55).

2.4.2 Approches alternatives

Les antibiotiques ont été parmi les découvertes marquantes du 20^e siècle et demeureront probablement un outil de choix dans le traitement des infections bactériennes au cours du 21^e siècle (209). Cependant, avec l'identification de bactéries zoonotiques pathogènes chez les animaux de consommation, le débat persiste quant aux impacts que peut avoir sur la dissémination et la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques des animaux aux humains et sur la santé humaine,

l'utilisation des antibiotiques en agriculture (209, 210). Puisque très peu de nouvelles classes d'antibiotiques ont été découvertes au cours des dernières années, il devient évident selon plusieurs experts que l'utilisation des antibiotiques à grande échelle chez les animaux de consommation s'achève. Ainsi, selon plusieurs, une réduction de l'utilisation globale des antibiotiques en agriculture combinée à l'usage et au développement d'approches alternatives devrait faire partie d'une volonté mondiale et coordonnée, faisant intervenir autant les agences gouvernementales, les institutions de recherche, que les entreprises privées (209-211). Des chercheurs soutiennent que le temps est venu d'identifier et de documenter, de façon scientifique, le mode d'action de ces alternatives (9, 212). Plusieurs alternatives aux antibiotiques en production animale sont actuellement disponibles commercialement, ou ont généralement été évaluées en conditions expérimentales, mais l'adoption systématique de l'une d'entre elles n'est actuellement pas effectuée compte tenu des résultats mitigés. L'identification d'une alternative qui remplacerait à elle seule les antibiotiques demeure difficile considérant que le mode d'action précis de ceux-ci sur toute l'écologie gastro-intestinale reste à préciser (213). L'activité antibactérienne, l'influence sur le taux de croissance et la conversion alimentaire des animaux, la stimulation du système immunitaire, la capacité à contrôler des maladies animales d'importance, ainsi que l'influence sur la microflore digestive sont quelques uns des effets bénéfiques recherchés des approches alternatives (28, 209).

2.4.2.1 Acides organiques

Les acides organiques font partie des différents additifs alimentaires pouvant être ajoutés soit à l'alimentation des animaux, soit à leur eau de boisson. Une grande variété d'acides aux propriétés physiques et chimiques différentes existe (9). Ils peuvent être utilisés individuellement, mais ce sont plus souvent les mélanges d'acides qui sont privilégiés afin d'assurer un plus large spectre d'activité (9, 213). Leur mode d'action suspecté impliquerait une diminution du pH interne de la bactérie suite à l'entrée d'acide non-dissocié dans la cellule bactérienne, suivie d'une dissociation subséquente à l'intérieur du cytoplasme bactérien alcalin, entraînant alors la mort de la cellule bactérienne par épuisement des réserves d'énergie servant à maintenir l'homéostasie interne (214, 215). On reconnaît plusieurs facteurs pouvant influencer l'activité antibactérienne d'un acide organique : sa formule chimique, la valeur de son pKa, sa forme chimique, son poids moléculaire, la susceptibilité du micro-organisme ciblé, l'espèce animale en cause, sa libération à des endroits précis du tractus intestinal grâce à des procédés d'encapsulation, ainsi que le pouvoir tampon de la diète à laquelle l'acide est combiné. Chaque acide posséderait ainsi son spectre d'activité et pourrait influencer différemment le microbiote intestinal. Par exemple, il a été démontré que l'acide butyrique stimulait la prolifération épithéliale intestinale, possédait une action anti-inflammatoire et renforçait la barrière muqueuse intestinale en augmentant la production de peptides antimicrobiens dans le mucus intestinal et en stimulant l'expression de protéines associées aux jonctions serrées. Cet acide agirait aussi en modulant la microflore digestive et en influençant l'établissement de bactéries pathogènes. Ces résultats laissent croire que certains acides organiques pourraient jouer

plus qu'un rôle antibactérien lorsqu'utilisés en remplacement des promoteurs de croissance (9).

Les résultats d'études publiées portant sur l'effet des acides organiques sur les performances de croissance des poulets de chair sont peu nombreux et parfois contradictoires (216-219). Gunal et coll. rapportent qu'en conditions expérimentales, une diète contenant des antibiotiques et une diète contenant un mélange d'acides organiques n'ont pas d'impacts différents sur le taux de mortalités, sur le taux de conversion alimentaire, sur la consommation alimentaire, ainsi que sur le poids des oiseaux, ce qui contraste avec les résultats obtenus par d'autres équipes (217, 219, 220). En effet, dans l'étude menée par Chowdhury et coll., l'ajout d'acide citrique à la diète des oiseaux était associé à une amélioration significative de la croissance, de la prise alimentaire, de l'efficacité alimentaire ainsi que du rendement de la carcasse. L'ajout de cet acide organique était même corrélé avec une fonction immunitaire bonifiée, se traduisant par l'augmentation du nombre de lymphocytes dans les amygdales caecales, ainsi que dans les follicules de la bourse de Fabricius (217). Gunal et coll. ont quant à eux noté que pour le groupe soumis à un régime à base d'antibiotiques tout comme pour les groupes recevant soit un mélange d'acide ou un probiotique ou un mélange des deux alternatives, un amincissement de la muqueuse intestinale était observable. Cette observation pourrait être reliée à la diminution de la réaction inflammatoire au niveau intestinal, probablement associée à la diminution des comptes pour les bactéries à Gram négatif (220). Dans une étude similaire, Geier et coll. ont vérifié l'efficacité d'un mélange à base d'acides formique, acétique, propionique, sorbique, caprylique et caprique dans un modèle d'infection

expérimentale d'entérite nécrotique. L'ajout du mélange n'a pas semblé être en mesure de prévenir la maladie, de réduire les mortalités associées, ni d'influencer positivement le taux de croissance des oiseaux. Les chercheurs ont cependant noté une amélioration de la conversion alimentaire, ainsi qu'une diminution des comptes de clostridies dans le groupe recevant le mélange d'acides organiques (221). Les résultats de cette étude vont ainsi dans le même sens que ceux publiés par Skrivanova et coll. qui ont observé que les acides caprique et laurique avaient pour effet de faire diminuer les comptes de *C. perfringens* (222). En fait, les premiers travaux rapportant cet effet inhibiteur des acides organiques sur *C. perfringens* datent d'il y a déjà plusieurs années (223, 224).

2.4.2.2 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés volatils extraits des plantes par un processus de distillation à la vapeur. Ces substances sont reconnues pour l'odeur plaisante de leur essence, pour leur saveur, ou même pour leurs propriétés antiseptiques, ou de préservation, dû à leurs effets antimicrobiens (225). Les huiles essentielles utilisées en nutrition animale sont décrites comme des additifs alimentaires renfermant des composés phytogéniques, au même titre que les épices. Depuis 2006, pour les pays de l'Union Européenne, plusieurs efforts ont été déployés afin d'identifier des substances alternatives qui assureraient le rôle joué par les antibiotiques quant au maintien de la santé digestive et des performances de croissance. Les extraits de plantes et leurs constituants purifiés représentent un groupe d'approches alternatives des plus populaires à cet effet, et les huiles essentielles figurent parmi les

composés les plus utilisés en ce sens (226-229). Les huiles essentielles sont une alternative intéressante du fait que leur utilisation n'entraîne pas la présence de résidus, et qu'elle est perçue comme sécuritaire (227). Ces additifs agiraient en améliorant la palatabilité de la ration, en stimulant la production d'enzymes digestives et d'acides biliaires ainsi qu'en augmentant la digestibilité des nutriments (229-231). Différentes études rapportent aussi que les huiles essentielles joueraient un rôle sur la communauté microbienne intestinale de par leur effet antimicrobien bactériostatique ou bactéricide, ce qui pourrait influencer les performances de croissance des oiseaux soumis à un régime contenant ces composés. Leur effet antibactérien serait d'autant plus prononcé lorsque ces huiles sont produites à partir d'herbes récoltées immédiatement après la floraison (226, 227, 229). Leur pouvoir « anti-odeur » en ferait de plus d'excellents produits à utiliser en production animale afin de contrôler les inconvénients reliés à l'ammoniac. Finalement, les huiles essentielles exerceraient leur effet bénéfique sur la santé digestive dû à leur pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire (227, 232).

Les études réalisées sur les effets bénéfiques des huiles essentielles sont toutefois peu nombreuses, et les conclusions pouvant en être tirées varient généralement d'une étude à une autre (31, 228-230, 233-236). Parmi les études rapportant des effets bénéfiques sur les performances de croissance associés à l'utilisation d'huiles essentielles, des chercheurs ont en général noté une amélioration du gain de poids, de la conversion et de la consommation alimentaires, ainsi qu'un rendement de carcasse supérieur (225, 228, 230, 236-241). Les chercheurs ont observé une diminution significative du taux de conversion alimentaire principalement pour les périodes de croissance et de finition des oiseaux, effet qu'ils ont relié à une digestion

améliorée des nutriments suite aux mesures de digestibilité iléale apparente répétées tout au long de l'expérimentation. C'est ce que rapportent d'autres auteurs dans des études semblables testant d'autres produits commerciaux à base de thymol, de carvacrol, de cinnamaldéhyde, d'origan, de menthe poivrée et de poivre (225, 228, 230, 236, 239, 242, 243). En plus de rapporter un effet significatif sur le taux de conversion alimentaire des oiseaux en période de croissance et de finition, certains chercheurs ont observé une différence significative sur le poids des oiseaux en fin d'élevage, différence associée à un gain de poids supérieur en période de croissance pour les oiseaux recevant des huiles essentielles (226, 228, 231, 237). Cette différence serait attribuable à l'augmentation de la capacité de sécrétion d'enzymes digestives provoquée par les huiles essentielles, tout ceci se faisant parallèlement avec la maturation des oiseaux (228). Alcicek et coll. ont cependant noté qu'il devenait inutile d'utiliser des taux d'inclusion trop élevés pour les huiles essentielles, ceux-ci pouvant parfois n'être associés à aucun effet bénéfique, ou même entraîner des conséquences négatives sur les performances de croissance (31, 228, 235, 237).

À l'opposé des résultats des études présentées ci-haut, certains chercheurs en sont venus à la conclusion que l'utilisation d'alternatives à base d'huiles essentielles n'entraînait pas d'effet positif sur les performances de croissance des oiseaux soumis à un régime contenant ces produits (55, 226, 231, 244). Dans une étude menée en 2011, Amad et coll. ont comparé différentes concentrations d'un produit commercial à base de thymol et d'anéthol à une diète dépourvue d'additifs alimentaires ou de promoteurs de croissance. Ils n'ont noté aucun effet significatif du produit sur la mortalité en élevage, sur le poids final des oiseaux, sur leur consommation alimentaire, ainsi que

sur le taux de conversion alimentaire pendant la période de démarrage. Seule une différence quant au taux de conversion alimentaire pendant les périodes de croissance et de finition a été observée (226). Lee et coll. n'ont quant à eux rapporté aucun effet positif significatif d'un produit commercial à base de thymol et de cinnamaldéhyde sur les performances de croissance des oiseaux soumis à une diète contenant ce produit pour la durée totale de l'élevage. Ces chercheurs ont par contre noté que le type de produit utilisé pouvait influencer de façon significative la consommation d'eau des oiseaux, ce qui peut avoir des impacts positifs notables en conditions d'élevage industriel, notamment sur la qualité de la litière et conséquemment sur le confort des oiseaux (231). Dans le même ordre d'idée, Cerisuelo et coll. ont rapporté que lors d'essais visant à comparer l'effet de différents niveaux de thymol et de cinnamaldéhyde ajoutés à la ration de poulets de chair à celui des promoteurs de croissance, aucune différence significative des divers traitements n'était observée quant à la mortalité, au poids final, au gain de poids moyen quotidien, à la prise et la conversion alimentaires et ce, autant pour les périodes de démarrage, de croissance et de finition (234). Selon les différents auteurs, divers facteurs pourraient expliquer cette variation observée dans les résultats: les essais sont habituellement réalisés dans des conditions hygiéniques de haut niveau, une diète hautement digestible est généralement utilisée, l'âge des oiseaux peut varier, la prise alimentaire influence la quantité de produit alternatif consommé, le niveau de maturité des plantes à partir desquelles les huiles essentielles sont extraites a une influence sur la puissance des composés actifs, la méthode d'extraction des huiles essentielles fait varier leur qualité, tout comme la méthode et la durée de leur entreposage. Finalement, la nature de l'extrait lui-même

exercera aussi une influence (227). Abildgaard et coll. soutiennent même que l'impact négatif sur la prise alimentaire du produit à base d'huiles essentielles qu'ils ont testé pourrait peut-être aussi être relié, en partie, à la vaccination contre la coccidiose utilisée dans le groupe soumis au test (55).

Les huiles essentielles sont aussi intéressantes en production animale grâce à leur pouvoir antibactérien. En fait, le potentiel hydrophobique des composantes phénoliques de ces huiles leur permettrait de séparer les lipides des parois cellulaires bactériennes et des mitochondries, provoquant ainsi des perturbations dans la structure et les processus intracellulaires des bactéries (245). Puisque plusieurs études ont été publiées dans la littérature scientifique concernant les propriétés antibactériennes des huiles essentielles, certains auteurs ont voulu évaluer l'efficacité de différents produits à base d'huiles essentielles sur l'amélioration des performances de croissance, mais ont aussi été intéressés de voir comment ces alternatives pouvaient influencer les comptes intestinaux de *C. perfringens* dans la perspective de remplacer l'effet prophylactique des promoteurs de croissance sur l'entérite nécrotique (55, 227, 246). Si et coll. ont d'abord vérifié l'effet inhibiteur de 66 huiles essentielles ou de leurs composés sur des cultures de *C. perfringens*. Des 66 composés testés, 33 ont montré un pouvoir inhibiteur de 80% et 9 se sont avérés capables d'inhiber 50% de la croissance bactérienne lorsqu'ajoutés à des concentrations de 500 mg / ml à des cultures de *C. perfringens*. Certains composés sont même parvenus à faire diminuer les comptes de *C. perfringens* de 2,5 logs lorsque mis en contact avec du contenu iléal de poulet (246). Mitsch et coll. ont quant à eux testé l'efficacité de deux produits commerciaux composés d'eugénol, de curcuma, de pipérine. Chacun des produits renfermait en plus

du thymol dans le cas du premier produit et du carvacrol en ce qui concerne le deuxième. Le pouvoir de ces deux produits pour diminuer les comptes de *C. perfringens* a été évalué dans des conditions d'élevage commercial. Chacun des produits s'est avéré efficace pour diminuer les comptes de la bactérie à différents moments de l'élevage, ainsi que dans les différentes portions du tractus intestinal soit le jejunum, le caecum ou le cloaque (247). Dans un modèle d'infection expérimentale d'entérite nécrotique, Jerzsele et coll. ont rapporté que l'utilisation d'un produit alternatif à base de gingembre et de carvacrol chez des oiseaux infectés avec *C. perfringens* était associée à une augmentation significative du gain de poids, celle-ci pouvant être expliquée par une augmentation de la longueur des villosités et de la profondeur des cryptes intestinales. Les scores lésionnels macroscopiques et histologiques étaient même statistiquement plus faibles dans le groupe recevant des huiles essentielles (248). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par McReynolds et coll. (249). Dans la même étude menée par Abildgaard et coll., et citée précédemment, aucun effet d'un produit commercial composé de thymol, d'eugénol et de pipérine n'a pu être observé sur les comptes de *C. perfringens* retrouvés dans l'iléon et le caecum, et ce, même à différentes concentrations (55). Cross et coll. ont quant à eux noté une légère diminution de la valeur d'un log sur les comptes de *C. perfringens* provenant du caecum d'oiseaux recevant une diète à base de romarin, de thym et de marjolaine. Cet effet suppresseur n'a cependant pas été noté pour le groupe recevant des huiles essentielles en remplacement des herbes (31).

L'approche alternative idéale, dans un cadre législatif où l'utilisation des anticoccidiens n'est pas permise, devrait en plus pouvoir exercer un contrôle sur les

différentes espèces d'*Eimeria* responsables de la coccidiose chez la volaille (45, 232). En effet, la gestion de la coccidiose représente un défi de taille pour tous les producteurs avicole due aux nombreux impacts négatifs que l'infection engendre : dommages intestinaux responsables d'une modification du processus de digestion des aliments, une absorption des nutriments altérées, une augmentation secondaire du taux de conversion alimentaire ainsi que la présence de fientes liquides imposant une régie d'élevage plus stricte afin d'éviter les problèmes secondaires à l'apparition d'une litière plus humide (250). La coccidiose aviaire représente en plus le facteur de risque principal pour l'apparition de l'entérite nécrotique (45). Très peu d'études sont retrouvées dans la littérature scientifique quant aux effets anti-parasitaires des huiles essentielles et leur mode d'action en ce sens reste à être identifié. On soupçonne entre autres que ce serait les polyphénols et les saponines retrouvés dans les plantes aromatiques qui seraient responsables de cette action antiparasitaire, en protégeant les cellules épithéliales de l'hôte et en agissant sur le cholestérol composant la paroi cellulaire du parasite respectivement. Certaines huiles essentielles causeraient aussi un stress oxydatif chez le parasite entraînant ainsi la destruction des oocystes(250) (245). Sans éliminer les impacts liés à la réplication d'*Eimeria* au niveau intestinal, Bozkurt et coll. ont noté que l'utilisation d'un mélange commercial composé de carvacrol, de thymol et de camphre permettait de bonifier l'utilisation des nutriments ainsi que le gain de poids chez des oiseaux soumis à une infection expérimentale par le parasite. En effet, le groupe alimenté avec une diète contenant le produit commercial présentait un gain de poids ainsi qu'une conversion alimentaire comparables au groupe recevant du monensin, un anticoccidien ionophore, et ces résultats étaient significativement

améliorés par rapport à ceux du groupe infecté ne recevant aucun additif alimentaire. La principale différence entre les deux était l'excrétion oocytaire, celle-ci étant significativement plus faible pour le groupe recevant l'ionophore (250). D'autres études ont rapporté des résultats semblables lors d'infection expérimentale par *E. tenella*. Les oiseaux recevant un produit alternatif à base d'origan présentaient des résultats améliorés par rapport au gain de poids, à l'excrétion oocytaire et au score lésionnel intestinal lorsque comparé aux oiseaux du groupe infecté mais ne recevant aucun traitement. Les résultats du groupe sous traitement alternatif n'étaient toutefois pas comparables à ceux du groupe recevant un anticoccidien (251, 252). Toutes les huiles essentielles ou extraits de plante ne semblent cependant pas agir de la même façon. En effet, c'est ce qu'ont noté Youn et Noh lors de l'évaluation de 15 extraits d'herbe différents administrés dans l'eau d'abreuvement, quant à leur effet, dans un modèle d'infection à *Eimeria tenella*. Le taux de survie des oiseaux, les scores lésionnels observés, le gain de poids, la présence de diarrhée sanguinolente ainsi que sur l'excrétion oocytaire ont tous été évalués. Les extraits testés ont montré des effets tantôt positifs, tantôt négatifs quant à la diminution des comptes d'excrétion oocytaire, ainsi qu'à la perte de gain de poids et la présence de lésions intestinales associées à l'infection (253).

2.4.2.3 Prébiotiques, probiotiques et produits d'exclusion compétitive

La composition nutritionnelle de l'alimentation animale est continuellement ajustée afin d'optimiser les effets recherchés sur la santé animale, la productivité et

surtout, afin de s'ajuster au prix constamment variable des intrants (213). Parmi les différentes stratégies alimentaires disponibles pour parvenir à cette optimisation, les probiotiques, prébiotiques et produits d'exclusion compétitive occupent une place de choix de part leur capacité naturelle à moduler positivement la santé digestive. Ceux-ci ont d'ailleurs reçu un grand intérêt suite à l'interdiction d'utiliser les antibiotiques en tant que promoteurs de croissance pour les pays Européens (254). Les prébiotiques sont des fibres alimentaires non-digestibles issues de la fermentation de certains hydrates de carbone. Les principaux prébiotiques utilisés sont des oligosaccharides, formés à partir de monnosaccharides tels que le glucose, le fructose, le galactose et le mannose. Les fructooligosaccharides (FOS), les mannan-oligosaccharides (MOS), ainsi que les galactooligosaccharides (GOS) figurent parmi les oligosaccharides les plus connus (28). Leurs composantes fermentées possèdent la capacité de moduler la microflore digestive, en assurant une exclusion compétitive face aux bactéries pathogènes digestives, ainsi qu'en favorisant la production de métabolites promouvant une bonne santé digestive (9, 209, 213). Les prébiotiques agiraient en favorisant la croissance des lactobacilles et bifidobactéries, rôle principalement attribué aux FOS, et ces bactéries bénéfiques compétitionneraient à leur tour avec les bactéries pathogènes pour les sites d'attachement au niveau intestinal ainsi que pour la disponibilité des nutriments. On soutient même que les MOS auraient la capacité de lier directement les fimbriae de bactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli* et *Salmonella*. La croissance des bactéries bénéfiques entraînerait de plus la production de composés toxiques et la stimulation du système immunitaire afin de mieux combattre les bactéries pathogènes (9, 255). Dans une étude menée par Baurhoo et coll., l'effet de

deux concentrations différentes de MOS sur les performances de croissance de poulets de chair, sur leur morphologie intestinale, et sur des populations bactériennes ciblées retrouvées dans le caecum a été évalué (256). Ils ont aussi comparé les résultats de cette approche avec ceux obtenus suite à l'utilisation de la virginiamycine et de la bacitracine. La principale différence se situait au niveau de la morphologie intestinale où les oiseaux recevant le MOS ont montré une augmentation significative de la longueur des villosités, ainsi qu'un nombre augmenté de cellules à goblet par villosité dans tous les segments intestinaux, aux jours 24 et 34 de l'essai. Cependant, aucun effet du traitement n'a été observé sur les performances de croissance, conclusion à laquelle Geier et coll. et Yang et coll. étaient parvenus dans des études comparables évaluant l'effet des MOS et des FOS (256-258). Geier et coll. ont même rapporté que les traitements à base d'oligosaccharides étaient associés à une diminution de la population intestinale d'*Escherichia coli*, une observation aussi faite par Kim et coll. dans une étude plus récente (259). Dans cette étude, le remplacement des antibiotiques promoteurs de croissance par des FOS et des MOS n'entraînait pas de conséquence statistiquement significative sur les performances de croissance. Au contraire, les oiseaux soumis à une diète renfermant ces alternatives performaient significativement mieux que des oiseaux où aucun traitement n'était utilisé en remplacement des promoteurs de croissance. Cette étude a même démontré que l'utilisation de prébiotiques était associée à une augmentation du nombre total de bactéries digestives, principalement due à une augmentation du nombre et de la diversité des lactobacilles présentes dans l'intestin. Tout comme Geier et coll., Kim et coll. ont observé une

diminution du nombre d'*Escherichia coli* et de *C. perfringens* au niveau intestinal (257, 259).

L'utilisation de cultures bactériennes ajoutées à l'alimentation des animaux d'élevage fut une des premières approches alternatives utilisées en remplacement des promoteurs de croissance (33). L'établissement d'une flore digestive bénéfique permettrait la mise en place d'un équilibre entre la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires et assurerait ainsi une fonction immunitaire digestive optimale (260). En effet, le système digestif aurait la capacité de reconnaître et de tolérer les bactéries commensales de l'intestin plutôt que d'activer une réponse inflammatoire envers des bactéries pathogènes voulant s'établir dans le tube digestif. Trois mécanismes distincts ont été avancés afin d'expliquer les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé digestive : la production de bactériocines par les souches bactériennes probiotiques empêcherait la colonisation du tractus intestinal par des pathogènes en ayant un effet délétère sur ces pathogènes, la stimulation d'une fonction immunitaire digestive optimale préviendrait l'établissement d'une flore pathogène, et finalement, la compétition pour des sites d'attachement au niveau de l'intestin serait en faveur des bactéries probiotiques présentes en plus grand nombre (260). Une variété d'espèces microbiennes ont été utilisées comme probiotiques : *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, des espèces de levures, des cultures bactériennes non-définies, et plusieurs de ces probiotiques ont été testés en conditions expérimentales chez des poulets de chair afin de vérifier leur effet en

remplacement des promoteurs de croissance (255). Dans une étude conduite par Gunal et coll., il a été démontré que l'utilisation d'un probiotique seul ou d'un promoteur de croissance n'était pas associée à des résultats différents quant au gain de poids, à la prise et la conversion alimentaire, ainsi qu'au taux de mortalité (220). Cependant, l'utilisation d'un probiotique était significativement associée à une réduction du nombre de bactéries à Gram négatif dans les segments de l'iléon et du caecum, tout comme à une longueur augmentée des villosités intestinales, probablement due à la production secondaire d'acides gras à chaîne courte, un sous-produit de la fermentation bactérienne capable de stimuler la prolifération des cellules épithéliales intestinales (220, 260). Des études expérimentales suggèrent que 95% des acides gras à courte chaîne produits par la microflore digestive seraient utilisés par les cellules épithéliales intestinales afin d'assurer leur prolifération, de favoriser la production de mucus, d'assurer une bonne motilité digestive, tout en favorisant le maintien d'une microflore équilibrée et bénéfique au maintien de l'homéostasie digestive (260). L'amélioration de la capacité digestive par les probiotiques a aussi été remarquée par Mountzouris et coll. dans une étude comparant les effets d'un antibiotique promoteur de croissance à ceux d'un probiotique composé de 5 espèces bactériennes isolées du jabot, du jéjunum, de l'iléon et du caecum d'oiseaux matures, administré à des poulets de chair en croissance. Les chercheurs n'ont noté aucune différence significative entre les groupes concernant le poids final, la consommation et la conversion alimentaires. Cependant, le groupe recevant un antibiotique présentait un poids légèrement supérieur à la fin de l'essai. Les principales différences se situaient au niveau de la composition de la microflore qui présentait des comptes de bifidobactéries, de lactobacilles et de coques à

Gram positif augmentés chez les oiseaux soumis au traitement par probiotique. Même si la concentration en acides gras volatils retrouvés dans le caecum ne différait pas entre les différents traitements, les chercheurs concluent tout de même à un effet bénéfique du probiotique sur la fonction digestive puisque les activités d'enzymes glycolytiques telles que les alpha et bêta-galactosidase étaient augmentées chez ce groupe d'oiseaux, probablement en lien avec l'augmentation du nombre de bifidobactéries et de lactobacilles reconnues pour produire ces enzymes jouant un rôle dans la fermentation glycolytique des hydrates de carbone (261). Les résultats d'une étude semblable menée par Mookiah et coll. vont dans le même sens que ceux présentés précédemment (254). Lors d'un essai expérimental comparant les performances de poulets de chair soumis à une diète sans aucun additif alimentaire à celles obtenues suite à l'utilisation d'un probiotique seul, d'un prébiotique seul et d'un probiotique combiné à un prébiotique (synbiotique), les chercheurs ont rapporté des effets positifs significatifs sur le gain de poids des oiseaux ainsi que sur la conversion alimentaire lors de l'utilisation des additifs seuls ou en combinaison. L'utilisation de probiotiques et de prébiotiques était aussi associée à une augmentation des populations caecales en lactobacilles et en bifidobactéries, en plus de concentrations caecales augmentées pour les acides gras volatils retrouvés à 21 et 42 jours d'âge, ce qui diffère des résultats rapportés par d'autres études (254).

Le concept de l'exclusion compétitive a pour la première fois été décrit en 1973 par Nurmi et Rantala, et a été identifié comme une approche efficace pour prévenir la colonisation du tractus digestif des volailles par *Salmonella* (262). Par la promotion de l'établissement d'une flore riche et diversifiée, un produit d'exclusion compétitive

préviendrait ainsi l'établissement de bactéries pathogènes au sein de la flore digestive (260). Au départ décrit comme une approche permettant le contrôle de bactéries indésirables, le concept d'exclusion compétitive est maintenant vu comme une alternative permettant d'optimiser les performances de croissance suite au retrait des antibiotiques (261). Cependant, contrairement à l'utilisation d'un probiotique qui souvent ne contient qu'une ou un nombre limité d'espèces bactériennes, un produit d'exclusion compétitive va plutôt favoriser l'implantation d'une microflore digestive mature et hautement compétitive (255, 263). Plus précisément, chez la volaille, on qualifie de produit d'exclusion compétitive une préparation dont la qualité est contrôlée et dont le contenu est un mélange non-défini de bactéries vivantes anaérobies strictes et anaérobies facultatives provenant d'oiseaux adultes sains dont le statut est reconnu pour l'absence d'organismes pathogènes spécifiques (260). Même si les produits d'exclusion compétitive ont été passablement étudiés et utilisés en production avicole, les mécanismes derrière leur mode d'action demeurent largement incompris. Un de ceux-ci serait la capacité des bactéries de la microflore digestive d'établir entre elles des interconnexions entraînant la formation du glycocalyx, une barrière dynamique à l'adhésion des bactéries pathogènes. Un second mécanisme suspecté serait que de par leur plus grand nombre, les bactéries commensales présenteraient un avantage compétitif pour l'utilisation des nutriments qui sont en quantité limitée dans l'intestin. Aussi, le métabolisme des bactéries associées à une flore d'exclusion compétitive entraînerait la production d'acides gras volatils tels les acides butyrique, acétique et propionique, et que sous l'influence du pH acide retrouvé dans l'environnement intestinal, ces acides seraient maintenus sous leur forme non-dissociée

leur permettant d'exercer leur pouvoir inhibiteur sur des bactéries pathogènes. Finalement, la production de peptides antimicrobiens, que l'on nomme aussi bactériocines, pourrait aussi représenter un moyen par lequel des bactéries commensales pourraient avoir l'avantage compétitif sur des bactéries pathogènes, quoique cette avenue reste à être mieux décrite (260). Ce phénomène d'exclusion compétitive semble aussi être applicable pour *C. perfringens*, puisque chez des oiseaux recevant ce type de produit en conditions expérimentales, les comptes de *C. perfringens*, ainsi que le nombre d'oiseaux à partir desquels la bactérie pouvait être isolée étaient significativement inférieurs lorsque comparés à ceux du groupe ne recevant rien (264). Cette même tendance fut observée par Kaldhusdal et coll. dans une étude réalisée en conditions d'élevage sur une ferme aux prises avec des problèmes récurrents associés à *C. perfringens*. Les oiseaux soumis au traitement d'exclusion compétitive ont montré une incidence réduite d'entérite nécrotique, et lorsque la condition se manifestait, l'apparition des lésions associées était retardée, atténuant ainsi les impacts négatifs généralement observés sur les performances obtenues. Ainsi, une diminution du taux de mortalité en élevage et un pourcentage moins élevé de condamnations à l'abattoir reliée à *C. perfringens* ont été notés pour le groupe traité avec le produit d'exclusion compétitive (265).

La recherche future visant l'identification de l'approche alternative idéale sera entre autres orientée vers l'administration combinée d'un probiotique et d'un prébiotique (synbiotique). Cette approche assurera donc la mise en place de populations bactériennes bénéfiques, auxquelles l'apport d'un substrat essentiel à leur maintien et à leur croissance sera garanti (9).

2.4.2.4 Enzymes et formulation de la diète

L'utilité d'ajouter des préparations d'enzymes exogènes à l'alimentation des volailles dans le but d'améliorer les performances de croissance et l'utilisation des nutriments est connue depuis longtemps (266). L'absence de compréhension quant à leur mode d'action ainsi que leur coût en limitaient par contre leur utilisation généralisée (33). Cependant, les avancées réalisées en biotechnologies au cours des dernières années permettent maintenant la production d'enzymes à un coût plus abordable, permettant ainsi leur inclusion pratiquement systématique à la formulation des diètes commerciales. De plus, les études réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes derrière l'action de ces enzymes ont aussi permis l'élaboration de produits synthétiques possédant une action plus ciblée et une efficacité optimale. L'industrie de l'alimentation de la volaille figure parmi les plus importants utilisateurs d'enzymes ajoutées en tant qu'additifs alimentaires, et cette pratique est largement acceptée. Dans certains pays, jusqu'à 90% des diètes destinées aux poulets de chair renferment des enzymes alimentaires, leur inclusion permettant plus de flexibilité dans le choix et le taux d'inclusion des intrants. L'utilisation des phytases issues de la fermentation microbienne est aussi devenue plus répandue au cours des dernières années. Le but ultime recherché par l'utilisation des enzymes digestives est d'améliorer l'efficacité alimentaire. Différents effets bénéfiques des enzymes permettent d'arriver à cette fin. Entre autres, l'ajout d'enzymes à l'alimentation permet de réduire la variabilité nutritionnelle, l'efficacité des enzymes étant améliorée en présence d'un intrant de moindre qualité. L'amélioration de la digestion des polysaccharides non-amidonnés permet de diminuer le taux d'humidité des fientes, ceci ayant un impact

majeur sur la qualité de la litière des animaux et permet en plus de réduire la quantité d'excréta, diminuant ainsi les impacts environnementaux associés à la production animale. Finalement, en modifiant la morphologie intestinale, la microflore digestive et conséquemment la fonction immunitaire, la digestion et l'absorption des composantes alimentaires sont optimisées (266).

Les quatre principales classes d'enzymes utilisées sont celles s'attaquant aux céréales que l'on qualifie de visqueuses, telles que les β -glucanases et les xylanases. Elles sont capables de scinder les polysaccharides non-amidonnés retrouvés en grande quantité dans les céréales telles que le blé, l'orge et le triticale. On retrouve aussi des enzymes possédant une activité amylase orientée vers la digestion de l'amidon retrouvé dans des céréales qualifiées de non-visqueuses, telles que le maïs et le sorgho. Une troisième catégorie d'enzymes sert à optimiser la digestion des intrants non-céréaliers tels que les farines de soya, de canola, de tournesol, de pois, de lupin et de palme, ces intrants étant largement utilisés dans les pays où l'utilisation des farines de viande et d'os a été interdite. Finalement, les phytases d'origine microbienne, capables de cibler les complexes phytate dans les végétaux ajoutés à la diète, ont principalement pour rôle d'aider à la libération du phosphore contenu dans les végétaux sous la forme d'acide phytique. Au départ peu considérées, les phytases d'origine microbienne sont maintenant largement utilisées et permettent d'optimiser l'utilisation du phosphore alimentaire, et ainsi réduire les niveaux d'inclusion à la diète des animaux tout comme les rejets environnementaux y étant associés (9). D'autres enzymes ou préparations enzymatiques telles que des amylases, lipases, protéases et cellulases sont aussi disponibles commercialement afin d'améliorer l'utilisation de nutriments tels que des

protéines, de l'amidon, des lipides ou même des composantes fibreuses. Leur utilisation ne se fait cependant pas sur une base routinière, leur rapport coût-efficacité n'étant pas toujours satisfaisant en conditions pratiques. Différents modes d'action sont attribués aux enzymes utilisées comme additifs à la diète. Elles permettent entre autres la rupture de liens spécifiques présents dans certains types d'aliments et généralement non-hydrolysés par des enzymes endogènes, elles assurent la dégradation de facteurs antinutritionnels, elles agissent sur la paroi cellulaire des cellules végétales afin de la détruire et d'assurer la relâche des nutriments. Les enzymes alimentaires vont aussi permettre une diminution des sécrétions endogènes associées au processus de digestion, diminuant ainsi les besoins de l'animal pour son maintien métabolique de base. Finalement, chez les jeunes animaux, l'ajout d'enzymes favorisera une croissance plus rapide en comblant le manque d'enzymes digestives associé à leur système digestif immature.

Le maintien d'une santé digestive optimale est essentiel afin d'assurer des performances d'élevage qui soient rentables et qui répondent aux besoins des marchés (266). Cette affirmation devient d'autant plus vraie quant on relie la santé digestive à l'apparition de l'entérite nécrotique (267). Quelques chercheurs se sont intéressés à évaluer le rôle des enzymes ajoutées à l'alimentation animale dans le maintien des performances de croissance ainsi que dans le contrôle de *C. perfringens* et d'*Eimeria*. Les résultats varient d'une étude à l'autre. Tang et coll. ont non seulement évalué l'effet d'avoir différentes sources de maïs comme intrant principal de la diète, mais aussi la pertinence d'ajouter un mélange d'enzymes comprenant de la xylanase, de l'amylase et une protéase à ces différentes diètes. L'utilisation de deux mélanges

commerciaux d'enzymes digestives a été associée à une augmentation du gain moyen quotidien, qui pouvait aller jusqu'à 8,6%, ainsi qu'à une réduction de la conversion alimentaire de l'ordre de 5%. Pour un des ces mélanges, les chercheurs ont noté une diminution de l'excrétion de fèces. L'ajout d'enzymes a aussi été associé à une amélioration du coefficient de digestibilité des protéines brutes et du niveau iléal d'énergie digestible (268). Yu et Chung ont aussi rapporté que l'ajout à la ration d'un mélange d'enzymes permettait de réduire de 3% la quantité d'énergie métabolisable devant être présente dans cette ration. Les performances de croissance des oiseaux soumis à ce régime étaient comparables à celles des groupes recevant une diète non-réduite en énergie (269). C'est à cette même conclusion que sont arrivés Zanella et coll. lorsqu'ils réduisaient les niveaux d'énergie de la diète. Ils ont en plus noté qu'à des niveaux d'énergie comparables, l'ajout d'enzymes permettait d'améliorer de 1,9% et de 2,2% le gain de poids et la conversion alimentaire respectivement (270). Dans une étude réalisée par Cowieson et O'Neill, l'ajout de xylanase à une diète à base de blé était non seulement associé à une amélioration du gain de poids et de la conversion alimentaire, mais aussi à une augmentation de la température interne des caeca, laissant supposer aux chercheurs que la microflore de la portion inférieure du tractus digestif jouerait un rôle important dans l'influence de ces résultats (271).

Les résultats sont moins clairs en ce qui a trait à la contribution des enzymes digestives dans le contrôle de l'entérite nécrotique et de la coccidiose. Alors que Barekattain et coll. n'ont trouvé aucun effet positif significatif de l'ajout de xylanase et de protéase afin de diminuer les pertes en performance associées à l'infection par *Eimeria*, Jackson et coll. ont plutôt démontré que les oiseaux infectés par *Eimeria* et

recevant de la β -mannanase présentaient un gain de poids supérieur de 4,5% lorsqu'on les comparait au groupe infecté ne recevant pas une diète supplémentée en enzyme (272, 273). Ces chercheurs ont même observé une réduction des scores lésionnels associés à l'entérite nécrotique pour les groupes supplémentés, effet qu'ils attribuent entre autres à la stimulation du système immunitaire (273). À l'opposé, Barekatin et coll. n'ont pas rapporté d'effet positif de l'ajout d'enzymes digestives dans le but de mieux contrôler l'entérite nécrotique, à l'exception de contribuer au maintien d'un gain de poids et d'une consommation alimentaire adéquate (272). Dans une étude menée par Liu et coll., l'ajout de xylanase à la diète à base de blé de poulets de chair soumis à une infection expérimentale par *C. perfringens* a montré avoir un impact positif sur les scores lésionnels intestinaux, sur la microarchitecture intestinale, sur les niveaux d'expression d'ARNm associé à MUC2, une mucine intestinale ainsi que sur l'expression d'ARNm associé à l'occludine, une protéine transmembranaire responsable de la cohésion des jonctions serrées retrouvées entre les cellules épithéliales intestinales. Les chercheurs ont donc conclu que l'ajout de xylanase permettait d'atténuer les effets négatifs associés à l'infection par *C. perfringens* (274). Dans une étude semblable, Guo et coll. ont démontré des effets positifs de l'ajout de xylanase à la diète des volailles, sur le gain moyen quotidien ainsi que sur le taux de conversion alimentaire, peu importe le fait que les oiseaux soient soumis à une infection expérimentale par *C. perfringens*. L'ajout d'enzyme chez le groupe infecté par *C. perfringens* a cependant permis de minimiser les effets néfastes de l'infection sur le taux de conversion, probablement en lien avec l'action de l'enzyme sur les

activités des enzymes digestives telles que l' α -amylase duodénale, la chymotrypsine et la trypsine pancréatique (267).

2.4.2.5 Vaccination contre la coccidiose

Jusqu'à tout récemment, la controverse demeurait importante quant au rôle que pouvait jouer la vaccination contre la coccidiose sur le contrôle de l'entérite nécrotique, et les essais réalisés en conditions contrôlées demeurent peu nombreux à ce jour. En production avicole, il est largement reconnu que le facteur prédisposant majeur pour l'apparition de l'entérite nécrotique sont les dommages causés à la muqueuse intestinale par *Eimeria*, l'agent causal de la coccidiose (275). Alors que certaines études rapportaient que des oiseaux recevant un vaccin atténué contre la coccidiose n'avait pas développé l'entérite nécrotique après avoir été soumis à une infection expérimentale par *C. perfringens*, d'autres essais démontrent que même une vaccination contre la coccidiose ou l'utilisation d'anticoccidiens n'ont pas réussi à prévenir un épisode de maladie (181, 276). Dans une étude réalisée par Williams et coll., il a été montré que le fait d'immuniser des oiseaux avec des souches vaccinales d'*Eimeria* avant de les soumettre à une infection par *Eimeria maxima* et *C. perfringens* permettait d'atténuer les effets négatifs associés à l'entérite nécrotique (277). McReynolds et coll. ont même démontré que la vaccination contre la coccidiose était associée à une mortalité réduite lors d'un épisode d'entérite nécrotique subséquent (278). Bangoura et coll. ont comparé les performances de croissance, l'excrétion de *C. perfringens*, l'excrétion oocytaire, ainsi que les scores lésionnels de groupes d'oiseaux non-vaccinés ou vaccinés contre la coccidiose. Ils ont soumis les oiseaux à une

infection par *Eimeria* ou par *Eimeria* et *C. perfringens*. Ils ont noté que pour les oiseaux n'ayant pas reçu le vaccin, le gain de poids était significativement affecté de manière négative, tout comme le taux de conversion alimentaire. Alors que pour les groupes recevant une vaccination contre la coccidiose seule une légère diarrhée secondairement à l'infection par *Clostridium perfringens* a été notée, des signes cliniques sévères d'entérite nécrotique ont été observés pour les groupes non-vaccinés, et un taux de mortalité de l'ordre de 8,3% a été rapporté. Finalement, lors de la co-infection par *Eimeria* et *C. perfringens*, les groupes ayant préalablement reçu un vaccin pour la coccidiose ont été associés à des taux d'excrétion oocytaire et de *C. perfringens* significativement plus faibles (279). Sur le même principe, Tsiouris et coll. ont observé des scores lésionnels significativement moindre, un pH intestinal plus élevé ainsi que des comptes de *C. perfringens* plus faibles chez des poulets ayant été immunisés contre la coccidiose avant d'être soumis à une infection expérimentale par *Eimeria* et par *C. perfringens* (275). Chez les oiseaux ayant reçu la vaccination contre la coccidiose, l'infection expérimentale par *Eimeria* et par *C. perfringens* qui ont suivi ont été associées à une réduction significative des comptes de *C. perfringens* provenant du foie, ainsi que des lésions hépatiques associées à la bactérie. Les auteurs avancent diverses hypothèses afin d'expliquer les résultats obtenus. En stimulant des mécanismes des immunités spécifique et non-spécifique, l'inflammation intestinale locale associée au cycle de reproduction complexe d'*Eimeria* favoriserait le développement d'une réaction immunitaire complexe, préparant ainsi mieux le système immunitaire à se défendre adéquatement contre des infections subséquentes, telles que l'entérite nécrotique ou la coccidiose. Aussi, en prévenant des lésions plus sévères

causées par la coccidiose, un tel vaccin limiterait la quantité de nutriments disponibles dans l'intestin et servant à la multiplication de *C. perfringens*. Finalement, la prévention des lésions extensives à la muqueuse intestinale causées par la coccidiose empêcherait l'attachement de *C. perfringens*, sa colonisation de l'intestin et sa libération de toxines (49, 154, 156, 275, 280). La vaccination contre la coccidiose représenterait donc un outil à deux fonctions : atténuer les effets négatifs de la coccidiose sur la santé digestive et sur les performances zootechniques, en plus d'assurer un rôle de soutien dans le contrôle de l'entérite nécrotique (275).

2.4.2.6 Vaccination contre *C. perfringens*

Alors que des vaccins commerciaux efficaces sont disponibles pour plusieurs conditions animales causées par *C. perfringens*, un seul vaccin commercial est disponible pour le contrôle de l'entérite nécrotique. Ce vaccin est composé de l'anatoxine alpha, et a été formulé à partir d'une culture de *C. perfringens* de type A d'origine bovine (281). Cependant, différentes stratégies ont été ou sont encore sous évaluation afin de valider leur efficacité. Même si quelques approches de contrôle de la maladie décrites précédemment semblent posséder une certaine valeur en ce sens, il semble logique de considérer le développement d'un vaccin comme faisant partie des approches les plus prometteuses. Le vaccin idéal permettant de contrôler l'entérite nécrotique induirait le développement d'une immunité protectrice et son administration de masse devrait pouvoir être effectuée soit via l'eau de boisson, soit via l'alimentation. Une administration au couvoir, *in ovo*, au moment du transfert des œufs entre l'incubateur et l'écloserie ou en vaporisation directement sur les poussins lors de

l'éclosion serait aussi une méthode de choix. Le défi reste cependant de taille, puisque la réponse immunitaire des oiseaux suite à l'infection par *C. perfringens* demeure encore largement incomprise (5, 199, 282). Ceci vient du fait qu'aucun antigène spécifique associé au développement de la maladie n'a jusqu'ici pas été identifié, ce qui rend difficile l'attribution des rôles précis joués par les différents médiateurs impliqués dans cette réponse immunitaire. Différentes études évaluant différents antigènes ainsi que différents moyens d'immunisation ont jusqu'à aujourd'hui été réalisées. Même si certains antigènes semblent plus aptes que d'autres à stimuler le développement d'une immunité protectrice, certains facteurs ont été identifiés comme ayant un impact sur le niveau observé de cette protection. Entre autres, la sévérité de l'infection, la souche de *C. perfringens* en cause, les conditions d'alimentation et de logement des oiseaux et le modèle d'infection expérimentale utilisé dans l'évaluation de cette protection semblent posséder une influence (89). Parmi les antigènes testés, on retrouve des surnageants non-inactivés de cultures de *C. perfringens*, des toxines brutes inactivées par la formaldéhyde, des toxines modifiées, ainsi que des protéines hautement immunogènes. Des administrations sous-cutanée, intra-musculaire, et même *per os* par l'entremise d'un vecteur vivant figurent parmi les diverses voies d'immunisation ayant été évaluées. Toutes ces études permettent pour le moment aux chercheurs de conclure que de multiples administrations seraient nécessaires afin d'assurer une immunité qui soit suffisamment protectrice.

Pour le moment, aucune étude ne rapporte l'efficacité d'une vaccination *in ovo* pour le contrôle de l'entérite nécrotique (121). La vaccination des oiseaux reproducteurs pourrait être une avenue intéressante considérant le fait qu'elle

favoriserait le développement d'une immunité hâtive chez la progéniture, et puisque le suivi de santé des troupeaux reproducteurs implique déjà l'administration de vaccins à des moments précis de leur élevage. De cette façon, la vaccination d'une poule reproductrice permettrait de protéger tous les oiseaux de sa progéniture, ce qui permettrait donc d'assurer une immunité protectrice chez un grand nombre d'oiseaux, diminuant par le fait même le coût associé à l'utilisation de ce vaccin. De plus, l'immunité maternelle transmise aux poussins semblerait jouer un rôle important dans la prévention de l'apparition de la maladie pendant les premières semaines de vie. En effet, les épisodes d'entérite nécrotique sont rarement observés avant l'âge de 3 à 4 semaines, moment associé à une baisse de l'immunité maternelle transmise aux poussins. Peu d'études se sont intéressées à évaluer l'efficacité d'une vaccination des oiseaux reproducteurs dans la prévention de l'entérite nécrotique chez les oiseaux issus des lignées parentales vaccinées (281, 283, 284). Le premier à s'y être intéressé fut Lovland dans une étude évaluant l'efficacité de deux vaccins, l'un composé des anatoxines d'une souche de *C. perfringens* de type A, et l'autre d'une souche de type C. L'immunisation des oiseaux reproducteurs à 11 et 18 semaines d'âge a permis le développement d'une réponse immunitaire, principalement médiée par des IgG, chez les parents, mais a aussi assuré le transfert de cette immunité à leur progéniture. Lorsque leur niveau de protection fut évalué dans un modèle d'entérite nécrotique, bien que l'immunité n'ait pas prévenu complètement l'apparition de lésions, les oiseaux issus de lignées parentales vaccinées ont montré une réduction significative des dommages intestinaux et hépatiques associées à la bactérie. La présence d'immunité n'a cependant pas semblé avoir d'effet sur la présence de *C. perfringens* dans l'intestin,

l'isolement de la bactérie étant comparable entre les groupes issus de lignées parentales vaccinées et non-vaccinées (284). À l'opposé, Crouch et coll. ont conclu que l'efficacité de la toxine alpha à contrôler l'entérite nécrotique pouvait en partie être associée à la capacité des anticorps développés face à cette toxine à limiter la croissance de *C. perfringens* dans l'intestin. Dans cette étude, une formule commerciale de l'anatoxine alpha, NetvaxTM a été utilisée pour immuniser des oiseaux reproducteurs aux âges de 11 et 18 semaines. Tout comme dans l'étude de Lovland et coll., les chercheurs ont observé un transfert de l'immunité des parents à la progéniture via le jaune de l'œuf. Alors qu'aucune lésion macroscopique, signe clinique et présence de *C. perfringens* étaient rapportés pour les oiseaux issus des lignées parentales vaccinées, les oiseaux n'ayant pas reçu d'immunité parentale ont présenté des comptes moyens de 10^3 bactéries / g de fientes, une mortalité réduite, ainsi qu'un score lésionnel moyen de 1,5 lorsque confrontés à l'entérite nécrotique (283). Les résultats variables quant à la protection offerte par la toxine alpha ont donc amené Keyburn et coll. à évaluer la combinaison de l'anatoxine alpha à une protéine identifiée comme un élément important faisant partie de la pathogénie de l'entérite nécrotique : NetB (285). En vaccinant les oiseaux reproducteurs à trois reprises avec un intervalle de 2 semaines entre chacune des vaccinations, Keyburn et coll. sont parvenus à stimuler le développement d'une immunité pouvant être transférée à la progéniture, et pouvant assurer un niveau de protection considérable lorsque ceux-ci ont été soumis à une infection expérimentale pour l'entérite nécrotique. Le vaccin offrant la meilleure protection fut celui formé à la fois de l'anatoxine alpha et de la protéine recombinante

NetB pour laquelle des manipulations génétiques assuraient une réduction de la toxicité (281).

Quoique plus difficilement praticable en production avicole et moins avantageuse, la vaccination des poulets à chair a aussi été évaluée afin de prévenir l'apparition de l'entérite nécrotique. Différents antigènes ont été ciblés à cette fin. Cooper et coll. ont immunisé, par voie sous-cutanée, des poulets de chair, à 5 et à 15 jours d'âge, avec un vaccin à base de toxine alpha recombinante. Ils ont ensuite, 10 jours plus tard, inoculé ces oiseaux avec *C. perfringens* ajouté à la ration, deux fois par jour pour quatre jours consécutifs. Même si une protection parfaite n'a pas été atteinte, la vaccination a permis de réduire le nombre d'oiseaux présentant des lésions d'entérite nécrotique (87,8% à 54,9%), ainsi que le score moyen des lésions observées (2,37 à 1,35). Les oiseaux vaccinés présentaient des taux d'anticorps significativement plus élevés que les oiseaux non-vaccinés, autant avant l'infection expérimentale qu'après celle-ci, avec des taux cinq fois et quinze fois plus élevés respectivement (286). Jiang et coll. ont quant à eux utilisé des protéines recombinantes identifiées comme étant hautement immunogènes afin de vérifier leur pouvoir protecteur chez des oiseaux soumis à une infection expérimentale d'entérite nécrotique. Ainsi, trois protéines préférentiellement sécrétées par les souches virulentes de *C. perfringens* ont été identifiées soit TpeL, une cytotoxine, Naglu, une endo-bêta-N-acétylglucosaminidase et Pgm, une phosphoglycérmutase. De ces trois protéines, seule Pgm a semblé offrir une protection valable, Dans ce cas, le niveau de protection a semblé être inversement proportionnel à la sévérité de l'infection. Cependant, autant pour Pgm que Naglu, les oiseaux vaccinés ont développé des anticorps spécifiques (287). Sur ce même principe,

Kulkarni et coll. ont identifié cinq protéines hautement immunogènes uniquement sécrétées par les souches virulentes de *C. perfringens* (27, 199). Parmi celles-ci, la toxine alpha, une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une pyruvate : ferredoxine oxydoréductase (PFOR), une fructose 1,6-biphosphate aldolase (FBA) et une protéine hypothétique (HP). Les analyses effectuées par ELISA sur des échantillons de sérum et de lavages intestinaux provenant d'oiseaux immuns ont montré le développement de titres d'anticorps élevés et spécifiques face à ces antigènes. En évaluant le pouvoir protecteur de chacune de ces protéines, les chercheurs ont identifié la toxine alpha, la HP ainsi que la PFOR comme étant les antigènes offrant la meilleure protection lors d'une infection expérimentale sévère, la protéine hypothétique donnant les résultats les meilleurs. Cependant, aucune des protéines testées n'a conféré une protection complète contre l'apparition de lésions associées à l'entérite nécrotique dans un modèle d'infection expérimentale. (27, 199).

En élevage industriel, l'administration de masse des mesures de contrôle représente une économie de travail et de temps reliés au processus d'administration (121). Pour cette raison, différents chercheurs ont évalué la pertinence d'avoir recours à des vaccins composés de vecteurs vivants atténués et porteurs de protéines immunogènes de *C. perfringens* (288-291). Pour le moment, le seul vecteur évalué pour cette fin est une souche atténuée de *Salmonella* Typhimurium pour laquelle une mutation a été introduite pour un gène associé au métabolisme du microorganisme, permettant au système immunitaire de garder le contrôle sur la bactérie vecteur. Le défi avec les vaccins utilisant un vecteur est d'assurer une bonne colonisation de l'hôte par ce vecteur afin d'assurer une exposition ainsi qu'une persistance de la souche vaccinale

qui soient suffisantes (121, 290). Dans une étude réalisée par Zekarias et coll., une souche recombinante de *Salmonella enterica* Typhimurium a été utilisée comme vecteur pour le domaine C-terminal de la toxine alpha de *C. perfringens*. Le vaccin a été administré oralement à des poulets de chair de 3 et 17 jours d'âge un dosage de 10^9 ufc. Lorsque soumis à une exposition en continue à *C. perfringens* via l'alimentation deux semaines après l'immunisation, les oiseaux vaccinés ont montré une réduction significative des scores lésionnels associés à l'entérite nécrotique, ainsi qu'un gain de poids corporel supérieur. Les chercheurs ont aussi démontré que le sérum immun de ces oiseaux, lorsque mis en contact avec des cultures de *C. perfringens* en bouillon, parvenait à inhiber la croissance de la souche bactérienne (291). En ayant aussi recours à un vecteur atténué de *Salmonella* Typhimurium, Kulkarni et coll. ont démontré qu'il était possible d'utiliser les antigènes FBA et HP décrit ci-haut afin de stimuler le développement d'une immunité protectrice chez les poulets vaccinés avec ce vecteur. Quoique la réponse immunitaire engendrée par cette vaccination fut associée à une réduction des scores lésionnels histologiques chez les oiseaux immunisés, cette réponse était toutefois moindre que chez des oiseaux dont l'immunisation avait été réalisée en injectant ces antigènes par voie intra-musculaire. De plus, certains antigènes tels que PFOR ne semblent pas pouvoir être administrés en utilisant des vaccins vecteurs (290). Les mêmes chercheurs ont répété l'expérience en utilisant plutôt des fragments de la toxine alpha et de la protéine HP correspondant à des épitopes reconnus par les lymphocytes B. Les fragments de gènes correspondants ont été clonés dans un plasmide, qui lui fut introduit dans une souche atténuée de *Salmonella* Typhimurium servant de vecteur. Les oiseaux ont été immunisés oralement à 1 et 10 jours d'âge, puis

certaines d'entre eux ont même reçu une troisième vaccination, cette fois-ci par injection intra-musculaire de la protéine alpha tronquée. Lorsque les chercheurs ont soumis les oiseaux vaccinés à une infection expérimentale à *C. perfringens*, ils ont remarqué que ceux-ci semblaient faiblement protégés et que cette protection variait pour les différents antigènes utilisés. Ils ont aussi observé un degré de colonisation pauvre par la souche vaccinale utilisée. Malgré cette faible protection, les oiseaux ont tout de même développé une réponse immunitaire, des immunoglobulines Y et A spécifiques au vecteur, ainsi qu'aux antigènes de *C. perfringens* utilisés dans la construction du vaccin ayant été détectés dans le sérum et dans les intestins des oiseaux vaccinés. Les auteurs ont cependant conclu que du travail restait à faire quant à l'optimisation de l'expression des antigènes appropriés de *C. perfringens* par la souche vaccinale vecteur, ainsi que sur l'identification du vecteur approprié (289). Dans une étude réalisée par Hoang et coll., ce sont plutôt des spores de *Bacillus subtilis* qui ont été utilisés comme vecteur d'antigènes propres à *C. perfringens*. Cette approche représenterait une avenue intéressante pour l'industrie de la volaille du fait que les spores pourraient être à peu de frais incorporés à l'alimentation, qu'ils sont résistants à la chaleur nécessaire au processus de cubage de la moulée, et que *Bacillus subtilis* a montré son utilité dans une approche d'exclusion compétitive face à *C. perfringens* (292, 293). De plus, en germinant à différents moments dans le petit intestin, les spores agiraient directement à l'endroit où *C. perfringens* cause les lésions lors d'entérite nécrotique et assurerait le maintien d'une immunité constante. Les auteurs ont donc utilisé un segment carboxy-terminal du gène codant pour la toxine alpha qu'ils ont fusionné au gène d'une glutathione-S-transférase de *Bacillus subtilis* d'une façon telle

qu'ils ont pu évaluer trois façons différentes d'exprimer la nouvelle protéine : à l'intérieur des cellules végétatives, à la surface de la spore et une combinaison des deux moyens d'expression précédents. Les auteurs sont parvenus à induire le développement d'une réponse immunitaire puissante chez des souris face à l'antigène ciblé, ce qui laisse croire que les spores de *Bacillus subtilis* pourraient représenter un véhicule efficace pour délivrer des antigènes directement dans le tractus intestinal des volailles (292).

Au final, le succès du contrôle adéquat de l'entérite nécrotique passe non seulement par une approche ciblée contre *C. perfringens*, mais fait aussi appel, tout comme le contrôle de d'autres conditions infectieuses, à la mise en place d'une régie d'élevage, d'une qualité de l'alimentation et de l'eau d'abreuvement, ainsi que de mesures sanitaires et de biosécurité adaptées. Une optimisation du niveau de santé du troupeau tout comme la maîtrise des facteurs prédisposant à l'entérite nécrotique devraient aussi faire partie intégrante d'une stratégie de lutte efficace.

2.5 Caractérisation génétique de *C. perfringens*

Le typage des souches de *C. perfringens* est généralement effectué à l'aide d'une approche par PCR visant la détection des gènes codant pour les quatre toxines majeures, alpha, bêta, epsilon et iota (20, 34, 46, 102, 196, 294-297). Cependant, les efforts déployés afin de mieux comprendre la pathogénie de l'entérite nécrotique ont permis l'identification de nouvelles toxines produites par la bactérie, et apportent une nouvelle dimension à la caractérisation du microorganisme. Par conséquent, certains

chercheurs suggèrent que le temps serait venu de revoir la classification des souches de *C. perfringens* basée sur la présence des toxines majeures (41). Malgré la mise en évidence de ces nouvelles toxines, aucune pour le moment ne semble pouvoir être identifiée comme étant le facteur de virulence spécifique possédé par les souches de *C. perfringens* capables de causer l'entérite nécrotique (84, 101, 103, 128, 196, 197, 298, 299).

Parmi les études réalisées au cours de la dernière décennie et visant à caractériser des souches de *C. perfringens*, les chercheurs ont employé diverses méthodes telles que le ribotypage, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), le MLST (multilocus sequence typing), le MLVA (multilocus variable number of tandem repeat analysis), ainsi que le séquençage de génomes entiers ou même de plasmides appartenant à *C. perfringens* (24, 46, 58, 59, 72, 80, 102, 132, 196, 198, 295, 300, 301). En regardant les résultats des différentes études réalisées, il n'est pour le moment pas possible de relier un sous-type précis de *C. perfringens* à l'apparition de l'entérite nécrotique (300). En utilisant le ribotypage, De Cesare et coll. ont démontré que parmi les 82,9% et 64,7% des 92 lots produits sans promoteurs de croissance et trouvés positifs pour *C. perfringens* en Italie et en République tchèque respectivement, plusieurs ribotypes pouvaient être retrouvés. Plus d'un ribotype a été identifié dans 76,5% des lots d'Italie et 57,1% des lots de République tchèque, soutenant le fait que le typage de plusieurs souches de *C. perfringens* d'un même troupeau étaient nécessaires afin d'apprécier la diversité se retrouvant à l'intérieur de ce troupeau. Étonnamment, des ribotypes identiques ont aussi été identifiés dans huit troupeaux distincts, alors que les deux pays échantillonnés partageaient quatre ribotypes communs, laissant croire

aux chercheurs que certaines souches de *C. perfringens* seraient ubiquitaires en production avicole et persisteraient dans le temps (72, 300). C'est aussi la conclusion à laquelle Craven et coll. étaient parvenus en démontrant que certains ribotypes de *C. perfringens* pouvaient être retrouvés sur une période d'échantillonnage de plusieurs mois, et que ces ribotypes pouvaient être observés à différentes étapes d'un système intégré de production, telles que dans des troupeaux reproducteurs, au couvoir et même jusque sur les carcasses de volailles échantillonnées à l'abattoir (80).

Des problèmes de dégradation de l'ADN par des endonucléases appartenant à la bactérie limitent quelques fois l'utilisation de techniques telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), faisant du ribotypage un outil de caractérisation intéressant pour *Clostridium* (198, 302). Malgré ces problèmes de dégradation d'ADN parfois rencontrés, de nombreux chercheurs ont eu recours au PFGE, ces dernières années, afin de réaliser des études épidémiologiques sur *C. perfringens*, et ainsi tenter de caractériser les souches associées à l'entérite nécrotique (46, 72, 102, 132, 196, 198, 301). Parmi les premières études publiées, Engström et coll. ont comparé les profils obtenus par PFGE à ceux générés par AFLP (amplified fragment length polymorphism), et en sont venus à la conclusion que les deux méthodes possédaient des pouvoirs de différenciation semblables pour les souches de *C. perfringens*. En effet, le nombre de sous-types ainsi que le groupement de ces sous-types étaient comparables pour les deux approches. La facilité d'interprétation des patrons de bandes générés par PFGE rendait cependant cette méthode plus attrayante (46, 303). Ils ont d'ailleurs pu démontrer que la diversité génétique observée pour *C. perfringens* était grande puisque plusieurs patrons ont été identifiés et ce, même si le nombre de souches

caractérisées pour chacun des lots était restreint. Cette étude a même démontré que le retrait des antibiotiques promoteurs de croissance ainsi que des anticoccidiens avait pour effet d'accroître la diversité des souches de *C. perfringens* dans les lots soumis à ce type de régime (46, 304). Et en comparant par PFGE des souches de *C. perfringens* isolées de lots de poulets de chair aux prises avec des problèmes d'entérite nécrotique à celles retrouvées chez des lots sains, Nauerby et coll. ont mis en évidence des différences significatives (198). Des 48 isolats provenant d'oiseaux sains, 25 pulsotypes différents ont été identifiés, et jusqu'à 5 pulsotypes différents pouvaient être retrouvés chez un même oiseau en santé âgé de 33 jours. A l'inverse, sur 208 isolats provenant de 46 oiseaux issus de 12 fermes différentes affectées par l'entérite nécrotique, l'analyse de diversité par PFGE a démontré que pour la majorité des lots, un seul pulsotype était identifié, et ce, même si jusqu'à 30 isolats provenant d'un même oiseau ont été caractérisés. Cette même observation a été rapportée par Gholamiandekhordi et coll., mais contredite par Johansson et coll. en ce qui concerne les lots affectés d'entérite nécrotique dans la forme sous-clinique (196, 301). Il a aussi été démontré qu'un traitement antibiotique chez les lots affectés par la maladie permettait de restaurer la diversité habituellement observée en l'absence d'entérite nécrotique (198). Les études de caractérisation génétique par PFGE ne sont par contre pas parvenues à faire le lien entre un pulsotype et un pathotype associé à l'entérite nécrotique (46, 102, 132, 196, 198, 301). Nauerby et coll. ont même montré qu'une souche de *C. perfringens* pouvait être identifiée comme le clone responsable d'entérite nécrotique dans un lot de poulets de chair, alors que sa présence était sans conséquence dans un lot parfaitement sain, soutenant l'hypothèse qu'une souche virulente de la

bactérie deviendrait pathogène en se retrouvant en présence de conditions favorables (198). C'est aussi ce que suggèrent les résultats de l'étude menée par Barbara et coll. où non seulement les souches de *C. perfringens* capables de causer l'entérite nécrotique posséderaient un avantage compétitif par rapport aux souches commensales, mais que ce niveau de compétitivité varierait même entre les souches virulentes. Cette capacité des souches pouvant causer l'entérite nécrotique à prendre préséance sur les souches commensales pourrait entre autres être expliquée par la production de composés tels que des bactériocines, mais aussi à des capacités d'adhésion supérieures, à une multiplication plus rapide, ou même à la production de toxines spécifiques et encore inconnues (131, 132).

En ayant recours au multi-locus sequence typing (MLST), Chalmers et coll. ont apporté un regard différent sur les souches de *C. perfringens* impliquées dans des cas d'entérite nécrotique (72). En fait, ils ont démontré que les souches isolées de troupeaux de poulets de chair issus de deux intégrateurs distincts avaient tendance à se regrouper en fonction de leur origine, laissant croire aux chercheurs que *C. perfringens* pourrait se disséminer tout au long de la chaîne de production chez un même intégrateur, et que les souches varieraient d'un intégrateur à l'autre, ce qui expliquerait pourquoi l'entérite nécrotique pourrait être plus problématique pour certains. La résistance à la bacitracine semblait aussi être corrélée avec le regroupement des souches. Dans les lots affectés par l'entérite nécrotique, les souches de *C. perfringens* isolées d'oiseaux atteints par la maladie se trouvaient dans les mêmes groupements que les souches provenant d'oiseaux sains du même lot, soutenant l'hypothèse que la seule présence d'une souche virulente est insuffisante pour déclencher un épisode

d'entérite nécrotique chez un oiseau et que la présence de facteurs prédisposants est essentielle (45, 72). La majorité des gènes codant pour les quelques 17 toxines produites par *C. perfringens* sont retrouvés sur de gros plasmides reconnus pour jouer un rôle majeur dans la virulence des souches. À la lumière des différentes études réalisées récemment, il apparaît évident que certains clones ou certaines lignées joueraient un rôle prédominant dû à une pathogénicité accrue (149). Dans l'étude menée par Lepp et coll., le séquençage du génome entier de sept souches de *C. perfringens* isolées de cas cliniques d'entérite nécrotique et d'une souche provenant aussi d'un cas clinique d'entérite nécrotique mais ayant été rendue avirulente suite à son isolement en laboratoire est venu corroborer ces hypothèses. Les souches étudiées possédaient entre deux et cinq plasmides dont la taille variait entre 45 et 150 kb. Sur certains de ces plasmides, la présence des trois loci, NELoc-1, NELoc-2 et NELoc-3 a été rapportée. Cette étude a aussi démontré que NELoc-2 et NELoc-3 pouvaient aussi être retrouvés sur une souche devenue avirulente, suggérant un rôle prédominant de NELoc-1, lequel contenant *netB*, dans la pathogénie de l'entérite nécrotique (24). Cependant, même en ne considérant que les souches virulentes portant le gène *netB*, Parreira et coll. ont montré que les différents plasmides retrouvés sur les souches pouvant causer l'entérite nécrotique présentaient une organisation complexe des loci de pathogénicité identifiés sur ces plasmides (59).

Le but de cette étude était donc de comparer deux protocoles d'élevage, un conventionnel et un combinant diverses stratégies alternatives en remplacement des antibiotiques, dans huit élevages industriels de poulets de chair au Québec. Les objectifs étaient ainsi de mesurer l'impact de chacun des traitements d'un point de vue économique, mais aussi mais aussi en lien avec la santé digestive des oiseaux et les populations de *C. perfringens* résidant dans les différents bâtiments suivis.

Chapitre 3. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

IMMUNOLOGY, HEALTH AND DISEASE

Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at farm level

Poultry Science, sous presse

M-L. Gaucher^{*#}, S. Quessy^{*}, A. Letellier^{*}, J. Arsenault[‡], M. Boulianne[#]

^{*}Research Chair in Meat Safety, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

[#]Chair in Poultry Research, Département de Sciences Cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

[‡]Swine and Poultry Infectious Disease Research Centre (CRIPA), Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

¹This work was supported by funding from the Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec (CDAQ).

²Corresponding author: Martine Boulianne

3.1 ABSTRACT

The use of antimicrobial agents as feed additives in poultry production is a public health concern due to the overall increase in antimicrobial resistance. Although some alternative products are commercially available, little is known on their potential impact on flock health and productivity. A prospective study involving 1.55 million birds was conducted on eight commercial broiler farms in Québec, Canada, to evaluate the impact of replacing antibiotic growth promoters and anticoccidial drugs by a drug-free program including improved brooding conditions, anticoccidial vaccination, essential oil-based feed additives and water acidification. Various productivity and health parameters were compared between barns allocated to the conventional and the drug-free program. Zootechnical performances were monitored as productivity criteria. Clinical necrotic enteritis and subclinical enteritis occurrences, litter and fecal moistures content were measured, microscopic gut health was evaluated. *C. perfringens* and *Campylobacter spp.* strains were recovered from fecal samples collected during farm visits. *C. perfringens* counts were used as poultry health indicators and *Campylobacter* prevalence was noted as well. The drug-free program was associated with significant increase in feed conversion ratio and decrease in mean live weight at slaughter and in daily weight gain. An increased incidence of necrotic enteritis outbreaks and subclinical enteritis cases, as well as an increase in litter moisture content at the end of the rearing period were also observed for this program. Mean microscopic intestinal lesion scores and prevalence of *Campylobacter* colonization were not statistically different between the two groups but the drug-free program was associated with higher *C. perfringens* isolation rates. According to the current study design, results suggest that substitution of antibiotic

growth promoters and anticoccidial drugs by a drug-free program impacts various broiler chicken production parameters and *C. perfringens* carriage levels.

Key words : broiler chicken, drug-free, growth performance, gut health, *C. perfringens*

3.2 INTRODUCTION

The benefits of antibiotics used as growth promoters (AGPs) were discovered during the 1940's and has largely contributed to the rapid expansion of the poultry industry worldwide (Dibner et coll., 2005; Niewold, 2007). AGPs are recognized to contribute to the establishment of a healthy and functional intestinal tract, allowing, in part, poultry producers to obtain maximum benefits of the high-yield broilers' genetics (Cooper et al., 2013; Danzeisen et al., 2011; Huyghebaert et al., 2011). However, early in the use of antimicrobial agents in animal feed, concerns were expressed about the possible development of resistant bacteria (Dibner et al., 2005). In the last two decades, many aspects of antimicrobial use, including long-term sub-therapeutic usage in intensively reared food-producing animals, have been identified to contribute to the development and spread of resistant bacteria (Aarestrup et al., 2000; Aarestrup et al., 2001; Asai et al., 2007; McDermott et al., 2002; Shea, 2004). Evidences from many studies suggest that bacteria carrying antibiotic resistance genes can be transmitted from animals to humans (Folster et al., 2012; Luangtongkum et al., 2006; Sahin et al., 2012; Tremblay et al., 2011; White et al., 2002). Based on these results and in line with the precautionary principle, the European Union Commission banned the use of antibiotic growth promoters in animal feed in 2006 (Castanon, 2007). Moreover, the World Health Organization concluded in 2014 that the use of antimicrobial agents as feed additives in agricultural animals was a public health issue and that an urgent global coordinated action plan was needed to reduce the use of these compounds in animal husbandry, as many antimicrobial agents used in farm animal production are also used to treat important human infections (WHO, 2014). An increasing pressure is now arising from

the medical and veterinary communities, the regulatory agencies and the consumers to reduce or eliminate antibiotics in the feed of food-producing animals (Dibner et al., 2005; Engster et al., 2002; Sun et al., 2005). The use of AGPs will likely become more restricted in the future, and the poultry industry will have to face this challenge. In Canada, poultry production is not yet under this legislative framework. However, for Canadian producers who want to produce drug-free broiler chickens, and as opposed to the European countries where anticoccidial ionophore inclusion in broiler feed is permitted, both antimicrobials and anticoccidial drugs are forbidden according to the current legislation. This situation represents a greater challenge to the poultry industry as coccidiosis represents a major predisposing factor for the occurrence of necrotic enteritis (Dibner et al., 2005; Huyghebaert et al., 2011; Timbermont et al., 2011; Van Immerseel et al., 2009).

Interest from the scientific community has been growing towards the identification of new non-antibiotic alternatives to improve bird performances and also to prevent colonization by zoonotic pathogens of human health importance, such as *Campylobacter jejuni* whose infections in humans from industrialized countries are exceeding those of *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* infections combined (Allen et al., 2011; Amerah et al., 2012; Hardy et al., 2013; Hume, 2011; Luangtongkum et al., 2006; O'Bryan et al., 2008; Rosenquist et al., 2013). Some of the replacement products such as organic acids, essential oils, herbs, probiotics and prebiotics have been found to be variably effective to control these pathogens, but none of these alternatives has been proven as efficient as AGPs in maintaining high production yields and controlling necrotic enteritis (Niewold, 2007). To date, there are no reports on the effect of a

combination of these products on economic and health conditions in commercial field trials and despite the increasing trend of non-conventional rearing practices in broiler chickens, still little is known on the consequences associated with it (Smith, 2011).

The main objectives of this study were then to evaluate the impacts, at the flock level, of raising broiler chickens under a drug-free program including non-antibiotic alternatives. Various parameters such as necrotic enteritis incidence, microscopic gut lesion scoring, litter and feces moisture content, zootechnical performance data and *Clostridium perfringens* occurrence and *Campylobacter jejuni* flock status were selected in order to monitor the impact of the drug-free program application.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Study Design. A prospective study was conducted on eight poultry farms with two identical 2 to 6 pen-barns for 6 consecutive producing periods as per the Canadian quota system.

3.3.2 Farm Selection. Farms (designated 1 to 8) were selected within a radius of 150 km from the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal among voluntary producers. Farms with two adjacent barns, similar in terms of dimensions, construction, equipments and management practices and employees with the same chick, feed and water supply were eligible for the study. Litter management also had to be identical for both barns and fresh bedding material had to replace the used litter for each new flock produced in every participating barn. On each farm, the conventional and drug-free programs were randomly assigned and maintained throughout the duration of the study. Only male broiler flocks at minimum and maximum values of stocking densities of 26

kilograms per square meter of pen floor (kg/m^2) and 31 kg/m^2 and with a maximum number of 20 000 birds per barn for all the 16 barns were to be produced over the study period. By entering this study, participants voluntarily agreed to comply with the experimental protocol, collecting data for the duration of the project, and also attending a training session for that purpose. A compensation calculation method was accepted by the producers to cover for any possible economical losses, with drug-free barn being compared to its conventional counterpart on the same farm.

3.3.3 Conventional Rearing Protocol

The conventional protocol consisted in raising broiler chickens by adding antibiotic growth promoters and anticoccidial drugs in the feed as prescribed by the veterinarian. No specific recommendations pertaining to water acidification and brooding were given. This control group followed the conventional management practices as per their feedmill and hatchery guidelines. Note that most protocols are modeled on Ross and Cobb management handbooks (Aviagen, 2013; CoBB-Vantress, 2013)

3.3.4 Drug-free program

The drug-free program consisted in raising chickens with no antimicrobials and no anticoccidial drugs added to the feed or to the drinking water and replaced by 3 commercially available essential oil based alternatives recognized for their beneficial effect on digestive health in the literature and also identified as the poultry industry leading practices in Québec. Anticoccidial vaccination at the hatchery, use of one of three selected essential oil-based feed alternatives, drinking water acidification and optimized brooding conditions were used in combination.

3.3.4.1 *Coccidiosis Vaccination.* An anticoccidial vaccine (Coccivac ® B, Schering Plough) was administered to chicks destined to the drug-free barn via spray cabinet at the hatchery (Peek et al., 2011). A pink dye was present in the vaccine solution.

3.3.4.2 *Feed and Feed Supplements.* Because specific nutritional factors are recognized to predispose to necrotic enteritis, feed composition of the drug-free barn was established (Cooper et al., 2009). One of three commercially available essential oil-based products in replacement of AGPs was added to the feed intended for use in the drug-free barn (Boulianne, M., unpublished data). These products were mixed by an independent feedmill, bagged and designated as premixes one, two and three (Oleo 10X-Oleo 500E, Probiotech, International Inc. Québec, Canada, Proteos Galleos, Substancia Inc., Québec, Canada, Biomin PEP, Biomin, Herzogenburg, Austria). Producers and people involved in the study were blinded to product allocation to minimize any potential bias. Their distribution to the participating feedmills was done respecting a random distribution over farms and time. Also, feed composition was standardized for all participating farms fixing maximum and minimum inclusion rates for the different feed ingredients (National Research Council (USA). Subcommittee on Poultry Nutrition, 1994) (Table 1).

3.3.4.3 *Water Quality.* A commercial product made of an organic and inorganic acid blend (Jefacid®, Jefo, Québec, Canada) was added to the drinking water to reach a pH value of four throughout the rearing period.

3.3.4.4 *Optimized Brooding Conditions.* Specific recommendations were given for the first four days of the rearing period. For every participating barn, a chick comfort zone was delimited according to the heating system type and drinker disposition, in order to

ensure optimum heating, feeding and drinking conditions. For every flock, pen floors were covered with at least three to four inches of fresh bedding material and house pre-heating was done at least 24 hours prior to chick placement. It was recommended that for each pen, two fans be kept operating (at minimal speed) 24 hours a day, to ensure noxious gas elimination. Water lines were cleaned, sanitized and flushed before placement and flushed daily afterwards. Additional paper feeders and feed boxes were added at a rate of one per 50 to 75 chicks to the comfort zone floor and were regularly top dressed with new feed during the brooding period. New light bulbs were provided to ensure appropriate lighting conditions (60 to 100 lux) directly above feeders and drinkers for the first 48 hours. Chick cloacal body temperatures were monitored 24 hours post-delivery and the comfort zone ambient temperature was adjusted accordingly. Chicks were visited by the participating producer three to four times during the first 24 hours following placement to stimulate activity, as well as feed and water consumption (Palliyeguru et al., 2014). Crop filling was measured 24 hours after placement to evaluate feed consumption and brooding conditions were adjusted correspondingly.

3.3.5 Study Conduct and Data Collection

3.3.5.1 Data Collection. Various data were collected by the participating poultry producers. Zootechnical performances were provided by the slaughter house and included percentage livability, feed conversion ratio, average live weight, age at slaughter, total condemnation percentages at slaughter, kilogram of broilers produced per square meter.

Cloacal temperatures and body weights at time of placement were also measured for 50 chicks per barn. Water pH and chlorine values were monitored daily for both barns.

3.3.5.2 Farm Visits. For each producing period, all participating barns were visited three times: 24 hours post-delivery, three weeks of age and on the day of shipping, for both types of participating barns. For the 24 hour visit, as chicks were evenly distributed between the test and the control barns, since placement was done simultaneously for both barns, for every producing period, various parameters such as quality of anticoccidial vaccination based on the percentage of chicks with presence of pink dye on the head, crop filling and cloacal temperature were monitored. Results from the 24 hour-visits will not be presented in this paper. A second visit was done when birds were three weeks of age. Each floor was divided in four longitudinal parallel rows corresponding to the walking path of the sampler. Up to ten samples were collected. For every pen, approximately 30 g of a pooled sample of fresh feces and 30 g of a pooled sample of litter were randomly collected on each floor surface and put into a Whirlpack® bag for relative moisture content analysis. Hermetically sealed bags were stored at 4°C until time of analysis. Another 10 g of a pooled sample of fresh feces from each pen was collected the same way and put into *Brucella* broth freezing media (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) with 30% glycerol (Fisher Scientific, NJ, USA) for microbiological analysis. Bags were kept on ice and brought back to the laboratory. For microscopic lesion score establishment, six clinically normal looking birds, representative of the flock status, were randomly selected in each barn and necropsied directly on the farm to collect a segment of the duodenum and jejunum-ileum junction (approximately two centimeters proximal and distal to the Meckel's diverticulum) which was immediately preserved in 10%

phosphate-buffered formalin. Another visit was conducted if an increased mortality rate was observed by the producer. Necropsies were then performed on moribund and dead birds. (Abildgaard et al., 2010a; Cooper et al., 2013). Finally, birds were visited on the day before slaughter and fecal sampling was repeated. When visited at the end of the rearing period, the presence of subclinical enteritis was assessed using the following definition: lack of uniformity in birds, liquid droppings, and a humid and caked litter that was qualified as such when upon squeezing a handful, it would remain shaped or excess liquid content would leak (Abildgaard et al., 2010a).

3.3.6 Laboratory Analysis

3.3.6.1 Moisture Content Analysis. Each fecal and litter sample was homogenized and individually tested. Five Grams were weighed and analyzed by a rapid desiccation (Miles et al., 2011) method with a moisture analyzer (Denver IR120 Moisture Balance, Laboratory Instrument Specialists, CA, USA). In order to use a single value for the analysis, mean fecal and litter moisture content values, including the values found for every pen of a barn, were calculated for each period of the study.

3.3.6.2 Microscopic Analysis of Digestive Tracts. Intestinal segments were fixed for at least 48 hours in 10% phosphate-buffered formalin for histological scoring according to Gholamiandehkordi et al., but with some modifications as certain evaluation criteria were not considered (2007). Digestive tract samples were removed from phosphate-buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of approximately four μm were cut and stained with haematoxylin and eosin. Periodic Acid Schiff staining was also used for

goblet cell visualization (Forder et al., 2007; Gholamiandehkordi et al., 2007; Teirlynck et al., 2011). Histological analysis of the intestinal samples was done using standard light microscopy (BX51, Olympus Optical Co., Ltd, Japan), a camera (QImaging, QiCAM, Fast 1394, Surrey, BC, Canada) and a computer-based image analysis system (Image Pro Plus, v7.0, Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA). Villi fusion, presence of coccidia, presence of bacteria, necrotic debris and capillary congestion were the five different parameters used to establish a microscopic lesion score by adding up the results of each parameter for a specific bird and then for each flock (see table 2). A mean microscopic intestinal lesion score was established for both treatments.

3.3.6.3 Isolation and Identification of *Clostridium Perfringens* Strains. For each pooled fecal sample collected during visits at three weeks of age and before slaughter, an enrichment and a direct plating isolation protocols were used. For the enrichment protocol, one milliliter of the fecal samples kept in *Brucella* broth freezing media and glycerol was cultured in Cooked Meat broth (Oxoid) for 48 hours at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). Ten µL were inoculated on 5% sheep blood anaerobic *Brucella* agar plates with neomycin (Oxoid, Canada), incubated in anaerobic conditions at 37°C for 48 hours. For each sample, the identity of all suspect colonies showing typical beta-hemolysis was confirmed by Gram staining and by the reverse CAMP test (Chalmers et al., 2008). Fecal samples were also submitted to a direct plating protocol. Again, one milliliter of the fecal samples kept in *Brucella* broth freezing media and glycerol was inoculated on *Perfringens* Agar Base media (LAB M, UK) plates containing 5% egg yolk emulsion and 400 mg/L of D-cycloserine as a selective agent (LAB M, UK). Plates were then incubated

in anaerobic conditions at 37°C for 48 hours. Bacterial growth from the last quadrant was streaked on 5% sheep blood anaerobic *Brucella* agar plates with neomycin (Oxoid, Canada), and grown in anaerobic conditions at 37°C for 48 hours. As for the first protocol, all suspect colonies showing typical beta-hemolysis were selected and their identity was confirmed by the reverse CAMP test. Strains isolated from both isolation protocols were summed up for each fecal sample. Recovered strains were frozen in *Brucella* broth (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) freezing media containing 30% glycerol (Fisher Scientific, NJ, USA) at -80°C for further characterization.

3.3.6.4 Isolation and Identification of *Campylobacter* Strains. One loopful of fecal material was directly plated on modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar (mCCDA) Preston (Oxoid, Ontario, Canada), and incubated at 42°C for 48 hours in a microaerobic atmosphere using Oxoid's Atmosphere Generation System with the *Campylobacter* gas generation kit. Typical colonies were identified and purified on mCCDA Preston (Oxoid) and subsequently on blood agar (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario). Each isolate was identified by Gram staining and then frozen at -80°C in *Brucella* broth freezing media containing 30% glycerol (Thibodeau et al., 2011). Confirmation of strain identity was performed at a later time and was done by PCR according to the protocol published by Persson and Olsen, 2005 (Persson et al., 2005).

3.3.7 Statistical Analysis

The statistical unit was the flock in all analyses. A mixed linear regression was used to model each of the various zootechnical performance, moisture and microscopic

intestinal lesion score indicators as outcome with treatment included as a fixed effect. Each model accounted for repeated measures (i.e. multiple flocks) within barns and also included the farm as a random effect. Two correlation structures were tested for the repeated measures: compound symmetry (CS) and first-order autoregressive (AR(1)), and one was selected based on the Akaike's Information Criterion (AIC) (Dohoo et al., 2010; Emborg et al., 2001). Residuals were visually assessed for normality and homogeneity of variance. To improve model fit, the livability and percentage of condemnation were log-transformed. Least square means were used to present results (which were back-transformed on their original scale for log-transformed variables).

For dichotomous outcome variables (i.e. *Campylobacter jejuni*, necrotic enteritis and subclinical enteritis status), a logistic regression model was first built with treatment included as a fixed effect and farm as a random effect. Predicted probabilities of the outcome variable for each treatment were used to present the results. However, for clinical necrotic enteritis and subclinical enteritis, no convergence of the model was reached due to the absence of cases in one of the treatment group. Thus, an exact chi-square was used to estimate the effect of the treatment on their occurrence.

For *Clostridium perfringens* counts, a Poisson regression model was first built with treatment included as a fixed effect and farm as a random effect. However, due to poor fit of this model based on the ratio of the generalized chi-square over degrees of freedom, a negative-binomial model with log link was used. Predicted counts for each treatment were used to present the results.

3.4 RESULTS

3.4.1 Farm Study Summary

The study was conducted from May 2011 to July 2012 and lasted 14 months. All farms were part of the study for the six originally planned production periods, with the exception of one participating producer who decided to withdraw from the study after four production periods as his farm was experiencing recurrent clinical necrotic enteritis outbreaks. Five randomly selected participating farms were allowed to extend the project for an extra production period for financial reasons. A total of 51 flocks produced under the drug-free program were compared to 51 paired-flocks conventionally-raised. All birds were housed in a two- or three-storey barn. Results pertaining to the total number of birds involved in the study and mean flock size are presented in Table 2. All the chicks involved in the study were injected at the hatchery either with Ceftiofur® or Linco-Spectin®. For the conventional flocks, four different antibiotics and eight anticoccidials were added in rotation to the feed: bacitracin, tylosin, virginiamycin, bambarmycin, roxarsone, salinomycin, decoquinate, narasin, nicarbazin, maduramicin, clopidol and monensin.

3.4.1.1 Water Quality. The drinking water pH and chlorine values were noted daily (Table 2).

3.4.1.2 Performance Data. Livability, age at time of slaughter and percentage of total condemnations were not significantly affected by implementation of the drug-free program (Table 3). However, drug-free broiler chicken flocks presented a significant decrease of 0.05 kilograms of mean live weight at time of slaughter, a lower daily weight

gain (2.05 grams per day), a 0.06 increase in feed conversion ratio, a mean decrease of 1.48 kilograms produced per square meter.

3.4.1.3 *Subclinical Enteritis Incidence and Clinical Necrotic Enteritis Outbreaks.*

A barn was identified affected by clinical necrotic enteritis when one or many of the following criteria were observed: a sudden increase in mortality, presence of moribund birds, bloody droppings on the floor at time of visit with necropsied birds presenting typical macroscopic necrotic enteritis lesions. Once diagnosed, a clinical NE outbreak in a drug-free flock was immediately treated with essential oil-based products (Aqua-Rush Probiotech, International Inc. Québec, Canada) via the drinking water. Flock health status was then monitored on a daily basis by the veterinarian in charge of all the clinical follow-up in this study, and treatment continued until complete recovery.

Application of the drug-free program in test barns was correlated with a significantly higher incidence of clinical necrotic enteritis outbreaks, as well as an increased prevalence of subclinical enteritis. While 27.4% of the drug-free flocks experienced a clinical necrotic enteritis outbreak and 49.0% developed subclinical enteritis as per our definition, no conventional flock had enteritis-related clinical signs. It is noteworthy to mention that from the eight participating farms, recurrent necrotic enteritis outbreaks were observed for all drug-free flocks from two specific farms. Antibiotic therapy with penicillin was used in 2 of these NE-affected flocks (3.52% of the total produced drug-free flocks), once on each affected farm, to control severe NE outbreaks and avoid further NE-associated complications.

3.4.1.4 Litter and Fecal Moisture Content. A total of 741 fecal and litter samples from 102 flocks were processed, analyzed and a mean value was calculated for every flock. Statistical results showed that only the moisture content of litter samples collected prior to slaughter was higher in the drug-free flocks (Table 3).

3.4.1.5 Microscopic Intestinal Lesion Score. A total of 270 birds (with an average of nearly 3 birds per flock) were evaluated. Analysis demonstrated that the drug-free program had no statistically significant effect on the mean microscopic intestinal lesion score of birds submitted to this treatment.

3.4.1.6 Isolation and Identification of *Clostridium Perfringens* and *Campylobacter Strains*. The prevalence of *Campylobacter jejuni* positive flocks was not statistically significant different ($p=0.33$) between drug-free flocks (22%) and the conventionally-reared ones (15%). However, the drug-free program was found to influence *Clostridium perfringens* isolation rate as the mean number of strains recovered per flock was 13.1 for the drug-free barns and 8.5 for their comparative conventional barns ($p=0.02$).

3.5 DISCUSSION

Since concerns are regularly raised with the use of AGPs in food-producing animals, many efforts have been made to identify new strategies (Collignon, 2013; Hume, 2011; Huyghebaert et al., 2011; Mathlouthi et al., 2012; Patterson et al., 2003; Shea, 2004; Smith, 2011; Stanton, 2013; van den Bogaard et al., 2000; Verstegen et al., 2002; Walsh et al., 2008; Wegener, 2003). Even if different AGP replacement products have been tested, very few studies assessing the impact of an approach combining several

of these in commercial poultry production conditions are available in the scientific literature (Graham et al., 2007; Smith, 2011). In this study, different performance parameters were selected to evaluate the influence of the application of a drug-free program, including various strategies, in commercially-raised broiler chicken flocks.

The performance results of our field study contrast with those presented by Graham et al. (Graham et al., 2007) in an economic analysis with large-scale empirical data collected by the US broiler industry. By comparing differences in mortality rates, average weight gain, feed conversion ratio and total condemnations, they estimated that AGPs use in poultry production was associated with economic losses to producers as the performance gains resulting from growth promoters were not sufficient to offset the cost of the antibiotics. In the current study, the mean final weight of the drug-free groups was 50 g lesser or 2.06% inferior to the conventional chickens with a 0.06 unit or 3.37% increase in the feed conversion ratio. This affected the daily weight gain which was reduced by 3.15% (two grams) for the drug-free groups. These results are in accordance with previously published data estimating that AGP withdrawal was associated with a significant decrease in final body weight as well as an increased feed conversion ratio (Butaye et al., 2003; Emborg et al., 2001; Engster et al., 2002; Smith, 2011). In our study, the 3.37% increase in the feed conversion of the birds raised under the drug-free program, which is slightly higher than what is reported in other European studies, could be explained by the fact that anticoccidial ionophores, recognized to have an antibacterial effect on Gram-positive bacteria, are currently used in the European countries, probably enabling a better control of the adverse effects of *Clostridium perfringens* on gut health

and performances (Allen et al., 2002; Cooper et al., 2009; Porter, 1998; Van Immerseel et al., 2004).

One plausible explanation for the relatively lower performance loss observed in our study when compared to others (Butaye et al., 2003; Emborg et al., 2001; Engster et al., 2002; Smith, 2011) could be the use of an anticoccidial vaccination. This vaccination has been shown to offer a protective effect for NE, to reduce the severity of lesions as well as mortality associated with NE (Bangoura et al., 2014; McReynolds et al., 2004; Tsiouris et al., 2013; Williams et al., 2003). Anticoccidial vaccination has also been recognized to reduce the effects of *Eimeria* or *Clostridium perfringens* infections on weight gain (Bangoura et al., 2014). Essential oil-based products added to the feed of our drug-free flocks might also have helped maintaining growth performances (Bravo et al., 2014; Cerisuelo et al., 2014; Mathlouthi et al., 2012; Tiihonen et al., 2010). Early feeding, which was achieved by optimization of the brooding conditions in this study, could also have contributed to maintain growth performances as well as promoting the development of stronger immune function (Ao et al., 2012; Bigot et al., 2003; Dibner, 1998; Gonzales et al., 2003; Halevy et al., 2000). On the other hand, the overall effect of organic acid inclusion in the drinking water in our study is not clear but we can hypothesize that a low water pH, with its antibacterial effect, improved water quality (Adil et al., 2010; Allaart et al., 2013; Che et al., 2012; Hernandez et al., 2006). However, it is not possible from the results of this study to assess the relative contribution of each element of the drug-free program in reducing the impact associated to the withdrawal of antibiotic growth promoters and anticoccidials.

In the current study, statistically significant differences were not found for flock livability parameter between both treatments. This could be attributed to the lower total mortalities in drug-free flocks not experiencing clinical necrotic enteritis when compared to their conventional controls, but also the fact that NE-affected flocks were rapidly treated with essential oil-based products upon onset of disease, thus limiting the losses due to NE-related mortalities. Similar results were presented in two studies evaluating the impact of AGP removal in commercial broiler flocks. Emborg et al., in a Danish retrospective study (November 1995 - July 1999) following AGP ban and including 6815 flocks from 575 different barns and 237 farms, reported a consequent reduction in mortality rates in AGP-free broiler flocks over time (Emborg et al., 2001). A second study evaluating the impact of AGP removal in a 3-year field trial in the United States and published by Engster et al. in 2002, reported an average livability sometimes negatively, sometimes positively affected by AGP removal, but with an overall slight 0.17% increase for this parameter. Engster et al. also reported that total plant condemnation rates were not affected by AGP withdrawal, just as it was observed in the current study (Engster et al., 2002). This result could partially be attributed to the use of acidified drinking water, although in the scientific literature, contradictory information can be found depending on the nature and the way of application of the organic acids tested (Adil et al., 2010; Chaveerach et al., 2004; Che et al., 2012; Geier et al., 2010; Hernandez et al., 2006). This could also be linked to the fact that raising broiler chickens without antimicrobial feed additives was not associated with an increased incidence of *Escherichia coli* infections, clostridial dermatitis, hepatitis and cholangiohepatitis or other infectious conditions enhancing total condemnations at slaughter (Lovland et al.,

2001; Marin-Flamand et al., 2014; Williams, 2002). Gangrenous dermatitis, a skin condition usually associated with Gram-positive organisms such as *Clostridium*, also often shows an increased incidence when AGPs are removed. Again, this condition was absent from our drug-free flocks. It is noteworthy that a live anticoccidial vaccine was used in all drug-free flocks and that an association between the use of such vaccine and a decreased incidence of gangrenous dermatitis has been reported (Gladys, 2009; Phillips, 2008; Roney, 2008).

Within the 51 drug-free flocks produced in the current study, fourteen flocks (27,4%) experienced a clinical necrotic enteritis outbreak and 25 flocks (49,0%) showed subclinical enteritis. Reported prevalences for both clinical presentations vary widely among studies and data on infection prevalences are scarce (Gholamiandekhordi et al., 2006). In his paper, when both forms of the disease are considered together, Smith reports prevalences of NE between 30% and 50% for drug-free flocks (Lanckriet et al., 2010; Smith, 2011). As all antibiotic use is prohibited in drug-free poultry flocks based on the Canadian legislation, a close clinical follow-up was performed in our study. When a clinical necrotic enteritis outbreak was diagnosed, an alternative treatment with essential oil-based commercial products was quickly established (Dorman et al., 2000; Jerzsele et al., 2012; McReynolds et al., 2009). Even if these products have been shown to improve gross and histological lesion scores in different experimental trials reproducing necrotic enteritis, we observed that they do not control necrotic enteritis outbreaks in field conditions as efficiently, economically and rapidly as antibiotics do (Cross et al., 2007; Jerzsele et al., 2012; Mitsch et al., 2004; Timbermont et al., 2010). Since treatment response was slower by a few days in sick flocks, this inevitably affected

daily weight gains, feed conversion ratios and final weights of the drug-free groups. Very few studies aiming at demonstrating this reality have been published so far, most of the scientific reports presenting the positive effects of essential oils on preventing a *Clostridium perfringens* challenge rather than against an already established clinical disease (Mathlouthi et al., 2012; Mitsch et al., 2004; Si et al., 2009; Timbermont et al., 2010). Despite a strict application of the drug-free program, efforts made to improve hygienic conditions and management practices, recurrent clinical outbreaks were observed for every drug-free flock on two participating NE-affected farms for the entire duration of the study. This result contrasts with the reported seasonal trend of the disease, with reported peaks in late winter and early spring months (Smith, 2011). Antibiotic therapy used in two severely NE-affected flocks, though it has probably influenced performances and mortality rates, didn't seem to have an impact on the recurrence of the outbreaks.

Litter moisture control was an ongoing challenge in this field study and the statistically significant results regarding the influence of the drug-free program on this parameter speak for themselves. Increased moisture was a problem mainly related to the last two weeks of the rearing cycle. According to different publications, wet litter is often linked to an altered digestive function and is often identified as a consequence of the clinical and subclinical forms of necrotic enteritis. This is our primary hypothesis to explain the higher litter moisture in our drug-free flocks at the end of the growing period (Abildgaard et al., 2010b; Barri et al., 2011; Cooper et al., 2009; Smith, 2011; Teirlynck et al., 2011; van der Hoeven-Hangoor et al., 2013). Wet litter is not only associated with secondary health problems in poultry flocks such as footpad dermatitis, cellulitis and

animal welfare, but can also influence the bacterial community found within a specific house (Abildgaard et al., 2010b; Schrader et al., 2004; Shepherd et al., 2010; van der Hoeven-Hangoor et al., 2013). Other studies showed that wet poultry litter harbors approximately three times the bacterial load of its dry equivalent, is more dynamic over time, and presents higher amounts of low G+C content Gram-positive bacteria, those including species such as *Clostridium perfringens* (Dumas et al., 2011; Wadud et al., 2012). Moreover, because wet litter tends to form a microaerophilic to an anoxic environment, it might promote growth, survival and transmission of *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens*. For *Clostridium perfringens*, this higher litter moisture content might potentially have encouraged persistence of pathogenic strains over time and have been associated with the recurrent clinical necrotic enteritis outbreaks and the higher *Clostridium perfringens* counts observed in our drug-free barns (Dumas et al., 2011; Kassem et al., 2010; Lovanh et al., 2007; Newell et al., 2003; Palliyeguru et al., 2014). However, our results showed that the increased litter moisture content observed in drug-free flocks was not associated with a greater prevalence of *Campylobacter jejuni* positive flocks. Application of the drug-free program was not associated with a decreased prevalence of *Campylobacter jejuni* positive flocks either, even though some of the replacement products included in this program have been recognized to exert action on *Campylobacter jejuni* control (Chaveerach et al., 2004; Grilli et al., 2013; van Alphen et al., 2012).

Analysis of our results showed no statistically significant difference between the microscopic intestinal lesions scores found for our conventional and our drug-free flocks. As clinically normal looking chickens were randomly selected within the flock during

each farm visit, the likelihood of selecting birds with lesions at necropsy was decreased. A live anticoccidial vaccine was also used for all drug-free flocks, this approach having been associated with lower *Clostridium perfringens* counts, reduced severity of lesions as well as decreased mortalities associated with necrotic enteritis (Bangoura et al., 2014; McReynolds et al., 2004; Tsiouris et al., 2013; Williams, 2005; Williams et al., 2003). Numerous reports can be found on the antibacterial effects of essential oil components such as thymol, carvacrol, eugenol, rosemary, oregano, geraniol, cinnamaldehyde and curcumin on pathogenic bacteria (Fu et al., 2007; Mathlouthi et al., 2012; Mitsch et al., 2004; Penalver et al., 2005; Sokovic et al., 2010; Thapa et al., 2012). In an experimental trial, Mitsch et al. found that essential oil components added to poultry feed significantly reduced *Clostridium perfringens* intestinal counts as well as lesion severity and mortalities associated with necrotic enteritis. Organic acids added to the feed or to the drinking water are also recognized to have an effect on *Clostridium perfringens* growth in the intestine without, however, influencing the intestinal micro-architecture (Adil et al., 2010; Allaart et al., 2013; Geier et al., 2010; Golder et al., 2010; Kaldhusdal et al., 1999; Si et al., 2007). Scientific literature supported our hypothesis that these products may contribute to mitigate NE risks in drug-free flocks. Indeed, a reduced population of *Clostridium perfringens* in the gut shows a positive correlation with lower NE incidence, improved gut health, better nutrient absorption and ultimately, better performances (Abildgaard et al., 2010a; Collier et al., 2003; Garces-Narro et al., 2013; Kaldhusdal et al., 1999; Mitsch et al., 2004). However, these benefits may not be sufficient to prevent severe NE outbreaks as well as the subclinical form of the disease on some poultry farms.

Our results show that it is possible to commercially raise broiler chickens using a drug-free program in the Canadian production system. However, it appears to be associated with reduced performance results, as well as with a higher risk of experiencing gut health problems such as clinical necrotic enteritis and subclinical enteritis for certain farms. Previous studies have shown that barn conditions seem to largely influence the microbial community found inside these barns (Dumas et al., 2011). Thus, considering that necrotic enteritis could have significantly contributed to the impaired production performances observed in this field study, it would represent an interesting avenue to take a closer look at the different *Clostridium perfringens* strains initially found in the participating farms and see how the application of the alternative protocol as well as the recurrent necrotic enteritis outbreaks seen might have influenced *Clostridium perfringens* population diversity.

3.6 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the chicken producers, the Éleveurs de Volailles du Québec, the Association des Abattoirs Avicoles du Québec, the Association Québécoise des Industries Animale et Céréalière and the Association des Couvoiriers du Québec for their kind collaboration. This study was supported by grants from the Canadian Agricultural Adaptation program of Agriculture and Agri-Food Canada (CDAQ #6466) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#PCIPJ 412247-10). We thank Geneviève Langevin-Carpentier, Éric Parent and Alexandre Quesy for their technical assistance and Huguette Mallet for editing the references.

3.7 REFERENCES

Aarestrup, F. M., Y. Agerso, P. Gerner-Smidt, M. Madsen, and L. B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:127-137.

Aarestrup, F. M., A. M. Seyfarth, H. D. Emborg, K. Pedersen, R. S. Hendriksen, and F. Bager. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2054-2059.

Abildgaard, L., O. Hojberg, A. Schramm, K. M. Balle, and R. M. Engberg. 2010a. The effect of feeding a commercial essential oil product on *Clostridium perfringens* numbers in the intestine of broiler chickens measured by real-time PCR targeting the alpha -toxin-encoding gene (plc). *Anim. Feed Sci. Technol.* 157:181-189.

Abildgaard, L., T. E. Sondergaard, R. M. Engberg, A. Schramm, and O. Hojberg. 2010b. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 144:231-235.

Adil, S., T. Banday, G. A. Bhat, M. S. Mir, and M. Rehman. 2010. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary medicine international* 2010:479485.

Allaart, J. G., A. J. A. M. v. Asten, and A. Grone. 2013. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36:449-464.

Allen, P. C., and R. H. Fetterer. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:58-65.

Allen, V. M., A. M. Ridley, J. A. Harris, D. G. Newell, and L. Powell. 2011. Influence of production system on the rate of onset of *Campylobacter* colonisation in chicken flocks reared extensively in the United Kingdom. *Br. Poult. Sci.* 52:30-39.

Amerah, A. M., G. Mathis, and C. L. Hofacre. 2012. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* heidelberg. *Poult. Sci.* 91:943-947.

Ao, Z., A. Kocher, and M. Choct. 2012. Effects of dietary additives and early feeding on performance, gut development and immune status of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25:541-551.

Asai, T., K. Harada, K. Ishihara, A. Kojima, T. Sameshima, V. Tamura, and T. Takahashi. 2007. Association of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food-producing animals with antimicrobial use on farms. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60:290-294.

Aviagen. 2013. Ross PS Management Handbook. http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_PS/Ross_PS_Handbook_2013_i-r1.pdf.

Bangoura, B., A. A. Alnassan, M. Lendner, A. A. Shehata, M. Kruger, and A. Dauschies. 2014. Efficacy of an anticoccidial live vaccine in prevention of necrotic enteritis in chickens. *Exp. Parasitol.* 145c:125-134.

Barri, A., and d. S. Smet. 2011. Clostridial enteritis - a continuing challenge for the poultry sector. *Poultry: MENA* 33:111.

Bigot, K., S. Mignon-Grasteau, M. Picard, and S. Tesseraud. 2003. Effects of delayed feed intake on body, intestine, and muscle development in neonate broilers. *Poult. Sci.* 82:781-788.

Bravo, D., V. Pirgozliev, and S. P. Rose. 2014. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *J. Anim. Sci.* 92:1531-1536.

Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:175-188.

Cerisuelo, A., C. Marin, F. Sanchez-Vizcaino, E. A. Gomez, J. M. de la Fuente, R. Duran, and C. Fernandez. 2014. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers. *Poult. Sci.* 93:599-606.

Chalmers, G., S. W. Martin, D. B. Hunter, J. F. Prescott, L. J. Weber, and P. Boerlin. 2008. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet. Microbiol.* 127:116-127.

Chaveerach, P., D. A. Keuzenkamp, L. J. Lipman, and F. Van Knapen. 2004. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poult. Sci.* 83:330-334.

Che, T. M., O. Adeola, M. J. Azain, S. D. Carter, G. L. Cromwell, G. M. Hill, D. C. Mahan, P. S. Miller, and J. E. Pettigrew. 2012. Effect of dietary acids on growth performance of nursery pigs: a cooperative study. *J. Anim. Sci.* 90:4408-4413.

CoBB-Vantress. 2013. CoBB Broiler Management Guide. <http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/guides/cobb-broiler-management-guide---english.pdf>.

Collier, C. T., J. D. van der Klis, B. Deplancke, D. B. Anderson, and H. R. Gaskins. 2003. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3311-3317.

Collignon, P. 2013. The importance of a One Health approach to preventing the development and spread of antibiotic resistance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 366:19-36.

Cooper, K. K., J. G. Songer, and F. A. Uzal. 2013. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25:314-327.

Cooper, K. K., H. T. Trinh, and J. G. Songer. 2009. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. *Vet. Microbiol.* 133:92-97.

Cross, D. E., R. M. McDevitt, K. Hillman, and T. Acamovic. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br. Poult. Sci.* 48:496-506.

Danzeisen, J. L., H. B. Kim, R. E. Isaacson, Z. J. Tu, and T. J. Johnson. 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS ONE* 6:e27949.

Dibner, J. J., Knight, C.D., Kitchell, M.L., Atwell, C.A., Downs, A.C., Ivey, F.J. 1998. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *J. Appl. Poult. Res.* 7:425-436.

Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84:634-643.

Dohoo, I., W. Martin, and H. Stryhn. 2010. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2 ed. VER Inc, Charlottetown, PEI.

Dorman, H. J., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.

Dumas, M. D., S. W. Polson, D. Ritter, J. Ravel, J. Gelb, J., R. Morgan, and K. E. Wommack. 2011. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. *PLoS ONE* 6:e24785.

Emborg, H.-D., A. K. Ersboll, O. E. Heuer, and H. C. Wegener. 2001. The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev. Vet. Med.* 50:53-70.

Engster, H. M., D. Marvil, and B. Stewart-Brown. 2002. The effect of withdrawing growth promoting antibiotics from broiler chickens: a long-term commercial industry study *J. Appl. Poult. Res.* 11:431-436.

Folster, J. P., G. Pecic, A. Singh, B. Duval, R. Rickert, S. Ayers, J. Abbott, B. McGlinchey, J. Bauer-Turpin, J. Haro, K. Hise, S. Zhao, P. J. Fedorka-Cray, J. Whichard, and P. F. McDermott. 2012. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009. *Foodborne Pathog. Dis.* 9:638-645.

Forder, R. E. A., G. S. Howarth, D. R. Tivey, and R. J. Hughes. 2007. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poult. Sci.* 86:2396-2403.

Fu, Y., Y. Zu, L. Chen, X. Shi, Z. Wang, S. Sun, and T. Efferth. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother. Res.* 21:989-994.

Garces-Narro, C., J. I. Barragan, M. D. Soler, M. Mateos, M. C. Lopez-Mendoza, and J. Homedes. 2013. Efficacy of low-dose tylvalosin for the control of clostridiosis in broilers and its effect on productive parameters. *Poult. Sci.* 92:975-978.

Geier, M. S., L. L. Mikkelsen, V. A. Torok, G. E. Allison, C. G. Olnood, M. Boulianne, R. J. Hughes, and M. Choct. 2010. Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. *J. Appl. Microbiol.* 109:1329-1338.

Gholamiandekordi, A. R., L. Timbermont, A. Lanckriet, W. Van Den Broeck, K. Pedersen, J. Dewulf, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2007. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 36:375-382.

Gholamiandekhordi, A. R., R. Ducatelle, M. Heyndrickx, F. Haesebrouck, and F. Van Immerseel. 2006. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet. Microbiol.* 113:143-152.

Gladys, G. 2009. Allen Family Farms draws on experience to stop losses from gangrenous dermatitis in *Intestinal Health Magazine*, North American ed.

Golder, H. M., M. S. Geier, P. I. Hynd, R. E. A. Forder, M. Boulianne, and R. J. Hughes. 2010. Feed additives influence goblet cell distribution and villus-crypt architecture in broilers after necrotic enteritis challenge. Pages 211-214 in *Proc. 21st Annual Austr. Poult. Sci. Symp.*, Sydney, New South Wales.

Gonzales, E., N. Kondo, E. S. Saldanha, M. M. Loddy, C. Careghi, and E. Decuyper. 2003. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poult. Sci.* 82:1250-1256.

Graham, J. P., J. J. Boland, and E. Silbergeld. 2007. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Public Health Rep.* 122:79-87.

Grilli, E., F. Vitari, C. Domeneghini, A. Palmonari, G. Tosi, P. Fantinati, P. Massi, and A. Piva. 2013. Development of a feed additive to reduce caecal *Campylobacter jejuni* in broilers at slaughter age: from in vitro to in vivo, a proof of concept. *J. Appl. Microbiol.* 114:308-317.

Halevy, O., A. Geyra, M. Barak, Z. Uni, and D. Sklan. 2000. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *J. Nutr.* 130:858-864.

Hardy, B., N. Crilly, S. Pendleton, A. Andino, A. Wallis, N. Zhang, and I. Hanning. 2013. Impact of rearing conditions on the microbiological quality of raw poultry meat. *J. Food Sci.* 78:M1232-1235.

Hernandez, F., V. Garcia, J. Madrid, J. Orengo, P. Catala, and M. D. Megias. 2006. Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 47:50-56.

Hume, M. E. 2011. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult. Sci.* 90:2663-2669.

Huyghebaert, G., R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187:182-188.

Jerzsele, A., K. Szeker, R. Csizinszky, E. Gere, C. Jakab, J. J. Mallo, and P. Galfi. 2012. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poult. Sci.* 91:837-843.

Kaldhusdal, M., M. Hofshagen, A. Lovland, H. Langstrand, and K. Redhead. 1999. Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24:337-343.

Kassem, I. I., Y. Sanad, D. Gangaiah, M. Lilburn, J. LeJeune, and G. Rajashekara. 2010. Use of bioluminescence imaging to monitor *Campylobacter* survival in chicken litter. *J. Appl. Microbiol.* 109:1988-1997.

Lanckriet, A., L. Timbermont, M. De Gussem, M. Marien, D. Vancraeynest, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2010. The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 39:63-68.

Lovanh, N., K. L. Cook, M. J. Rothrock, D. M. Miles, and K. Sistani. 2007. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. *Poult. Sci.* 86:1840-1849.

Lovland, A., and M. Kaldhusdal. 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathol.* 30:73-81.

Luangtongkum, T., T. Y. Morishita, A. J. Ison, S. Huang, P. F. McDermott, and Q. Zhang. 2006. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter spp.* in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3600-3607.

Marin-Flamand, E., A. Vazquez-Duran, and A. Mendez-Albores. 2014. Effect of organic acid blends in drinking water on growth performance, blood constituents and immune response of broiler chickens. *J. Poult. Sci.* 51:144-150.

Mathlouthi, N., T. Bouzaienne, I. Oueslati, F. Recoquillay, M. Hamdi, M. Urdaci, and R. Bergaoui. 2012. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J. Anim. Sci.* 90:813-823.

McDermott, P. F., S. Zhao, D. D. Wagner, S. Simjee, R. D. Walker, and D. G. White. 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim. Biotechnol.* 13:71-84.

McReynolds, J., J. Byrd, R. Anderson, R. Moore, T. Edrington, K. Genovese, T. Poole, L. Kubena, and D. Nisbet. 2004. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 83:1948-1952.

McReynolds, J., C. Waneck, J. Byrd, K. Genovese, S. Duke, and D. Nisbet. 2009. Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phyto-genetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. *Poult. Sci.* 88:2075-2080.

Miles, D. M., D. E. Rowe, and T. C. Cathcart. 2011. High litter moisture content suppresses litter ammonia volatilization. *Poult. Sci.* 90:1397-1405.

Mitsch, P., K. Zitterl-Eglseer, B. Kohler, C. Gabler, R. Losa, and I. Zimpernik. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poult. Sci.* 83:669-675.

National Research Council (USA). Subcommittee on Poultry Nutrition. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C.

Newell, D. G., and C. Fearnley. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4343-4351.

Niewold, T. A. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult. Sci.* 86:605-609.

O'Bryan, C. A., P. G. Crandall, and S. C. Ricke. 2008. Organic poultry pathogen control from farm to fork. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:709-720.

Palliyeguru, M. W. C. D., and S. P. Rose. 2014. Sub-clinical necrotic enteritis: its aetiology and predisposing factors in commercial broiler production. *Worlds Poult. Sci. J.* 70:803-815.

Patterson, J. A., and K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82:627-631.

Peek, H. W., and W. J. M. Landman. 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 31:143-161.

Penalver, P., B. Huerta, C. Borge, R. Astorga, R. Romero, and A. Perea. 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *APMIS* 113:1-6.

Persson, S., and E. P. K. Olsen. 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J. Med. Microbiol.* 54:1043-1047.

Phillips, R. A. 2008. Is GD skin or gut related? Probably both. *Intestinal Health Magazine*, North American ed.

<http://www.thepoultrysite.com/intestinalhealth/issue1/north-american-edition-1/18/is-gd-skin-or-gut-related-probably-both>. Accessed January 7th 2015.

Porter, J., R. E. 1998. Bacterial enteritides of poultry. *Poult. Sci.* 77:1159-1165.

Roney, C. S. 2008. We've faced challenges with gangrenous dermatitis. *Intestinal Health Magazine*, North American ed.
<http://www.thepoultrysite.com/intestinalhealth/issue1/north-american-edition-1/19/roney-weve-faced-challenges-with-gangrenous-dermatitis>. Accessed January 7th 2015.

Rosenquist, H., L. Boysen, A. L. Krogh, A. N. Jensen, and M. Nauta. 2013. *Campylobacter* contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. *Int. J. Food Microbiol.* 162:226-230.

Sahin, O., C. Fitzgerald, S. Stroika, S. Zhao, J. Sippy, P. Kwan, P. J. Plummer, J. Han, M. J. Yaeger, and Q. Zhang. 2012. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 50:680-687.

Schrader, J. S., R. S. Singer, and E. R. Atwill. 2004. A prospective study of management and litter variables associated with cellulitis in California broiler flocks. *Avian Dis.* 48:522-530.

Shea, K. M. 2004. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *Pediatrics* 114:862-868.

Shepherd, E. M., and B. D. Fairchild. 2010. Footpad dermatitis in poultry. *Poult. Sci.* 89:2043-2051.

Si, W., J. Gong, Y. Han, H. Yu, J. Brennan, H. Zhou, and S. Chen. 2007. Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the

development of necrotic enteritis in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7110-7113.

Si, W., X. Ni, J. Gong, H. Yu, R. Tsao, Y. Han, and J. R. Chambers. 2009. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. *J. Appl. Microbiol.* 106:213-220.

Smith, J. A. 2011. Experiences with drug-free broiler production. *Poult. Sci.* 90:2670-2678.

Sokovic, M., J. Glamoclija, P. D. Marin, D. Brkic, and L. J. van Griensven. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* 15:7532-7546.

Stanton, T. B. 2013. A call for antibiotic alternatives research. *Trends Microbiol.* 21:111-113.

Sun, X., A. McElroy, K. E. J. Webb, and A. Selton, E. 2005. Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poult. Sci.* 84:1294-1302.

Teirlynck, E., M. D. E. Gussem, J. Dewulf, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2011. Morphometric evaluation of "dysbacteriosis" in broilers *Avian Pathol.* 40:139-144.

Thapa, D., R. Losa, B. Zweifel, and R. J. Wallace. 2012. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. *Microbiology* 158:2870-2877.

Thibodeau, A., P. Fravalo, S. Laurent-Lewandowski, E. Guévremont, S. Quessy, and A. Letellier. 2011. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Québec. *Can. J. Vet. Res.* 75:298-307.

Tiihonen, K., H. Kettunen, M. H. L. Bento, M. Saarinen, S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, H. Schulze, and N. Rautonen. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *Br. Poult. Sci.* 51:381-392.

Timbermont, L., F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. Van Immerseel. 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40:341-347.

Timbermont, L., A. Lanckriet, J. Dewulf, N. Nollet, K. Schwarzer, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and F. v. Immerseel. 2010. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol.* 39:117-121.

Tremblay, C.-L., A. Letellier, S. Quessy, M. Boulianne, D. Daignault, and M. Archambault. 2011. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of tetO and ermB genes. *J. Food Prot.* 74:1639-1648.

Tsiouris, V., I. Georgopoulou, C. Batzios, N. Pappaioannou, A. Diakou, E. Petridou, R. Ducatelle, and P. Fortomaris. 2013. The role of an attenuated anticoccidial vaccine on the intestinal ecosystem and on the pathogenesis of experimental necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathol.* 42:163-170.

van Alphen, L. B., S. A. Burt, A. K. Veenendaal, N. M. Bleumink-Pluym, and J. P. van Putten. 2012. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. *PLoS One* 7:e45343.

van den Bogaard, A. E., and E. E. Stobberingh. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14:327-335.

van der Hoeven-Hangoor, E., N. D. Paton, I. B. van de Linde, M. W. A. Verstegen, and W. H. Hendricks. 2013. Moisture content in broiler excreta is influenced by excreta nutrient contents. *J. Anim. Sci.* 91:S705-713.

Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33:537-549.

Van Immerseel, F., J. I. Rood, R. J. Moore, and R. W. Titball. 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.* 17:32-36.

Verstegen, M. W. A., and B. A. Williams. 2002. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim. Biotechnol.* 13:113-127.

Wadud, S., A. Michaelsen, E. Gallagher, G. Parcsi, O. Zemb, R. Stuetz, and M. Manefield. 2012. Bacterial and fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content *Br. Poult. Sci.* 53:561-569.

Walsh, C., and S. Fanning. 2008. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens - a cause for concerns? *Curr. Drug Targets* 9:808-815.

Wegener, H. C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:439-445.

White, D. G., S. Zhao, S. Simjee, D. D. Wagner, and P. F. McDermott. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect.* 4:405-412.

WHO. 2014. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014. World Health Organization, Geneva, CH.

Williams, R. B. 2002. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol.* 31:317-353.

Williams, R. B. 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol.* 34:159-180.

Williams, R. B., R. N. Marshall, R. M. La Ragione, and J. Catchpole. 2003. A new method for the experimental reproduction of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol. Res.* 90:19-26.

TABLE 1. Nutritional guidelines pertaining to feed composition for
all participating farms

Components	Maximum inclusion rates (%)
Barley	0
Distiller's dried grains	7
Dog	5
Meat meal	2 to 7
Canola	5
Wheat	15
Gluten meal	5
Gluten feed	5
Feather meal	3
Fat	4
Bakery by-products	10
Vitamins and minerals	as usual
Phytase	permitted

TABLE 2. Summary of the results relative to the study conduct

	Drug-free program	Conventional
Number of birds involved in field trial	773 114	785 114
Mean flock size (nb of birds)	15159	15394
Mean water pH value	4.50	5.77
Mean chlorine value	3.64	3.64

TABLE 3. Impact of the drug-free program on performance parameters and health status

a. Continuous outcomes

	Drug-free		Conventional		<i>P</i> value
	LSMeans	S.E.	LSMeans	S.E.	
Zootechnical performances					
Livability (%)	98.37	0.31	98.63	0.31	0.49
Age at time of slaughter (d)	38.5	1.04	38.1	1.04	0.17
Percentage of condemnations (%)	2.70	0.22	2.55	0.22	0.45
Mean live weight at slaughter (kg)	2.38	0.05	2.43	0.05	0.01
Mean daily weight gain (g/d)	61.48	0.57	63.52	0.57	<0.001
Feed conversion ratio	1.84	0.04	1.78	0.04	<0.01
Kilograms per square meter	27.67	0.85	29.15	0.85	0.01
Mean litter humidity (%)					
Three weeks of age	39.72	1.21	39.89	1.21	0.91
Day before slaughter	39.99	1.79	35.73	1.80	0.01
Mean feces humidity (%)					
Three weeks of age	78.04	0.63	78.37	0.61	0.64
Day before slaughter	77.30	0.70	77.54	0.70	0.81
Mean microscopic intestinal lesion scores	15.85	0.19	15.54	0.19	0.25

b. Dichotomous outcomes

	Drug-free	Conventional	<i>P</i> value
Clinical necrotic enteritis outbreaks (% flocks)	27.45	0	<0.001
Subclinical enteritis cases (% flocks)	49.02	0	<0.001

Chapitre 4. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Clostridium perfringens population dynamics in commercial broiler chicken flocks
submitted to two different farm rearing protocols

M-L. Gaucher^a, G. G. Perron^b, J. Arsenault^c, M. Boulianne^d, A. Letellier^a, S. Quessy^a

^a Research Chair in Meat Safety, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

^b Program of Biology, Bard College, 30 Campus Road, Annandale-On-Hudson, NY 12504.

^c Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA), Département de pathologie et microbiologie vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

^d Chair in Poultry Research, Département de Sciences Cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Corresponding author : Dr Sylvain Quessy, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, CP 5000, Québec, Canada J2S 7C6

4.1 ABSTRACT

The growing pressure arising from consumers and governmental authorities to reduce the use of antimicrobials in food-producing animals represents a major challenge for the poultry industry. Banning the use of these compounds in broiler chicken production has led to various problems in the European Union countries; with necrotic enteritis being the most significant issue. In an effort to identify new alternatives in replacement of antimicrobials, it becomes relevant to better describe the impact of these alternative strategies on the population dynamics, in commercial broiler chicken flocks, of *Clostridium perfringens*, the causative agent for necrotic enteritis. Here, we report how a conventional rearing protocol which includes the use of antimicrobials, and a drug-free program, which combines substitutes to antimicrobials and improved management practices, affect resident *C. perfringens* populations found in poultry barns at initial and final time points of a 14-month field study. By using PFGE for molecular typing, rarefaction curves showed that *C. perfringens* species richness was not different between farm protocols. A balanced increasing diversity was noted for both farm rearing protocols between initial and final time points of the study. PCR toxinotyping also showed an increased prevalence of strains harboring more virulence genes at the end of the experiment, this situation being correlated with a decreased frequency in strains carrying a single virulence gene. We thus conclude that *C. perfringens* populations found in poultry barns are very dynamic and that feed additives do not seem to play a major role in the genotypic diversity of this bacterial species.

Key words: commercial broiler chickens, rearing protocols, *Clostridium perfringens*, population dynamics, rarefaction curves

HIGHLIGHTS

- We commercially raised broiler chickens using two different rearing protocols, one of which excluding antibiotic growth promoters and anticoccidials
- We evaluated the influence of both protocols on *C. perfringens* population dynamics
- Results showed that the temporal dynamics of *C. perfringens* does not seem to be influenced by the different rearing protocols.
- An increase in the number of isolates carrying many virulence genes was noted for both protocols.

4.2 Introduction

Clostridium perfringens is a rod-shaped Gram positive anaerobic spore-forming bacteria found ubiquitously in the digestive tract of warm-blooded animals and in soil. The bacterium is recognized as a commensal of the digestive tract of its host, but can also cause serious diseases such as necrotic enteritis (NE) in poultry. Classically, the bacteria falls into five toxinotypes, from A to E, based on production of four major toxins known as α , β , ϵ , ι . Type A can be found as part of the normal intestinal microflora of various animal species, whereas types B to E are always related to pathological processes in their host (Sawires and Songer, 2006). Additionally, *C. perfringens* produces several extracellular toxins and enzymes for which genes can be located either on the chromosome or on plasmids (Sawires and Songer, 2006).

In poultry, *C. perfringens* type A and C strains can cause necrotic enteritis, making the bacterium one of the most clinically and economically relevant bacterial pathogen for the industry (Van Immerseel et al., 2009). For years, sub-therapeutic levels of in-feed antibiotics were routinely used to control the disease and to promote broiler chicken growth (Golder et al., 2011). Because low-dosage inclusion of these compounds in food-producing animal feeds contributes to the emergence and persistence of antibiotic resistance genes within bacterial communities, European countries have decided to discontinue the use of such compounds. As a consequence, NE incidence significantly increased and many efforts have been made by the scientific community to achieve a better understanding of the pathogenesis of the disease, including the identification of bacterial host-encoded genes that could possibly be

attributed to disease-causing strains (Lepp et al., 2013; Lepp et al., 2010; Seal, 2013). Alternative control strategies such as the combination of water and feed additives have been used to control the disease, (Van Immerseel et al., 2009; Wierup, 2001). Even if showing promising results, none of these strategies have proven to be fully successful in replacing antibiotics so far (Dibner and Richards, 2005).

Healthy broiler chickens have been shown to harbor several *C. perfringens* genotypes, whereas only one or two virulent clones seem to predominate in NE-affected birds (Barbara et al., 2008; Engstrom et al., 2003; Nauerby et al., 2003). The inclusion of antibiotics and ionophore anticoccidials (antimicrobials) in the feed is also associated with a reduced population of *C. perfringens*, these compounds preventing the uncontrolled multiplication of the bacteria in poultry gut (Chalmers et al., 2008; Knarreborg et al., 2002). However, little is known on how *C. perfringens* population genetic diversity evolves, over consecutive flocks in a same broiler chicken barn, in response to a conventional rearing method, as well as to a drug-free program, in commercial production conditions (Lanckriet et al., 2010; Lu et al., 2003). Since demand is increasing for drug-free poultry and because necrotic enteritis represents the main issue in this type of production, it becomes relevant to assess the impact of drug-free production over time (Huyghebaert et al., 2011; Parreira et al., 2012).

The aim of this study was to assess the impact of producing commercial broiler chicken flocks, using two different rearing protocols : 1) a conventional protocol including antimicrobials; and 2) a drug-free program (or alternative protocol) combining different control strategies such as in-feed essential oil-based products,

water acidification, anticoccidial vaccination, and improved brooding conditions on the genetic diversity of *C. perfringens*, as well as on the prevalence of *C. perfringens* strains harboring virulence genes. The genetic diversity evolution of *C. perfringens* strains isolated from these flocks was compared between initial and final time points of a 14-month field study by using PCR, PFGE and rarefaction curves (Gotelli and Colwell, 2001; Nauerby et al., 2003).

4.3 Materials and methods

4.3.1 Sampling protocol

From May 2011 to July 2012, eight broiler chicken farms in the province of Québec (Canada) were selected to take part in a fourteen month-prospective study aiming at comparing conventional and drug-free broiler chickens (Gaucher et al., 2015). A convenient sample of farms with two adjacent barns similar in terms of dimensions, construction, equipments, management practices and employees, with the same source of chicks, feed and water supply, were eligible to take part in the study. For each farm, the two different rearing protocols were randomly assigned between the two barns. Conventionally-raised flocks were fed a diet containing antimicrobials as growth promoters (AGPs) and anticoccidials for coccidiosis prevention. Four different antibiotics and eight anticoccidials were added in rotation to the feed: bacitracin, tylosin, virginiamycin, bambermycin, roxarsone, salinomycin, decoquinate, narasin, nicarbazin, maduramicin, clopidol and monensin. Water treatment and brooding

conditions were left unchanged for these birds. In the second barn, designated as the drug-free barn, AGPs and anticoccidials were withdrawn from the diet and replaced by a protocol including anticoccidial vaccination by spray cabinet (Coccivac ® B, Schering Plough) at the hatchery. Drinking water acidification with a commercial blend of inorganic and organic acids (Jefacid®, Jefo, Québec, Canada) to a pH of 4 during all the rearing cycle was performed. Three commercially available essential oil-based products were selected (Boulianne, M., unpublished data) used as feed additives respecting a randomized-block design distribution over farms and time. These products were mixed by an independent feedmill, bagged and designated as premixes one, two and three (Oleo 10X-Oleo 500E, Probiotech, International Inc. Québec, Canada, Proteos Galleos, Substancia Inc., Québec, Canada, Biomin PEP, Biomin, Herzogenburg, Austria). Only one product out of the three was incorporated in a given flock diet. All the chicks involved in the field study were injected at the hatchery either with Ceftiofur® or Linco-Spectin®. Finally, every participating farm was also required to comply with strict biosecurity measures in order to ascertain that each barn was considered as a closed and unique entity (Gaucher et al., 2015).

For all farms, every pen of both barns was visited at three weeks of age, as well as the day before slaughter for the collection of fecal samples. For the purpose of the analysis presented here, only *C. perfringens* isolates corresponding to the day before slaughter visit and to the first two and the last flocks produced on each participating farms of the field study were considered and were attributed to the initial and final diversity, respectively. Each pen was divided in four longitudinal parallel rows corresponding to the walking path of the sampler. Up to ten samples were collected.

Approximately 10 Grams of a pooled sample of fresh feces were collected per pen and were put in a Whirlpack® bag containing 90ml of *Brucella* broth freezing media (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) including 30% of glycerol (Fisher Scientific, NJ, USA). Bags were kept on ice during transportation and were immediately frozen at -80°C upon arrival to the lab.

4.3.2 Isolation of *C. perfringens* strains

An enrichment and a direct plating isolation protocols were used. For the enrichment protocol, one mL of fecal material was cultured in Cooked Meat broth (Oxoid) for 48 hours at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). We then inoculated 10 µL onto 5% sheep blood anaerobic *Brucella* agar plates with neomycin (Oxoid, Canada), incubated in anaerobic conditions at 37°C for 48 hours. For each sample, the identity of all suspect colonies showing typical beta-hemolysis was confirmed by Gram staining and by the reverse CAMP test (Chalmers et al., 2008). Fecal samples were also submitted to a direct plating protocol. We inoculated 1 mL on Perfringens Agar Base media (LAB M, UK) plates containing 5% egg yolk emulsion and 400 mg/L of D-cycloserine as a selective agent (LAB M, UK). Plates were then incubated in anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada) at 37°C for 48 hours. Bacterial growth from the last quadrant was streaked on 5% sheep blood anaerobic *Brucella* agar plates with neomycin (Oxoid, Canada), and grown in anaerobic conditions at 37°C for 48 hours. As for the first protocol, all suspect colonies showing typical beta-hemolysis

were selected and their identity was confirmed by the reverse CAMP test. Strains that were recovered were frozen in *Brucella* broth (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) freezing media containing 30% glycerol (Fisher Scientific, NJ, USA) at -80°C for further characterization.

4.3.3 *C. perfringens* reference strains

The following strains were used as positive controls in this study: *C. perfringens* type A (AHL316, positive for *plc* gene), *C. perfringens* type A (AHL311, positive for *plc* and *cpe* genes), *C. perfringens* type A (STF2003-1256, positive for *plc* and *netB* genes), *C. perfringens* type B (AHL156, positive for *plc*, *cpb* and *etx* genes), *C. perfringens* type D (AHL344, positive for *plc* and *etx* genes) and finally *C. perfringens* type E (AHL155, positive for *plc*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes).

4.3.4 Toxinotyping by multiplex PCR

Each strain included in this study was screened for the presence of virulence genes encoding toxins. DNA extraction was performed according to Charlebois et al. (2012) with slight modifications for PCR optimization. Briefly, isolates were grown overnight on 5% sheep blood agar plates (Oxoid, Canada) at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). A loopful of colonies was suspended in 100 µL of a 10% Chelex 100 solution (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) and boiled for 20 minutes. Centrifugation at 13 000 rpm for 3

minutes was done and the supernatant containing DNA was collected and used for multiplex PCR. Two modified multiplex PCR protocols were used for the detection of the toxin genes *cpa* (alpha), *cpb* (beta), *cpb2* (β 2), *tpeL* (TpeL), and *cpe* (enterotoxin), *netB* (NetB), *iA* (iota), *etx* (epsilon), respectively. Primer sequences were designed according to the protocols published by Charlebois et al. (2010) and Keyburn et al. (2010). PCR amplification of the genomic DNA was performed with a 25 μ L reaction volume and was done using 2,5 μ L of 10X PCR buffer (Invitrogen, Ontario, Canada), 0,05 μ M of MgCl₂ (Invitrogen, Ontario, Canada), 3 units of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Ontario, Canada), 25 μ M of dNTPs (Bio Basic Inc. Ontario, Canada), and specific concentrations of each selected primers (Invitrogen, Ontario, Canada): 4,2 μ M *cpa*, 1,28 μ M *cpb*, 2,72 μ M *cbp2*, 0,8 μ M *tpeL*, 0,9 μ M *cpe*, 0,6 μ M *netB*, 4 μ M *iA* and 0,7 μ M *etx*. Denaturation (94°C, 60 sec), annealing (55°C, 60 sec), and extension (72°C, 60 sec) were performed for 35 cycles. A hot start step of 2 min at 94°C and a 10 min final elongation step at 72°C were added. A 12,5 μ L volume of the PCR reaction product was submitted to electrophoresis using on a 1% agarose gel containing 0,01% SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Ontario, Canada). A 100 bp ladder (Track It, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as a molecular weight marker.

4.3.5 Pulsed-field gel electrophoresis

Plug preparation, restriction digestion and electrophoresis conditions were essentially performed according to the protocol previously described for *C. perfringens*

by Chalmers et al. (2008). Isolates were grown at 37°C overnight on 5% sheep blood agar (Oxoid, Canada) in anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). As DNA degradation was a problem with *C. perfringens* strains typing with PFGE, a formaldehyde treatment step, as described by Gibson et al. (1994), was added to the initial protocol. Briefly, harvested colonies were suspended in a 900 µl suspension buffer (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8) volume to a final OD of 1,25 at 600 nm. Hundred µL of a 40% formaldehyde solution (Fisher Scientific, NJ, USA) were added to the bacterial suspension. Suspensions were incubated for 1 h at room temperature. Bacterial cell washes with saline (0,85%) were then repeated three times and a final step involving bacterial cell suspension in 500 µL saline was done. This final volume was embedded in an equal volume of 1,0% melted SeaKem Gold Agarose (Lonza, USA), poured into plug moulds for solidification at 4°C for 30 minutes. Cell lysis was done by incubating the plugs at 37°C with gentle shaking for 5 hours in a lysis buffer (10mM Tris, 100mM EDTA, 50 mg/ml lysozyme (Sigma-Aldrich, MO, USA). Plugs were rinsed for 15 minutes in TE buffer (10 mM Tris, 100 mM EDTA) and incubated overnight in EDTA 0,5M, 1% sarkosyl (Sigma-Aldrich, MO, USA) and 2 mg/ml proteinase K (Fisher Scientific, Canada). To remove traces of proteinase K, plugs were rinsed five times for 30 minutes each in washing buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8). One plug per isolate was equilibrated in 200 µL restriction buffer (New England BioLabs, Ipswich, MA) at room temperature for 20 minutes and then transferred into 200 µL of digestion buffer containing 100U of *Sma*I restriction enzyme (Chalmers et al., 2008) (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA). Low Range PFG marker (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA) was used for

molecular weight standard purpose. Electrophoresis was performed in TE 1% SeaKem Gold Agarose gel that were ran in 2500 ml volume of 0,5% TBE buffer containing 200 μ M thiourea (Sigma-Aldrich, MO, USA) at 14°C for 19 hours. Pulse times started at 4s and ended at 38s, with linear ramping and a field of 6 V/cm in a Bio-Rad CHEF II electrophoresis unit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Gels were stained with ethidium bromide and photographs were saved as tiff-files and loaded into BioNumerics software v6.0 (Applied Maths NV) for band matching. The unweighted pair group for arithmetic means (UPGMA) tree-building approach with 0,5% optimization and 1% position tolerance was used for band matching and macrorestriction patterns similarity was compared using Dice coefficient. A dendroGram was generated. A similarity of more than 95% was set as a limit for isolates to be considered as a same PFGE type (Gholamiandekhordi et al., 2006).

4.3.6 *Statistical analyses*

4.3.6.1 Diversity analysis. First, we compared the number of strains and genotypes obtained between the drug-free program and the conventional treatment. To do so, we compiled the strains for each treatment into a single data frame and used a series of Fisher's Exact tests to test: 1) whether the ratio of strains observed between initial and final time points changed between the two types of rearing methods, 2) whether we observed an unbalanced increase in the number of genotypes in one type of rearing method compared to the other.

We controlled for the difference in strains isolated between the two rearing protocols and compared the genetic diversity of isolated *C. perfringens* strains, both at the start and at the end of the study period using rarefaction curves and extrapolation curves. Rarefaction curves with 95% confidence intervals were computed to compare the genetic diversity of isolated *C. perfringens* strains, both at the start and at the end of the study period. Rarefaction curves are plots of the cumulative species richness as a function of the numbers of individuals sampled and they allow comparison, on an equal-effort basis, of species richness among specific environments, in this case, the barns (Gotelli and Colwell, 2001). They also represent a process of interpolation from the pooled species richness of the full set of samples to the expected richness of a subset of those samples (Colwell et al., 2004). Rarefaction and extrapolation curves with 95% confidence intervals were computed using the iNEXT package as implemented in the R programming environment (v.3.1.2) (from <http://chao.stat.nthu.edu.tw/blog/software-download/inext-r-package/>). Even if a sample-based approach for rarefaction curves usually gives better results as it accounts for natural levels of sample heterogeneity, an individual-based approach was retained in the current study to provide specific and relevant information for microbial population ecology description (Gotelli and Colwell, 2001).

Two different scenarios were tested: to avoid replication bias, any duplicate strain corresponding to a same genotype and phenotype and isolated from a same sample but using a different isolation method was removed from the dataset for the first scenario. In a second part, these duplicate strains were considered in the analysis.

4.3.6.2 Toxinotyping analysis. We first used a series of Fisher Exact tests to investigate whether toxin genes were identified at different frequency in the different treatment at the start and at the end of the study. We also tested whether they changed in frequency over the course of the experiment within each rearing protocol. Because of the multiple statistical tests, we used a Bonferroni correction and adjusted our critical p-value ($\alpha=0.00625$). We also investigated whether the number of strains harboring multiple virulence genes increased over time in either of the rearing protocols. We first implemented a 2X3 contingency table (initial and final time points vs 0, 1 and 2 or more virulence genes), and used the Fisher's Exact test to evaluate if a change in the ratio of *C. perfringens* strains carrying multiple virulence genes was observed over the study period. We then investigated whether the changes in frequency of strains carrying multiple virulence genes was due to changes in strains with two virulence genes or strains harboring one or no virulence genes within each rearing protocol. Again, because we conducted multiple statistical tests, we used a Bonferroni correction and adjusted our critical p-value ($\alpha=0.00625$).

4.4 Results

4.4.1 Sampling and C. perfringens isolation and typing

Antibiotics, anticoccidials and essential oil-based products used on participating farms during field study are presented in Tables 1 and 2. From the eight voluntary producers, five were randomly selected and allowed to extend the project for an extra production period for financial reasons. For those farms, the 6th and 7th flocks produced were considered as the final sampling time point, whereas the 5th and 6th produced flocks were attributed to the final sampling for the other farms. Producer from farm 4 decided to withdraw from the field study after four production periods due to recurring clinical necrotic enteritis outbreaks in the drug-free barn. For this farm, only the first two production periods were used for initial sampling, and no sampling was performed at final time. A total of 1592 *C. perfringens* isolates were recovered from all the sampling visits of the field study. However, 595 *C. perfringens* isolates were considered for the current study as they were associated with the day before slaughter visit, as well as with the first two and the last flocks produced on each participating farms. A sub-sampling including 369 isolates was done to ensure an approximately equal representation of each sub-group: drug-free versus conventional rearing protocol, enrichment versus direct plating isolation method, initial versus final time points of the experiment, as well as a similar number of strains retained for typing per farm. From this total, 275 *C. perfringens* isolates were successfully typed by PFGE using *Sma*I restriction endonuclease. Degradation of DNA by endonucleases prevented typing of 94 isolates (see table 3). On average, the digestion of genomic DNA generated genotypes comprising between 7 and 12 bands, allowing us to identify 146 genotypes (see figure 3). The relative frequency of untypable strains between the different isolation methods was not statistically different (Fisher's Exact test; P = 0.40). This

frequency was also not different between the two rearing protocols (Fisher's Exact test; $P = 0.07$). Untypable strains were discarded from further analyses.

While 158 strains isolated from the drug-free barns were typed, typing was successfully performed for 117 strains from barns of the conventional protocol. A total of 109 and 166 strains were attributed to the initial and final sampling time points of the field study, respectively. A total of 73 and 77 genotypes were obtained from the genotyping of the isolates recovered from the initial and final time points of the sampling procedure, respectively. From that number, only 4 genotypes were found to be part of both initial and final diversity groups. It is worth noting that for a same sample, even if both isolation protocols occasionally yielded identical genotypes, the two techniques typically generated distinct genotypes, even though a same fecal sample was used for the two isolation procedures. For initial counts, only three genotypes (genotype # 77, 81, and 127) were generated concomitantly by the two isolation methods, whereas the typing procedure realized on strains corresponding to the final counts identified eight common genotypes (# 23, 25, 29, 30, 34, 35, 36, and 46) between both isolation procedures. Statistical analyses showed that the two different isolation methods did not differ in their ability to isolate strains over the course of the study (Fisher's Exact test: $P = 0.53$) or to isolate unique genotypes (Fisher's Exact test: $P = 0.39$). In other words, even though we isolated more strains with the direct plating isolation method (tsc), the relative number of strains and genotypes was conserved across both isolation methods. We thus combined unique genotypes obtained from either isolation methods into a single dataset for further analyses.

4.4.2 Genotypic diversity

Overall, we observed a higher number of isolates in drug-free barns (Table 2). We found, however, that the increase in the number of strains isolated at the end of the study when compared to the initial sampling was similar in both farm rearing protocols ($P = 0.81$). Thus, in both cases, a significant result indicated that the relative number of strains changed over time. In other words, it could indicate that the number of isolates or genotype increase (or decrease) significantly in one treatment when compared to the other. Using genotypic profiling from PFGE analyses, we then compared whether we observed a change in the number of unique genotypes between both types of rearing methods. Again, we observed no significant difference when comparing both rearing protocols: the number of genotypes identified between the initial and final time points of the study was proportionally similar in both treatments (Fisher Exact test: $P = 0.76$). In other words, neither treatment favored an increase or a decrease in genotypic diversity compared to the other one as the number of *C. perfringens* strains increased in both cases.

We then used a set of rarefaction and extrapolation curves to compare the genetic diversity found in drug-free and conventional groups when controlling for sample size at the different time points of the study. The rarefaction curves (full line in Figure 1 and 2) enable to compare the genotypic diversity observed in the two rearing protocols for a similar number of strains. Given the rarefaction, we see that there is no difference in genotypic diversity between the samples associated with the drug-free program and conventional treatment at the start of the study. Interestingly, we observed

a small increase in diversity in the drug-free barns, but this difference is not significant when considering the calculated 95% confidence intervals. When we consider the extrapolation curves (dashed lines in Figure 1 and 2), which allow comparing the predicted total genotypic diversity if we were able to increase the sampling efforts, we see that there is no significant difference in predicted diversity between the samples associated with the drug-free and conventional rearing protocols. Also using rarefaction and extrapolation, we compared genotypic diversity observed at the start of the study to that observed at the end of the study within each rearing protocol. We found that genotypic diversity was slightly higher at the start of the study in both drug-free (Figure 2A) and conventional barns (Figure 2B), but these differences were not significant and disappeared when considering extrapolations. Taken together, these results suggest that even though the drug-free program might allow for a higher number of strains, there is no difference in genotypic diversity between both farm rearing protocols.

4.4.3 *Toxinotyping by multiplex PCR*

Toxinotyping results are presented in Table 4. Statistical analysis showed that the toxin genes *cpb2* and *netB* were detected at similar frequencies within barns submitted to both farm rearing protocols at the start of the study (Fisher Exact test: $P = 0.83$ and $P = 0.07$, respectively). For B2-toxin gene, even though we observed an increase in *cpb2* detection frequency between initial and final time points, in both drug-free (Fisher's Exact test: $P < 0.001$) and conventional (Fisher Exact test: $P = 0.03$) barns, only the increase associated with the drug-free program was found to be

significant when a Bonferroni correction controlling for multiple testing was applied (adjusted alpha for 8 tests = 0.00625). On the other hand, we detected an increase in *netB* in both the drug-free program ($P < 0.001$) and the conventional treatment ($P < 0.001$) as well. Interestingly, both *cpb2* and *netB* genes were found at the same frequency in both rearing protocols ($P = 0.07$).

We then looked at patterns in the number of virulence genes harbored by strains in both drug-free and conventional barns. First, we looked at overall trends in change in frequencies of strains harboring 0, 1, or 2 virulence genes within each barn type. We found that the number of virulence genes carried by bacteria strains changed over time in both drug-free (Fisher's Exact test; $P < 0.0001$) and conventional barns ($P < 0.0001$). For both the drug-free and the conventional rearing protocols, this increase was explained by an increase in strains harboring two virulence genes ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively) and a decrease in strains harboring no or one virulence gene ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively). We also found that, even though the number of strains with two virulence genes was not different at the start of the study ($P = 0.05$), the number of strains with two virulence genes reached a higher frequency in drug-free barns at the end of the study ($P = 0.002$).

4.5 Discussion

Little is known about *C. perfringens* population evolution in poultry farms, and still less is known about the impact of replacing antimicrobials by a drug-free program

on this population structure. The current study provides new insights into *C. perfringens* population dynamics and is, to our knowledge, the first study assessing the effect of different rearing protocols on *C. perfringens* population dynamics in poultry farms, over a 14-month period.

Based on previous work, we expected to see higher numbers and greater diversity of *C. perfringens* strains in the drug-free barns (Knarreborg et al., 2002). However, we found that the ratio of strains isolated from both the initial and final time points of the study was not statistically different between both farm rearing protocols, confirming a proportional representation for all compared groups. However, as the rarefaction curves are still steep at the level of sampling for this study, this effort could nonetheless have been low relative to the true richness of our *C. perfringens* microbial inventory, supposing that a considerable portion of this diversity could further be explored by increasing the sampling effort (Hughes and Hellmann, 2005). Another explanation for the steep appearance of the computed rarefaction curves could be a consequence of the high discriminatory power of the PFGE method (Nauerby et al., 2003).

An interesting result was the absence of a significant effect of the rearing protocol on the dynamics of *C. perfringens* genotypes over time, both barn types showing a balanced increase in the number of genotypes observed at the end of the field study. This observation confirms that in a relatively homogenous environment, a bacterial population exhibits great and increasing diversity (Maharjan et al., 2012). Our results overlap, to some extent, with those published by Chalmers et al. when

comparing the genetic diversity observed for *C. perfringens* strains isolated from two adjacent barns on a same farm (Chalmers et al., 2008). It is thus not surprising to see identical genotypes among our two rearing protocols, as barns for each participating farm were very close proximity on a same farm. They were supplied with the same litter, feed, water and bird source and visited by the same farm personnel as well (Chalmers et al., 2008). Our results are also in agreement with those of a previous study reporting phylogenetically similar strains recovered from organically and conventionally-raised birds. However, the analysis was performed on both a limited number of birds and strains, which limits the extrapolation of these results to ours (Brady et al., 2010). It is though interesting to note that the genotypes found between the initial and final sampling time points of the study in a same barn are, generally genetically distinct. Different hypothesis could explain this observation. Amongst other things, chicks, bedding material, feed and breach in biosecurity measures could be identified as potential sources of many of these new genotypes observed at the end of the study (Craven, 2003, Craven, 2001, Craven, 2001). Unlike their conventional counterparts where antimicrobial selective pressure on the resident *C. perfringens* population could lead to a feedback process known as niche construction, the greater diversity observed in our drug-free barns could be due to the withdrawal of antimicrobials. (Chalmers et al., 2008; Engstrom et al., 2003; Wu et al., 2014). However, as opposed to the absence of a short-term bacitracin withdrawal effect on strain diversity observed by Chalmers et al., a drug-free program seems to positively influence *C. perfringens* population heterogeneity. However, statistical analysis showed that there was no influence of the rearing protocol on the magnitude of this

diversity change over time. The population variance observed over time in both barn types may reflect the higher adaptation capacity of a specific population facing a challenging colonized habitat (Rius and Darling, 2014). The comparable increase in both drug-free and conventional species richness over the study period, even in the presence of the selective pressure created by antimicrobial use in conventional barns, could in part be explained by the creation of a certain balance between *C. perfringens* communities living in the two barns of a same farm. The higher number of genotypes shared among both rearing protocols between both time points of the study could further support this hypothesis. This observation could, among other factors, be explained by common supplying sources, as well as by breaks in biosecurity measure compliance on certain participating farms (Craven et al., 2003; Racicot et al., 2011). However, a greater increase in *C. perfringens* population diversity observed for the drug-free program could have been masked by the presence of recurrent necrotic enteritis outbreaks on two participating farms. During a necrotic enteritis outbreak, usually one *C. perfringens* virulent clone displaces the commensal strains while multiplying in the gut (Barbara et al., 2008; Nauerby et al., 2003). This selective multiplication could then have negatively influenced the evolution of *C. perfringens* diversity in these affected barns and could explain the lower increase in diversity observed for strains recovered from the drug-free barns.

Prevalence of each toxin genes reported here is in accordance with those published elsewhere (Abildgaard et al., 2010; Chalmers et al., 2008; Crespo et al., 2007; Engstrom et al., 2003; Johansson et al., 2010). However, prevalences of *cpb2* and *netB* genes were relatively high. As *cpb2* and *netB* reside on large plasmids, the

acquisition of these mobile genetic elements by *C. perfringens* strains could foster rapid emergence of new clones. These plasmids are also recognized to bear fitness genes, representing a competitive advantage for the bacteria acquiring those plasmids (Gyles and Boerlin, 2014; Parreira et al., 2012; Rius and Darling, 2014; Sawires and Songer, 2006). Moreover, the increase in the prevalence of strains harboring more virulence genes at the expense of strains for which only one or two virulence genes had been identified over the 14-month period suggests a high transmission rate of these mobile genetic elements within the population, and might relate them to major ecological functions by allowing the carrying strains to maintain either symbiotic or pathogenic relationships with their environment or host. It also confirms the dynamic nature of *C. perfringens* populations (Heuer et al., 2008; Lepp et al., 2013; Lepp et al., 2010; Sawires and Songer, 2006). More concerning would be the acquisition of these mobile genetic elements by strains possessing the chromosomal background conferring them the superior ability to initiate a necrotic enteritis outbreak in the presence of predisposing factors such as antimicrobial withdrawal (Hibberd et al., 2011; Lepp et al., 2013; Parreira et al., 2012).

Bacterial isolation was done by using two microbiological methods to maximize the likelihood of detecting *C. perfringens*, contrasting with previous work on *C. perfringens* (Dennison et al., 2005; Engstrom et al., 2003; Nauerby et al., 2003). No significant difference was observed between both isolation methods in their ability to generate unique genotypes. However, very few of these genotypes were shared among both microbiological methods even if a same fecal sample was used for each sampling

result. More than one isolation procedures has thus the advantage of not only yielding a maximum number of strains, but also allowing a better assessment of the diversity. Influence of the culture media on strain and genotype recovery has been reported for other bacterial species such as *Campylobacter spp.* and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Cernicchiaro et al., 2008; Williams et al., 2012). However, even though each isolation method generated different genotypes, the high *C. perfringens* genotypic diversity observed in the current study and reported by other authors, should be taken into account when considering the ability of both microbiological procedures to yield unique genotypic types (Nauerby et al., 2003, Chalmers et al., 2008).

In the current study, one quarter of the initial 369 isolates was discarded because of DNA degradation, which represents a higher percentage of what has already been reported (Johansson et al., 2010, Naeurby et al., 2003). The PFGE typing of the 275 strains generated 146 genotypes. The high genetic diversity found is in agreement with other results (Chalmers et al., 2008; Engstrom et al., 2003; Gholamiandekhordi et al., 2006; Johansson et al., 2010; Nauerby et al., 2003).

The diversity observed of *C. perfringens* populations does not seem to be influenced by either a drug-free program or a conventional rearing protocol. The species richness found in both barn types of this study seems to be high, as saturation was not observed with the rarefaction curves. This observation suggests that many more genotypes remain to be sampled in these barns. Finally, even though virulence genes dissemination essentially behave in a similar way between both barn types, it

was slightly more pronounced in drug-free barns. It then becomes relevant to more specifically evaluate the temporal population dynamics of *C. perfringens* in these barns, considering the fact that some of these farms seem to be more prone to recurring necrotic enteritis outbreaks.

4.6 Acknowledgements

We thank Marie Archambault for kindly providing the reference strains, Alexandre Thibodeau for his precious advice in PCR technique optimization, Audrey Charlebois for her generous assistance during the first PFGE assays and Alexandre Quessy for his technical assistance in PFGE analyses realization. We would also like to thank Huguette Mallet for editing the references.

4.7 References

- Abildgaard, L., Sondergaard, T.E., Engberg, R.M., Schramm, A., Hojberg, O., 2010. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 144, 231-235.
- Barbara, A.J., Trinh, H.T., Glock, R.D., Glenn Songer, J., 2008. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet. Microbiol.* 126, 377-382.
- Brady, J., Hernandez-Doria, J.D., Bennett, C., Guenter, W., House, J.D., Rodriguez-Lecompte, J.C., 2010. Toxinotyping of necrotic enteritis-producing and commensal isolates of *Clostridium perfringens* from chickens fed organic diets. *Avian Pathol.* 39, 475-481.
- Cernicchiaro, N., Wells, S.J., Janagama, H., Sreevatsan, S., 2008. Influence of type of culture medium on characterization of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 46, 145-149.
- Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J., Boerlin, P., 2008. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet. Microbiol.* 127, 116-127.
- Charlebois, A., Jalbert, L.A., Harel, J., Masson, L., Archambault, M., 2012. Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One* 7, e44449.
- Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S., Cosby, D.E., 2003. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Dis.* 47, 707-711.

- Crespo, R., Fisher, D.J., Shivaprasad, H.L., Fernandez-Miyakawa, M.E., Uzal, F.A., 2007. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 329-333.
- Dennison, A.C., Metre, D.C.v., Morley, P.S., Callan, R.J., Plampin, E.C., Ellis, R.P., 2005. Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 132-138.
- Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult. Sci. 84, 634-643.
- Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud, V., Gunnarsson, A., 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. Vet. Microbiol. 94, 225-235.
- Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., 2006. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. Vet. Microbiol. 113, 143-152.
- Gibson, J.R., Sutherland, K., Owen, R.J., 1994. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 19, 357-358.
- Golder, H.M., Geier, M.S., Forder, R.E., Hynd, P.I., Hughes, R.J., 2011. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. Br. Poult. Sci. 52, 500-506.
- Gotelli, N.J., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. Ecol. Lett. 4, 379-391.

- Gyles, C., Boerlin, P., 2014. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet. Pathol.* 51, 328-340.
- Heuer, H., Abdo, Z., Smalla, K., 2008. Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 361-371.
- Hibberd, M.C., Neumann, A.P., Rehberger, T.G., Siragusa, G.R., 2011. Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1556-1567.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., 2005. The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods Enzymol.* 397, 292-308.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187, 182-188.
- Johansson, A., Aspan, A., Kaldhusdal, M., Engstrom, B.E., 2010. Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 144, 87-92.
- Keyburn, A.L., Yan, X.X., Bannam, T.L., Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., 2010. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet. Res.* 41, 21.
- Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B., Tannock, G.W., 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5918-5924.

- Lanckriet, A., Timbermont, L., De Gussem, M., Marien, M., Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2010. The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 39, 63-68.
- Lepp, D., Gong, J., Songer, J.G., Boerlin, P., Parreira, V.R., Prescott, J.F., 2013. Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. *J. Bacteriol.* 195, 1152-1166.
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V.R., Marri, P.R., Rosey, E.L., Gong, J., Songer, J.G., Vedantam, G., Prescott, J.F., 2010. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One* 5, e10795.
- Lu, J., Sanchez, S., Hofacre, C., Maurer, J.J., Harmon, B.G., Lee, M.D., 2003. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 901-908.
- Maharjan, R.P., Ferenci, T., Reeves, P.R., Li, Y., Liu, B., Wang, L., 2012. The multiplicity of divergence mechanisms in a single evolving population. *Genome Biol.* 13, R41.
- Nauerby, B., Pedersen, K., Madsen, M., 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet. Microbiol.* 94, 257-266.
- Parreira, V.R., Costa, M., Eikmeyer, F., Blom, J., Prescott, J.F., 2012. Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoS One* 7, e49753.
- Perron, G.G., Quessy, S., Letellier, A., Bell, G., 2007. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 7, 223-228.

- Racicot, M., Venne, D., Durivage, A., Vaillancourt, J.P., 2011. Description of 44 biosecurity errors while entering and exiting poultry barns based on video surveillance in Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.* 100, 193-199.
- Rius, M., Darling, J.A., 2014. How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends Ecol. Evol.* 29, 233-242.
- Sawires, Y.S., Songer, J.G., 2006. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 12, 23-43.
- Seal, B.S., 2013. Characterization of bacteriophages virulent for *Clostridium perfringens* and identification of phage lytic enzymes as alternatives to antibiotics for potential control of the bacterium. *Poult. Sci.* 92, 526-533.
- Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., Titball, R.W., 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.* 17, 32-36.
- Wierup, M., 2001. The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microb. Drug. Resist.* 7, 183-190.
- Williams, L.K., Sait, L.C., Cogan, T.A., Jorgensen, F., Grogono-Thomas, R., Humphrey, T.J., 2012. Enrichment culture can bias the isolation of *Campylobacter* subtypes. *Epidemiol. Infect.* 140, 1227-1235.
- Wu, Y., Saddler, C.A., Valckenborgh, F., Tanaka, M.M., 2014. Dynamics of evolutionary rescue in changing environments and the emergence of antibiotic resistance. *J. Theor. Biol.* 340, 222-231.

Table 1. Random attribution of the three essential oil-based products (1,2,3) for to the production of drug-free flocks in eight Québec commercial broiler chicken farms.

Farm id	Production period						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	2	3	3	1	2	2
2	2	1	1	3	2	3	Study completed
3	3	1	1	2	3	3	2
4	1	3	2	1	Participant's withdrawal	-	-
5	3	2	2	1	2	1	3
6	3	1	1	2	3	3	Study completed
7	2	2	3	2	1	1	3
8	2	3	3	1	3	2	1

Table 2. Antimicrobial rotation in conventional barns over time during a 14-month field trial

Farm	Production period						
	1	2	3	4	5	6	7
1	VIR / ROB	BAC / ROB, SAL, MAD, DEC, 3-NIT	BAC / NAR, NIC, 3-NIT	BAC / NAR, NIC, MON	BAC, TYL / NAR, NIC, MON	TYL, VIR / NAR, NIC, MON, SAL	VIR / NAR, NIC, SAL
2	BAC / ROB, NAR, 3-NIT	BAC / ZOA, NAR, 3-NIT	TYL / MON, NIC, 3-NIC	TYL / MON, NIC, 3-NIT	TYL / MON, NIC, 3-NIT	TYL / MON, NIC, 3-NIT	Study completed
3	NAR	NAR	MON	MON	MON	MON	SAL
4	BAC / ROB, NAR, 3-NIT	BAC / ZOA, NAR, 3-NIT	TYL / MON, NIC, 3-NIT	TYL / MON, NIC, 3-NIT	Participant's withdrawal	Participant's withdrawal	Participant's withdrawal
5	VIR / CLOP, SAL, 3-NIT	VIR / CLOP, SAL, 3-NIT	VIR / CLOP, SAL, 3-NIT	VIR / NAR, MON	VIR / NAR, MON	VIR / NAR, MON	VIR / ROB, SAL
6	VIR / CLOP, SAL, 3-NIT	VIR, BAC / CLOP, NAR, NIC, 3-NIT	BAC / NAR, NIC	BAC / NAR, NIC, MON	BAC / NAR, NIC, 3-NIT	BAC / NAR, NIC, 3-NIT	Study completed
7	BAC / ROB, NAR, 3-NIT	BAC / ZOA, NAR, 3-NIT	BAC / CLOP, NAR, 3-NIT	TYL / NAR, NIC, 3-NIT	TYL / NAR, NIC, 3-NIT	TYL / NAR, NIC, 3-NIT	TYL, VIR / NAR, NIC, 3-NIT
8	VIR / ROB, 3- NIT, SAL	FLAV / NAR, NIC	FLAV / NAR, NIC	BAC / MON	BAC / MON	VIR / SAL	VIR / SAL

VIR= virginiamycin, BAC= bacitracin, TYL= tylosin, FLAV= flavomycin, ROB= robenidine, SAL= salinomycin, MAD= maduramicin, DEC= decoquinatone, 3-NIT= 3-nitro, NAR= narasin, NIC= nicarbazine, MON= monensin, CLOP= clopidol, ZOA= zoalene

Table 3. Number of positive isolates for *Clostridium perfringens* initially planned to be used for rarefaction curve generation and the number of these isolates actually used due to untypability by PFGE

Type of diversity and isolate origin	Actual number of strains genotyped/Number of isolates planned for genotyping	
	Drug-free program	Conventional protocol
Initial diversity		
Direct plating	37 / 52	19 / 34
Enrichment	31 / 49	22 / 41
<i>Total</i>	<i>68 / 101</i>	<i>41 / 75</i>
Final diversity		
Direct plating	48 / 56	46 / 48
Enrichment	42 / 49	30 / 39
<i>Total</i>	<i>90 / 105</i>	<i>76 / 87</i>

Table 4. Number of isolates genotyped *Clostridium perfringens* strains and corresponding number of genotypes identified between farm rearing protocols, sampling time points and isolation methods

Type of diversity and isolate origin	Number of genotypes identified/Number of isolates genotyped	
	Drug-free program	Conventional protocol
Initial diversity		
Direct plating	28 / 37	16 / 19
Enrichment	21 / 31	17 / 22
<i>Total</i>	<i>49 / 46</i>	<i>33 / 41</i>
Final diversity		
Direct plating	28 / 48	20 / 46
Enrichment	23 / 42	20 / 30
<i>Total</i>	<i>49 / 90</i>	<i>40 / 76</i>

Table 5. Distribution of *Clostridium perfringens* strains positive for the toxin genes screened between drug-free and conventional protocols, and initial and final time points of the study.

	Number of isolates (A)	% positive isolates for each toxin gene (C)							
		<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>cpb2*</i>	<i>tpeL</i>	<i>netB*</i>	<i>iA</i>	<i>etx</i>	<i>cpe</i>
Rearing protocol									
Conventional	117	100	0	79.5	0	63.2	0	0.8	0
Drug-free	158	100	0	82.3	0	78.5	1.3	0	0
Sampling time									
Initial	109	100	0	70.0	0	52.3	1.8	0.9	0
Final	166	100	0	90.4	0	84.9	0	0	0

A: comparing the relative number of isolates in each treatment at initial and final time points

C: comparing the relative number of isolates carrying virulence genes within any given treatment between initial and final time points

*indicates a significant difference in the ratio conventional and drug-free farms (using Bonferonni corrections)

Figure 1. Species richness estimates in drug-free (red) and conventional barns (blue) at the start (A) and at the end of the experiment (B). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 200 samples with 95% confidence intervals.

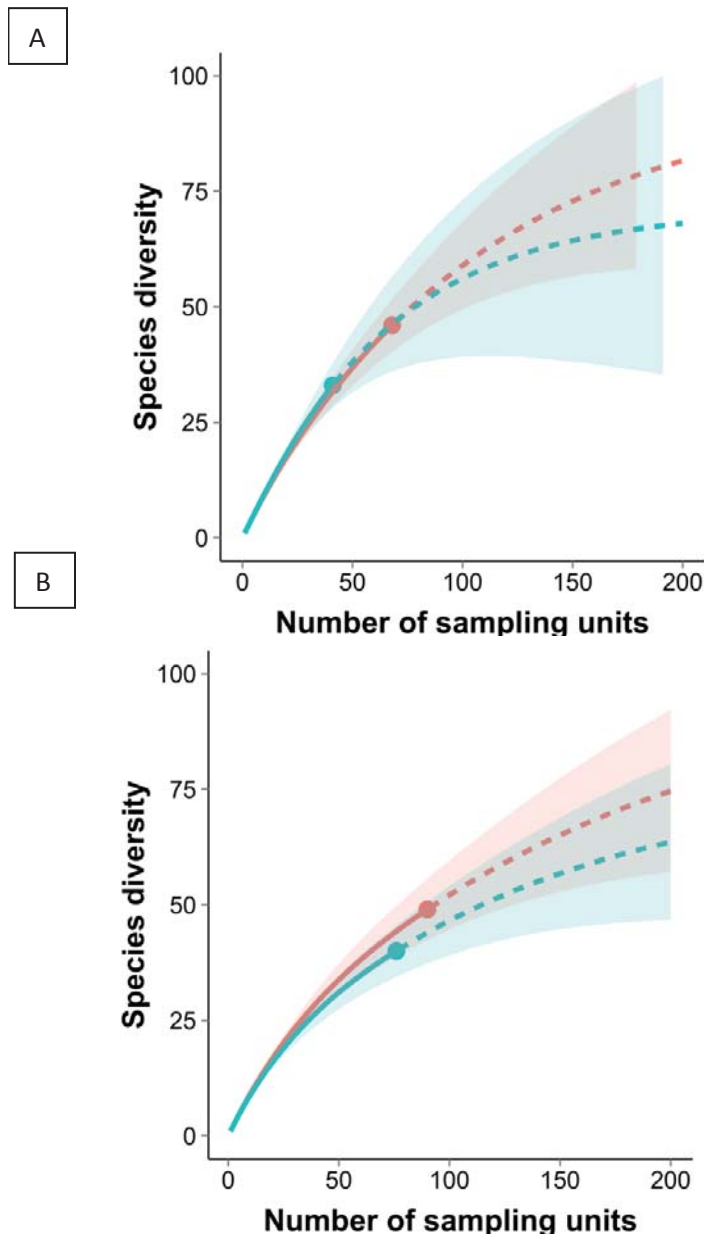


Figure 2. Species richness estimates (nb of genotypes vs nb of isolates) in drug-free (A) and conventional barns (B) at the start (blue) and at the end of the experiment (red). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 200 samples with 95% confidence intervals (shade area).

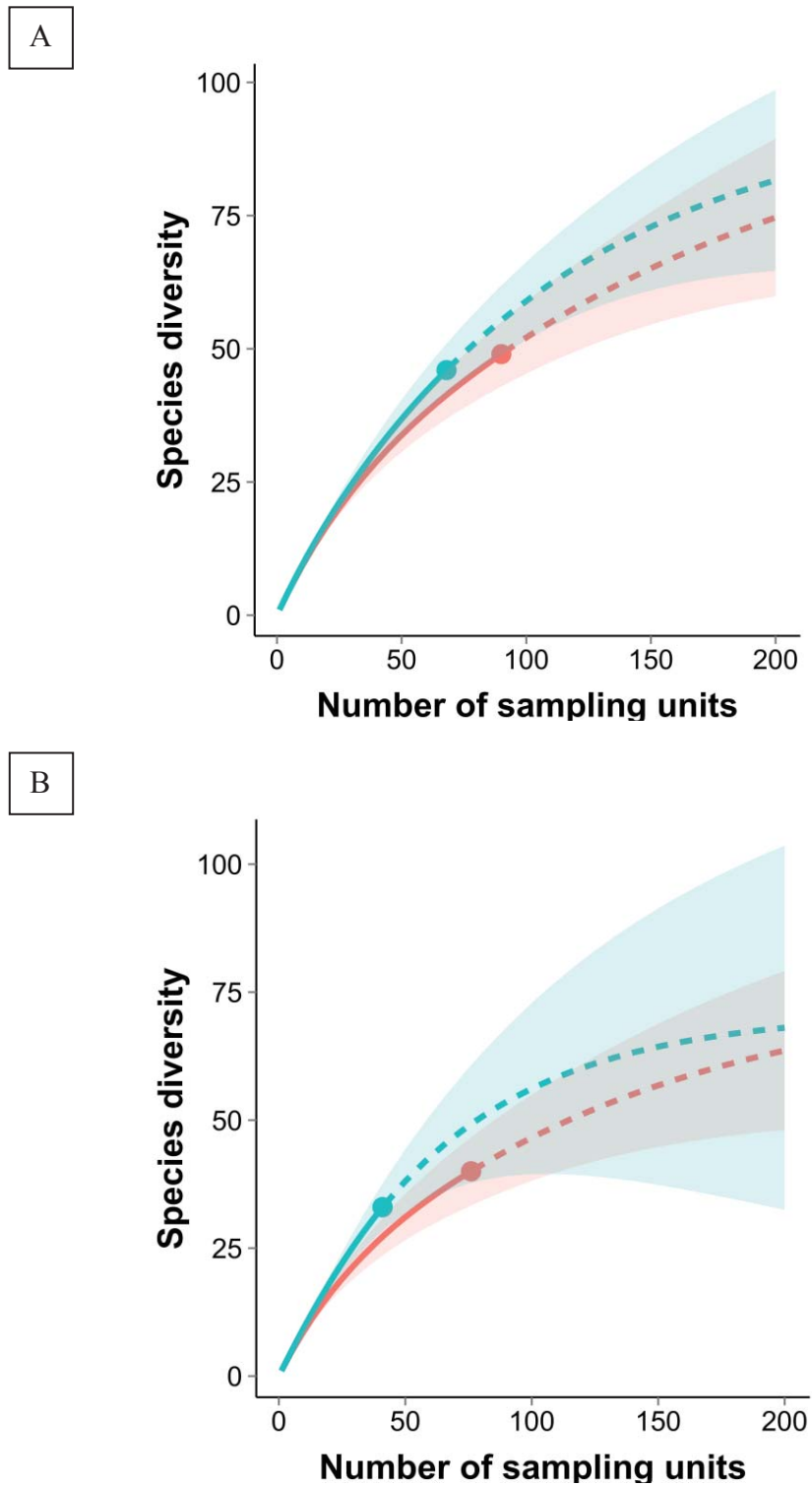
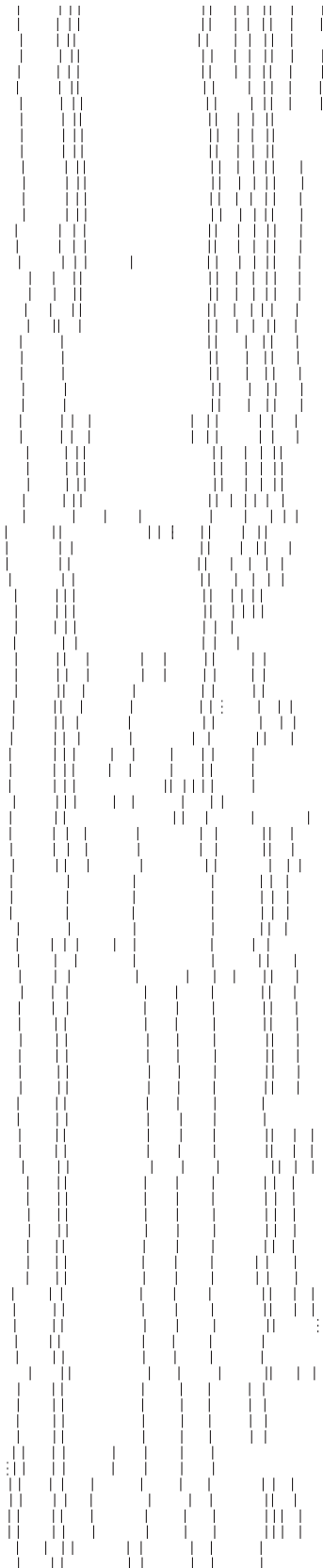
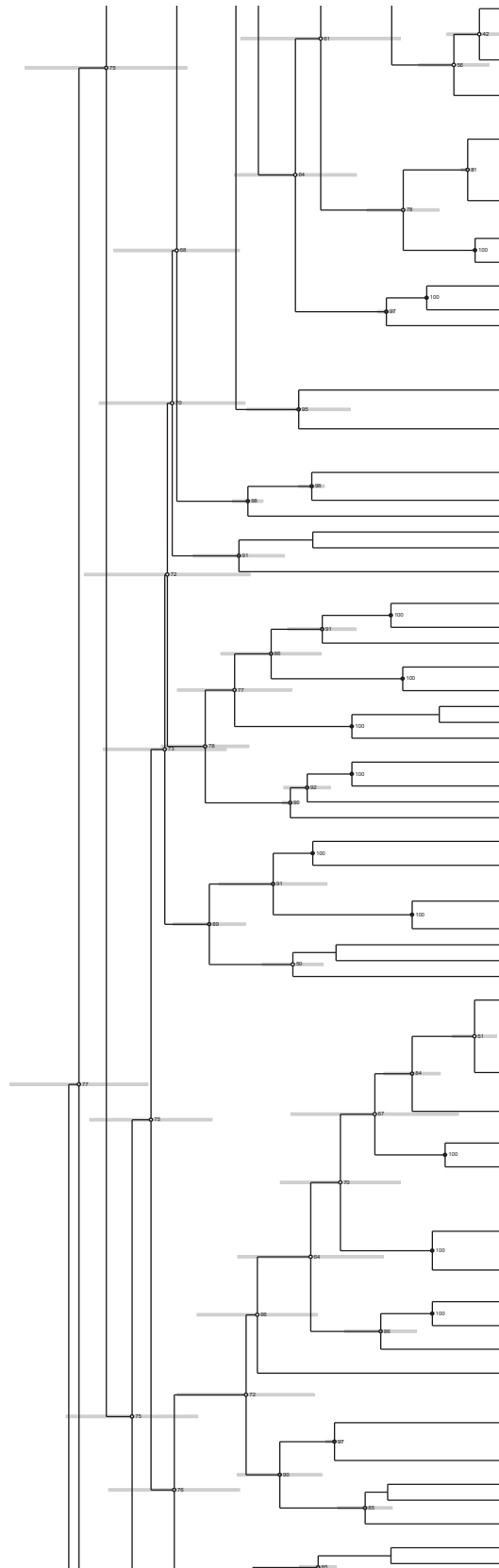


Figure 3. Dendrogram showing the distribution of the 146 genotypes from the 275 *Clostridium perfringens* isolates obtained by unweighted pair group method using arithmetic averages clustering with a Dice coefficient and 1% position tolerance. Informations to the right of dendroGram correspond to farm identification, rearing protocol, isolation media, sampling timepoint and genotype number.



3	c	cm	i	91
3	c	cm	i	91
4	a	cm	i	92
7	a	cm	i	93
3	c	cm	f	94
4	a	cm	i	95
4	a	cm	i	95
3	c	cm	i	96
3	c	tsc	f	97
7	c	cm	i	98
7	c	cm	i	98
7	c	cm	i	99
7	c	cm	i	99
7	c	cm	i	100
5	c	tsc	i	101
1	a	cm	i	102
8	a	tsc	f	103
8	a	tsc	f	104
7	c	tsc	f	105
7	c	tsc	f	105
7	c	tsc	f	105
8	a	tsc	f	106
8	a	tsc	f	106
8	a	tsc	f	106
8	c	tsc	i	106
8	a	tsc	f	107
8	a	tsc	i	107
7	c	tsc	f	108
7	c	tsc	f	108
7	c	tsc	f	109
7	c	tsc	f	109
7	c	tsc	f	110
7	c	cm	f	111
7	a	cm	f	111
7	c	cm	f	112
8	a	cm	i	113
5	a	tsc	f	114
8	a	cm	i	115
7	a	cm	f	116
7	a	cm	f	117
2	a	cm	f	117
7	c	cm	f	117
7	c	cm	f	117
7	a	cm	f	117
7	a	cm	f	117
2	a	cm	f	118
7	c	cm	f	118
7	a	cm	f	119
7	a	cm	f	119
7	a	cm	f	119
7	c	cm	f	120
7	c	cm	f	120
7	c	cm	f	120
7	a	cm	f	121
7	a	cm	f	121
7	c	cm	f	122
7	c	cm	f	122
4	a	cm	i	123
4	a	cm	i	124
5	c	tsc	i	125
5	c	tsc	i	125
5	c	tsc	i	126
5	a	tsc	i	127
5	a	cm	i	127
5	a	cm	i	127
5	c	cm	f	128
8	c	cm	f	129
7	c	tsc	i	130
7	c	tsc	i	131
5	a	cm	i	131
2	a	tsc	i	132
7	a	tsc	i	133
7	a	tsc	i	133
6	a	tsc	i	133
7	a	tsc	i	133
6	c	tsc	i	133
6	c	tsc	i	133
3	a	cm	f	134
6	c	tsc	i	134
5	a	tsc	i	135
7	a	tsc	i	136
1	c	tsc	i	137
8	c	cm	f	138
8	c	cm	f	138
6	c	cm	i	139
3	a	tsc	f	140
4	a	tsc	i	141
3	c	cm	i	142
3	c	cm	i	143
3	c	cm	i	144
6	a	tsc	i	145
7	a	tsc	f	146



7	c	tsc	f	43
7	c	tsc	f	43
7	c	tsc	f	43
7	c	tsc	f	43
7	c	tsc	f	44
7	c	tsc	f	44
5	a	cm	f	45
7	c	cm	f	45
7	c	cm	f	45
7	c	tsc	f	46
7	c	tsc	f	46
7	c	tsc	f	46
7	a	cm	f	47
7	a	cm	f	47
5	a	cm	f	47
7	a	tsc	f	48
7	a	tsc	f	48
7	a	cm	f	49
7	a	cm	f	50
8	a	tsc	f	51
8	a	tsc	f	51
8	a	tsc	f	51
8	a	tsc	f	51
7	a	cm	i	52
7	a	cm	i	52
2	a	tsc	f	53
2	a	tsc	f	53
5	a	tsc	f	54
1	c	cm	i	55
4	a	tsc	i	55
4	a	tsc	i	56
4	a	tsc	i	57
4	a	tsc	i	57
5	a	tsc	f	58
5	a	tsc	f	58
3	a	cm	i	59
4	a	tsc	i	60
3	a	tsc	f	61
3	a	tsc	f	61
3	c	cm	f	62
3	c	cm	f	63
3	c	cm	f	64
4	a	tsc	i	65
1	a	tsc	i	66
1	a	tsc	i	66
2	a	tsc	f	67
1	a	tsc	i	68
4	a	tsc	i	69
4	a	tsc	i	70
4	a	tsc	i	70
3	a	tsc	f	71
1	a	tsc	i	72
1	a	tsc	f	72
1	a	tsc	f	73
1	a	tsc	i	74
7	c	tsc	i	75
5	a	tsc	i	76
7	a	cm	i	77
7	a	cm	i	77
6	a	tsc	i	77
6	a	tsc	i	77
6	c	tsc	i	77
7	a	cm	i	77
7	a	cm	i	78
7	a	cm	i	78
7	a	cm	i	79
7	a	cm	i	79
7	a	cm	i	79
6	c	tsc	i	81
7	a	cm	i	81
7	a	cm	i	81
7	a	tsc	i	81
6	c	tsc	i	81
7	a	cm	i	82
7	a	cm	i	82
2	a	tsc	i	83
2	a	tsc	i	83
7	a	cm	i	84
7	a	cm	i	85
6	c	cm	i	85
7	a	cm	i	86
6	a	tsc	f	87
6	a	tsc	f	87
6	a	tsc	f	87
6	a	tsc	f	87
3	c	cm	i	88
3	c	cm	i	88
3	c	cm	i	89
3	c	cm	i	90
3	c	cm	i	91
3	c	cm	i	91
4	a	cm	i	92
7	a	cm	i	93

Chapitre 5. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

**Recurring necrotic enteritis outbreaks in commercial broiler chicken flocks
strongly**

influence *Clostridium perfringens* population diversity evolution

M-L. Gaucher^a, G. G. Perron^b, J. Arsenault^c, A. Letellier^a, M. Boulianne^d, S. Quessy^a

^a Research Chair in Meat Safety, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

^b Program of Biology, Bard College, 30 Campus Road, Annandale-On-Hudson, NY 12504.

^c Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA), Département de pathologie et microbiologie vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

^d Chair in Poultry Research, Département de Sciences Cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Corresponding author : Dr Sylvain Quessy, Département de Pathologie et
Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue
Sicotte, St-Hyacinthe, CP 5000, Québec, Canada J2S 7C6

5.1 Abstract

Extensive use of antibiotic growth promoters (AGPs) in food animals has been questioned due to the global increasing problem of antibiotic resistance. For the poultry industry, digestive health management following AGP withdrawal in European countries has been a challenge, with necrotic enteritis representing the main issue. Accordingly, considerable research efforts have been made by the scientific community to better understand and control the factors affecting gut health in commercial broiler chicken husbandry. Understanding the precise role of *Clostridium perfringens* in necrotic enteritis pathogenesis is a key element for a sustainable and cost-effective production in the absence of AGPs. Using PCR and PFGE molecular approaches, we evaluated how *C. perfringens* population evolved, in drug-free commercial broiler chicken flocks, either healthy or with recurring clinical necrotic enteritis outbreaks, over a 14-month period. Results showed that a high genotypic diversity was associated with an increased risk of experiencing clinical necrotic enteritis. Also, NE-affected farms showed a significant reduction of this *C. perfringens* genotypic diversity over time, as well as an increase in the number of *C. perfringens* strains harboring multiple virulence genes. Necrotic enteritis occurrence not only seems to be correlated with the presence of an initially highly diverse *C. perfringens* population, but appears to largely influence the evolution of this species richness in poultry farms within a 14-month period.

Key words : commercial broiler chickens, drug-free program, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, diversity

5.2 Introduction

In order to meet the constantly growing demand for poultry meat, high production standards must be met to ensure optimum feed efficiency, weight gain and subsequent meat yield. In this context, a healthy and functional digestive tract in commercially-raised broiler chickens is essential. Antibiotic growth promoters and anticoccidials (antimicrobials) have long been used to positively impact this precarious intestinal health balance and prevent a diseased state under intensive commercial broiler production conditions (Porter, 1998; Daniel et al., 2011). However, the large-scale use of antimicrobials in animal production is no longer considered as an optimal option due to concerns raised over food-producing animals representing a major reservoir for the transmission of antibiotic resistant pathogens to humans (Seal et al., 2013). Unfortunately, antimicrobials withdrawal represents one of the most triggering factors affecting gut health in intensively-reared broiler chickens (Timbermont et al., 2011). Indeed, following the voluntary ban on antibiotic growth promoters (AGPs) in European countries, expected effects on production performances were noted, but this decision was also correlated with an increased incidence of digestive problems in poultry flocks, such as necrotic enteritis (NE) (Van Immerseel et al., 2009). Accordingly, these regulatory restrictions, as well as the rising limitations linked to the use of these compounds in other countries, have forced the poultry industry worldwide to work at identifying applicable alternatives able to keep gut health issues under control (Yegani and Korver, 2008).

Necrotic enteritis is a disease caused by *Clostridium perfringens* and impacts the economic, welfare, as well as the food safety aspects of the production (Van

Immerseel et al., 2004). Two presentations of the disease are recognized, the acute clinical form being the most devastating with mortality rates sometimes rising up to 50% (Cooper and Songer, 2009). The sub-clinical form is rather characterized by production losses due to altered digestive conditions caused by chronic intestinal mucosal damages combined with the absence of typical clinical signs in affected birds (Van Immerseel et al., 2004; Bannam et al., 2011). Nevertheless, as the exact mode of action of AGPs is yet to be explained, the identification of broadly effective replacement solutions to control NE in the absence of AGPs remains a challenge (Huyghebaert et al., 2011; Allen et al., 2013; Allen and Stanton, 2014). (Niewold, 2007; Smith, 2011). Until now, none of these strategies has been completely cost-effective in replacing AGPs, even in the presence of other control measures that beneficially affect gut health. This situation makes any research effort aiming at better understanding *C. perfringens* virulence highly relevant (Huyghebaert et al., 2011; Smith, 2011).

A previous field study was conducted by our group and compared the impact of commercially raising broiler chickens using two different farm rearing protocols: a conventional protocol where birds were fed a diet containing antimicrobials, and a drug-free program, where antimicrobials were replaced by a combination of alternative strategies including essential oil-based products added to poultry feed, an acidification of the drinking water, an anticoccidial vaccination, as well as an improvement of the brooding conditions. Results showed that the implementation of the drug-free program was strongly associated with an increased incidence of clinical necrotic enteritis outbreaks (Gaucher et al., 2015). Thus, as certain farms seem to be associated with a

higher risk of developing clinical necrotic enteritis, even under the same rearing protocol it becomes relevant to better characterize the *C. perfringens* community found in these healthy and NE-affected barns and see how recurring necrotic enteritis outbreaks might have influenced *C. perfringens* population diversity (Dumas et al., 2011, Smith, 2011). The aim of this study, therefore, was to compare *C. perfringens* strain diversity and virulence genes carriage initially found in these healthy and NE-affected flocks and see how a flock healthy status compared with recurring clinical necrotic enteritis influenced this bacterial species population over time.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Sample selection

C. perfringens strains used in this study were recovered from fecal samples collected during farm visits at the end of the rearing cycle in commercially-raised drug-free broiler chicken flocks. These farms were sampled as part of an impact assessment study conducted by the Québec poultry industry from May 2011 to July 2012 (Gaucher et al., 2015). For all participating farms of this field study, every pen of both barns was visited at three weeks of age, as well as the day before slaughter for the collection of fecal samples. For the current study, only *C. perfringens* strains isolated from three drug-free healthy farms and two drug-free farms affected with recurring clinical necrotic enteritis outbreaks were included. For those sampled farms, only the first two

(initial) and the last two (final) production periods of the field study were considered for molecular analysis (Table 1). Briefly, in the drug-free barn, AGPs and anticoccidials were withdrawn from the diet and replaced by an anticoccidial vaccination by spray cabinet (Coccivac ® B, Schering Plough) at the hatchery, an acidification of the drinking water with a commercial blend of inorganic and organic acids (Jefacid®, Jefo, Québec, Canada) to a pH of 4 during all the rearing cycle, three commercially available essential oil-based products added to the feed respecting a randomized-block design distribution over farms and time. Only one of these essential oil-based product out of the three was incorporated in the birds' diet per production period. All the chicks involved in the field study were injected at the hatchery either with Ceftiofur® or Linco-Spectin®. Finally, every farm was also required to comply with strict biosecurity measures in order to ascertain that each barn was considered as a closed and unique entity.

5.3.2 Isolation of *C. perfringens* strains

A direct plating isolation protocol was used. One millilitre of suspended feces was inoculated on Perfringens Agar Base media (LAB M, UK) plates containing 5% egg yolk emulsion and 400 mg/L of D-cycloserine as a selective agent (LAB M, UK). Plates were then incubated in anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada) at 37°C for 48 hours. Bacterial growth from the last quadrant was streaked on 5% sheep blood anaerobic *Brucella* agar plates with neomycin (Oxoid, Canada), and grown in anaerobic conditions at 37°C for 48 hours.

All suspect colonies showing typical beta-hemolysis were selected and their identity was confirmed by the reverse CAMP test. Strains that were recovered were frozen in *Brucella* broth (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) freezing media containing 30% glycerol (Fisher Scientific, NJ, USA) at -80°C for further characterization (Chalmers et al., 2008).

5.3.3 *C. perfringens* reference strains

The following strains were used as positive controls in this study: *C. perfringens* type A (AHL316, positive for *plc* gene), *C. perfringens* type A (AHL311, positive for *plc* and *cpe* genes), *C. perfringens* type A (STF2003-1256, positive for *plc* and *netB* genes), *C. perfringens* type B (AHL156, positive for *plc*, *cpb* and *etx* genes), *C. perfringens* type D (AHL344, positive for *plc* and *etx* genes) and finally *C. perfringens* type E (AHL155, positive for *plc*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes).

5.3.4 Toxinotyping by multiplex PCR

C. perfringens strains recovered from the two farm clinical profiles were also screened for the presence of virulence genes encoding toxins. DNA extraction was performed according to Charlebois et al. (2012) with slight modifications for PCR optimization. Briefly, isolates were grown overnight on 5% sheep blood agar plates (Oxoid, Canada) at 37°C under anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). A loopful of colonies was suspended in 100 µL of a 10% Chelex 100 solution (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) and boiled for 20 minutes. Centrifugation at 13 000 rpm for 3 minutes was done and the supernatant containing DNA was collected and used for multiplex PCR. Two modified multiplex PCR

protocols were used for the detection of the toxin genes *cpa* (alpha), *cpb* (beta), *cpb2* ($\beta 2$), *tpeL* (TpeL), and *cpe* (enterotoxin), *netB* (NetB), *iA* (iota), *etx* (epsilon), respectively. Primer sequences were designed according to the protocols published by Charlebois et al. (2012) and Keyburn et al. (2010). PCR amplification of the genomic DNA was performed with a 25 μ L reaction volume and was done using 2,5 μ L of 10X PCR buffer (Invitrogen, Ontario, Canada), 0,05 μ M of $MgCl_2$ (Invitrogen, Ontario, Canada), 3 units of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Ontario, Canada), 25 μ M of dNTPs (Bio Basic Inc. Ontario, Canada), and specific concentrations of each selected primers (Invitrogen, Ontario, Canada): 4,2 μ M *cpa*, 1,28 μ M *cpb*, 2,72 μ M *cpb2*, 0,8 μ M *tpeL*, 0,9 μ M *cpe*, 0,6 μ M *netB*, 4 μ M *iA* and 0,7 μ M *etx*. Denaturation (94°C, 60 sec), annealing (55°C, 60 sec), and extension (72°C, 60 sec) were performed for 35 cycles. A hot start step of 2 min at 94°C and a 10 min final elongation step at 72°C were added. A 12,5 μ L volume of the PCR reaction product was submitted to electrophoresis using on a 1% agarose gel containing 0,01% SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Ontario, Canada). A 100 bp ladder (Track It, Invitrogen, Ontario, Canada) was used as a molecular weight marker.

5.3.5 Genotyping by pulsed-field gel electrophoresis

Plug preparation, restriction digestion and electrophoresis conditions were essentially performed according to the protocol previously described for *C. perfringens* by Chalmers et al. (2008). Isolates were grown at 37°C overnight on 5% sheep blood agar (Oxoid, Canada) in anaerobic conditions (AnaeroGen Gas Generating System, Oxoid, Ontario, Canada). As DNA degradation was a problem with *C. perfringens*

strains typing with PFGE, a formaldehyde treatment step, as described by Gibson et al. (1994), was added to the initial protocol. Briefly, harvested colonies were suspended in a 900 μ l suspension buffer (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8) volume to a final OD of 1,25 at 600 nm. Hundred μ L of a 40% formaldehyde solution (Fisher Scientific, NJ, USA) were added to the bacterial suspension. Suspensions were incubated for 1 h at room temperature. Bacterial cell washes with saline (0,85%) were then repeated three times and a final step involving bacterial cell suspension in 500 μ L saline was done. This final volume was embedded in an equal volume of 1,0% melted SeaKem Gold Agarose (Lonza, USA), poured into plug moulds for solidification at 4°C for 30 minutes. Cell lysis was done by incubating the plugs at 37°C with gentle shaking for 5 hours in a lysis buffer (10mM Tris, 100mM EDTA, 50 mg/ml lysozyme (Sigma-Aldrich, MO, USA). Plugs were rinsed for 15 minutes in TE buffer (10 mM Tris, 100 mM EDTA) and incubated overnight in EDTA 0,5M, 1% sarkosyl (Sigma-Aldrich, MO, USA) and 2 mg/ml proteinase K (Fisher Scientific, Canada). To remove traces of proteinase K, plugs were rinsed five times for 30 minutes each in washing buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8). One plug per isolate was equilibrated in 200 μ L restriction buffer (New England BioLabs, Ipswich, MA) at room temperature for 20 minutes and then transferred into 200 μ L of digestion buffer containing 100U of SmaI restriction enzyme (Chalmers et al., 2008) (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA). Low Range PFG marker (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA) was used for molecular weight standard purpose. Electrophoresis was performed in TE 1% SeaKem Gold Agarose gel that were ran in 2500 ml volume of 0,5% TBE buffer containing 200 μ M thiourea (Sigma-Aldrich, MO, USA) at 14°C for 19 hours. Pulse times started at 4s

and ended at 38s, with linear ramping and a field of 6 V/cm in a Bio-Rad CHEF II electrophoresis unit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Gels were stained with ethidium bromide and photographs were saved as tiff-files and loaded into BioNumerics software v6.0 (Applied Maths NV) for band matching. The unweighted pair group for arithmetic means (UPGMA) tree-building approach with 0,5% optimization and 1% position tolerance was used for band matching and macrorestriction patterns similarity was compared using Dice coefficient. A dendroGram was generated. A similarity of more than 95% was set as a limit for isolates to be considered as a same PFGE type (Gholamiandekhordi et al., 2006).

5.3.6 Statistical analyses

5.3.6.1 Diversity analysis. First, we compared the number of strains isolated between healthy and diseased flocks. To do so, we compiled the strains for each group into a single data set and used a Fisher's Exact test to investigate whether the relative frequency of strains in each types of farms stayed constant throughout the study.

We then explored genotypic diversity by controlling for the difference in number of strains isolated between the two health status and compared the genetic diversity of isolated *C. perfringens* strains both at the start and at the end of the study period using rarefaction curves and extrapolation curves. Rarefaction curves are plots of the cumulative species richness as a function of the numbers of individuals sampled and they allow comparison of species richness among specific environments on an equal-effort basis (Gotelli and Colwell, 2001). Rarefaction and extrapolation curves with 95% confidence intervals were computed using the iNEXT package as

implemented in the R programming environment (v.3.1.2) (cit from <http://chao.stat.nthu.edu.tw/blog/software-download/inext-r-package/>) (Chao et al., 2014).

5.3.6.2 Toxinotyping analysis. We first used a series of Fisher Exact tests to investigate whether toxin genes were found at different frequencies between both healthy and diseased flocks at the start and at the end of the field study. We also tested whether these genes changed in frequency over the course of the experiment with each clinical profile. Because of the multiple statistical tests, we used a Bonferroni correction and adjusted our critical p-value ($\alpha= 0.00625$). We also investigated whether the number of strains harboring multiple virulence genes increased over time in either farm type. We first implemented a 2X3 contingency table (initial and final time points vs 0, 1 and 2 or more virulence genes), and used the Fisher's Exact test to evaluate if a change in the ratio of *C. perfringens* strains carrying multiple virulence genes was observed over the study period. We then investigated whether the changes in frequency of strains carrying multiple virulence genes was due to changes in strains with two virulence genes or strains harboring one or no virulence genes within each health status. Again, because we conducted multiple statistical tests, we used a Bonferroni correction and adjusted our critical p-value ($\alpha= 0.00625$).

5.4 Results

5.4.1 *C. perfringens* isolation and typing

A total of 1592 *C. perfringens* isolates were recovered from all the sampling visit of the field study. However, a total of 134 *C. perfringens* strains were considered in the current study for the following reasons. They were associated with the fecal samples collected during the first two and the last two production periods on the two NE-affected and the three healthy drug-free farms of the field study. They were also recovered using a direct plating isolation method. Details about farms, production periods, strain recovery and genotypes identified are presented in Table 2. These strains were submitted to multiplex toxinotyping PCR, as well as PFGE profiling using *SmaI* restriction endonuclease. All isolates were successfully typed and genomic DNA digestion with *SmaI* enzyme generated 70 distinct genotypes, each comprising between 7 and 12 bands.

5.4.2 *C. perfringens* genotypic diversity

When combining all flocks together, we found that flocks that experienced NE were characterized by a larger number of strains than flocks that remained healthy throughout the study period. Interestingly, we found that the number of strains on diseased farms remained relatively similar throughout the study, whilst the number of strains increased in healthy farm (Fisher's Exact test: $P = 0.04$).

We then used a set of rarefaction and extrapolation curves to compare the genetic diversity found in healthy and diseased farms when controlling for sample size

at the different time points of the study. The rarefaction curves (full lines in Figures 1 and 2) enable to compare the genotypic diversity observed in the two farm health status for a given number of strains. Given the rarefaction, we see that there is a difference in the genotypic diversity between the samples associated with farms that remained healthy compared to farms where disease developed (Figure 1A). When we consider the extrapolation curves (dashed lines in Figure 1 and 2), which allow comparing the predicted total genotypic diversity if we were able to increase the sampling efforts, we can see that the difference in diversity is predicted to be even larger if we were to sample additional isolates. Interestingly, the difference in diversity disappeared by the end of the study (Figure 1B), mostly due to a significant decrease in diversity in diseased farms over the course of the study (Figure 2B). We observed a small increase in diversity in healthy farms (Figure 2A), but this difference is not significant, even when extrapolating over 100 samples.

5.4.3 *C. perfringens* toxinotyping by multiplex PCR

All the strains tested were found to be positive for the presence of *cpa* gene, confirming *C. perfringens* identity. Results pertaining to toxinotyping results are presented in Table 3. Using a Fisher's Exact test and a Bonferonni correction, we found that both β -2 and NetB toxin genes (*cpb2* and *netB*, respectively) were present at higher frequencies in healthy farms than in diseased farms at the start of the experiment ($P = 0.002$ and $P = 0.0008$). However, the final frequency of strains harboring these genes was not different between both farm health status at the end of the study ($P >$

0.05 for both genes). To see if *cpb2* or *netB* genes underwent a significant increase in either farm clinical profile during the study, a Fisher's Exact test was used. Interestingly, we found that both *cpb2* and *netB* increased in frequency in diseased farms ($P < 0.0001$). However, this significant increase was not observed for either genes in farms characterized by a healthy status ($P > 0.1$).

Interestingly, we found that isolates harboring two virulence genes significantly increased in frequency by the end of the experiment in NE-affected farms ($P < 0.001$) when compared to healthy farms ($P > 0.1$). Even more interesting, we consistently observed a reduction in the frequency of strains harboring a single virulence gene in diseased farms ($P < 0.001$), with a concomitant increase in the number of strains harboring two virulence genes ($P < 0.001$). Statistical analysis demonstrated that such a change in the number of virulence genes harbored by strains recovered from healthy farms was not observed ($P > 0.1$), meaning that the occurrence of strains harboring multiple virulence genes did not significantly vary over time in the farms not experiencing necrotic enteritis.

5.5 Discussion

Since the European regulatory ban imposed on the use of antibiotic growth promoters in poultry feed combined with the reduced use of these compounds in many other countries, necrotic enteritis has become a major economical challenge for the poultry industry worldwide (Sluis, 2000; Gholamiandekordi et al., 2006).

Surprisingly, even though many studies have been conducted to better describe the role of *C. perfringens* in the disease pathogenesis, very little research work has been done to better characterize this microorganism population evolution over time in commercial broiler chicken farms where the use of antimicrobials has been discontinued. More importantly, much remains to be explained to better understand why raising drug-free birds would be more challenging in some farms in regard to digestive health management (Brady et al., 2010; Smith, 2011). The current study provides new insights into the dynamics of *C. perfringens* in drug-free farms, according to their digestive health clinical profile. As expected, some of our participating farms experienced necrotic enteritis during our field study. As all participating farms were standardized and because the drug-free program was implemented in a stringent and harmonized manner within each and between participating farms, we can suppose that the different *C. perfringens* populations living in these farms had a role to play, not only in the occurrence of the disease at the beginning of the project, but also in the recurrent nature of the problem (Barbara et al., 2008; Cooper and Songer, 2009; Lepp et al., 2010; Shojadoost et al., 2012).

In healthy and well performing farms, *C. perfringens* species richness was lower and relatively well assessed with our initial sampling procedure, an affirmation supported by the more rapidly plateauing appearance of the rarefaction curve (Gotelli and Colwell, 2001; Hughes and Hellmann, 2005). Conversely, one unanticipated result was the presence of a higher and not all revealed genotypic diversity found at the beginning of the field study in farms associated with recurring NE outbreaks. This higher diversity might have increased the likelihood that a virulent clone might be

present at the start of the study. Also, these NE-affected farms might have been more prone to experience clinical outbreaks at the onset of the project due to the presence of this more significant and diverse *C. perfringens* population. Indeed, a mild sub-clinical form of necrotic enteritis can exist even in the presence of antimicrobials and more importantly, can be correlated with a larger and a more diverse *C. perfringens* population (Johansson et al., 2010; Lyhs et al., 2013). Furthermore, *C. perfringens* can show high levels of resistance to the antibiotics that were routinely used as growth promoters on these NE-affected farms before their removal, supporting the contribution of a less well-controlled population in the occurrence of these disease outbreaks (Watkins et al., 1997; Johansson et al., 2004; Martel et al., 2004; Silva et al., 2009; Gharaibeh et al., 2010; Charlebois et al., 2012). Both antimicrobial resistance and virulence genes can contribute to the adaptation process of *C. perfringens*, and although antibiotic resistance was not the cause of NE outbreaks in diseased farms of this study, it may have contributed to it by fostering the colonization of *C. perfringens* strains harboring these plasmids (Beceiro et al., 2013). Evaluation of the antibiotic resistance profile of the recovered *C. perfringens* strains from these farms at the end of the study could then be interesting as the genes encoding antibiotic resistance can be found on the same plasmids carrying the toxins genes that showed a significant increase in frequency over time in the diseased farms of the current study (Harrison and Brockhurst, 2012; Palliyeguru and Rose, 2014). If that is the case, the recurring nature of disease outbreaks observed on these farms could conversely have contributed to an increased prevalence of strains showing antibiotic resistance at the end of the experiment (Beceiro et al., 2013).

The evolution of *C. perfringens* diversity over the study period also showed great differences between both farm clinical profiles based on rarefaction curves (Perron et al., 2007). Interestingly, in healthy and well-performing farms, rarefaction curves demonstrated that the *C. perfringens* diversity found was relatively well assessed by our sampling procedure, except for the initial sampling time point in farms where NE developed. However, diversity was well revealed by our final sampling (Colwell et al., 2004). The rarefaction curve associated with this healthy status let us pretend that the implementation of the drug-free program in these farms was associated with the development of a beneficial (Heuer et al., 2008) and saturating *C. perfringens* population for the birds, an affirmation supported by the performance results (see table of performance results). Thus, in healthy farms, this slight increase in overall population genetic diversity over time might be associated with a heightened capacity to respond to further selective pressure, as well as it could represent the successful establishment of a favorable and well-adapted population in this novel and challenging environment generated by the implementation of the drug-free program (Rius and Darling, 2014). The presence of multiple *C. perfringens* clones in healthy birds and healthy flocks has also been reported by other authors (Engstrom et al., 2003; Nauerby et al., 2003; Barbara et al., 2008; Chalmers et al., 2008). By contrast, the marked reduction in *C. perfringens* species richness observed at the end of the study for the farms that experienced recurring clinical necrotic enteritis is highly revealing. Indeed, as previously proposed, birds living in NE-affected farms may have acquired the virulent clone from their environment potentially contaminated following earlier episodes of subclinical NE. Accordingly, given the proper conditions engendered by

antimicrobial withdrawal, clinical NE outbreaks occurred in these farms, further increasing the available population of disease-causing strains (Cooper and Songer, 2009). This is also in accordance with the assumption stating that in a finite population, under specific conditions, a clone that is better adapted and able to use the niche's resources, can arise with all organisms of this population eventually becoming direct descendants of this fitter and favored ancestor (Doolittle, 2012; Maharjan et al., 2012). Furthermore, as a clinical necrotic enteritis outbreak is usually related to the selective multiplication of one virulent clone, it is possible for us to say that in diseased farms, the panmictic *C. perfringens* population is gradually replaced by the clonal expansion of a virulent strain (Sawires and Songer, 2006; Barbara et al., 2008; Timbermont et al., 2009). It is relevant to mention that antibiotic therapy with penicillin was used to control severe NE outbreaks and avoid further NE-associated complications in 2 of the 11 (one treatment on each affected farm) NE-affected flocks produced during the field study. This approach might also have, to a limited extent, contributed to the observed decrease in *C. perfringens* genotypic diversity by selectively eliminating specific susceptible clones.

Our sampling procedure most likely included this virulent clone when we consider the loss in species richness over time as well as the trend towards a more rapidly plateauing curve observed for these diseased farms at the end of the experiment (see figure 4).

Some factors might influence these virulent clones in their ability to colonize and persist in these NE-associated farms. One explanation could come from the

toxintyping results of the current study. It has been reported that *C. perfringens* strains associated with NE outbreaks would not only possess a chromosomal genetic background conferring them a selective advantage over the commensal strains (Chalmers et al., 2008; Hibberd et al., 2011; Lepp et al., 2013), but that these strains would also harbor many plasmid-borne virulence genes organized in pathogenicity loci (Lepp et al., 2010). Indeed, some genes found on these strains could be associated with a better adaptation to an environment where disease is raging and where they will be able to undergo positive selection (Sawires and Songer, 2006). Among these virulence genes, *netB*, which plays a critical role in NE pathogenesis, and *cpb2* have been identified within loci of the plasmids found in virulent strains (Lepp et al., 2010; Parreira et al., 2012). Surprisingly, a higher prevalence of strains carrying the *netB* gene was found in healthy farms. Though this situation has already been reported, we would have expected to see this higher prevalence in diseased farms (Abildgaard, 2010). This result could be explained by the fact that strains were typed for the healthy farms, as well as by the evidence that the sole presence of *netB* is not sufficient to cause clinical disease. Interestingly, in diseased farms of the current study, occurrence of *cpb2* and *netB* genes underwent a significant increase during the project. Furthermore, the frequency of strains harboring these genes was not only increased in these farms, but was also correlated with a decreased frequency of strains harboring one virulence gene, confirming the contribution of these plasmids in causing NE (Shojadoost et al., 2012). Two hypotheses can be proposed to explain this increased frequency in *netB* and *cpb2* harboring strains in diseased farms. The selective multiplication and amplification over time of a dominant clone harboring these genes

may have contributed to the observed increased occurrence of virulent strains as well as to the reduced genotypic variation also noted for these NE-affected farms (see figure 4). Also, as *cpb2* and *netB* genes reside on mobile genetic elements, we cannot exclude the possibility of an increased horizontal gene transfer between the different variants of *C. perfringens* colonizing the gut of NE-affected birds (Bannam et al., 2011; Stecher et al., 2012). Our results are consistent with those of previous studies reporting the important role of plasmid DNA conjugative transfer in antibiotic resistance and virulence gene transfer in influencing *C. perfringens* adaptation (Wisniewski et al., 2015). However, conducive conditions seem to be essential to promote an optimal horizontal transfer as healthy farms didn't show this upward trend in frequency of strains harboring more virulence genes. Moreover, even an increased genotypic diversity in these healthy farms was not correlated with an increased frequency of strains carrying these genes. Surprisingly, even if both β -2 and NetB toxin genes were present at higher frequencies in healthy farms at the start of the experiment, no clinical necrotic enteritis outbreak was observed throughout the duration of the study in these farms. The absence of the chromosomally-encoded genetic signature characteristic of NE-causing strains in the *C. perfringens* population colonizing these farms could potentially explain this observation but would need further investigation (Lepp et al., 2010). Also, even with the strict and uniformized application of the drug-free program protocol between farms and as the sole presence of *cpb2* and *netB* seems not to be always correlated with NE occurrence (Gholamiandekhordi et al., 2006; Keyburn et al., 2008; Martin and Smyth, 2009; Brady et al., 2010), other contributing factors might have been overshadowed. The final frequency of strains harboring virulence genes was

not different between both farm health status at the end of the study, further demonstrating the significant increase in diseased farms.

Findings of this study show that even under comparable levels of *C. perfringens* species richness, commercial broiler chicken farms submitted to a drug-free program can show significantly different profiles according to clinical necrotic enteritis. To further explain the results of the current study, different avenues could be considered. Among these, comparative genomics realized between virulent and commensal strains of *C. perfringens* could help explain why clinical necrotic enteritis was not observed in healthy farms despite the presence of strains harboring toxin genes (Lepp et al., 2010; Parreira et al., 2012; Lepp et al., 2013). A specific and beneficial intestinal microflora could also be involved in this healthy profile and would deserve a more comprehensive assessment (Torok et al., 2011; Singh et al., 2014; Stanley et al., 2014). Ultimately, a re-sampling of the *C. perfringens* populations living in the healthy and diseased participating farms after the re-introduction of antimicrobials could also help us to better assess the evolution of these populations under different selective environments.

5.6 Acknowledgements

We thank Marie Archambault for kindly providing the reference strains and Alexandre Quesy for his technical assistance in PFGE analyses realization. We also thank Huguette Mallet for her valuable assistance in editing the references.

5.7 References

Allen, H.K., and Stanton, T.B. (2014) Altered egos: antibiotic effects on food animal microbiomes. *Annu Rev Microbiol* **68**: 297-315.

Allen, H.K., Levine, U.Y., Looft, T., Bandrick, M., and Casey, T.A. (2013) Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol* **21**: 114-119.

Bannam, T.L., Yan, X.X., Harrison, P.F., Seemann, T., Keyburn, A.L., Stubenrauch, C. et al. (2011) Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *MBio* **2**.

Barbara, A.J., Trinh, H.T., Glock, R.D., and Glenn Songer, J. (2008) Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol* **126**: 377-382.

Beceiro, A., Tomas, M., and Bou, G. (2013) Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* **26**: 185-230.

Brady, J., Hernandez-Doria, J.D., Bennett, C., Guenter, W., House, J.D., and Rodriguez-Lecompte, J.C. (2010) Toxinotyping of necrotic enteritis-producing and commensal isolates of *Clostridium perfringens* from chickens fed organic diets. *Avian Pathol* **39**: 475-481.

Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J., and Boerlin, P. (2008) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol* **127**: 116-127.

Charlebois, A., Jalbert, L.A., Harel, J., Masson, L., and Archambault, M. (2012) Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One* **7**: e44449.

Colwell, R.K., Mao, C.X., and Chang, J. (2004) Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* **85**: 2717-2727.

Cooper, K.K., and Songer, J.G. (2009) Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* **15**: 55-60.

Daniel, C.R., Cross, A.J., Koebnick, C., and Sinha, R. (2011) Trends in meat consumption in the USA. *Public Health Nutr* **14**: 575-583.

Doolittle, W.F. (2012) Population genomics: how bacterial species form and why they don't exist. *Curr Biol* **22**: R451-453.

Dumas, M.D., Polson, S.W., Ritter, D., Ravel, J., Gelb, J., J., Morgan, R., and Wommack, K.E. (2011) Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. *PLoS ONE* **6**: e24785.

Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud, V., and Gunnarsson, A. (2003) Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol* **94**: 225-235.

Gharaibeh, S., Al Rifai, R., and Al-Majali, A. (2010) Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. *Anaerobe* **16**: 586-589.

Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., and Van Immerseel, F. (2006) Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet Microbiol* **113**: 143-152.

Gibson, J.R., Sutherland, K., and Owen, R.J. (1994) Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* **19**: 357-358.

Gotelli, N.J., and Colwell, R.K. (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol Lett* **4**: 379-391.

Harrison, E., and Brockhurst, M.A. (2012) Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol* **20**: 262-267.

Heuer, H., Abdo, Z., and Smalla, K. (2008) Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 361-371.

Hibberd, M.C., Neumann, A.P., Rehberger, T.G., and Siragusa, G.R. (2011) Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. *J Clin Microbiol* **49**: 1556-1567.

Hughes, J.B., and Hellmann, J.J. (2005) The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods Enzymol* **397**: 292-308.

Huyghebaert, G., Ducatelle, R., and Van Immerseel, F. (2011) An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J* **187**: 182-188.

Johansson, A., Greko, C., Engstrom, B.E., and Karlsson, M. (2004) Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol* **99**: 251-257.

Johansson, A., Aspan, A., Kaldhusdal, M., and Engstrom, B.E. (2010) Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol* **144**: 87-92.

Keyburn, A.L., Yan, X.X., Bannam, T.L., Van Immerseel, F., Rood, J.I., and Moore, R.J. (2010) Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res* **41**: 21.

Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D. et al. (2008) NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* **4**: e26.

Lepp, D., Gong, J., Songer, J.G., Boerlin, P., Parreira, V.R., and Prescott, J.F. (2013) Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. *J Bacteriol* **195**: 1152-1166.

Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V.R., Marri, P.R., Rosey, E.L., Gong, J. et al. (2010) Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One* **5**: e10795.

Lyhs, U., Perko-Makela, P., Kallio, H., Brockmann, A., Heinikainen, S., Tuuri, H., and Pedersen, K. (2013) Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poult Sci* **92**: 1750-1757.

Maharjan, R.P., Ferenci, T., Reeves, P.R., Li, Y., Liu, B., and Wang, L. (2012) The multiplicity of divergence mechanisms in a single evolving population. *Genome Biol* **13**: R41.

Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere, A., and Haesebrouck, F. (2004) Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol* **33**: 3-7.

Martin, T.G., and Smyth, J.A. (2009) Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet Microbiol* **136**: 202-205.

Nauerby, B., Pedersen, K., and Madsen, M. (2003) Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* **94**: 257-266.

Niewold, T.A. (2007) The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci* **86**: 605-609.

Palliyeguru, M.W.C.D., and Rose, S.P. (2014) Sub-clinical necrotic enteritis: its aetiology and predisposing factors in commercial broiler production. *Worlds Poult Sci J* **70**: 803-815.

Parreira, V.R., Costa, M., Eikmeyer, F., Blom, J., and Prescott, J.F. (2012) Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoS One* **7**: e49753.

Perron, G.G., Quessy, S., Letellier, A., and Bell, G. (2007) Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *Infect Genet Evol* **7**: 223-228.

Porter, R.E., Jr. (1998) Bacterial enteritides of poultry. *Poult Sci* **77**: 1159-1165.

Rius, M., and Darling, J.A. (2014) How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends Ecol Evol* **29**: 233-242.

Sawires, Y.S., and Songer, J.G. (2006) *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* **12**: 23-43.

Seal, B.S., Lillehoj, H.S., Donovan, D.M., and Gay, C.G. (2013) Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim Health Res Rev* **14**: 78-87.

Shojadoost, B., Vince, A.R., and Prescott, J.F. (2012) The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research* **43**.

Silva, R.O., Salvarani, F.M., Assis, R.A., Martins, N.R., Pires, P.S., and Lobato, F.C. (2009) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. *Braz J Microbiol* **40**: 262-264.

Singh, K.M., Shah, T.M., Reddy, B., Deshpande, S., Rank, D.N., and Joshi, C.G. (2014) Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. *J Appl Genet* **55**: 145-154.

Sluis, W.v.d. (2000) Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poultry* **16**: 42-43.

Smith, J.A. (2011) Experiences with drug-free broiler production. *Poult Sci* **90**: 2670-2678.

Stanley, D., Hughes, R.J., and Moore, R.J. (2014) Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 4301-4310.

Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M.J., Pickard, D.J. et al. (2012) Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 1269-1274.

Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Van Immerseel, F. (2011) Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol* **40**: 341-347.

Timbermont, L., Lanckriet, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Van Immerseel, F. (2009) Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Vet Microbiol* **137**: 388-391.

Torok, V.A., Hughes, R.J., Mikkelsen, L.L., Perez-Maldonado, R., Balding, K., MacAlpine, R. et al. (2011) Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5868-5878.

Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J., and Titball, R.W. (2009) Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol* **17**: 32-36.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. (2004) *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol* **33**: 537-549.

Watkins, K.L., Shryock, T.R., Dearth, R.N., and Saif, Y.M. (1997) In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet Microbiol* **54**: 195-200.

Wisniewski, J.A., Teng, W.L., Bannam, T.L., and Rood, J.I. (2015) Two novel membrane proteins, TcpD and TcpE, are essential for conjugative transfer of pCW3 in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **197**: 774-781.

Yegani, M., and Korver, D.R. (2008) Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult Sci* **87**: 2052-2063.

Table 1. Estimates (standard deviation) of performance parameters in drug-free farm categorization according to flock health status (data from Gaucher et al., 2015)

Performance parameters*	NE*-affected (n=11 flocks)	Healthy (n=21 flocks)
Livability (%)	97.25 (1.96)	98.56 (1.76)
Condemnations (%)	3.31 (2.58)	2.52 (1.19)
Mean live weight at slaughter (kg)	2.33 (0.15)	2.45 (0.22)
Mean daily weight gain (g/d)	61.90 (3.27)	60.86 (1.55)
Kg produced per square meter	25.46 (1.93)	27.88 (2.11)
Clinical necrotic enteritis (% of affected flocks)	100	0

*NE= necrotic enteritis

Table 2. Summary of health status and numbers of strains and genotypes associated with each drug-free farm.

	Farm identification number				
	3	4	5	7	8
Farm health status	Healthy	NE*	Healthy	NE	Healthy
Number of CP strains typed	6	43	16	43	26
Number of genotypes	4	22	8	23	13

*NE= necrotic enteritis

Table 3. Distribution of *Clostridium perfringens* strains positive for the toxin genes screened between healthy and diseased farms, and initial and final timepoints of the study.

	Number of isolates (A)	% positive isolates for each toxin gene (C)							
		<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>cpb2</i> *	<i>tpeL</i>	<i>netB</i> *	<i>iA</i>	<i>etx</i>	<i>cpe</i>
Farm health status									
Healthy	48	100	0	8.5	0	79.2	0	0	0
Diseased	86	100	0	63.9	0	58.1	11.6	0	0
Sampling time									
Initial	63	100	0	44.4	0	33.3	15.9	0	0
Final	71	100	0	95.8	0	94.4	0	0	0

A: comparing the relative number of isolates in each farm clinical profile at initial and final time points

C: comparing the relative number of isolates carrying virulence genes within any given farm clinical profile between initial and final time points

*indicate a significant difference in the ratio healthy and NE-affected farms (using Bonferonni corrections)

Figure 1. Species richness estimates (nb of genotypes vs nb of isolates) in farms that would experience disease (red) and farms that did not experience disease (blue) at the start of (A) and at the end of the experiment (B). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 100 samples with 95% confidence intervals (shade area).

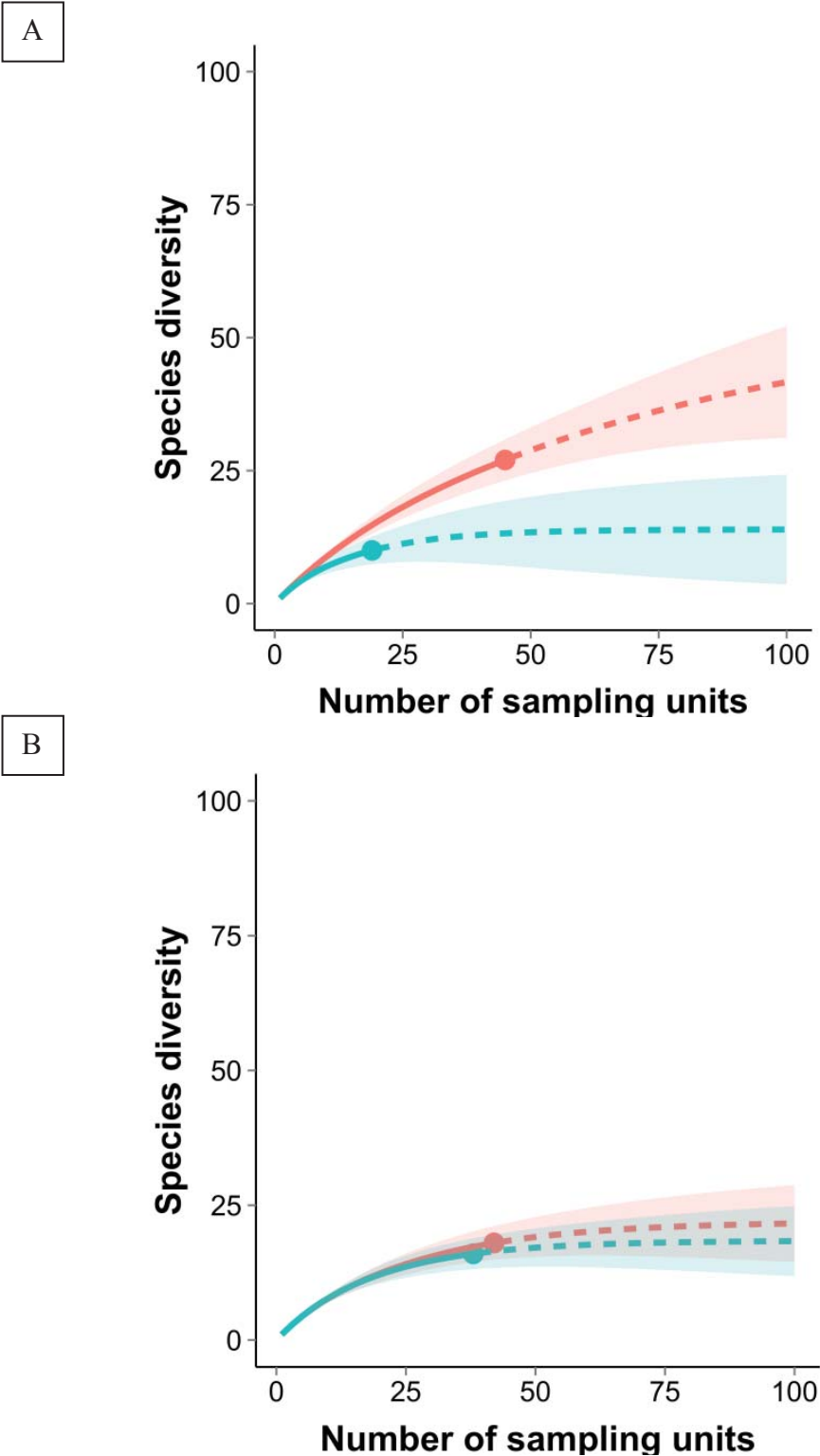
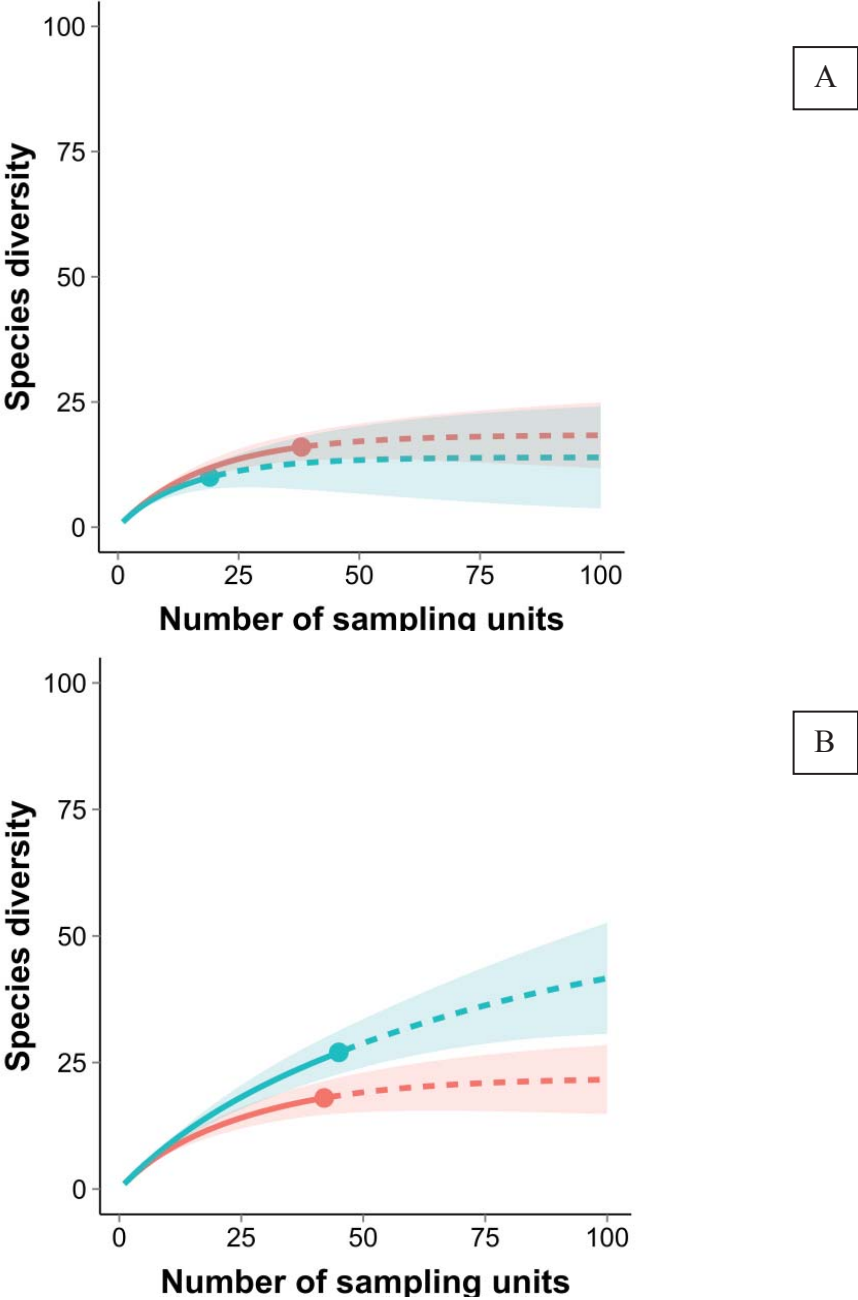
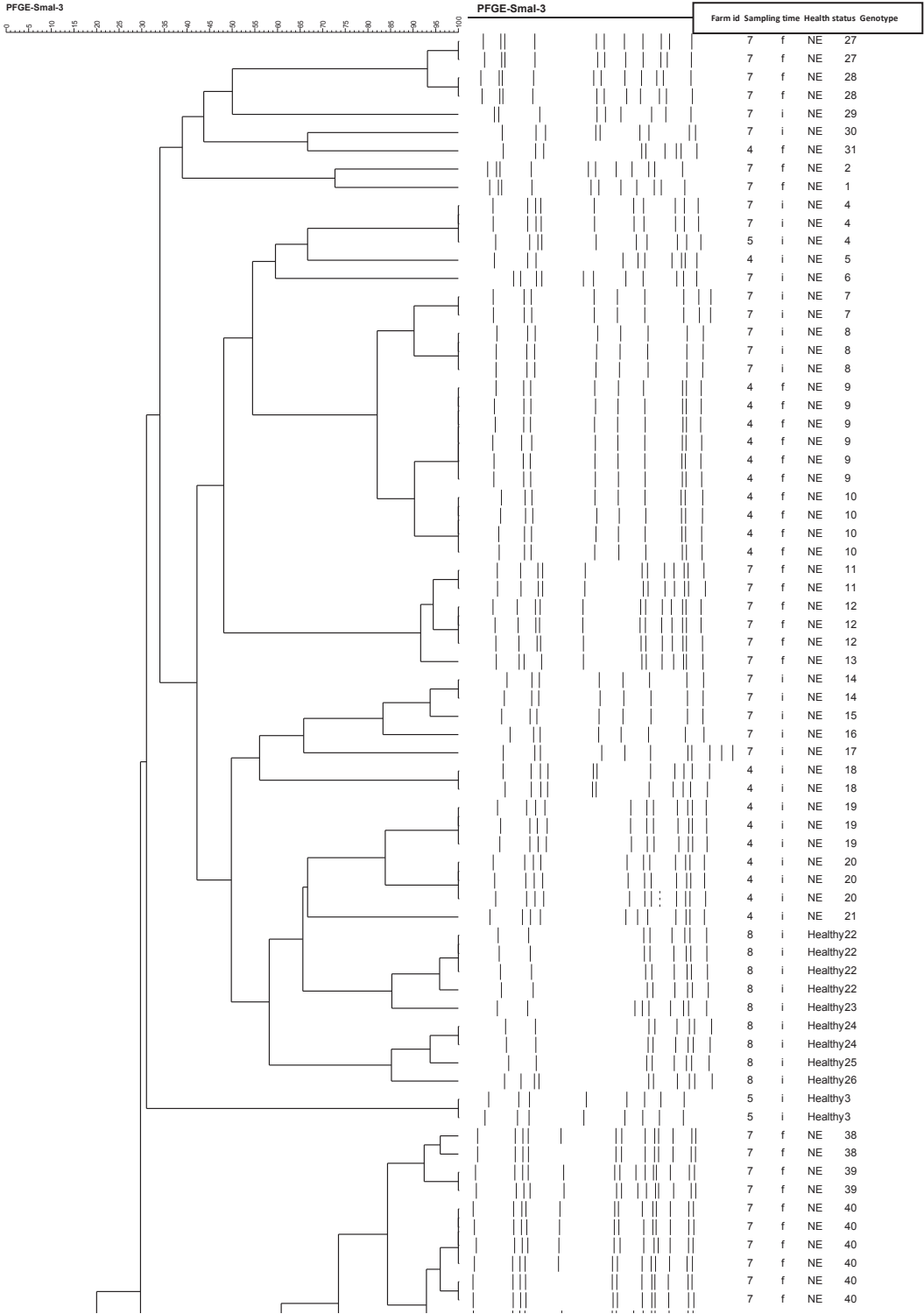


Figure 2. Species richness estimates (nb of genotypes vs nb of isolates) in farms that would stay healthy (A) and farms that would experience disease (B) at the start (blue) and at the end of the experiment (red). Species richness for rarefied (full lines) and extrapolated (dashed lines) curves for up to 100 samples with 95% confidence intervals (shade area).





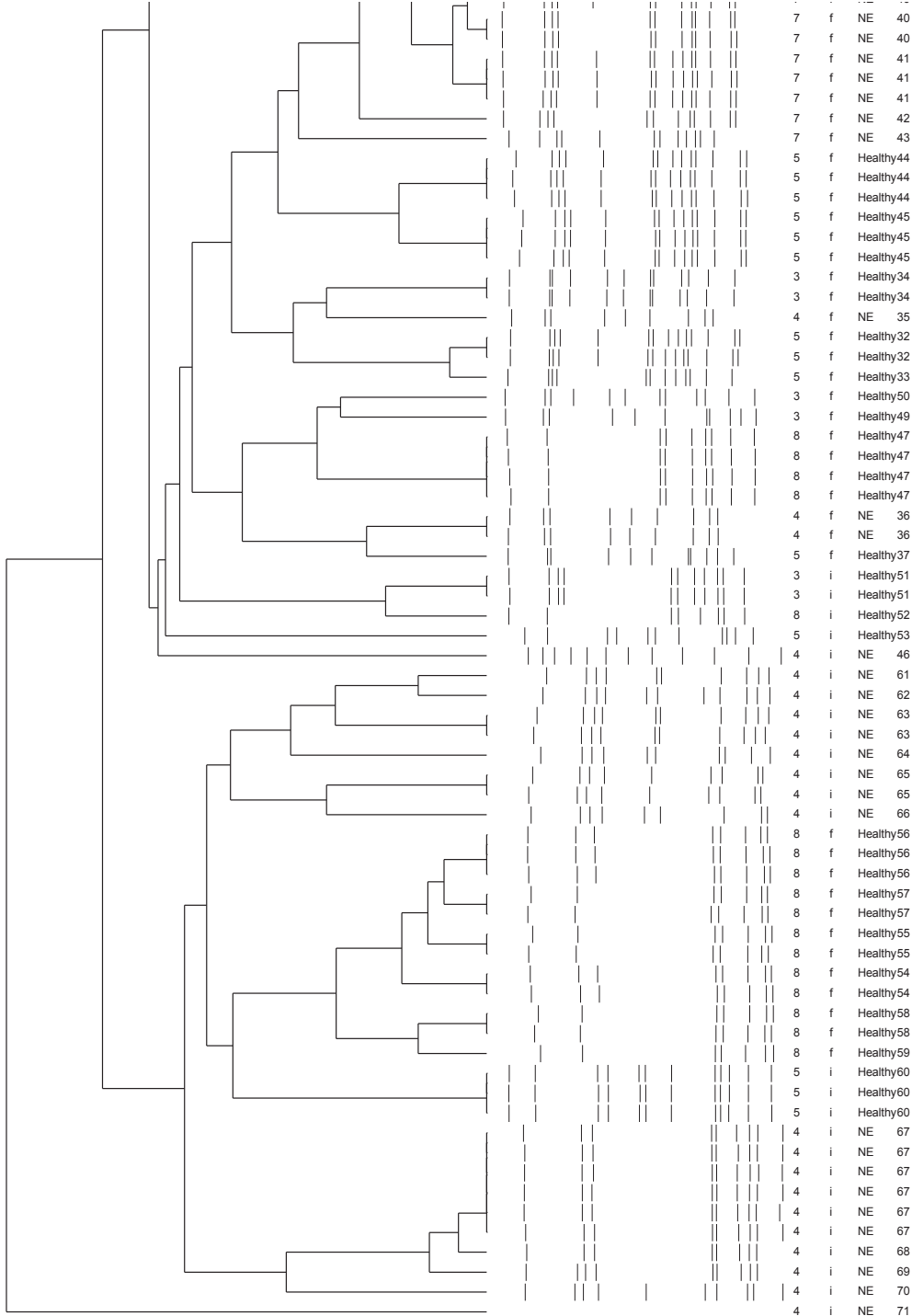


Figure 3. Dendrogram showing the distribution of the 71 genotypes from the 134 *Clostridium perfringens* isolates obtained by unweighted pair group method using arithmetic averages clustering with a Dice coefficient and 1% position tolerance. Informations to the right of dendrogram correspond to farm identification, sampling timepoint, farm health status and genotype number.

Chapitre 6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis les 25 dernières années, le phénomène de la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenu une préoccupation mondiale. Alors que l’OMS soutenait dans son rapport de 2008 qu’une utilisation prudente et judicieuse des antibiotiques en production animale était à privilégier, son rapport publié en 2014 fait plutôt état d’une situation alarmante, où un plan d’action global et coordonné est nécessaire afin de limiter l’ampleur que prend actuellement le phénomène de l’antibiorésistance. Ultimement, selon l’OMS, toutes les actions devraient être prises afin de préserver l’efficacité des antibiotiques pour leur usage en médecine humaine. Plusieurs causes sont pointées du doigt afin d’expliquer l’augmentation de la prévalence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques au cours des dernières années. Cependant, l’utilisation à grande échelle chez les animaux destinés à la consommation humaine est identifiée comme étant une cause majeure (305).

Pour l’industrie avicole québécoise, l’utilisation des antibiotiques en élevage représente un avantage économique certain, puisqu’elle contribue non seulement à l’amélioration des performances de croissance des oiseaux, mais aussi à la prévention des maladies. Leur retrait est associé à des conséquences importantes pour la production. Au Canada, les exigences rattachées à une appellation « sans antibiotiques » pour les produits de viande de volailles sont d’autant plus strictes, du fait que la réglementation interdit non seulement les antibiotiques, mais aussi l’utilisation des anticoccidiens utilisés pour prévenir la coccidiose aviaire. La présente étude avait donc pour but d’évaluer, s’il était économiquement rentable pour l’industrie

avicole québécoise, d'élever à grande échelle et sur une base commerciale, des poulets de chair mâles, sans l'ajout d'antibiotiques ni d'anticoccidiens à leur ration. Les données ainsi que les divers échantillons récoltés pendant cette étude ont non seulement permis de documenter les impacts de la production de poulets sans antibiotiques au Québec, mais serviront aussi à fonder les bases de travaux de recherche futurs visant l'optimisation d'une telle production. Le but ultime étant de répondre aux exigences auxquelles l'industrie avicole devra inévitablement se conformer.

Les hypothèses de ce projet étaient donc qu'il est possible, au Québec, d'élever des poulets de chair mâles sans l'ajout d'antibiotiques ni d'anticoccidiens à la ration, en remplaçant ceux-ci par un protocole d'élevage incluant diverses stratégies alternatives, telles que des produits à base d'huiles essentielles, un mélange d'acides organiques et inorganique, une vaccination contre la coccidiose ainsi qu'une amélioration des conditions de démarrage. Ce projet portant sur la production à grande échelle de poulets de chair élevés sans antibiotiques avait donc pour objectifs de mesurer l'impact de cette méthode d'élevage sur les performances zootechniques ainsi que sur la rentabilité des fermes, sur la santé digestive des oiseaux élevés selon ce protocole et sur la dynamique des populations de *C. perfringens* retrouvées dans les bâtiments soumis à cette méthode d'élevage sans antibiotiques.

6.1 Design expérimental

6.1.1 Sélection des fermes participantes

Malgré la législation en vigueur depuis 2006 pour les pays de l'Union Européenne, très peu d'études ont quantifié les impacts d'une telle décision sur la production commerciale de poulets de chair (306-311). De plus, à notre connaissance, aucune publication n'a rapporté la comparaison des résultats zootechniques ou de prévalence de clostridies dans des poulaillers soumis à divers protocoles d'élevage dans une étude prospective telle que celle présentée dans le présent ouvrage. Au Québec, l'industrie avicole n'avait jamais non plus documenté, de manière scientifique, l'effet du retrait des antimicrobiens dans les élevages de poulets de chair. Dans la présente étude, toutes les fermes de poulets de chair du Québec étaient invitées à participer au projet. Leur admissibilité était toutefois dictée par certains critères de sélection : les fermes participantes devaient être situées dans un rayon de 150 km de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour des raisons de logistique des échantillons récupérés lors des visites de fermes. Deux poulaillers adjacents et similaires en termes de dimensions, construction, équipements, pratiques de régie et employés, devaient être retrouvés sur un même site. Les deux bâtiments devaient avoir des sources identiques pour l'approvisionnement en poussins, en moulée et en l'eau. L'attribution des deux protocoles d'élevage était faite de façon aléatoire entre les deux bâtiments sur un même site et ne changeait pas dans le temps. Pour chacun des lots comparés, un maximum de 20 000 poulets de chair mâles élevés à une densité maximale 31 kg/m^2 était permis. Au total, ce sont huit fermes de régions géographiques différentes qui ont participé à la portion terrain de cette étude. Ces éléments viennent renforcer la validité scientifique de nos conclusions puisque les auteurs ayant publiés sur le sujet préalablement, rapportent l'importance de considérer

la densité d'élevage dans ce type de production (308, 310). De plus, il a été rapporté que les conditions du poulailler et de sa régie peuvent grandement influencer la communauté bactérienne pouvant être retrouvée à l'intérieur de celui-ci (312, 313). Les divers critères d'inclusion établis permettent ainsi d'assurer une gestion équivalente des deux bâtiments participants d'une même ferme, garantissant par le fait même une comparaison facilitée et précise de l'impact du retrait des antimicrobiens. Ceci représente généralement le facteur limitant pour les études du genre (307-310).

6.1.2 Amélioration des conditions de démarrage du poussin

Puisque la majorité des quelques études publiées sur l'élevage de poulets sans antibiotiques rapportent des effets négatifs du retrait des promoteurs de croissance sur les performances zootechniques, une attention particulière a été apportée aux éléments pouvant potentiellement compenser pour cette perte anticipée dans l'étude actuelle (10, 307, 308, 310). En effet, il a été démontré qu'une consommation alimentaire hâtive suite à l'éclosion optimise le développement de l'intestin encore incomplet chez le poussin (314). Les effets bénéfiques sont perçus autant sur le poids de l'intestin, que sur la profondeur des cryptes intestinales. Le nombre et la longueur des villosités intestinales sont aussi augmentés par cette alimentation précoce (315-318). Le fait de consommer rapidement la moulée favorise aussi la mise en place d'une fonction immunitaire optimale, et une prolifération accrue des cellules satellites des muscles squelettiques (314, 319). Tous ces éléments combinés ont pour conséquence ultime d'accroître l'absorption de nutriments par le tube digestif, d'optimiser la croissance

musculaire, et ultimement, d'améliorer les performances de croissance chez les oiseaux alimentés rapidement après la naissance (314, 320, 321).

Il n'est pas rare que des poussins demeurent plusieurs heures sans manger suite à l'éclosion (322). Dans une étude précédente, il a été démontré que lorsque plus de 30 heures s'écoulaient entre l'éclosion et le moment où des poussins avaient accès à la moulée, on observait une baisse significative de 7% du gain de poids à 7 jours d'âge. Les répercussions de cette privation se faisaient même sentir jusqu'en fin d'élevage puisque les oiseaux ayant jeûné présentaient encore un poids inférieur (2,2%) à celui de ceux alimentés rapidement (323). Dans notre étude, alors qu'aucune indication particulière n'était donnée aux éleveurs participants quant à la régie de démarrage des poussins du poulailler conventionnel recevant des antibiotiques et anticoccidiens dans l'alimentation, une régie de départ stricte devait être appliquée pour les poulaillers soumis au protocole alternatif. La litière de ces poulaillers devait être chauffée au moins 24 heures avant la livraison des poussins, et une ventilation minimum devait être assurée en permanence afin d'éliminer les gaz nocifs. Afin d'optimiser la consommation alimentaire et le bien-être des oiseaux dans les premiers jours de vie, une zone de confort, où les poussins devaient être déposés à leur arrivée au poulailler, était délimitée pour chacun des poulaillers alternatifs participants. Cette zone de confort était délimitée en fonction du système de chauffage en place, et de la disposition des mangeoires et abreuvoirs. Une attention particulière devait être portée à la qualité de l'eau, à l'éclairage de la zone de confort, ainsi qu'à l'accessibilité à une quantité suffisante de moulée fraîche (324). Une visite des poussins était effectuée 24 heures suite à la livraison afin de valider la qualité du démarrage dans le poulailler sans

antibiotiques, et aussi dans le but de s'assurer que les changements associés à la mise en place de ce protocole de régie de départ optimisé n'étaient pas transposés au poulailler conventionnel. Des températures cloacales étaient mesurées pour évaluer le confort des oiseaux, et le remplissage des jabots servait à évaluer la consommation alimentaire. Le cas échéant, les différents éléments du protocole de démarrage étaient optimisés (325, 326). Quoique les poulaillers soumis aux deux types de protocole d'élevage de la présente étude ont montré des résultats significativement différents quant aux performances zootechniques et à l'incidence d'entérite nécrotique autant clinique que sous-clinique, il est tout de même permis de supposer que l'amélioration des conditions de démarrage a pu contribuer à atténuer non seulement les pertes de performances pour les lots soumis au protocole d'élevage alternatif, mais aussi la sévérité des épisodes d'entérite nécrotique (314).

6.1.3 Vaccination contre la coccidiose

La réglementation dictée par l'ACIA en ce qui a trait à l'appellation « sans antibiotiques » exige qu'un poulet élevé conformément à cette appellation ne doit pas recevoir, ni par l'aliment, ni par l'eau, d'antibiotiques ou d'anticoccidiens ionophores (ACIA). Cette exigence fait de l'élevage de poulets sans antibiotiques un défi encore plus complexe. En effet, les anticoccidiens ionophores agissent à deux niveaux. Ils assurent le contrôle de la coccidiose, une maladie parasitaire affectant le système digestif des volailles responsable non seulement de pertes de production, mais entraînant aussi la création d'un environnement favorisant l'apparition d'entérite

nécrotique (9, 20, 22, 41, 45, 78, 327). De plus, par leur action antimicrobienne sur les bactéries à Gram positif telles que *C. perfringens*, les anticoccidiens assurent un certain contrôle sur la multiplication de la bactérie dans l'intestin, et ainsi peuvent contribuer à diminuer le risque de développer l'entérite nécrotique (10, 70). Dans la présente étude, un vaccin à base de souches vivantes d'*Eimeria* a été administré au couvoir pour tous les oiseaux destinés au poulailler alternatif sur chacune des fermes. La qualité d'administration du vaccin ainsi que le niveau de sa réplication ont été étroitement surveillés lors des visites à la ferme. Plusieurs éléments viennent supporter le fait que l'utilisation de ce vaccin chez les oiseaux soumis au protocole d'élevage alternatif a pu être associée à une atténuation des pertes de production, ainsi que des pertes associées à l'entérite nécrotique. En effet, bien que peu d'études scientifiques aient été publiées quant à l'impact d'utiliser des vaccins constitués de souches vivantes d'*Eimeria* dans des lots de poulets commerciaux, certains auteurs rapportent un effet bénéfique de l'utilisation de ce vaccin sur la mortalité globale des troupeaux (181, 328). Bien que les souches d'*Eimeria* présentes dans ce vaccin entraîneront, lors de leur réplication dans les cellules intestinales, une dépression transitoire de la croissance des oiseaux, le développement de l'immunité protectrice qu'elles engendreront peu après sera plutôt associé à un gain de poids compensatoire chez les oiseaux vaccinés. À l'inverse, dans les poulaillers conventionnels de notre étude, l'utilisation des anticoccidiens a vraisemblablement eu pour effet de faire perdurer cette pression négative de l'infection par *Eimeria* sur la croissance de ces oiseaux. En effet, les programmes anticoccidiens utilisés en élevage conventionnel entraîne plutôt le développement d'une immunité tardive, ainsi qu'une absence de ce gain compensatoire en fin d'élevage (329, 330).

Dans une méta-analyse recensant la littérature publiée sur le sujet, Williams a trouvé des études rapportant que des troupeaux de poulets de chair vaccinés avec un vaccin vivant contre la coccidiose présentaient des performances de gain de poids, de conversion alimentaire et de mortalités améliorées (181). La même observation avait été faite dans une étude précédente qui rapportait des performances de croissance équivalentes entre des lots de poulets de chair vaccinés et des lots soumis à un programme anticoccidien (331). Les résultats contradictoires rapportés par certains auteurs pourraient, entre autres, être attribuables à la qualité de gestion du vaccin à la ferme (330). En conditions expérimentales, il a été rapporté que des oiseaux ayant reçu le vaccin performaient mieux que des oiseaux traités à la salinomycine (332). En se basant sur ces références, il est légitime de croire que l'utilisation d'un vaccin contre la coccidiose a pu contribuer à diminuer les pertes de performance reliées au retrait des antimicrobiens dans notre étude. Cependant, dans l'explication de nos résultats, nous nous devons tout de même de garder en tête que les souches vaccinales d'*Eimeria*, en se multipliant dans l'intestin des oiseaux vaccinés, vont causer des dommages à l'épithélium intestinal et provoquer la création d'un environnement favorable à l'apparition d'entérite nécrotique (20). En ce sens, l'utilisation de ce vaccin dans notre étude pourrait avoir contribué aux pertes associées aux épisodes d'entérite nécrotique. En effet, malgré une gestion stricte des conditions pouvant affecter le cycle du vaccin dans le poulailler (181, 330), il a été difficile pour les oiseaux des poulaillers soumis au protocole alternatif d'atteindre un pic d'excrétion oocytaire avant 16 à 17 jours d'âge, et ainsi de développer une immunité protectrice plus hâtive (330). Ainsi, comme la période la plus critique pour l'apparition d'entérite nécrotique chez ces oiseaux se situe

généralement entre 2 et 6 semaines d'âge, tous les épisodes d'entérite nécrotique observés pour les lots affectés lors de notre étude sont apparus lors de l'atteinte de ce pic d'excrétion oocytaire. Ce pic d'excrétion est associé au moment où la sévérité des lésions intestinales causées par le cycle du vaccin est habituellement la plus importante et précède le développement de l'immunité protectrice chez les oiseaux (32, 248, 333-336).

En se basant sur les résultats d'évaluation histologique des coupes d'intestins effectuées sur les oiseaux sélectionnés à partir de lots atteints d'entérite nécrotique dans notre étude, nous pouvons affirmer que ce ne sont pas tous les oiseaux d'un lot qui sont atteints de la maladie lors d'un épisode. Ainsi, chez les oiseaux demeurés sains, il est possible que l'utilisation du vaccin contre la coccidiose ait eu des effets positifs dans la prévention de l'entérite nécrotique. En effet, dans un modèle d'infection expérimentale pour l'entérite nécrotique, Tsiouris et coll. ont démontré que les souches vaccinales d'*Eimeria* pouvaient offrir une protection contre *C. perfringens* de deux façons différentes. Premièrement en prévenant les effets néfastes d'une coccidiose non contrôlée, un facteur de risque majeur pour l'apparition d'entérite nécrotique, mais aussi en créant un écosystème intestinal bénéfique suite aux modifications de pH intestinal et de viscosité du digesta (248, 275, 279). Dans un essai où des oiseaux ont été infectés avec une souche virulente de *C. perfringens*, les sujets qui présentaient une immunité protectrice contre *Eimeria* ont montré une diminution moins marquée du pH intestinal et de la viscosité du digesta suite à l'infection par *C. perfringens*, cette baisse étant reconnue comme facteur contribuant à la multiplication de la bactérie (41, 45, 182). Ainsi, pour les groupes immunisés contre *Eimeria*, les comptes de *C. perfringens*

retrouvés dans les ceaca étaient significativement diminués (275). De plus, en mimant une infection naturelle, la vaccination contre la coccidiose a pu agir de manière semblable à une approche de restriction alimentaire reconnue pour offrir une protection partielle contre l'entérite nécrotique (337, 338). Il a été démontré que le processus inflammatoire provoqué par l'infection à *Eimeria* est associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles entraînent une augmentation d'expression de la leptine, un peptide retrouvé au niveau de l'hypothalamus et responsable d'envoyer un signal de satiété. L'effet ultime de cette cascade se manifeste par une diminution de la prise alimentaire chez les oiseaux infectés (337, 338). Or, il a été démontré qu'une restriction temporaire sur la prise alimentaire des oiseaux dans la période critique pour l'apparition de l'entérite nécrotique assurait un contrôle partiel sur la maladie en influençant autant le pH intestinal, la viscosité du digesta, les comptes de *C. perfringens* ainsi que la sévérité des lésions, lorsque celles-ci se manifestaient (338).

Puisque les lésions intestinales causées par *Eimeria* peuvent exacerber les manifestations d'une souche virulente de *C. perfringens*, et parce que le design expérimental de notre étude ne permettait pas le développement d'une immunité protectrice complète contre la coccidiose avant l'atteinte de la période critique pour l'apparition d'un épisode d'entérite nécrotique, un peu plus du quart de nos lots soumis au protocole d'élevage alternatif ont présenté un épisode d'entérite nécrotique clinique (20, 32, 181, 277, 335, 339).

6.1.4 Stratégies alternatives administrées via l'aliment ou l'eau

Le protocole d'élevage alternatif incluait deux types d'additifs utilisés en remplacement des antibiotiques. Trois produits commerciaux à base d'huiles essentielles ont été utilisés en rotation dans le temps sur les fermes participantes (Oleo 10X-Oleo 500E, Probiotech, International Inc. Québec, Canada, Proteos Galleos, Substancia Inc., Québec, Canada, Biomin PEP, Biomin, Herzogenburg, Austria). Aussi, tous les poulaillers alternatifs se sont vus imposer l'ajout, à l'eau d'abreuvement des oiseaux, d'un produit commercial (Jefacid®, Jefo, Québec, Canada) formé d'un mélange d'acides organiques (citrique, lactique, malique) et inorganique (phosphorique). Le taux d'inclusion de ce produit a dû être ajusté pour chacune des fermes afin d'atteindre le pH visé de 4 tout au long de la période d'élevage. Lors d'essais antérieurs dans un modèle d'infection expérimentale pour l'entérite nécrotique, l'acidification de l'eau d'abreuvement à divers pH, par l'ajout de ce même produit, a permis de démontrer qu'une eau à un pH de 4 était associée à une atténuation de la sévérité des lésions, ainsi qu'à une diminution de la mortalité chez les oiseaux inoculés (Boulianne, M., données non-publiées). Les effets positifs des acides organiques faibles seraient attribués à divers modes d'action : en abaissant le pH interne des bactéries, en agissant comme un prébiotique sur la flore commensale, ainsi qu'en ayant un effet direct sur la paroi cellulaire bactérienne (137). Bien que les résultats de divers essais sur les acides organiques montrent que ceux-ci varient quant à leur efficacité à améliorer les performances de croissance (217, 221), il est en général reconnu qu'ils possèdent un effet inhibiteur sur la croissance de *C. perfringens*, en conditions *in vitro*, comme dans l'intestin des volailles (137). Même si dans notre étude les acides organiques et inorganique ont été utilisés en combinaison avec d'autres

approches alternatives, il nous est tout de même possible de supposer que ceux-ci ont eu un effet bénéfique à différents niveaux. Dans un premier temps, l'ajout de ces substances à l'eau ou à la ration des poulets ne devrait pas influencer la micro-architecture intestinale (340, 341), tel qu'observé lors des analyses histologiques réalisées sur les oiseaux de la présente étude. Cependant, ces additifs ont probablement agi à d'autres niveaux afin d'expliquer l'absence de différence entre les scores lésionnels calculés pour les groupes conventionnels et alternatifs. Avec leur effet inhibiteur sur la croissance de *C. perfringens*, les acides ont probablement contribué à atténuer la sévérité des épisodes d'entérite nécrotique observés sur certaines fermes et conséquemment, à maintenir à un certain niveau les performances de croissance (70, 137, 221, 340, 342). De plus, en modulant la microflore digestive et en contrôlant la charge bactérienne de *C. perfringens* dans l'intestin des volailles, les acides utilisés dans notre étude ont probablement participé à l'amélioration globale de la santé digestive des poulets soumis à ce traitement (247, 343). Chez les oiseaux de notre étude exposés à cette alternative, un système digestif en santé s'est fort probablement traduit par une absorption des nutriments optimisée, une amélioration de l'efficacité alimentaire, ainsi qu'un risque diminué de maladies intestinales telles que l'entérite nécrotique (23, 55, 70, 247, 344). Cependant, l'utilisation de cette stratégie alternative en combinaison avec d'autres approches, de la façon dont elle a été faite dans notre étude, rend l'interprétation des résultats plus complexe. Il devient ainsi plus difficile de déterminer le rôle exact joué par les acides organiques et inorganiques dans l'obtention des résultats. Chose certaine, l'utilisation de ces composés, même dans un protocole combinant plusieurs stratégies de contrôle, n'est pas parvenue à prévenir complètement

l'entérite nécrotique, autant clinique que sous-clinique, pour certaines fermes. Ceci est en accord avec des résultats rapportés par d'autres auteurs (221). À la limite, en tenant compte que notre interprétation est limitée par la combinaison des alternatives du programme sans antibiotiques, nous pourrions tout de même supposer que ces acides ont aidé à atténuer, soit l'incidence de maladie, soit la sévérité des épisodes le cas échéant. Ultiment, cette action aurait pu contribuer à diminuer les pertes de performances mesurées pour les deux traitements pendant l'étude.

Dans le même ordre d'idée, l'action bénéfique attribuable aux produits commerciaux à base d'huiles essentielles testés pendant cette portion terrain de notre étude est difficile à évaluer et se reflète probablement sur les résultats obtenus pour les divers paramètres zootechniques évalués. De nombreuses études ont documenté le pouvoir antibactérien des huiles essentielles (227). Mais plus spécifiquement, il a été démontré que des mélanges d'huiles essentielles, telles que le thymol, l'eugénol, le curcuma et le carvacrol, des composantes actives retrouvées dans les produits commerciaux utilisés dans notre étude, lorsqu'administrés à des poulets de chair, agiraient de diverses façons pour exercer leur impact positif. Il est donc légitime de penser que ces modes d'action auraient été impliqués dans l'obtention des résultats de la présente étude. Entre autres, les huiles essentielles et surtout leurs composantes actives auraient pu stimuler la libération de sécrétions digestives, et la motilité intestinale chez nos poulets élevés sans antimicrobiens. Tout ceci aurait eu comme effet d'optimiser le processus d'assimilation des nutriments chez ces oiseaux. De manière plus importante, ces composés alternatifs ont fort probablement contribué au maintien d'une flore digestive bénéfique à la santé, ainsi qu'au contrôle des épisodes

d'entérite nécrotique pour les lots produits avec le protocole d'élevage alternatif (227). En effet, tout comme il a été démontré par Mitsch et coll., les huiles essentielles parviendraient non seulement à limiter la colonisation et la prolifération de *C. perfringens* dans l'intestin des volailles, mais agiraient aussi en limitant la sévérité des lésions associées à l'infection par la bactérie. Quoiqu'il demeure difficile d'évaluer le rôle exact joué par les produits à base d'huiles essentielles utilisés sur les fermes de la présente étude, il est possible de croire que ceux-ci ont pu contribuer de la sorte afin de limiter les conséquences du retrait des antimicrobiens et des épisodes d'entérite nécrotique dans les lots de poulets alternatifs (227, 247). Les produits à base d'huiles essentielles utilisés dans notre étude auraient aussi pu contribuer à améliorer les performances de croissance des oiseaux exposés en atténuant les effets négatifs liés au passage intestinal du vaccin contre la coccidiose. En effet, des études réalisées sur le sujet montrent que les huiles essentielles seraient en mesure de diminuer l'excrétion oocytaire, limitant ainsi les dommages induits aux cellules intestinales, mais diminuant aussi la pression d'infection environnementale à laquelle les oiseaux sont par la suite exposés. Les effets positifs des huiles essentielles se feraient même sentir suite au passage du pic d'excrétion oocytaire et seraient alors associés à de meilleures performances de croissance suivant le développement de l'immunité protectrice (245). Il a de plus été démontré qu'en protégeant les villosités intestinales, et en augmentant l'épaisseur de la couche de mucus retrouvée à la surface de l'intestin, les huiles essentielles auraient la double fonction d'atténuer les dommages causés par le vaccin contre la coccidiose, mais aussi de limiter l'adhésion de *C. perfringens* et les conséquences associées à celle-ci (22, 37, 227).

6.2 Performances zootechniques

La plupart des quelques études scientifiques publiées sur l'impact du retrait des antibiotiques promoteurs de croissance diffèrent de l'étude actuelle sur plusieurs aspects. Ce sont principalement les pays européens, où l'interdiction d'utiliser des promoteurs de croissance chez les animaux de consommation a été mise en place il y a déjà quelques années, qui ont rapporté des résultats. Toutefois, puisque la législation en place dans ces pays diffère de ce que les normes canadiennes imposent, les comparaisons des études publiées avec la nôtre demeurent difficiles. En effet, pour les pays de l'Union Européenne, l'utilisation des anticoccidiens est toujours permise et garantit un contrôle certain sur la coccidiose, cette infection étant responsable autant de pertes de production, que de l'augmentation du risque d'entérite nécrotique (45). C'est probablement cette action antibactérienne qui serait aussi à l'origine de la différence observée entre nos résultats et ceux rapportés par l'étude menée par Graham aux États-Unis (309). Dans la comparaison des données de performances de lots de poulets de chair produits avec et sans l'utilisation de promoteurs de croissance, dans deux régions géographiques distinctes, sur une période de plus de trois ans, les auteurs rapportent que l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance est associée à des pertes monétaires pour les éleveurs. En effet, l'analyse des données d'élevages pairées montrent que les promoteurs de croissance ne parviennent pas à améliorer les performances de croissance d'une façon telle que cette croissance optimisée compense pour le coût d'utilisation des antibiotiques (309). Ainsi, le gain de poids, la conversion

alimentaire, les mortalités et les taux de condamnations à l'abattoir n'étaient pas significativement bonifiés par l'ajout d'antibiotiques à la ration des oiseaux. Cependant, alors que seuls les antibiotiques promoteurs de croissance ont été retirés dans l'alimentation des oiseaux des poulaillers « tests » dans cette étude, l'utilisation généralisée des anticoccidiens dans tous les bâtiments comparés semble avoir significativement contribué aux résultats obtenus. D'une part, il y a eu une atténuation des effets négatifs de la coccidiose, mais aussi une action sur *C. perfringens*, prévenant du même coup les effets dévastateurs d'un épisode d'entérite nécrotique (275, 309, 345). De façon analogue, dans une étude européenne publiée en 2001 comparant plus de 6815 lots de poulets de chair, Emborg et coll. attribuent des effets limités au retrait des promoteurs de croissance sur les performances de croissance de poulets de chair. Sur une période d'environ trois ans et demi, les auteurs rapportent que ce retrait n'a fait qu'augmenter légèrement de 0,016 unités le taux de conversion alimentaire, laissant inchangés le taux de mortalités, ainsi que le nombre de kilogrammes de viande produits par mètre carré de surface de plancher (307). De la même façon, dans son étude publiée en 2011, Smith rapporte des résultats semblables provenant d'un des plus importants éleveurs de poulets de chair du Danemark qui rapportait une légère augmentation de 0,04 unités du taux de conversion alimentaire suite au bannissement des promoteurs de croissance en Europe (310). Aux États-Unis, Engster et coll. relèvent aussi des pertes de performance de 0,2% et 0,14% pour la viabilité, de 0,016 et 0,012 unités pour la conversion alimentaire, et finalement de 0,014 kg et 0,019 kg pour le poids final pour des lots de poulets de chair produits sans promoteurs de croissance (308). Alors que les études précédentes font toutes état de pertes limitées suite au

retrait des antibiotiques, l'impact de la mise en place du protocole alternatif dans les poulaillers de notre étude peut être expliqué de différentes façons. Il est justifié de croire que les diverses stratégies alternatives utilisées dans la présente étude ont pu contribuer à atténuer les baisses de performances attendues suite au retrait des antibiotiques et anticoccidiens. En effet, autant les produits commerciaux à base d'huiles essentielles, l'acidifiant, le vaccin contre la coccidiose, et l'amélioration des conditions de démarrage des poussins ont montré des effets bénéfiques, soit sur la santé digestive, soit sur l'amélioration des performances zootechniques (137, 233, 234, 275, 279, 314, 340, 346). Le rôle joué par chacune de ces approches demeure toutefois difficile à quantifier compte tenu de leur utilisation en combinaison. Cependant, tel que rapporté par des auteurs ayant réalisé des travaux sur l'impact du retrait des antimicrobiens chez le poulet de chair, les diverses stratégies alternatives actuellement disponibles doivent généralement être combinées à des pratiques de régie adaptées afin de limiter l'impact de ce retrait, du moins jusqu'à l'identification de stratégies de remplacement pleinement efficaces (263, 310).

6.3 Entérite nécrotique clinique et sous-clinique

Même si plusieurs éléments de la pathogénie de l'entérite nécrotique restent à être élucidés, plusieurs facteurs prédisposants sont tout de même reconnus pour favoriser l'apparition de la maladie (22). Parmi ceux-ci, le retrait des antibiotiques promoteurs de croissance figure évidemment en tête de liste (20). Cependant, l'interdiction d'utiliser des anticoccidiens imposée par la législation canadienne a probablement tout autant contribué à augmenter l'incidence d'entérite nécrotique

observée dans notre étude. En effet, il est reconnu et rapporté que l'arrêt de l'utilisation des promoteurs de croissance pour les pays européens aurait eu des conséquences autrement plus importantes sur la viabilité économique de l'industrie avicole européenne, n'eût été de l'usage encore autorisé des anticoccidiens (9). En combinant une limitation des dommages intestinaux causés par la coccidiose à un contrôle sur la multiplication des souches virulentes de *C. perfringens*, les anticoccidiens représentent un outil de travail important en l'absence d'antibiotiques. Le retrait des anticoccidiens dans l'alimentation des poulets de notre étude a certainement fait de l'entérite nécrotique un défi plus imposant. Encore une fois, très peu d'études rapportent les prévalences observées, autant pour les formes sous-clinique que clinique de la maladie, suite à l'arrêt d'utilisation des promoteurs de croissance. L'absence de signes cliniques caractéristiques propres à la forme sous-clinique de la maladie rend le diagnostic plus difficile, et joue un rôle dans la variation de prévalence rapportée pour la condition. Ainsi, des prévalences variant entre 1% et 40% sont rapportées (265). Alors que les études où l'utilisation des anticoccidiens est permise rapportent peu de problèmes avec l'entérite nécrotique, Smith concluait que, lors de la mise en place d'un programme d'élevage excluant l'ajout d'anticoccidiens et d'antibiotiques, 30% à 50% des lots de poulets de chair soumis à ce programme vivaient un épisode d'entérite nécrotique en cours d'élevage (310). De tous ces lots, tout près de 12% devaient en bout de ligne recevoir un traitement antibiotique afin de limiter les complications associées à ces épisodes de maladie. Les résultats rapportés par Smith se rapprochent de ceux obtenus dans notre étude, où 27,45% des lots soumis au protocole d'élevage sans antibiotiques ont vécu un épisode clinique de la maladie, et où près de 4% de ces lots se sont vus

prescrire un traitement antibiotique à base de pénicilline. Pour Smith, il aura fallu presque cinq ans de travail suite à l'implantation de ce programme afin d'obtenir des taux de traitement aux antibiotiques comparables au nôtre pour les lots atteints d'entérite nécrotique (310).

Compte tenu du rôle majeur joué par la coccidiose dans l'apparition d'épisodes d'entérite nécrotique, un suivi strict du cycle du vaccin a été effectué par l'entremise de courbes d'excrétion oocytaire pour tous les poulaillers soumis au protocole d'élevage sans antibiotiques dans la présente étude. Curieusement, l'utilisation d'un vaccin contre la coccidiose semble avoir contribué autant aux bonnes performances de croissance observées pour certains poulaillers soumis au programme sans antibiotiques, qu'aux difficultés associées au passage de ces souches vaccinales, et à l'apparition d'entérite nécrotique pour certains autres poulaillers alternatifs (22, 177, 275, 279). En effet, pour les fermes de notre étude ayant vécu des épisodes d'entérite clinique, le moment d'apparition d'un épisode de la maladie était toujours corrélé avec l'atteinte du pic d'excrétion oocytaire associé au passage des souches d'*Eimeria* dans l'intestin des oiseaux vaccinés. Bien que ce pic d'excrétion ait été observé pour chacun des poulaillers sans antibiotiques utilisant le vaccin pour contrôler la coccidiose, tous n'ont pas vécu d'épisodes d'entérite nécrotique, laissant croire que d'autres facteurs interviennent dans le déclenchement de la maladie (20, 22, 41, 310). Bien que ces épisodes ont été gérés par la mise en place d'un traitement à base d'huiles essentielles ou d'antibiotiques lorsque jugé nécessaire, ces épisodes ont sans aucun doute contribué à affecter les performances d'élevages des lots issus du protocole d'élevage alternatif (9, 37, 333, 347). De plus, alors que les études publiées sur le sujet rapportent plutôt

une tendance sporadique et saisonnière, plus marquée pendant la saison d'hiver, pour les épisodes d'entérite nécrotique clinique, ces épisodes ont plutôt été observés de façon constante, pour chacun des lots alternatifs produits sur deux fermes participantes de notre étude (52, 185, 310, 348). Cette observation supporte une fois de plus l'hypothèse que certains facteurs, tels que la microflore résidente, interviendraient préférentiellement dans ces fermes afin de favoriser le déclenchement de la maladie (349-351). Finalement, malgré l'utilisation d'un produit commercial à base d'huiles essentielles pour le traitement des épisodes d'entérite nécrotique observés dans notre étude, le recours à un traitement alternatif n'est pas parvenu à limiter les pertes de production associées à la maladie, la rapidité d'action de ces produits n'étant pas comparable à celle d'un traitement antibiotique conventionnel (31, 246-248, 346, 352).

Contrairement à toute l'attention de recherche dirigée sur la forme clinique de l'entérite nécrotique, très peu de travaux sont consacrés à la forme sous-clinique (24, 41, 58, 59, 84, 295, 345, 353). Dans la portion terrain de la présente étude, cette forme sous-clinique de la maladie a significativement contribué aux pertes de production et financières encourues par la mise en place du protocole d'élevage alternatif (22, 265). Pour près de 50% des lots soumis à ce protocole d'élevage, une détérioration des conditions d'élevage était observée entre la troisième et quatrième semaine d'âge des oiseaux, bien après l'atteinte du pic d'excrétion oocytaire, nous permettant alors d'exclure un rôle qu'aurait pu jouer la coccidiose dans l'apparence clinique de cette condition. Chez les oiseaux des lots atteints, un contenu intestinal plus liquide

accompagné d'une diarrhée faible, mais chronique, et d'une paroi intestinale plutôt amincie et flaccide étaient caractéristiques. Dans ces élevages, la dégradation subséquente de la qualité de litière se traduisait généralement par des oiseaux au plumage souillé, ainsi que des taux de condamnations légèrement augmentés à l'abattoir. Ces lots affectés de la forme sous-clinique de la maladie ont généralement été associés à une augmentation du taux de conversion alimentaire, ainsi qu'à une réduction du poids au moment de l'abattage. Même si la proportion des lots affectés par cette forme sous-clinique d'entérite nécrotique semble être plus élevée pour notre étude que ce qui a été publiée antérieurement, les pertes relatives au gain de poids et à la conversion alimentaire sont tout de même beaucoup moins marquées que ce qui est rapporté par une autre étude canadienne (48, 345). Ainsi, malgré le fait que cette forme de la maladie se soit manifestée dans certains lots soumis au protocole alternatif dans la présente étude, il est, une fois de plus, fort probable que l'utilisation d'une combinaison de stratégies alternatives ait pu contribuer à réduire les impacts négatifs de celle-ci en agissant sur divers aspects tels que la modulation de la microflore digestive, le contrôle des microorganismes pathogènes, la micro-architecture intestinale, la fonction immunitaire digestive, ainsi que la palatabilité et digestibilité de la diète.

6.4 Gestion de la litière

Dans notre étude, l'utilisation d'un vaccin dans le contrôle de la coccidiose nécessitait une gestion adéquate de la litière. En effet, les souches d'*Eimeria* vivantes

présentent dans le vaccin doivent effectuer plusieurs cycles de réplication, incluant autant des stades à l'intérieur de l'hôte que dans l'environnement du poulailler, afin de stimuler le développement de l'immunité chez les oiseaux vaccinés (177, 181, 354). Ainsi, les éleveurs participants devaient s'assurer de changer la litière usée à la fin de chacun des lots produits, autant dans les poulaillers soumis au protocole d'élevage conventionnel qu'alternatif. La gestion de la coccidiose dans le poulailler conventionnel était faite par l'ajout d'anticoccidiens à la ration des volailles. Afin d'assurer un passage adéquat du vaccin chez les oiseaux soumis au protocole d'élevage alternatif, des conditions d'humidité et de température spécifiques étaient dictées aux éleveurs participants (181, 330). Ainsi, une température de la litière variant entre 88F et 92F, et un contenu en humidité allant de 60% à 65% étaient demandés (325, 326).

Alors que le remplacement des antibiotiques et anticoccidiens par le protocole d'élevage alternatif a été associé à très peu de conséquences négatives pour certaines fermes participantes de notre étude, le défi a été beaucoup plus important pour d'autres. Les épisodes récurrents d'entérite nécrotique clinique vécus sur deux fermes participantes ainsi que les manifestations de la forme sous-clinique dans d'autres poulaillers soumis au protocole d'élevage alternatif ont fait de la gestion de la litière, un défi pour ces éleveurs participants. En effet, autant les épisodes d'entérite nécrotique clinique sont associés à des lésions intestinales typiques et à une diarrhée profuse, la forme sous-clinique de la maladie est quant à elle généralement associée à des conséquences importantes sur la fonction digestive. Ces conséquences se manifestent habituellement par une gestion plus ardue de la litière. En effet, la diarrhée chronique caractérisant ces cas sous-cliniques est à l'origine de la détérioration de la

litière dans les élevages affectés (22, 324, 345, 355). Pour les pays européens, *C. perfringens* associé à cette forme sous-clinique pourrait aussi intervenir afin de contribuer au phénomène de la dysbactériose aussi généralement incriminé dans ces cas. Les résultats obtenus pour les contenus en eau des divers échantillons de litière et de fèces récoltés pendant l'étude terrain viennent supporter ces hypothèses. En effet, la différence significative observée entre les contenus en humidité des échantillons de litière récoltés en fin de lots, pour les lots alternatifs et conventionnels, laisse croire que les formes sous-clinique et clinique de l'entérite nécrotique ont contribué à cette différence observée (20, 55, 310, 355-357). Autant la diarrhée profuse associée à la forme clinique que la diarrhée chronique caractérisant la forme sous-clinique, ont pu contribuer à augmenter le contenu en eau des déjections des oiseaux des lots affectés. Puisque la litière sert entre autres à absorber l'excédent d'eau, cette conséquence de l'entérite nécrotique a ainsi pu se refléter en fin d'élevage, et expliquer la différence observée pour les taux d'humidité des litières récupérées des deux protocoles d'élevage.

Malgré le fait que la litière usée était remplacée par une litière fraîche pour chacun des nouveaux lots produits dans les poulaillers participants, il est logique de croire que l'humidité emmagasinée dans les litières plus humides des lots alternatifs vivant des problèmes d'entérite nécrotique clinique ou sous-clinique ait pu contribuer à maintenir une flore bactérienne résidente favorisant la récurrence d'épisodes d'entérite pour les lots subséquents du projet sur ces fermes (55, 357-359). En effet, il a été démontré que des litières plus humides renfermaient des charges microbiennes significativement plus élevées. Et puisque *Clostridium* figure en tête de liste des

microorganismes dominant la communauté digestive bactérienne des poulets de chair (312, 360), il est possible de croire qu'une litière plus humide ait pu contribuer à maintenir une charge environnementale plus élevée pour cette bactérie dans le temps, augmentant ainsi le risque de vivre un épisode d'entérite nécrotique dû à la persistance de clones virulents (70, 324). Les comptes significativement plus élevés observés pour *C. perfringens* dans les lots alternatifs de la présente étude viennent soutenir cette hypothèse. Cette humidité persistante à l'intérieur des bâtiments aux prises avec l'entérite nécrotique a aussi pu contribuer à maintenir une charge oocyttaire résiduelle plus importante, ainsi qu'à augmenter la sporulation des souches vaccinales d'*Eimeria* présente dans ces poulaillers, créant ainsi une pression d'infection plus grande pour la coccidiose sur les oiseaux de ces bâtiments (330), et augmentant par le fait même le risque d'entérite nécrotique (20, 324).

6.5 Santé digestive

6.5.1 Isolement de *C. perfringens* et de *Campylobacter jejuni*

À partir des échantillons récoltés pendant la portion en ferme de la présente étude, des souches de *C. perfringens* ont été isolées. Dans un premier temps, les comptes obtenus à partir des lots soumis aux deux protocoles d'élevage ont servi d'indicateurs afin d'évaluer la santé digestive des oiseaux (70, 324). Tel qu'attendu, les résultats montrent clairement que le remplacement des antibiotiques et anticoccidiens par un protocole d'élevage incluant différentes stratégies alternatives est associé à une charge plus imposante de *C. perfringens* chez les oiseaux soumis à ce protocole, si on

en juge par les comptes significativement plus élevés (21, 63, 73, 361). Bien que les différentes stratégies alternatives utilisées dans les lots élevés de manière alternative ont pour la plupart été reconnues pour avoir des effets positifs sur le contrôle de *C. perfringens* et de l'entérite nécrotique, il apparaît tout de même que cet effet soit limité en conditions d'élevage commerciales (31, 247, 248, 275, 352, 362). Tel que discuté précédemment, les plus hauts taux d'humidité observés pour les litières des poulaillers soumis au protocole alternatif ont sûrement favorisé le maintien d'une flore résidente de *C. perfringens* plus importante dans ces poulaillers (312, 360). De plus, les épisodes récurrents d'entérite nécrotique observés sur certaines fermes participantes ont aussi fort probablement contribué à non seulement augmenter la charge bactérienne de *C. perfringens* dans les poulaillers affectés, mais aussi à encourager l'amplification sélective de clones virulents de la bactérie (37, 132). Ainsi, le risque de vivre des épisodes récurrents d'entérite nécrotique pour ces fermes était probablement amplifié lot après lot (voir section 4.7).

Les résultats de la présente étude n'ont pas permis d'établir un lien entre l'utilisation préférentielle d'un protocole d'élevage et la prévalence de lots positifs à *Campylobacter jejuni*. Étonnamment, certains éléments auraient pu contribuer à l'augmentation de la prévalence de ces lots positifs. Entre autres, pour les lots de poulets soumis au protocole d'élevage alternatif, le contenu augmenté en humidité des litières observé aurait pu favoriser la transmission de *Campylobacter*, principalement dû à la création d'un environnement micro-aérophile propice à la survie de la bactérie (312). L'absence de différence de prévalence observée entre les deux protocoles d'élevage pourrait être expliquée par l'action des diverses stratégies du protocole

d'élevage alternatif sur la colonisation de *Campylobacter jejuni* (341, 363, 364), mais aussi par l'action des antibiotiques contenus dans la ration des lots conventionnels (63). L'abreuvement des poulets soumis au protocole alternatif avec une eau à un pH de 4 aurait aussi pu contribuer à un meilleur contrôle de la bactérie dans ces lots (365). De plus, alors que plusieurs souches d'*Eimeria* sont responsables d'une production augmentée de mucus au niveau intestinal au moment de l'infection, et qu'on suspecte fortement la capacité de *Campylobacter* à coloniser et à se répliquer à l'intérieur de cette couche de mucus (366), il aurait été logique de supposer pour les lots soumis au protocole alternatif, que le pic d'excrétion oocytaire généralement observé vers trois semaines d'âge, ait pu être associé à une colonisation hâtive par *Campylobacter* des oiseaux associés à ce protocole (78, 350). À l'opposé, le pic d'excrétion oocytaire et l'augmentation de production de mucus associée survenant plutôt vers la fin d'élevage dans des lots conventionnels dû à l'ajout d'anticoccidiens à la ration auraient pu être liés à une colonisation tardive des oiseaux soumis à ce protocole. Le statut positif pour *Campylobacter* généralement observé pour des élevages conventionnels laisse croire à un rôle que pourrait jouer un environnement intestinal favorable créé par l'infection par *Eimeria*, à la fin de la période d'élevage, dans l'établissement de la bactérie.

6.5.2 Analyses histologiques

L'évaluation histologique des segments intestinaux récupérés des oiseaux soumis aux protocoles d'élevages conventionnel et alternatif lors des visites à la ferme a aussi été utilisée comme indicateur de la santé digestive (41, 51, 193). Les portions d'intestins ont été récupérées à partir des six oiseaux nécropsiés lors des visites

effectuées à trois semaines d'âge dans chacun des bâtiments participants. Malgré le dépôt rapide des échantillons dans la formaldéhyde, la préservation de nos échantillons semble avoir été affectée, puisque les coupes histologiques ont été associées à des dommages pour plusieurs de ces échantillons, principalement dû à leur grande fragilité. Ceci a ainsi empêché l'analyse de plusieurs d'entre eux. Malgré le fait que cette perte d'échantillons semble avoir été semblable pour les deux protocoles d'élevage, il est possible que ce nombre réduit d'échantillons ait diminué nos chances d'observer des changements significatifs quant à l'impact des deux protocoles sur les scores lésionnels intestinaux observés. Même si plusieurs critères ont été considérés pour l'établissement des scores lésionnels (176), les analyses statistiques réalisées à partir de ces scores ont montré qu'aucune différence statistiquement significative ne pouvait être observée entre les deux protocoles d'élevage sur l'apparence microscopique du tractus digestif des oiseaux soumis à ces protocoles. Même si logiquement nous aurions pu nous attendre à observer une différence (41, 324, 355, 367), certaines hypothèses peuvent être avancées afin de justifier cette absence de différence. Le fait que, non seulement un faible nombre d'oiseaux ait été retenu pour l'évaluation microscopique de la santé digestive, mais aussi que les oiseaux servant à cette évaluation aient été choisis de manière aléatoire dans les lots visités à trois semaines d'âge, pourrait expliquer pourquoi même dans les lots affectés d'entérite nécrotique clinique, les scores calculés n'étaient pas significativement plus élevés. Les différentes stratégies incluses dans le protocole d'élevage alternatif auraient elles aussi pu contribuer à atténuer les effets négatifs du retrait des antibiotiques, et des épisodes d'entérite clinique et sous-clinique, sur l'apparence microscopique du tractus intestinal. Ceci a d'ailleurs été démontré par

d'autres auteurs (31, 247, 248, 346, 352, 368-371). L'amélioration des conditions de démarrage a aussi certainement pu contribuer à réduire l'impact du retrait des antibiotiques sur la santé digestive, en favorisant le développement d'un tractus intestinal plus efficace et plus compétent d'un point de vue immunitaire (315-317, 319, 372). De plus, pour les fermes où les épisodes d'entérite nécrotique clinique ont été observés, l'utilisation d'un vaccin contre la coccidiose a probablement pu contribuer à atténuer les dommages intestinaux chez certains oiseaux issus de ces lots, alors que chez d'autres oiseaux, cet effet aurait même pu se traduire par l'absence d'apparition de la maladie (45, 275, 277-279).

6.6 Typage de *C. perfringens*

6.6.1 Étude de la diversité de *C. perfringens*

Depuis les premiers bannissements imposés par certains pays européens il y a un peu plus de 15 ans, *C. perfringens* retrouvé chez la volaille a gagné en popularité. Le retour en force de l'entérite nécrotique suite à la disparition des antibiotiques promoteurs de croissance dans ces pays a forcé la communauté scientifique à mieux définir la pathogénie de la maladie. Pour ce faire, la caractérisation des souches de *C. perfringens* impliquées dans ces épisodes de maladie devenait un incontournable. Plusieurs auteurs se sont donc intéressés à comparer les souches cliniques aux souches commensales retrouvées chez les volailles. Malgré le fait que notre connaissance de la biologie moléculaire de *C. perfringens* se soit considérablement améliorée au cours des dernières années, plusieurs efforts restent à être déployés afin de percer le mystère de

l'entérite nécrotique. Les études réalisées au cours des dernières années ont entre autres permis de savoir que les souches de *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique se distinguent des souches commensales de cette même espèce, bien que les deux peuvent cohabiter dans l'intestin d'un oiseau sain (57). Les études de caractérisation génétique ont aussi démontré que les oiseaux de troupeaux sains vont généralement arborer une population très diversifiée de *C. perfringens*, cette diversité augmentant à mesure que les oiseaux vieillissent (102). À l'inverse, les oiseaux des lots où l'on retrouve l'entérite nécrotique vont plutôt être associés à la prolifération d'un seul clone virulent remplaçant toute cette diversité (132, 198, 301). Alors que pour le moment aucun profil génétique n'a pu être associé à la capacité de causer l'entérite nécrotique, il semblerait que certains marqueurs génétiques de virulence tels, que la présence des toxines NetB et TpeL, ainsi que le portage de certains plasmides, ou même l'implication de certains gènes du génome de base de l'espèce (24, 46, 57, 59, 72) représentent des éléments-clé dans l'élucidation de la pathogénie de la maladie. Curieusement, alors que plusieurs efforts ont été dirigés vers la mise en lumière des facteurs de virulence responsables de l'apparition de la maladie, très peu d'études ont regardé quel pouvait être l'effet d'une production de poulet de chair sans antibiotiques sur l'évolution de la population de *C. perfringens*, et sur le rôle que pouvait jouer cette évolution sur l'incidence d'entérite nécrotique (102).

6.7 Impact du protocole d'élevage sur l'évolution de la diversité génétique de *C. perfringens*

La comparaison des populations de *C. perfringens* retrouvées dans les différents bâtiments des fermes participantes sur toute la durée de notre étude terrain a généré des observations intéressantes, et nous a aussi permis d'émettre certaines hypothèses. Pour le moment, aucune étude comme la nôtre ne s'est intéressée à suivre la dynamique de la bactérie, dans des élevages industriels, et sur une aussi longue période de temps. La plupart des auteurs l'ayant fait ont réalisé cette évaluation sur l'intervalle d'un seul lot de production, ou même à partir d'échantillonnages ponctuels sur diverses fermes (46, 102, 198, 296).

Dans notre étude, l'analyse des échantillons récoltés de manière séquentielle a permis de constater que la diversité génétique des populations de *C. perfringens* augmente à des taux comparables dans le temps, peu importe le protocole d'élevage en place. Cette observation reflète la théorie voulant que dans un environnement constant, une population saine montrera une diversité croissante dans le temps (373). À première vue, les résultats observés nous laissent supposer que d'une façon générale, la pression de sélection exercée par les antibiotiques et anticoccidiens ne semble pas affecter négativement la diversification de la population de *C. perfringens* à travers le temps. En effet, dans un premier temps, l'exploration des données reliées à la diversité de *C. perfringens* pour chacun des protocoles d'élevage, ne nous a pas permis d'observer une différence dans l'influence de chacun de ces protocoles sur l'évolution de la diversité génétique de la population bactérienne étudiée. Une hypothèse plausible pour expliquer cette observation pourrait être que les effets des antimicrobiens sont comparables à ceux des huiles essentielles et acides organiques en ce qui a trait à leur influence sur la dynamique populationnelle de *C. perfringens*. Cependant, il serait pertinent d'évaluer,

de manière plus spécifique, l'effet des épisodes d'entérite nécrotique vécus sur certaines des fermes participantes sur l'évolution de cette diversité dans le temps. Les résultats de cette analyse seront discutés dans la section suivante (6.8). D'une manière générale, les populations de *C. perfringens* semblent augmenter en diversité dans le temps, peu importe le traitement en place. L'augmentation du nombre de souches porteuses de gènes de virulence vient aussi supporter l'hypothèse que *C. perfringens* représente une population dynamique (39). Considérant le fait que ces gènes de virulence sont retrouvés sur des plasmides, cette augmentation marquée, observée sur une période aussi courte que 14 mois, laisse croire dans un premier temps, que ces plasmides sont facilement transférables entre les souches d'une même population, mais aussi que ceux-ci doivent probablement transporter des gènes associés à des fonctions écologiques importantes chez les bactéries qui les possèdent (24, 58, 59, 374).

Même si un certain nombre de pulsotypes ont été retrouvés à la fois dans les bâtiments soumis au protocole conventionnel qu'alternatif, les pulsotypes identifiés dans chacun des types de bâtiments étaient, en général, différents dépendamment du traitement utilisé. Ces observations peuvent être associées à différentes hypothèses. Entre autres, pour chacune des fermes participantes, les sources d'approvisionnement en eau, en moulée, en litière et en poussins devaient être les mêmes, il est légitime de croire que ces sources aient pu être à l'origine de l'introduction de certains de ces profils génétiques partagés entre les deux bâtiments d'une même ferme (102). Il a même déjà été rapporté que des clones identiques de *C. perfringens* pouvaient autant être retrouvés dans le tractus digestif d'oiseaux issus d'élevages conventionnels et organiques (296). Même si des règles de biosécurité strictes étaient en vigueur pour les

éleveurs participant à l'étude, il n'est pas impossible non plus qu'au cours du projet, des génotypes aient pu être échangés entre les deux bâtiments d'une même ferme participante, considérant la proximité des deux poulaillers sur chacun des sites (375).

Alors que la plupart des études rapportent l'utilisation d'une méthode par ensemencement direct pour l'isolement de *C. perfringens*, cette approche a été combinée à une méthode d'isolement par enrichissement dans notre étude. Même si le ratio d'isolats générés par chacune des méthodes d'isolement, entre le début et la fin de l'étude, n'a pas semblé être influencé par la nature de la méthode d'isolement pour chacun des protocoles d'élevage respectifs, il est intéressant de constater que chacune des méthodologies a permis de générer des génotypes distincts pour un même protocole d'élevage. Malgré le fait que plusieurs des génotypes aient été observés dans les élevages échantillonnés, l'apparence abrupte des courbes de raréfaction générées par l'analyse de ces génotypes nous laisse croire qu'une bonne partie de cette diversité reste à être révélée (376). Ainsi, cette diversité déjà marquée et comparable à celle rapportée par d'autres études pourrait être encore plus significative si on augmentait l'effort d'échantillonnage (46, 102, 196, 198, 301, 376).

6.8 Existence d'un possible lien entre la diversité génétique de *C. perfringens* et la récurrence d'épisodes d'entérite nécrotique clinique

Les lots de poulets soumis au protocole d'élevage alternatif ont montré une évolution de la diversité de leur population de *C. perfringens* qui était comparable à celle des lots produits avec un protocole conventionnel. Cependant, puisque les lots de poulets produits sous le protocole d'élevage alternatif ont présenté des profils cliniques

très distincts, il devenait intéressant d'explorer les données différemment en comparant les populations de *C. perfringens* en fonction du statut de santé des lots, et ainsi voir si nous pouvions nous permettre de nuancer les observations faites précédemment. En effet, en ne considérant que les lots produits sous le protocole d'élevage alternatif, il est possible de supposer que les deux fermes participantes où l'entérite nécrotique a été observée de façon répétée aient pu contribuer significativement à limiter la diversité qui aurait pu être plus marquée en l'absence de signes cliniques. Les analyses réalisées sur les souches de *C. perfringens* correspondant aux profils cliniques « sain » et « entérite nécrotique » uniquement pour les lots alternatifs ont montré que pour les fermes où les oiseaux demeuraient sains, et où les performances de croissance étaient bonnes, la population de *C. perfringens* montrait une augmentation de la diversité génétique des souches présentes dans ces poulaillers entre le début et la fin de notre étude. À l'inverse, l'effet des épisodes récurrents de la maladie s'est traduit par une perte significative de cette diversité pour les fermes affectées. Ainsi, ces épisodes d'entérite nécrotique ont très bien pu contribuer à limiter une augmentation plus manifeste pour les populations de *C. perfringens* issues des poulaillers soumis au protocole d'élevage alternatif. Curieusement, les fermes où ces épisodes de maladie ont été observés de manière récurrente montraient une diversité génétique plus importante pour *C. perfringens* en début d'étude. Le risque de vivre des épisodes de maladie était alors, pour ces fermes, peut-être déjà augmenté, dû à la présence de cette population plus importante et plus diversifiée. En effet, il est reconnu que dans les formes sous-cliniques de la maladie, une population plus importante de *C. perfringens* peut être présente, même avec l'utilisation des promoteurs de croissance (196, 298). Ainsi, des

clones porteurs de plasmides associés à une virulence ainsi qu'à une résistance aux antibiotiques augmentée étaient possiblement présents sur ces fermes, même avant le début de notre étude (59, 196, 298). La perte de diversité observée pour les fermes vivant l'entérite nécrotique est cependant fort probablement associée à la multiplication d'un clone virulent possédant un avantage compétitif face aux souches commensales de son espèce (24, 58, 59, 132). L'augmentation marquée de la proportion de souches portant plusieurs gènes de virulence, combinée à cette perte de diversité, vient non seulement supporter l'idée qu'un clone dominant ait été amplifié dans le temps suite aux épisodes récurrents d'entérite nécrotique, mais appuie aussi l'hypothèse que les plasmides transportant ces gènes, représenteraient une caractéristique importante des souches pouvant causer l'entérite nécrotique (24, 58, 59). L'inquiétude pouvant être soulevée quant à l'amplification sélective de ces clones virulents dans le temps est reliée à la présence de ces plasmides. En fait, en plus de transporter des gènes pouvant conférer un avantage sélectif à ces souches quant à leur survie dans un environnement donné, des gènes codant pour une résistance aux antibiotiques peuvent aussi être retrouvés sur ces plasmides. Les épisodes récurrents de la maladie favorisent par la suite, la dissémination de ces clones résistants (377, 378). Les conditions environnementales rencontrées dans les poulaillers affectés d'épisodes d'entérite nécrotique, notamment en ce qui a trait à l'humidité, ont aussi pu contribuer à maintenir cette population virulente tout au long du projet (312, 360).

Chapitre 7. CONCLUSIONS

Le projet de doctorat présenté ici avait pour objectif d'étudier les impacts économiques et ceux sur l'incidence de maladie digestive, d'une production commerciale à grande échelle de poulets de chair élevés sans antibiotiques, au Québec. L'hypothèse de départ était qu'il était possible de le faire, et qu'il était même pensable d'obtenir des performances d'élevage, pour ces lots produits sans antibiotiques, comparables à celles de lots conventionnels. Les résultats obtenus ont permis de valider cette hypothèse, en plus de mieux caractériser les effets de cette production sur les performances zootechniques, et sur la dynamique des populations de *C. perfringens* dans les élevages soumis à une régie d'élevage sans antibiotiques. Le design expérimental unique de la portion « terrain » du projet a assuré l'obtention de résultats précis, pertinents et encore jamais rapportés dans la littérature scientifique. Ainsi, cette étude permet de tirer les conclusions suivantes :

-L'élevage de poulets de chair sans antibiotiques à grande échelle est possible au Québec lorsque les antibiotiques et anticoccidiens sont remplacés par un protocole d'élevage incluant diverses stratégies alternatives telles que des huiles essentielles, des acides organiques et inorganique, une vaccination contre la coccidiose, ainsi qu'une amélioration des conditions de démarrage.

-L'élevage de poulets de chair sans antibiotiques s'avère cependant économiquement moins rentable que l'élevage conventionnel, entre autres dû à la diminution des performances zootechniques et à l'incidence de maladies digestives.

- L'élevage de poulets de chair sans antibiotiques provoque une augmentation de l'incidence d'entérite nécrotique, puisque contrairement aux élevages

conventionnels où la maladie n'a pas été observée tout au long de l'étude, 27% et 49% des lots élevés sans antibiotiques ont vécu un épisode d'entérite nécrotique clinique et sous-clinique respectivement.

-Un contenu en humidité significativement plus élevé en fin de lot pour les litières des troupeaux élevés sans antibiotiques traduit la présence d'un environnement intestinal modifié chez les poulets de ces lots.

-Les protocoles d'élevage conventionnel et sans antibiotiques n'affectent pas de manière significative l'apparence histologique du tractus intestinal des oiseaux soumis à ces protocoles.

-Alors que les prévalences de lots de poulets de chair positifs pour la présence de *Campylobacter jejuni* ne sont pas influencées par l'un ou l'autre des protocoles d'élevage, les lots soumis au protocole sans antibiotiques ont montré des comptes de *C. perfringens* significativement plus élevés.

-La nature du protocole d'élevage n'affecte pas la dynamique populationnelle de *C. perfringens* dans le temps.

-Pour les deux types d'élevages, une augmentation du nombre de souches de *C. perfringens* portant plusieurs gènes de virulence a été notée.

-Pour les fermes débutant un élevage sans antibiotiques, une diversité génétique plus importante de la population de *C. perfringens* est associée à un risque augmenté de vivre des épisodes d'entérite.

-La présence d'épisodes récurrents de la maladie est corrélée avec une réduction marquée de cette diversité dans le temps, tout comme avec une augmentation significative du nombre de souches de *C. perfringens* transportant plusieurs gènes de virulence.

-Les épisodes récurrents d'entérite nécrotique accroissent le risque de vivre des épisodes d'entérite nécrotique en favorisant la multiplication de clones virulents.

La présente étude ouvre donc sur une toute nouvelle vision de la production à grande échelle de poulets de chair élevés sans antibiotiques au Québec. À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons affirmer que pour les éleveurs de volailles désireux de le faire, l'élevage de poulets de chair sans antibiotiques est associé à une incidence augmentée de maladies digestives, principalement l'entérite nécrotique clinique. Nous pouvons aussi affirmer qu'une production appelée sans antibiotiques, même si elle ne semble pas associée à une évolution distincte de la diversité génétique des populations de *C. perfringens* dans les poulaillers soumis à ce type d'élevage, influence tout de même la dispersion des gènes de virulence retrouvés chez cette espèce bactérienne. Les résultats générés par les différentes analyses nous permettent aussi de conclure que les épisodes d'entérite nécrotique observés sur certaines fermes sont, en partie du moins, responsables de cette dispersion, tout comme ils influencent négativement l'augmentation normale, dans le temps, de la diversité génétique de *C. perfringens* observée dans des lots de poulets sains.

7.1 Perspectives

Les résultats obtenus et les observations faites pendant cette étude ont permis de répondre à certaines interrogations, mais ont aussi contribué à soulever d'autres questionnements. Dans un premier temps, l'inquiétude face au rôle que pourrait jouer l'utilisation à grande échelle des antibiotiques promoteurs de croissance dans l'apparition et la persistance des bactéries résistantes aux antibiotiques est la motivation principale du retrait de ces antibiotiques chez les animaux de consommation. Ainsi, à partir des échantillons de fientes récupérés des poulaillers impliqués dans cette étude, il pourrait être intéressant de cibler des microorganismes d'importance pour la santé humaine, afin de comparer l'évolution des profils de résistance aux antibiotiques de ces bactéries en fonction des deux types de protocoles d'élevage. La résistance aux antibiotiques des souches de *C. perfringens* isolées de ces lots pourrait aussi être évaluée pour diverses raisons. Entre autres, il serait intéressant de valider si l'utilisation en continu d'antibiotiques est associée à la sélection de clones résistants et persistants dans les fermes traitées. Aussi, la localisation des gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés dans ces souches permettrait de voir si une corrélation peut être établie entre l'augmentation du nombre de souches résistantes, et celles présentant un profil de virulence, tel qu'observé dans la présente étude. Évidemment, tout reste à être démontré quant au rôle précis des marqueurs de virulence propres aux souches pathogènes dans l'apparition d'entérite nécrotique. En ce sens, un travail réalisé autant sur les plamides portés par la bactérie, que sur le

pouvoir de compétition des souches virulentes, ou encore que sur l'identification de nouvelles toxines impliquées dans le processus pathologique pourrait contribuer à élucider la pathogénie de l'entérite nécrotique.

Alors que plusieurs efforts de recherche sont dirigés vers une meilleure compréhension du rôle de *C. perfringens* dans la pathogénie de l'entérite nécrotique, très peu d'informations relatives à la prévalence des souches entérotoxigènes de cette espèce bactérienne dans les élevages de poulets de chair au Québec sont actuellement disponibles. Cette situation est pour le moins étonnante, considérant le fait que *C. perfringens* se retrouve parmi les microorganismes les plus souvent incriminés comme cause de toxi-infections alimentaires chez l'humain (379). Il serait donc pertinent, dans un premier temps, d'avoir une vue d'ensemble de la prévalence de ces souches dans les élevages de poulets de chair, mais aussi d'évaluer l'impact d'un protocole d'élevage alternatif sur cette prévalence.

CHAPITRE 8. BIBLIOGRAPHIE

1. Daniel CR, Cross AJ, Koebnick C, Sinha R. Trends in meat consumption in the USA. *Public Health Nutr.* 2011;14(4):575-83. Epub 2010/11/13.
2. Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjonneland A, et al. Meat consumption and mortality--results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.* 2013;11:63. Epub 2013/03/19.
3. Micha R, Michas G, Mozaffarian D. Unprocessed red and processed meats and risk of coronary artery disease and type 2 diabetes--an updated review of the evidence. *Current atherosclerosis reports.* 2012;14(6):515-24. Epub 2012/09/25.
4. Pan A, Sun Q, Bernstein AM, Schulze MB, Manson JE, Willett WC, et al. Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(4):1088-96. Epub 2011/08/13.
5. Lee KW, Lillehoj HS, Jeong W, Jeoung HY, An DJ. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci.* 2011;90(7):1381-90. Epub 2011/06/16.
6. Godfray HC, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science.* 2010;327(5967):812-8. Epub 2010/01/30.
7. Voluntary plan to reduce the use of antibiotic growth promoters in the USA. *Vet Rec.* 2013;173(24):595. Epub 2013/12/24.
8. Bywater RJ. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. *Poult Sci.* 2005;84(4):644-8. Epub 2005/04/23.
9. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J.* 2011;187(2):182-8. Epub 2010/04/13.
10. Van Immerseel F, Rood JI, Moore RJ, Titball RW. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.* 2009;17(1):32-6.
11. Collignon P. The importance of a One Health approach to preventing the development and spread of antibiotic resistance. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;366:19-36. Epub 2012/06/14.
12. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):2054-9. Epub 2001/06/16.
13. Kieke AL, Borchardt MA, Kieke BA, Spencer SK, Vandermause MF, Smith KE, et al. Use of streptogramin growth promoters in poultry and isolation of streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* from humans. *J Infect Dis.* 2006;194(9):1200-8. Epub 2006/10/17.
14. McDermott PF, Cullen P, Hubert SK, McDermott SD, Bartholomew M, Simjee S, et al. Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed virginiamycin. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):4986-91. Epub 2005/09/10.
15. Shea KM. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *Pediatrics.* 2004;114(3):862-8.
16. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:175-88.
17. Acar J, Casewell M, Freeman J, Friis C, Goossens H. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6(9):477-82. Epub 2001/02/13.

18. Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27949.
19. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):48-54. Epub 2009/12/25.
20. Cooper KK, Songer JG. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 2009;15:55-60.
21. Lanckriet A, Timbermont L, De Gussem M, Marien M, Vancraeynest D, Haesebrouck F, et al. The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol*. 2010;39(1):63-8. Epub 2010/04/15.
22. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol*. 2011;40(4):341-7. Epub 2011/08/05.
23. Collier CT, van der Klis JD, Deplancke B, Anderson DB, Gaskins HR. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(10):3311-7. Epub 2003/09/25.
24. Lepp D, Roxas B, Parreira VR, Marri PR, Rosey EL, Gong J, et al. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One*. 2010;5(5):e10795. Epub 2010/06/10.
25. Sarson AJ, Wang Y, Kang Z, Dowd SE, Lu Y, Yu H, et al. Gene expression profiling within the spleen of *Clostridium perfringens*-challenged broilers fed antibiotic-medicated and non-medicated diets. *BMC genomics*. 2009;10:260. Epub 2009/06/09.
26. Zhou H, Gong J, Brisbin J, Yu H, Sarson AJ, Si W, et al. Transcriptional profiling analysis of host response to *Clostridium perfringens* infection in broilers. *Poult Sci*. 2009;88(5):1023-32. Epub 2009/04/11.
27. Kulkarni RR, Parreira VR, Sharif S, Prescott JF. *Clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2006;13(12):1358-62. Epub 2006/10/27.
28. Hume ME. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult Sci*. 2011;90(11):2663-9. Epub 2011/10/20.
29. Biggs P, Parsons CM. The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult Sci*. 2008;87:2581-9.
30. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Harvey RB, Genovese KJ, Kennedy CN, et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim Health Res Rev*. 2008;9(2):217-25.
31. Cross DE, McDevitt RM, Hillman K, Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci*. 2007;48(4):496-506. Epub 2007/08/19.
32. Dahiya JP, Wilkie DC, Van Kessel AG, Drew MD. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim Feed Sci Technol*. 2006;129:60-88.
33. Verstegen MWA, Williams BA. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim Biotechnol*. 2002;13(1):113-27.

34. Stiles BG, Wigelsworth DJ, Popoff MR, Barth H. Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2011;1:11. Epub 2011/01/01.
35. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(2):216-34. Epub 1996/04/01.
36. Myers GS, Rasko DA, Cheung JK, Ravel J, Seshadri R, DeBoy RT, et al. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome research*. 2006;16(8):1031-40. Epub 2006/07/11.
37. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol*. 2004;33(6):537-49. Epub 2005/03/15.
38. Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*. 1999;7(3):104-10. Epub 1999/04/22.
39. Sawires YS, Songer JG. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe*. 2006;12(1):23-43. Epub 2006/05/17.
40. Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual review of microbiology*. 1998;52:333-60. Epub 1999/01/19.
41. Shojadoost B, Vince AR, Prescott JF. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Veterinary Research*. 2012;43.
42. Varga JJ, Nguyen V, O'Brien DK, Rodgers K, Walker RA, Melville SB. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Molecular microbiology*. 2006;62(3):680-94. Epub 2006/09/27.
43. Lindstrom M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food microbiology*. 2011;28(2):192-8. Epub 2011/02/15.
44. Martin TG, Smyth JA. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet Microbiol*. 2009;136(1-2):202-5. Epub 2008/12/17.
45. Williams RB. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol*. 2005;34(3):159-80. Epub 2005/09/30.
46. Engstrom BE, Fermer C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V, Gunnarsson A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol*. 2003;94(3):225-35. Epub 2003/06/20.
47. Keyburn AL, Bannam TL, Moore RJ, Rood JI. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)*. 2010;2(7):1913-27. Epub 2010/07/01.
48. Lovland A, Kaldhusdal M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathol*. 2001;30(1):73-81. Epub 2001/02/01.
49. McDevitt RM, Brooker JD, Acamovic T, Sparks NHC. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *Worlds Poult Sci J*. 2006;62(2):221-47.
50. Kaldhusdal M, Hofshagen M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poult Sci*. 1992;71(7):1145-53. Epub 1992/07/01.
51. Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Laarveld B, Sawicki G. Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: novel etiological consideration based on ultra-structural

and molecular changes in the intestinal tissue. *Res Vet Sci.* 2008;85(3):543-53. Epub 2008/03/25.

52. Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Drew MD. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):99-108. Epub 2005/12/13.

53. Lovland A, Kaldhusdal M. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;24(3):345-51. Epub 1999/07/09.

54. Chalmers G, Bruce HL, Toole DL, Barnum DA, Boerlin P. Necrotic enteritis potential in a model system using *Clostridium perfringens* isolated from field outbreaks. *Avian Dis.* 2007;51(4):834-9. Epub 2008/02/07.

55. Abildgaard L, Hojberg O, Schramm A, Balle KM, Engberg RM. The effect of feeding a commercial essential oil product on *Clostridium perfringens* numbers in the intestine of broiler chickens measured by real-time PCR targeting the alpha -toxin-encoding gene (plc). *Anim Feed Sci Technol.* 2010;157(3/4):181-9.

56. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e26. Epub 2008/02/13.

57. Keyburn AL, Yan XX, Bannam TL, Van Immerseel F, Rood JI, Moore RJ. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res.* 2010;41(2):21. Epub 2009/11/26.

58. Lepp D, Gong J, Songer JG, Boerlin P, Parreira VR, Prescott JF. Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. *Journal of bacteriology.* 2013;195(6):1152-66. Epub 2013/01/08.

59. Parreira VR, Costa M, Eikmeyer F, Blom J, Prescott JF. Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids. *PLoS One.* 2012;7(11):e49753. Epub 2012/11/29.

60. Hermans PG, Morgan KL. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathol.* 2007;36(1):43-51. Epub 2007/03/17.

61. Long JR. Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. *Can J Comp Med.* 1973;37(3):302-8. Epub 1973/07/01.

62. Miwa N, Nishina T, Kubo S, Honda H. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J Vet Med Sci.* 1997;59(7):557-60. Epub 1997/07/01.

63. Wise MG, Siragusa GR. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J Appl Microbiol.* 2007;102(4):1138-49. Epub 2007/03/27.

64. Bjerrum L, Engberg RM, Leser TD, Jensen BB, Finster K, Pedersen K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci.* 2006;85(7):1151-64. Epub 2006/07/13.

65. Craven SE, Stern NJ, Bailey JS, Cox NA. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Dis.* 2001;45(4):887-96. Epub 2002/01/12.

66. Lu J, Sanchez S, Hofacre C, Maurer JJ, Harmon BG, Lee MD. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(2):901-8.

67. Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(1):124-37. Epub 2002/01/05.
68. Barnes EM, Mead GC, Barnum DA, Harry EG. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br Poult Sci.* 1972;13(3):311-26. Epub 1972/05/01.
69. Wise MG, Siragusa GR. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3911-6. Epub 2005/07/08.
70. Kaldhusdal M, Hofshagen M, Lovland A, Langstrand H, Redhead K. Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;24(3):337-43. Epub 1999/07/09.
71. Timbermont L, Lanckriet A, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Vet Microbiol.* 2009;137(3-4):388-91. Epub 2009/02/10.
72. Chalmers G, Bruce HL, Hunter DB, Parreira VR, Kulkarni RR, Jiang YF, et al. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):3957-64. Epub 2008/10/24.
73. Engberg RM, Hedemann MS, Leser TD, Jensen BB. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult Sci.* 2000;79(9):1311-9. Epub 2000/10/06.
74. Feng Y, Gong J, Yu H, Jin Y, Zhu J, Han Y. Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Vet Microbiol.* 2010;140(1-2):116-21. Epub 2009/08/04.
75. Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(12):5918-24. Epub 2002/11/27.
76. Ginter A, Williamson ED, Dessy F, Coppe P, Bullifent H, Howells A, et al. Molecular variation between the alpha-toxins from the type strain (NCTC 8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with disease in man and animals. *Microbiology.* 1996;142 (Pt 1):191-8. Epub 1996/01/01.
77. Miyamoto K, Yumine N, Mimura K, Nagahama M, Li J, McClane BA, et al. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS One.* 2011;6(5):e20376. Epub 2011/06/10.
78. Collier CT, Hofacre CL, Payne AM, Anderson DB, Kaiser P, Mackie RI, et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2008;122(1-2):104-15. Epub 2007/12/11.
79. Shane SM, Koetting DG, Harrington KS. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian Dis.* 1984;28(4):1120-4. Epub 1984/10/01.
80. Craven SE, Cox NA, Bailey JS, Cosby DE. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Dis.* 2003;47(3):707-11. Epub 2003/10/18.
81. Craven SE, Cox NA, Stern NJ, Mauldin JM. Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian Dis.* 2001;45(4):1050-3. Epub 2002/01/12.

82. Choct M. Managing gut health through nutrition. *Br Poult Sci.* 2009;50(1):9-15. Epub 2009/02/24.
83. Sakurai J, Nagahama M, Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem.* 2004;136(5):569-74. Epub 2005/01/06.
84. Cooper KK, Theoret JR, Stewart BA, Trinh HT, Glock RD, Songer JG. Virulence for chickens of *Clostridium perfringens* isolated from poultry and other sources. *Anaerobe.* 2010;16(3):289-92. Epub 2010/03/03.
85. Fukata T, Hadate Y, Baba E, Uemura T, Arakawa A. Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Res Vet Sci.* 1988;44(1):68-70. Epub 1988/01/01.
86. Coursodon CF, Trinh HT, Mallozzi M, Vedantam G, Glock RD, Songer JG. *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. *Anaerobe.* 2010;16(6):614-7. Epub 2010/10/12.
87. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson MM, Awad MM, Rood JI, et al. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infection and immunity.* 2006;74(11):6496-500. Epub 2006/08/23.
88. Thompson DR, Parreira VR, Kulkarni RR, Prescott JF. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet Microbiol.* 2006;113(1-2):25-34. Epub 2005/11/18.
89. Lanckriet A, Timbermont L, Eeckhaut V, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Variable protection after vaccination of broiler chickens against necrotic enteritis using supernatants of different *Clostridium perfringens* strains. *Vaccine.* 2010;28(36):5920-3. Epub 2010/07/06.
90. Hunter SE, Brown JE, Oyston PC, Sakurai J, Titball RW. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity.* 1993;61(9):3958-65. Epub 1993/09/01.
91. Uzal FA, McClane BA. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet Microbiol.* 2011;153(1-2):37-43. Epub 2011/03/23.
92. Garcia JP, Adams V, Beingesser J, Hughes ML, Poon R, Lyras D, et al. Epsilon toxin is essential for the virulence of *Clostridium perfringens* type D infection in sheep, goats, and mice. *Infection and immunity.* 2013;81(7):2405-14. Epub 2013/05/01.
93. Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, Naylor CE, Basak AK, Titball RW. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.* 2011;278(23):4589-601. Epub 2011/04/27.
94. Popoff MR. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J.* 2011;278(23):4602-15. Epub 2011/05/04.
95. Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins (Basel).* 2009;1(2):208-28. Epub 2009/12/01.
96. Perelle S, Gibert M, Boquet P, Popoff MR. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infection and immunity.* 1995;63(12):4967. Epub 1995/12/01.
97. Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, Songer JG. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol.* 2003;94(2):121-9. Epub 2003/06/05.

98. Fisher DJ, Miyamoto K, Harrison B, Akimoto S, Sarker MR, McClane BA. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular microbiology*. 2005;56(3):747-62. Epub 2005/04/12.
99. Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*. 1997;203(1):65-73. Epub 1998/01/13.
100. Waters M, Savoie A, Garmory HS, Bueschel D, Popoff MR, Songer JG, et al. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3584-91. Epub 2003/08/09.
101. van Asten AJ, Nikolaou GN, Grone A. The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Veterinary journal*. 2010;183(2):135-40. Epub 2008/12/23.
102. Chalmers G, Martin SW, Hunter DB, Prescott JF, Weber LJ, Boerlin P. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*. 2008;127(1-2):116-27. Epub 2007/09/25.
103. Crespo R, Fisher DJ, Shivaprasad HL, Fernandez-Miyakawa ME, Uzal FA. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19(3):329-33. Epub 2007/04/27.
104. Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, Songer JG. Association of genes encoding beta2 toxin and a collagen binding protein in *Clostridium perfringens* isolates of porcine origin. *Vet Microbiol*. 2006;115(1-3):173-82. Epub 2006/03/04.
105. Lebrun M, Filee P, Mousset B, Desmecht D, Galleni M, Mainil JG, et al. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Vet Microbiol*. 2007;120(1-2):151-7. Epub 2006/11/28.
106. Li J, Chen J, Vidal JE, McClane BA. The Agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infection and immunity*. 2011;79(6):2451-9. Epub 2011/04/06.
107. Lahti P, Lindstrom M, Somervuo P, Heikinheimo A, Korkeala H. Comparative genomic hybridization analysis shows different epidemiology of chromosomal and plasmid-borne cpe-carrying *Clostridium perfringens* type A. *PLoS One*. 2012;7(10):e46162. Epub 2012/10/25.
108. Smedley JG, 3rd, Uzal FA, McClane BA. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infection and immunity*. 2007;75(5):2381-90. Epub 2007/02/20.
109. Veshnyakova A, Protze J, Rossa J, Blasig IE, Krause G, Piontek J. On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel)*. 2010;2(6):1336-56. Epub 2010/06/01.
110. Miyamoto K, Li J, McClane BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. *Microbes Environ*. 2012;27(4):343-9. Epub 2012/04/17.
111. Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T, Miki Y, Kaneko I, Li J, et al. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One*. 2009;4(5):e5598. Epub 2009/05/30.
112. Guran HS, Oksuztepe G. Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts. *Lett Appl Microbiol*. 2013;57(1):77-82. Epub 2013/04/19.
113. Miki Y, Miyamoto K, Kaneko-Hirano I, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(17):5366-72. Epub 2008/07/09.

114. Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, Korkeala H. *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):371-3. Epub 2007/11/16.
115. Tanaka D, Kimata K, Shimizu M, Isobe J, Watahiki M, Karasawa T, et al. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates collected from food poisoning outbreaks and healthy individuals in Japan based on the cpe locus. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60(1):68-9. Epub 2007/02/23.
116. Grant KA, Kenyon S, Nwafor I, Plowman J, Ohai C, Halford-Maw R, et al. The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog Dis.* 2008;5(5):629-39. Epub 2008/08/07.
117. Paredes-Sabja D, Sarker MR. *Clostridium perfringens* sporulation and its relevance to pathogenesis. *Future Microbiol.* 2009;4(5):519-25. Epub 2009/06/06.
118. Paredes-Sabja D, Sarker N, Sarker MR. *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. *Microb Pathog.* 2011;51(5):384-8. Epub 2011/08/04.
119. Mitchell LA, Koval M. Specificity of interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins (Basel).* 2010;2(7):1595-611. Epub 2010/07/01.
120. Brynestad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int J Food Microbiol.* 2002;74(3):195-202. Epub 2002/05/02.
121. Mot D, Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2014;43(4):290-300. Epub 2014/07/02.
122. Amimoto K, Noro T, Oishi E, Shimizu M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology.* 2007;153(Pt 4):1198-206. Epub 2007/03/24.
123. Just I, Gerhard R. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:23-47. Epub 2004/09/28.
124. Schirmer J, Aktories K. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1673(1-2):66-74. Epub 2004/07/09.
125. Gurjar A, Li J, McClane BA. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infection and immunity.* 2010;78(11):4860-9. Epub 2010/09/09.
126. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, Jiang YF, Reid-Smith R, Prescott JF. *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe.* 2010;16(3):314-5. Epub 2009/12/08.
127. Sayeed S, Li J, McClane BA. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. *Infection and immunity.* 2010;78(1):495-504. Epub 2009/10/28.
128. Coursodon CF, Glock RD, Moore KL, Cooper KK, Songer JG. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe.* 2012;18(1):117-21. Epub 2011/10/25.
129. Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists.* 2013;62(3):223-35. Epub 2014/01/28.
130. Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2014. Epub 2014/08/15.
131. Timbermont L, De Smet L, Van Nieuwerburgh F, Parreira VR, Van Driessche G, Haesebrouck F, et al. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium*

perfringens strains from broilers with necrotic enteritis. Vet Res. 2014;45:40. Epub 2014/04/09.

132. Barbara AJ, Trinh HT, Glock RD, Glenn Songer J. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. Vet Microbiol. 2008;126(4):377-82. Epub 2007/09/14.

133. Higa A, Yoshida E, Miyoshi Y. Characterization of two bacteriocins produced by *Clostridium perfringens*. Microbiology and immunology. 1991;35(6):411-21. Epub 1991/01/01.

134. Li AW, Verpoorte JA, Lewis RG, Mahony DE. Characterization of bacteriocin 28 produced by *Clostridium perfringens*. Canadian journal of microbiology. 1982;28(7):860-73. Epub 1982/07/01.

135. Smith HW. The bacteriophages of *Clostridium perfringens*. Journal of general microbiology. 1959;21:622-30. Epub 1959/12/01.

136. Watson GN, Stringer MF, Gilbert RJ, Mahony DE. The potential of bacteriocin typing in the study of *Clostridium perfringens* food poisoning. Journal of clinical pathology. 1982;35(12):1361-5. Epub 1982/12/01.

137. Allaart JG, Asten AJAMv, Grone A. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013;36(5):449-64.

138. Seal BS. Characterization of bacteriophages virulent for *Clostridium perfringens* and identification of phage lytic enzymes as alternatives to antibiotics for potential control of the bacterium. Poult Sci. 2013;92(2):526-33. Epub 2013/01/10.

139. Oakley BB, Talundzic E, Morales CA, Hiatt KL, Siragusa GR, Volozhantsev NV, et al. Comparative genomics of four closely related *Clostridium perfringens* bacteriophages reveals variable evolution among core genes with therapeutic potential. BMC genomics. 2011;12(1):282. Epub 2011/06/03.

140. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virol J. 2012;9:9. Epub 2012/01/12.

141. Kim KP, Born Y, Lurz R, Eichenseher F, Zimmer M, Loessner MJ, et al. Inducible *Clostridium perfringens* bacteriophages PhiS9 and PhiS63: Different genome structures and a fully functional sigK intervening element. Bacteriophage. 2012;2(2):89-97. Epub 2012/10/11.

142. Nariya H, Miyata S, Tamai E, Sekiya H, Maki J, Okabe A. Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. Applied microbiology and biotechnology. 2011;90(6):1973-9. Epub 2011/04/13.

143. Zimmer M, Scherer S, Loessner MJ. Genomic analysis of *Clostridium perfringens* bacteriophage phi3626, which integrates into *guaA* and possibly affects sporulation. Journal of bacteriology. 2002;184(16):4359-68. Epub 2002/07/27.

144. Bardina C, Spricigo DA, Cortes P, Llagostera M. Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. Appl Environ Microbiol. 2012;78(18):6600-7. Epub 2012/07/10.

145. Fischer S, Kittler S, Klein G, Glunder G. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. PLoS One. 2013;8(10):e78543. Epub 2013/11/10.

146. Miller RW, Skinner EJ, Sulakvelidze A, Mathis GF, Hofacre CL. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. Avian Dis. 2010;54(1):33-40. Epub 2010/04/23.

147. Wang JP, Yan L, Lee JH, Kim IH. Evaluation of bacteriophage supplementation on growth performance, blood characteristics, relative organ weight, breast muscle

- characteristics and excreta microbial shedding in broilers. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2013;26(4):573-8. Epub 2013/04/01.
148. Vidal JE, Ohtani K, Shimizu T, McClane BA. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cellular microbiology*. 2009;11(9):1306-28. Epub 2009/05/15.
149. Li J, Adams V, Bannam TL, Miyamoto K, Garcia JP, Uzal FA, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2013;77(2):208-33. Epub 2013/05/24.
150. Bannam TL, Yan XX, Harrison PF, Seemann T, Keyburn AL, Stubenrauch C, et al. Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *mBio*. 2011;2(5). Epub 2011/09/29.
151. Li J, Miyamoto K, McClane BA. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infection and immunity*. 2007;75(4):1811-9. Epub 2007/01/31.
152. Sayeed S, Li J, McClane BA. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infection and immunity*. 2007;75(5):2391-8. Epub 2007/03/07.
153. Steen JA, Bannam TL, Teng WL, Devenish RJ, Rood JI. The putative coupling protein TcpA interacts with other pCW3-encoded proteins to form an essential part of the conjugation complex. *Journal of bacteriology*. 2009;191(9):2926-33. Epub 2009/03/03.
154. Ohtani K, Shimizu T. Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. *Research in microbiology*. 2014. Epub 2014/10/12.
155. Chen J, Ma M, Uzal FA, McClane BA. Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut microbes*. 2014;5(1):96-107. Epub 2013/09/26.
156. Ma M, Vidal J, Saputo J, McClane BA, Uzal F. The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *mBio*. 2011;2(1):e00338-10. Epub 2011/01/26.
157. Chen J, Rood JI, McClane BA. Epsilon-toxin production by *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 is dependent upon the agr operon but not the VirS/VirR two-component regulatory system. *mBio*. 2011;2(6). Epub 2011/12/15.
158. Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T. Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology*. 2009;191(12):3919-27. Epub 2009/04/14.
159. Martin TG, Smyth JA. The ability of disease and non-disease producing strains of *Clostridium perfringens* from chickens to adhere to extracellular matrix molecules and Caco-2 cells. *Anaerobe*. 2010;16(5):533-9. Epub 2010/07/27.
160. Taha S, Johansson O, Rivera Jonsson S, Heimer D, Krovacek K. Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007;30(3):163-74. Epub 2007/01/24.
161. Katayama S, Nozu N, Okuda M, Hirota S, Yamasaki T, Hitsumoto Y. Characterization of two putative fibronectin-binding proteins of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 2009;15(4):155-9. Epub 2009/03/19.
162. Katayama S, Nozu N, Yokoyama M, Hitsumoto Y. Detection of fibronectin-binding proteins in *Clostridium perfringens*. *Acta medica Okayama*. 2006;60(6):351-5. Epub 2006/12/27.

163. Hitsumoto Y, Morita N, Yamazoe R, Tagomori M, Yamasaki T, Katayama S. Adhesive properties of *Clostridium perfringens* to extracellular matrix proteins collagens and fibronectin. *Anaerobe*. 2014;25:67-71. Epub 2013/11/19.
164. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2007;232(9):1121-9. Epub 2007/09/27.
165. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(2):996-1001. Epub 2002/01/17.
166. Mendez M, Huang IH, Ohtani K, Grau R, Shimizu T, Sarker MR. Carbon catabolite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology*. 2008;190(1):48-60. Epub 2007/11/06.
167. McBride MJ. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual review of microbiology*. 2001;55:49-75. Epub 2001/09/07.
168. Rodgers K, Arvidson CG, Melville S. Expression of a *Clostridium perfringens* type IV pilin by *Neisseria gonorrhoeae* mediates adherence to muscle cells. *Infection and immunity*. 2011;79(8):3096-105. Epub 2011/06/08.
169. Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G. Pili in gram-positive pathogens. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(7):509-19. Epub 2006/06/17.
170. Liu H, McCord KD, Howarth J, Popham DL, Jensen RV, Melville SB. Hypermotility in *Clostridium perfringens* strain SM101 is due to spontaneous mutations in genes linked to cell division. *Journal of bacteriology*. 2014;196(13):2405-12. Epub 2014/04/22.
171. Vidal JE, Ma M, Saputo J, Garcia J, Uzal FA, McClane BA. Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Molecular microbiology*. 2012;83(1):179-94. Epub 2011/12/14.
172. Sharman PA, Smith NC, Wallach MG, Katrib M. Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite Immunol*. 2010;32(8):590-8. Epub 2010/07/16.
173. Tewari AK, Maharana BR. Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J Parasit Dis*. 2011;35(1):10-7. Epub 2012/06/02.
174. Shirley MW, Bedrnik P. Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: Success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitol Today*. 1997;13(12):481-4. Epub 2004/07/28.
175. Vermeulen AN, Schaap DC, Schetters TP. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*. 2001;12(100):13-20.
176. Gholamiandehkordi AR, Timbermont L, Lanckriet A, Van Den Broeck W, Pedersen K, Dewulf J, et al. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol*. 2007;36(5):375-82.
177. Wallach M. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. *Trends Parasitol*. 2010;26(8):382-7. Epub 2010/05/11.
178. Chapman HD. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol*. 1997;26(2):221-44. Epub 1997/06/01.
179. Stephen B, Rommel M, Dausgies A, Haberkorn A. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet Parasitol*. 1997;69(1-2):19-29. Epub 1997/04/01.

180. Chapman HD, Hacker AB. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken. *Poult Sci.* 1994;73(9):1404-8. Epub 1994/09/01.
181. Williams RB. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol.* 2002;31(4):317-53. Epub 2002/10/25.
182. Annett CB, Viste JR, Chirino-Trejo M, Classen HL, Middleton DM, Simko E. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathol.* 2002;31:599-602.
183. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *The British journal of nutrition.* 2003;89(5):597-606. Epub 2003/05/02.
184. Craven SE. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poult Sci.* 2000;79(6):843-9. Epub 2000/06/30.
185. Riddell C, Kong XM. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 1992;36(3):499-503. Epub 1992/07/01.
186. Engberg RM, Hedemann MS, Jensen BB. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2002;43(4):569-79. Epub 2002/10/09.
187. Branton SL, Reece FN, Hagler WM, Jr. Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poult Sci.* 1987;66(8):1326-30. Epub 1987/08/01.
188. Engberg RM, Hedemann MS, Steinfeldt S, Jensen BB. Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poult Sci.* 2004;83(6):925-38. Epub 2004/06/23.
189. Dahiya JP, Hoehler D, Wilkie DC, Van Kessel AG, Drew MD. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* populations in broiler chickens. *Poult Sci.* 2005;84:1875-85.
190. Dahiya JP, Hoehler D, Van Kessel AG, Drew MD. Dietary encapsulated glycine influences *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* growth in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *The Journal of nutrition.* 2007;137(6):1408-14. Epub 2007/05/22.
191. Drew MD, Syed NA, Goldade BG, Laarveld B, Van Kessel AG. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poult Sci.* 2004;83(3):414-20. Epub 2004/03/31.
192. Danicke S, Vahjen W, Simon O, Jeroch H. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium. on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poult Sci.* 1999;78(9):1292-9. Epub 1999/10/09.
193. Golder HM, Geier MS, Forder RE, Hynd PI, Hughes RJ. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. *Br Poult Sci.* 2011;52(4):500-6. Epub 2011/09/17.
194. Cheema MA, Qureshi MA, Havenstein GB. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci.* 2003;82(10):1519-29. Epub 2003/11/07.
195. Jang SI, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Lillehoj EP, Hong YH, et al. Relative disease susceptibility and clostridial toxin antibody responses in three commercial broiler lines coinfecting with *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* using an experimental model of necrotic enteritis. *Avian Dis.* 2013;57(3):684-7. Epub 2013/11/29.

196. Johansson A, Aspan A, Kaldhusdal M, Engstrom BE. Genetic diversity and prevalence of *netB* in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol.* 2010;144(1-2):87-92. Epub 2010/01/09.
197. Abildgaard L, Sondergaard TE, Engberg RM, Schramm A, Hojberg O. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by *netB*-positive and *netB*-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Vet Microbiol.* 2010;144(1-2):231-5. Epub 2010/01/23.
198. Nauerby B, Pedersen K, Madsen M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol.* 2003;94(3):257-66. Epub 2003/06/20.
199. Kulkarni RR, Parreira VR, Sharif S, Prescott JF. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Clinical and vaccine immunology : CVI.* 2007;14(9):1070-7. Epub 2007/07/20.
200. Moore PR, Evenson A, et al. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biol Chem.* 1946;165(2):437-41. Epub 1946/10/01.
201. Dumonceaux TJ, Hill JE, Hemmingsen SM, Van Kessel AG. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2815-23. Epub 2006/04/07.
202. Mead GC. Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Veterinary journal.* 2000;159(2):111-23. Epub 2000/03/14.
203. Farthing MJ. Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18(2):233-9. Epub 2004/05/05.
204. Yoon MY, Lee K, Yoon SS. Protective role of gut commensal microbes against intestinal infections. *Journal of microbiology (Seoul, Korea).* 2014;52(12):983-9. Epub 2014/12/04.
205. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci.* 2005;84(4):634-43.
206. Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol.* 2002;13(1):29-42. Epub 2002/09/06.
207. Jones FT, Ricke SC. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci.* 2003;82(4):613-7. Epub 2003/04/25.
208. Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci.* 2007;86(4):605-9.
209. Seal BS, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim Health Res Rev.* 2013;14(1):78-87. Epub 2013/05/25.
210. Stanton TB. A call for antibiotic alternatives research. *Trends Microbiol.* 2013;21(3):111-3. Epub 2013/03/12.
211. Gould IM. Coping with antibiotic resistance: the impending crisis. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36 Suppl 3:S1-2. Epub 2010/12/07.
212. Diarra MS, Malouin F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in Microbiology.* 2014;17(5):282.
213. Allen HK, Levine UY, Looft T, Bandrick M, Casey TA. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol.* 2013;21(3):114-9. Epub 2013/03/12.

214. Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci.* 2003;82(4):632-9. Epub 2003/04/25.
215. Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, et al. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.* 2006;35(3):182-8. Epub 2006/06/07.
216. Cave NA. Effect of dietary propionic and lactic acids on feed intake by chicks. *Poult Sci.* 1984;63(1):131-4. Epub 1984/01/01.
217. Chowdhury R, Islam KM, Khan MJ, Karim MR, Haque MN, Khatun M, et al. Effect of citric acid, avilamycin, and their combination on the performance, tibia ash, and immune status of broilers. *Poult Sci.* 2009;88(8):1616-22. Epub 2009/07/11.
218. Izat AL, Tidwell NM, Thomas RA, Reiber MA, Adams MH, Colberg M, et al. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. *Poult Sci.* 1990;69(5):818-26. Epub 1990/05/01.
219. Samanta S, Haldar S, Ghosh TK. Comparative efficacy of an organic Acid blend and bacitracin methylene disalicylate as growth promoters in broiler chickens: effects on performance, gut histology, and small intestinal milieu. *Veterinary medicine international.* 2010;2010:645150. Epub 2010/05/07.
220. Gunal M, Yayli G, Kaya O, Karahan N, Sulak O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science.* 2006;5(2):149-55.
221. Geier MS, Mikkelsen LL, Torok VA, Allison GE, Olnood CG, Boulianne M, et al. Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. *J Appl Microbiol.* 2010;109(4):1329-38. Epub 2010/05/26.
222. Skrivanova E, Marounek M, Dlouha G, Kanka J. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C-C fatty acids. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41(1):77-81. Epub 2005/06/18.
223. Galbraith H, Miller TB, Paton AM, Thompson JK. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *The Journal of applied bacteriology.* 1971;34(4):803-13. Epub 1971/12/01.
224. Nieman C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological reviews.* 1954;18(2):147-63. Epub 1954/06/01.
225. Amerah AM, Péron A, Zaefarian F, Ravindran V. Influence of whole wheat inclusion and a blend of essential oils on the performance, nutrient utilisation, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2011;52(1):124-32.
226. Amad AA, Manner K, Wendler KR, Neumann K, Zentek J. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult Sci.* 2011;90(12):2811-6. Epub 2011/11/15.
227. Brenes A, Roura E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim Feed Sci Technol.* 2010;158(1/2):1-14.
228. Khattak F, Ronchi A, Castelli P, Sparks N. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. *Poult Sci.* 2014;93(1):132-7. Epub 2014/02/27.
229. Mueller K, Blum NM, Kluge H, Mueller AS. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic- and antioxidant enzymes in broiler chickens. *The British journal of nutrition.* 2012;108(4):588-602. Epub 2011/11/17.
230. Hernandez F, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megias MD. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci.* 2004;83(2):169-74. Epub 2004/02/26.

231. Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2003;44(3):450-7. Epub 2003/09/11.
232. Wallace RJ, Oleszek W, Franz C, Hahn I, Baser KH, Mathe A, et al. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *Br Poult Sci.* 2010;51(4):461-87. Epub 2010/10/07.
233. Bravo D, Pirgozliev V, Rose SP. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *J Anim Sci.* 2014;92(4):1531-6. Epub 2014/02/06.
234. Cerisuelo A, Marin C, Sanchez-Vizcaino F, Gomez EA, de la Fuente JM, Duran R, et al. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers. *Poult Sci.* 2014;93(3):599-606. Epub 2014/03/08.
235. Habibi R, Sadeghi G, Karimi A. Effect of different concentrations of ginger root powder and its essential oil on growth performance, serum metabolites and antioxidant status in broiler chicks under heat stress. *Br Poult Sci.* 2014;55(2):228-37. Epub 2014/04/05.
236. Weber GM, Michalczuk M, Huyghebaert G, Juin H, Kwakernaak C, Gracia MI. Effects of a blend of essential oil compounds and benzoic acid on performance of broiler chickens as revealed by a meta-analysis of 4 growth trials in various locations. *Poult Sci.* 2012;91(11):2820-8. Epub 2012/10/24.
237. Alcicek A, Bozkurt M, Cabuk M. The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. *S Afr J Anim Sci.* 2003;33(2):89-94.
238. Alcicek A, Bozkurt M, Cabuk M. The effect of a mixture of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. *S Afr J Anim Sci.* 2004;34(4):217-22.
239. Bassett R. Oregano's positive impact on poultry production. *World Poult.* 2000;16(9):31-4.
240. Langhout P. New additives for broiler chickens. *World Poultry.* 2000;16(3):27.
241. Lewis MR, Rose SP, Mackenzie AM, Tucker LA. Effects of dietary inclusion of plant extracts on the growth performance of male broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2003;44(1, Supplement):S43-S4.
242. Ocak N, Erener G, Ak FB, Sungu M, Altop A, Ozmen A. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. *Czech Journal of Animal Science.* 2008;53(4):169-75.
243. Tiihonen K, Kettunen H, Bento MHL, Saarinen M, Lahtinen S, Ouwehand AC, et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *Br Poult Sci.* 2010;51(3):381-92.
244. Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris DJ, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br Poult Sci.* 2002;43(2):223-30.
245. Bozkurt M, Giannenas I, Kucukyilmaz K, Christaki E, Florou-Paneri P. An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *Br Poult Sci.* 2013;54(6):713-27. Epub 2014/01/09.
246. Si W, Ni X, Gong J, Yu H, Tsao R, Han Y, et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. *J Appl Microbiol.* 2009;106(1):213-20. Epub 2008/12/05.

247. Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Kohler B, Gabler C, Losa R, Zimpernik I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poult Sci.* 2004;83(4):669-75. Epub 2004/04/28.
248. Jerzsele A, Szeker K, Csizinszky R, Gere E, Jakab C, Mallo JJ, et al. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poult Sci.* 2012;91(4):837-43.
249. McReynolds J, Waneck C, Byrd J, Genovese K, Duke S, Nisbet D. Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phyto-genetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. *Poult Sci.* 2009;88(10):2075-80. Epub 2009/09/19.
250. Bozkurt M, Selek N, Kucukyilmaz K, Eren H, Guven E, Catli AU, et al. Effects of dietary supplementation with a herbal extract on the performance of broilers infected with a mixture of *Eimeria* species. *Br Poult Sci.* 2012;53(3):325-32. Epub 2012/09/18.
251. Christaki E, Florou-Paneri P, Giannenas I, Papazahariadou M, Botsoglou NA, Spais AB. Effect of a mixture of herbal extracts on broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Animal Research.* 2004;53(2):137-44.
252. Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition.* 2003;57(2):99-106.
253. Youn HJ, Noh JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol.* 2001;96(4):257-63. Epub 2001/03/27.
254. Mookiah S, Sieo CC, Ramasamy K, Abdullah N, Ho YW. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the science of food and agriculture.* 2014;94(2):341-8. Epub 2013/09/17.
255. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci.* 2003;82:627-31.
256. Baurhoo B, Ferket PR, Zhao X. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult Sci.* 2009;88(11):2262-72. Epub 2009/10/17.
257. Geier MS, Torok VA, Allison GE, Ophel-Keller K, Hughes RJ. Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but do not influence the performance of broiler chickens. *J Appl Microbiol.* 2009;106(5):1540-8. Epub 2009/02/04.
258. Yang Y, Iji PA, Kocher A, Thomson E, Mikkelsen LL, Choct M. Effects of mannanoligosaccharide in broiler chicken diets on growth performance, energy utilisation, nutrient digestibility and intestinal microflora. *Br Poult Sci.* 2008;49(2):186-94. Epub 2008/04/15.
259. Kim GB, Seo YM, Kim CH, Paik IK. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult Sci.* 2011;90(1):75-82. Epub 2010/12/24.
260. Nava GM, Bielke LR, Callaway TR, Castaneda MP. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim Health Res Rev.* 2005;6(1):105-18.
261. Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating

- cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult Sci.* 2007;86(2):309-17. Epub 2007/01/20.
262. Berge AC, Wierup M. Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. *Animal : an international journal of animal bioscience.* 2012;6(4):557-64. Epub 2012/03/23.
263. Sun X, McElroy A, Webb KEJ, Selton A, E. Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poult Sci.* 2005;84(8):1294-302.
264. Craven SE, Stern NJ, Cox NA, Bailey JS, Berrang M. Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given Mucosal Starter Culture. *Avian Dis.* 1999;43(3):484-90. Epub 1999/09/24.
265. Kaldhusdal M, Schneitz C, Hofshagen M, Skjerve E. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Dis.* 2001;45(1):149-56. Epub 2001/05/03.
266. Ravindran V, Son JH. Feed enzyme technology: present status and future developments. *Recent patents on food, nutrition & agriculture.* 2011;3(2):102-9. Epub 2011/03/25.
267. Guo S, Liu D, Zhao X, Li C, Guo Y. Xylanase supplementation of a wheat-based diet improved nutrient digestion and mRNA expression of intestinal nutrient transporters in broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Poult Sci.* 2014;93(1):94-103. Epub 2014/02/27.
268. Tang D, Hao S, Liu G, Nian F, Ru Y. Effects of maize source and complex enzymes on performance and nutrient utilization of broilers. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014;27(12):1755-62. Epub 2014/11/02.
269. Yu B, Chung TK. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. *J Appl Poult Res.* 2004;13(2):178-82.
270. Zanella I, Sakomura NK, Silversides FG, Figueirido A, Pack M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult Sci.* 1999;78(4):561-8. Epub 1999/05/07.
271. Cowieson AJ, Masey O'Neill HV. Effects of exogenous xylanase on performance, nutrient digestibility and caecal thermal profiles of broilers given wheat-based diets. *Br Poult Sci.* 2013;54(3):346-54. Epub 2013/05/09.
272. Berekatain MR, Antipatis C, Rodgers N, Walkden-Brown SW, Iji PA, Choct M. Evaluation of high dietary inclusion of distillers dried grains with solubles and supplementation of protease and xylanase in the diets of broiler chickens under necrotic enteritis challenge. *Poult Sci.* 2013;92(6):1579-94. Epub 2013/05/21.
273. Jackson ME, Anderson DM, Hsiao HY, Mathis GF, Fodge DW. Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. *Avian Dis.* 2003;47(3):759-63. Epub 2003/10/18.
274. Liu D, Guo S, Guo Y. Xylanase supplementation to a wheat-based diet alleviated the intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged by *Clostridium perfringens*. *Avian Pathol.* 2012;41(3):291-8. Epub 2012/06/19.
275. Tsiouris V, Georgopoulou I, Batzios C, Pappaioannou N, Diakou A, Petridou E, et al. The role of an attenuated anticoccidial vaccine on the intestinal ecosystem and on the pathogenesis of experimental necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2013;42(2):163-70.
276. Waldenstedt L, Lunden A, Elwinger K, Thebo P, Ugglå A. Comparison between a live, attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial ionophore, on performance of broilers

- raised with or without a growth promoter, in an initially *Eimeria*-free environment. *Acta veterinaria Scandinavica*. 1999;40(1):11-21. Epub 1999/07/27.
277. Williams RB. Coccidial and clostridial interactions in broilers vaccinated against coccidiosis. *World Poultry*. 2003;19(Special):26-8.
278. McReynolds J, Byrd J, Anderson R, Moore R, Edrington T, Genovese K, et al. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poult Sci*. 2004;83:1948-52.
279. Bangoura B, Alnassan AA, Lendner M, Shehata AA, Kruger M, Dauschies A. Efficacy of an anticoccidial live vaccine in prevention of necrotic enteritis in chickens. *Exp Parasitol*. 2014;145c:125-34. Epub 2014/08/19.
280. Cheung JK, Keyburn AL, Carter GP, Lanckriet AL, Van Immerseel F, Moore RJ, et al. The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infection and immunity*. 2010;78(7):3064-72. Epub 2010/05/12.
281. Keyburn AL, Portela RW, Ford ME, Bannam TL, Yan XX, Rood JI, et al. Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Vet Res*. 2013;44:108. Epub 2013/11/14.
282. Jiang Y, Kulkarni RR, Parreira VR, Prescott JF. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis using purified recombinant immunogenic proteins. *Avian Dis*. 2009;53(3):409-15. Epub 2009/10/24.
283. Crouch CF, Withanage GS, de Haas V, Eto F, Francis MJ. Safety and efficacy of a maternal vaccine for the passive protection of broiler chicks against necrotic enteritis. *Avian Pathol*. 2010;39(6):489-97. Epub 2010/12/15.
284. Lovland A, Kaldhusdal M, Redhead K, Skjerve E, Lillehaug A. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. *Avian Pathol*. 2004;33(1):83-92. Epub 2003/12/19.
285. Keyburn AL, Portela RW, Sproat K, Ford ME, Bannam TL, Yan X, et al. Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Vet Res*. 2013;44:54. Epub 2013/07/20.
286. Cooper KK, Trinh HT, Songer JG. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. *Vet Microbiol*. 2009;133(1-2):92-7. Epub 2008/07/19.
287. Jang SI, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Lillehoj EP, Hong YH, et al. Vaccination with *Clostridium perfringens* recombinant proteins in combination with Montanide ISA 71 VG adjuvant increases protection against experimental necrotic enteritis in commercial broiler chickens. *Vaccine*. 2012;30(36):5401-6. Epub 2012/06/21.
288. Jiang Y, Kulkarni RR, Parreira VR, Poppe C, Roland KL, Prescott JF. Assessment of 2 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-based vaccines against necrotic enteritis in reducing colonization of chickens by *Salmonella* serovars of different serogroups. *Can J Vet Res*. 2010;74(4):264-70. Epub 2011/01/05.
289. Kulkarni RR, Parreira VR, Jiang YF, Prescott JF. A live oral recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine expressing *Clostridium perfringens* antigens confers protection against necrotic enteritis in broiler chickens. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(2):205-14. Epub 2009/12/17.
290. Kulkarni RR, Parreira VR, Sharif S, Prescott JF. Oral immunization of broiler chickens against necrotic enteritis with an attenuated *Salmonella* vaccine vector expressing *Clostridium perfringens* antigens. *Vaccine*. 2008;26(33):4194-203. Epub 2008/07/04.

291. Zekarias B, Mo H, Curtiss R, 3rd. Recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing the carboxy-terminal domain of alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces protective responses against necrotic enteritis in chickens. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2008;15(5):805-16. Epub 2008/03/14.
292. Hoang TH, Hong HA, Clark GC, Titball RW, Cutting SM. Recombinant *Bacillus subtilis* expressing the *Clostridium perfringens* alpha toxoid is a candidate orally delivered vaccine against necrotic enteritis. *Infection and immunity*. 2008;76(11):5257-65. Epub 2008/09/10.
293. La Ragione RM, Woodward MJ. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet Microbiol*. 2003;94(3):245-56. Epub 2003/06/20.
294. Charlebois A, Jalbert LA, Harel J, Masson L, Archambault M. Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One*. 2012;7(9):e44449. Epub 2012/09/13.
295. Hibberd MC, Neumann AP, Rehberger TG, Siragusa GR. Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1556-67. Epub 2011/01/29.
296. Brady J, Hernandez-Doria JD, Bennett C, Guenter W, House JD, Rodriguez-Lecompte JC. Toxinotyping of necrotic enteritis-producing and commensal isolates of *Clostridium perfringens* from chickens fed organic diets. *Avian Pathol*. 2010;39(6):475-81. Epub 2010/12/15.
297. Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, Titball RW. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect*. 2000;124(1):61-7. Epub 2000/03/18.
298. Lyhs U, Perko-Makela P, Kallio H, Brockmann A, Heinikainen S, Tuuri H, et al. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poult Sci*. 2013;92(7):1750-7. Epub 2013/06/19.
299. Smyth JA, Martin TG. Disease producing capability of *netB* positive isolates of *C. perfringens* recovered from normal chickens and a cow, and *netB* positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. *Vet Microbiol*. 2010;146(1-2):76-84. Epub 2010/06/12.
300. De Cesare A, Borilova G, Svobodova I, Bondioli V, Manfreda G. *Clostridium perfringens* occurrence and ribotypes in healthy broilers reared in different European countries. *Poult Sci*. 2009;88(9):1850-7. Epub 2009/08/19.
301. Gholamiandekhordi AR, Ducatelle R, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Van Immerseel F. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet Microbiol*. 2006;113(1-2):143-52. Epub 2005/12/13.
302. Schalch B, Bader L, Schau HP, Bergmann R, Rometsch A, Maydl G, et al. Molecular typing of *Clostridium perfringens* from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):892-5. Epub 2003/02/08.
303. McLauchlin J, Ripabelli G, Brett MM, Threlfall EJ. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol*. 2000;56(1):21-8. Epub 2000/06/17.
304. Elwinger K, Berndtson E, Engstrom B, Fossum O, Waldenstedt L. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. *Acta veterinaria Scandinavica*. 1998;39(4):433-41. Epub 1999/02/02.

305. WHO. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014. Geneva, CH: World Health Organization; 2014.
306. European commission review of the regulation of coccidiostats and histomanostats as feed additives. 2007.
307. Emborg H-D, Ersboll AK, Heuer OE, Wegener HC. The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev Vet Med.* 2001;50:53-70.
308. Engster HM, Marvil D, Stewart-Brown B. The effect of withdrawing growth promoting antibiotics from broiler chickens: a long-term commercial industry study *J Appl Poult Res.* 2002;11:431-6.
309. Graham JP, Boland JJ, Silbergeld E. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Public Health Rep.* 2007;122:79-87.
310. Smith JA. Experiences with drug-free broiler production. *Poult Sci.* 2011;90:2670-8.
311. Miller GY, McNamara PE, Singer RS. Stakeholder position paper: economist's perspectives on antibiotic use in animals. *Prev Vet Med.* 2006;73(2-3):163-8. Epub 2005/11/01.
312. Dumas MD, Polson SW, Ritter D, Ravel J, Gelb J, J., Morgan R, et al. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e24785.
313. Singh KM, Shah TM, Reddy B, Deshpande S, Rank DN, Joshi CG. Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. *J Appl Genet.* 2014;55(1):145-54. Epub 2013/10/19.
314. Ao Z, Kocher A, Choct M. Effects of dietary additives and early feeding on performance, gut development and immune status of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2012;25(4):541-51. Epub 2012/04/01.
315. Geyra A, Uni Z, Sklan D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Poult Sci.* 2001;80(6):776-82. Epub 2001/07/10.
316. Noy Y, Sklan D. Energy utilization in newly hatched chicks. *Poult Sci.* 1999;78(12):1750-6. Epub 2000/01/08.
317. Noy Y, Sklan D. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. *Poult Sci.* 2001;80(10):1490-5. Epub 2001/10/16.
318. Uni Z, Ganot S, Sklan D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult Sci.* 1998;77(1):75-82. Epub 1998/02/20.
319. Shira EB, Sklan D, Friedman A. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2005;105(1-2):33-45. Epub 2005/03/31.
320. Bigot K, Mignon-Grasteau S, Picard M, Tesseraud S. Effects of delayed feed intake on body, intestine, and muscle development in neonate broilers. *Poult Sci.* 2003;82(5):781-8. Epub 2003/05/24.
321. Halevy O, Geyra A, Barak M, Uni Z, Sklan D. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *J Nutr.* 2000;130(4):858-64. Epub 2000/03/29.
322. Wang Y, Li Y, Willems E, Willemsen H, Franssens L, Koppenol A, et al. Spread of hatch and delayed feed access affect post hatch performance of female broiler chicks up to day 5. *Animal : an international journal of animal bioscience.* 2014;8(4):610-7. Epub 2014/02/15.

323. Gonzales E, Kondo N, Saldanha ES, Loddy MM, Careghi C, Decuyper E. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poult Sci.* 2003;82(8):1250-6. Epub 2003/08/29.
324. Palliyeguru MWCD, Rose SP. Sub-clinical necrotic enteritis: its aetiology and predisposing factors in commercial broiler production. *Worlds Poult Sci J.* 2014;70(4):803-15.
325. Aviagen. Ross PS Management Handbook: 2013. [modifié le; cité le]; [180]. Disponible: http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_PS/Ross_PS_Handbook_2013_i-r1.pdf
326. CoBB-Vantress. CoBB Broiler Management Guide: CoBB; 2013. [modifié le; cité le]; [73]. Disponible: <http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/guides/cobb-broiler-management-guide---english.pdf>
327. Peek HW, Landman WJM. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet Q.* 2011;31(3):143-61.
328. Williams RB, Gobbi L. Comparison of an attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial drug programme in commercial broiler chickens in Italy. *Avian Pathol.* 2002;31(3):253-65. Epub 2002/10/29.
329. Teeter R. Late coccidiosis challenge has a profound impact on profits: 2009. [modifié le; cité le April 22nd 2015]. Disponible: <https://www.ihc-poultry.com/pages.aspx?id=640>
330. Newman L, J., Broussard CT, Smykot A, Detzler D. Practical aspects and field experiences in coccidiosis. *Poult Sci.* 2011;90(E-suppl. 1).
331. Williams RB, Carlyle WW, Bond DR, Brown IA. The efficacy and economic benefits of Paracox, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom. *Int J Parasitol.* 1999;29(2):341-55. Epub 1999/04/30.
332. Lee KW, Lillehoj HS, Jang SI, Lee SH, Bautista DA, Donald Ritter G, et al. Comparison of live *Eimeria* vaccination with in-feed salinomycin on growth and immune status in broiler chickens. *Res Vet Sci.* 2013;95(1):110-4. Epub 2013/03/08.
333. Cooper KK, Songer JG, Uzal FA. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J Vet Diagn Invest.* 2013;25(3):314-27. Epub 2013/04/11.
334. Williams RB, Johnson JD, Andrews SJ. Anticoccidial vaccination of broiler chickens in various management programmes: relationship between oocyst accumulation in litter and the development of protective immunity. *Vet Res Commun.* 2000;24(5):309-25. Epub 2000/06/27.
335. Williams RB. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int J Parasitol.* 1998;28(7):1089-98. Epub 1998/09/02.
336. Yun CH, Lillehoj HS, Lillehoj EP. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev Comp Immunol.* 2000;24(2-3):303-24. Epub 2000/03/16.
337. Min WN, Dalloul RA, Lillehoj HS. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. *Journal of Veterinary Science.* 2004;5(4):279-88.
338. Tsiouris V, Georgopoulou I, Batzios C, Pappaioannou N, Ducatelle R, Fortomaris P. Temporary feed restriction partially protects broilers from necrotic enteritis. *Avian Pathol.* 2014;43(2):139-45.
339. Shirley MW, Smith AL, Blake DP. Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine.* 2007;25(30):5540-7. Epub 2007/01/17.
340. Adil S, Banday T, Bhat GA, Mir MS, Rehman M. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Vet Med Int.* 2010;2010:479485. Epub 2010/07/09.

341. Chaveerach P, Keuzenkamp DA, Lipman LJ, Van Knapen F. Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poult Sci.* 2004;83(3):330-4. Epub 2004/03/31.
342. Golder HM, Geier MS, Hynd PI, Forder REA, Boulianne M, Hughes RJ. Feed additives influence goblet cell distribution and villus-crypt architecture in broilers after necrotic enteritis challenge. *Proc 21st Annual Austr Poult Sci Symp* 1 -3. february 2010; Sydney, New South Wales 2010. p. 211-4.
343. Nava GM, Attene-Ramos MS, Gaskins HR, Richards JD. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Vet Microbiol.* 2009;137(3-4):345-53. Epub 2009/03/10.
344. Garces-Narro C, Barragan JI, Soler MD, Mateos M, Lopez-Mendoza MC, Homedes J. Efficacy of low-dose tyvalosin for the control of clostridiosis in broilers and its effect on productive parameters. *Poult Sci.* 2013;92(4):975-8. Epub 2013/03/09.
345. Skinner J, Bauer S, Young V, Pauling G, Wilson J. An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 2010;54:1237-40.
346. Mathlouthi N, Bouzaienne T, Oueslati I, Recoquillay F, Hamdi M, Urdaci M, et al. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci.* 2012;90(3):813-23. Epub 2011/11/09.
347. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2003;52(2):159-61. Epub 2003/07/03.
348. Hamdy AH, Thomas RW, Yancey RJ, Davis RB. Therapeutic effect of optimal lincomycin concentration in drinking water on necrotic enteritis in broilers. *Poult Sci.* 1983;62(4):589-91. Epub 1983/04/01.
349. Cawthraw SA, Newell DG. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis.* 2010;54:86-93.
350. Lin J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(7):755-65. Epub 2009/05/12.
351. Sahin O, Luo N, Huang S, Zhang Q. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5372-9.
352. Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, et al. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol.* 2010;39(2):117-21.
353. Engstrom BE, Johansson A, Aspan A, Kaldhusdal M. Genetic relatedness and netB prevalence among environmental *Clostridium perfringens* strains associated with a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol.* 2012;159(1-2):260-4. Epub 2012/04/21.
354. Blake DP, Tomley FM. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol.* 2014;30(1):12-9. Epub 2013/11/19.
355. Teirlynck E, Gussem MDE, Dewulf J, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Morphometric evaluation of "dysbacteriosis" in broilers *Avian Pathol.* 2011;40(2):139-44.
356. Barri A, Smet dS. Clostridial enteritis - a continuing challenge for the poultry sector. *Poultry: Middle East & North Africa.* 2011;33(218):111.

357. van der Hoeven-Hangoor E, Paton ND, van de Linde IB, Verstegen MWA, Hendricks WH. Moisture content in broiler excreta is influenced by excreta nutrient contents. *J Anim Sci.* 2013;91(12):S705-13.
358. Schrader JS, Singer RS, Atwill ER. A prospective study of management and litter variables associated with cellulitis in California broiler flocks. *Avian Dis.* 2004;48(3):522-30.
359. Shepherd EM, Fairchild BD. Footpad dermatitis in poultry. *Poult Sci.* 2010;89(10):2043-51.
360. Wadud S, Michaelsen A, Gallagher E, Parcsi G, Zemb O, Stuetz R, et al. Bacterial and fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content *Br Poult Sci.* 2012;53(5):561-9.
361. Arakawa A, Oe O. Reduction of *Clostridium perfringens* by feed additive antibiotics in the ceca of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poult Sci.* 1975;54(4):1000-7. Epub 1975/07/01.
362. Tsiouris V, Georgopoulou I, Batzios C, Pappaioannou N, Ducatelle R, Fortomaris P. High stocking density as a predisposing factor for necrotic enteritis in broiler chicks. *Avian Pathol.* 2015;44(2):59-66. Epub 2015/01/08.
363. Grilli E, Vitari F, Domeneghini C, Palmonari A, Tosi G, Fantinati P, et al. Development of a feed additive to reduce caecal *Campylobacter jejuni* in broilers at slaughter age: from in vitro to in vivo, a proof of concept. *J Appl Microbiol.* 2013;114(2):308-17. Epub 2012/11/01.
364. van Alphen LB, Burt SA, Veenendaal AK, Bleumink-Pluym NM, van Putten JP. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e45343. Epub 2012/10/11.
365. Hermans D, Van Deun K, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Haesebrouck F, et al. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Vet Microbiol.* 2011;152(3-4):219-28. Epub 2011/04/13.
366. Naughton J, Duggan G, Bourke B, Clyne M. Interaction of microbes with mucus and mucins: recent developments. *Gut microbes.* 2014;5(1):48-52. Epub 2013/10/24.
367. Wilson J, Tice G, Brash ML, St. Hilaire S. Manifestations of *Clostridium perfringens* and related bacterial enteritides in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J.* 2005;61(3):435-49.
368. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res.* 2007;21(10):989-94. Epub 2007/06/15.
369. Penalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *APMIS.* 2005;113(1):1-6. Epub 2005/01/29.
370. Sokovic M, Glamoclija J, Marin PD, Brkic D, van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules.* 2010;15(11):7532-46. Epub 2010/10/30.
371. Thapa D, Losa R, Zweifel B, Wallace RJ. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. *Microbiology.* 2012;158(Pt 11):2870-7. Epub 2012/08/11.
372. Dibner JJ, Knight, C.D., Kitchell, M.L., Atwell, C.A., Downs, A.C., Ivey, F.J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *J Appl Poult Res.* 1998;7:425-36.
373. Maharjan RP, Ferenci T, Reeves PR, Li Y, Liu B, Wang L. The multiplicity of divergence mechanisms in a single evolving population. *Genome Biol.* 2012;13(6):R41. Epub 2012/06/12.

374. Heuer H, Abdo Z, Smalla K. Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;65(3):361-71. Epub 2008/07/12.
375. Racicot M, Venne D, Durivage A, Vaillancourt JP. Description of 44 biosecurity errors while entering and exiting poultry barns based on video surveillance in Quebec, Canada. *Prev Vet Med.* 2011;100(3-4):193-9. Epub 2011/05/25.
376. Hughes JB, Hellmann JJ. The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods Enzymol.* 2005;397:292-308. Epub 2005/11/02.
377. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):185-230. Epub 2013/04/05.
378. Wisniewski JA, Teng WL, Bannam TL, Rood JI. Two novel membrane proteins, TcxD and TcxE, are essential for conjugative transfer of pCW3 in *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology.* 2015;197(4):774-81. Epub 2014/12/10.
379. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, et al. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(7):639-48. Epub 2013/05/11.