

Université de Montréal

**Effet des promoteurs de croissance bacitracine de zinc et  
virginiamycine sur la résistance aux antibiotiques  
observée chez les entérobactéries provenant de poulets à  
griller : étude terrain.**

par

Alexandre Thibodeau

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès sciences (M. Sc)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Avril, 2007

© Alexandre Thibodeau, 2007



SF

607

U54

2007

V-017

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effet des promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine sur la  
résistance aux antibiotiques observée chez les entérobactéries provenant de poulets à  
griller : étude terrain.**

présenté par :

Alexandre Thibodeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marie Archambault, présidente-rapporteur

Sylvain Quessy, directeur de recherche

Ann Letellier, codirectrice

Moussa Sory Diarra, codirecteur

Éric Nadeau, membre du jury

## Résumé

Dans cette étude, nous avons évalué, dans des conditions terrain, l'implication des promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine dans l'émergence d'un réservoir d'isolats (*Escherichia coli* et *Enterococcus* spp.) phénotypiquement résistants à certains antibiotiques et d'un réservoir de gènes de résistance associés à ces mêmes promoteurs de croissance. Nous avons aussi étudié l'effet de ces composés sur le gain de poids moyen quotidien et la mortalité des poulets à griller à la fin de chacun des trois cycles de production étudiés. Dans cette étude terrain, aucun effet positif des promoteurs de croissance sur le gain de poids moyen quotidien et la mortalité moyenne n'a été observé. Une variation des pourcentages de résistance aux antibiotiques sélectionnés des isolats a été observée avant et après 34 jours d'expérimentation. Les promoteurs de croissance n'ont pas favorisé l'émergence d'entérocoques résistants, mais semblent au contraire avoir contribué à diminuer la prévalence de *E. coli* résistants à la céphalotine, à l'acide nalidixique et au sulfaméthoxazole. Les gènes de résistances *vatD* et *ermB*, associés à la résistance à la virginiamycine, ont été détectés par PCR chez *Enterococcus*. Ces gènes n'ont toutefois pas été retrouvés chez toutes les souches résistantes à la virginiamycine. Le gène de résistance à la bacitracine *bcrR* a été détecté par PCR chez les mêmes microorganismes, mais encore une fois n'a pas été observé chez toutes les souches résistantes à la bacitracine. Une analyse par PCR en temps réel, effectuée sur des échantillons de litières, a indiqué que les promoteurs de croissance n'influençaient pas la distribution du gène *bcrR*, mais que la virginiamycine sélectionnerait positivement pour le gène *vatD*. En résumé, l'utilisation des promoteurs de croissance ne semble pas créer de réservoir de résistance phénotypique aux antibiotiques chez les bactéries étudiées, mais pourrait contribuer à l'émergence de certains gènes.

**Mots-clés :** Résistance aux Antibiotiques, Virginiamycine, Bacitracine, Poulet à Griller, Étude Terrain, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, Antibiorésistance, gènes de résistance, aviaire.

## Abstract

One of the suspected sources for the selection of antibiotic resistant bacteria is the use of growth promoters on farms. The objective of this study was to evaluate the effect, in field conditions, of the use of zinc bacitracin and virginiamycin on emergence of antimicrobial resistance genes reservoir. We also evaluate their possible effects on weight gain and mortality. No positive effect of growth promoters was found on the average daily weight gain and mortality of broiler chickens. Antibiotic resistance profiles for *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. isolated from birds and environment in the different diet conditions were evaluated and compared. Antibioresistance was variable when profiles from day 0 and day 34 were compared. Growth promoters did not select for phenotypical antibioresistance in *Enterococcus* spp. but seemed to decrease resistance in *E. coli*. *Enterococcus* spp. isolates were PCR screened for growth promoter associated resistance genes. Virginiamycin associated resistance genes *vatD* and *ermB* were detected in *Enterococcus* but not in all phenotypically resistant isolates. The same observations could be made for bacitracin associated resistance gene *bcrR* in *Enterococcus*. Real-Time PCR analysis of broiler's litters indicated that growth promoters did not influence *bcrR* gene distribution but that virginiamycin selected for *vatD* gene. In conclusion, the use of zinc bacitracin and virginiamycin did not seem to allow the emergence of a phenotypical antibiotic resistance reservoir but might have contributed to the emergence of antibiotic resistance genes.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Virginiamycin, Bacitracin, Broiler, Field study, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, Resistance genes, Poultry

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>2</b>	<b>Liste des figures</b> .....	<b>ix</b>
<b>3</b>	<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>4</b>	<b>Remerciements</b> .....	<b>xi</b>
<b>5</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>6</b>	<b>Recension de la littérature</b> .....	<b>3</b>
6.1	Promoteur de croissance .....	3
6.1.1	Définition .....	3
6.1.2	Historique.....	3
6.1.3	Utilisation mondiale et canadienne .....	6
6.1.4	Bacitracine .....	6
6.1.4.1	Description .....	6
6.1.4.2	Mécanisme d'action et cible .....	7
6.1.4.3	Résistance .....	8
6.1.5	Virginiamycine .....	9
6.1.5.1	Description .....	9
6.1.5.2	Mécanisme d'action et cible .....	10
6.1.5.3	Résistance .....	11
6.2	Microorganismes d'intérêt pour l'étude.....	13
6.2.1	<i>Enterococcus</i> spp. ....	13
6.2.1.1	Description générale .....	13
6.2.1.2	Infections.....	14
6.2.1.3	Résistances aux antibiotiques.....	14
6.2.2	<i>Escherichia coli</i> .....	17
6.2.2.1	Description générale .....	17
6.2.2.2	Infections.....	17
6.2.2.3	Résistances aux antibiotiques.....	17

<b>7</b>	<b>Article scientifique .....</b>	<b>20</b>
7.1	ABSTRACT.....	21
7.2	INTRODUCTION .....	22
7.3	MATERIALS AND METHODS.....	24
7.3.1	Farm Trials.....	24
7.3.2	Bacterial Isolation .....	25
7.3.3	Antimicrobial resistance .....	26
7.3.4	DNA Extracts.....	27
7.3.5	Polymerase Chain Reaction .....	28
7.3.6	SYBR Green Real-Time PCR (QPCR).....	28
7.3.7	Statistical analyses .....	30
7.4	RESULTS .....	30
7.4.1	Average daily weight gain and average mortality .....	30
7.4.2	Antimicrobial resistance profiles .....	30
7.4.3	Presence of antimicrobial resistance genes.....	31
7.4.4	Real-Time PCR.....	31
7.5	DISCUSSION .....	32
7.5.1	Average daily weight gain and average mortality .....	32
7.5.2	Antimicrobial resistance profiles .....	32
7.5.3	Occurrence of antimicrobial resistance genes .....	34
7.5.4	Real-Time PCR.....	35
7.6	CONCLUSION.....	36
7.7	ACKNOWLEDGMENTS .....	36
7.8	REFERENCES .....	36
<b>8</b>	<b>Discussion générale des résultats .....</b>	<b>47</b>
8.1	Gain de poids quotidien moyen et mortalité moyenne .....	47
8.2	Résistance phénotypique aux antibiotiques .....	51
8.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	52

8.2.2	<i>Enterococcus</i> spp. ....	55
8.3	Résistance génotypique aux antibiotiques .....	57
8.3.1	PCR .....	57
8.3.2	PCR en Temps-Réel.....	59
<b>9</b>	<b>Conclusions</b> .....	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>63</b>
<b>11</b>	<b>ANNEXE I</b> .....	<b>XII</b>

## 1 Liste des tableaux

Tableau I : Principaux gènes impliqués dans la résistance à la bacitracine .....	9
Tableau II : Principaux gènes impliqués dans la résistance à la virginiamycine .....	13
Table 1: Isolates distribution throughout the study.....	43
Table 2: List of primers used in this study.....	44
Table 3: Significant antimicrobial resistance means variation over time (Day 0 vs Day 34) in <i>E. coli</i> for each type of diet.....	45
Table 4: Significant antimicrobial resistance means variation over time (Day 0 vs Day 34) in <i>Enterococcus</i> for each type of diet.....	46

## 2 Liste des figures

Figure 1 : Courbe standard utilisée lors du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène <i>bcrR</i> .....	XII
Figure 2 : Courbe de dénaturation du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène <i>bcrR</i> .....	XII
Figure 3 : Courbe standard utilisée lors du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène <i>vatD</i> .....	XIII
Figure 4 : Courbe de dénaturation du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène <i>vatD</i> .....	XIII
Figure 5 : Quantification du gène de résistance à la virginiamycine <i>vatD</i> tel qu'obtenu par PCR en Temps-Réel.....	XIV

### 3 Liste des sigles et abréviations

Voici la liste ainsi que la définition des abréviations les plus utilisées dans le présent ouvrage.

PCR : polymerase chain reaction ou réaction en chaîne de la polymérase

QPCR : PCR en Temps-Réel ou PCR quantitatif

ADN : acide désoxyribonucléique

CRDA : Centre de Recherche et de Développement des Aliments

GREMIP : Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc

FDA : Food and Drugs Administration

ACIA : Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

CMI : concentration minimale inhibitrice

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : enzyme qui utilise de l'ATP

ARN : acide ribonucléique

ARNt : ARN de transfert

ARNm : ARN messenger

VRE : vancomycin resistant enterococci ou enterocoques résistants à la vancomycine

GRE : glycopeptide resistant enterococci ou enterocoques résistants aux glycopeptides

ESBL : extended spectrum  $\beta$ -lactamase ou  $\beta$ -lactamase à spectre étendu

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

BMD : Bacitracin Methylene Disacylate

ZB : zinc bacitracine ou bacitracine de zinc

VG : virginiamycine

Q/D : quinupristine/dalfopristine

PFGE : pulse field gel electrophoresis ou électrophorèse en champ pulsé

MLST: multi-locus sequence typing ou typage génomique multilocus

ct : threshold cycle ou cycle seuil

$\mu$ g : microgramme

$\mu$ l : microlitre

g : gramme

#### 4 Remerciements

Je voudrais utiliser cet espace pour remercier toutes les personnes qui ont été impliquées ou m'ayant soutenu durant le projet. Je voudrais tout d'abord remercier mon épouse Sophie, sans qui je n'aurais jamais pu terminer ce projet ni même continuer sur la voie du PhD. Je voudrais remercier mes directeurs et codirecteurs de maîtrise de m'avoir accueillis à la Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes et d'avoir eu foi en mon potentiel. J'aimerais remercier également les membres de la Chaire de Recherche et plus spécialement Mme Hélène Bergeron. Je veux aussi remercier l'équipe du CRDA formée de Alain Houde, Évelyne Guévremont, Danielle Leblanc, Pierre Ward, Élyse Poitras, Marie-Josée Gagné et Valérie Normand (Merci pour les classes de Biomol!). Merci aussi à tous les membres de ma famille qui sont fiers de moi et qui m'ont toujours supporté, même si la plupart du temps ils n'avaient aucune idée de ce dont je parlais. Merci beaucoup aux Drs Moussa Sory Diarra et Edward Topp pour l'encadrement financier, mais surtout scientifique dont ils ont fait preuve. Merci aussi aux membres du GREMIP avec qui j'ai pu échanger science et festivités. Merci également aux membres du comité d'évaluation du présent mémoire ainsi que ceux de mon comité conseil.

## 5 Introduction

L'industrie avicole est une industrie très importante au Canada. Elle emploie plus de 49 700 personnes. C'est une industrie dont le chiffre d'affaire est d'environ 9.5 milliards de dollars dont environ 3.4 milliards proviennent du secteur de la production. En 2005, la volaille était la deuxième viande la plus consommée au Canada avec environ 1 000 millions de kilogrammes de consommés. Le principal pays vers lequel le Canada exporte ces surplus de production est les États-Unis <sup>35</sup>. La production de poulet à griller est régie par un système de quotas permettant un meilleur contrôle de l'offre et ainsi s'assurer de la stabilité du marché. Les aliments et l'achat des poussins peut représenter jusqu'à 75% des coûts relatifs à la production des poulets à griller <sup>38</sup>.

L'augmentation de la résistance envers les agents antimicrobiens qui sont importants pour le traitement des maladies humaines, tels les fluoroquinolones et les céphalosporines lors d'infections à *Salmonella* et *Campylobacter*, représente une problématique importante en santé publique. Chaque année, les médias rapportent différentes épidémies causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques causant des infections nosocomiales, et ce, au grand désagrément des utilisateurs des hôpitaux du Québec. Ces derniers temps, des maladies causées par des souches résistantes de *Clostridium difficile* ou de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine ont suscitées l'attention des médias. Outre les désagréments associés à l'infection, ces épisodes requièrent des mesures spéciales de confinement et de quarantaine des patients qui font gonfler les coûts des établissements de santé. Plusieurs attribuent la surutilisation des antibiotiques dans le traitement des infections bénignes, ce qui crée une pression sélective favorable aux microorganismes possédant des mécanismes de résistance aux antimicrobiens. Ces « super bactéries » peuvent alors tirer avantage des traitements aux antibiotiques pour favoriser leur colonisation. D'autres auteurs pointent l'industrie de l'élevage commercial des animaux comme autre source de microorganismes résistants aux antibiotiques.

Les antibiotiques sont depuis longtemps utilisés en production animale, soit comme promoteur de croissance, soit en usage prophylactique ou en usage thérapeutique. L'utilisation des antibiotiques dans un but autre que thérapeutique suscite des

préoccupations grandissantes en santé publique, tant du point de vue scientifique que politique <sup>61</sup>. Cette situation est due en partie à l'apparition de gènes de résistance aux antibiotiques chez certaines bactéries pathogènes pour l'homme que l'on retrouve à la ferme <sup>83,97</sup>. Ces bactéries résistantes provenant des animaux de consommation peuvent se retrouver dans la chaîne alimentaire par le biais de la contamination des viandes et être responsable d'infections chez l'homme. En effet, des souches de *Salmonella*, *Enterococcus* spp., *E. coli* et *Campylobacter* résistantes aux antibiotiques ont été isolées à maintes reprises de différents types de nourriture à l'épicerie <sup>5,6,63,77,96,102</sup>. Plusieurs intervenants de l'industrie canadienne de la volaille se posent des questions quant aux impacts de l'utilisation des promoteurs de croissance sur la flore bactérienne intestinale des oiseaux, notamment chez le poulet à griller.

Cette problématique nous amène à formuler l'hypothèse suivante : l'utilisation des promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine dans l'industrie du poulet à griller, provoque l'apparition d'un réservoir de souches démontrant une résistance aux antibiotiques, et par conséquent possédant les gènes codant pour cette même résistance. Un premier objectif se rattachant à cette hypothèse est de vérifier l'émergence de la résistance aux antibiotiques suite à l'utilisation des promoteurs de croissance. Pour ce faire, nous avons tout d'abord isolé de l'environnement et des caeca des poulets à griller *Escherichia coli* et *Enterococcus* et déterminé leur profil d'antibiorésistance. Les pourcentages de résistance des isolats à un antibiotique donné obtenus au jour 0 ont été comparés à ceux obtenus au jour 34. Les pourcentages de résistance à un antibiotique donné des isolats retrouvés dans les différentes conditions de moulée, obtenus au jour 34, ont été comparés deux à deux. Nous avons également vérifié la présence chez ces *Enterococcus* spp. par PCR, de gènes codant pour la résistance aux promoteurs de croissance employés. Nous avons ensuite quantifié par PCR en Temps-Réel (QPCR) la présence de ces gènes dans l'ADN total extrait des litières sur lesquelles ont été élevés les poulets. Finalement, comme objectif complémentaire, l'effet des promoteurs de croissance sur le gain de poids moyen quotidien et la mortalité des poulets à griller a été vérifié.

## **6 Recension de la littérature**

### **6.1 Promoteur de croissance**

#### **6.1.1 Définition**

Les modifications apportées aux modes de production ont entraîné une tendance, pour les pays en voie de développement et industrialisés, vers la diminution du nombre de troupeaux et l'augmentation du nombre de têtes par élevage. Pour maximiser les rendements dans cette industrie très compétitive, des antibiotiques sont utilisés à des doses infimes pour augmenter les performances zootechniques des animaux. Les antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance sont peu absorbés par l'animal et leur mode d'action est méconnu. Certains proposent que ces produits agiraient sur la microflore intestinale des animaux d'élevage. Ils pourraient réduire la destruction des nutriments en réduisant le nombre de microorganismes, indirectement contribuer à la diminution de l'épaisseur de la de l'intestin pari, ce qui faciliterait l'absorption des nutriments et inhiber les microorganismes sécrétant des toxines et prévenir les infections <sup>36</sup>.

Des études récentes suggèrent que les antibiotiques promoteurs de croissance augmentent les performances zootechniques des poulets à griller <sup>13,29,65</sup>. Ces résultats restent controversés, car d'autres études ne peuvent faire d'association entre l'augmentation des performances zootechniques des oiseaux et l'utilisation de promoteurs de croissance antibiotiques <sup>28,74</sup>. Une récente analyse agroéconomique suggère même que le retrait des promoteurs de croissance ne diminuerait pas la rentabilité des élevages. À la lumière des données publiées de la compagnie Perdue, 4<sup>ème</sup> producteur de poulets aux États-Unis, l'utilisation des promoteurs de croissance entraîne des pertes de l'ordre de 0,0093 \$ par animal. Cette étude n'évalue toutefois pas les coûts vétérinaires pouvant être occasionnés par le retrait des promoteurs de croissance, ni le coût encouru par une hausse de mortalité des poulets <sup>40</sup>.

#### **6.1.2 Historique**

La démonstration de l'effet des antibiotiques sur la croissance des animaux d'élevage s'est effectuée en plusieurs étapes. Dans les années 1940, plusieurs recherches étaient en cours pour mettre au point une diète efficace maximisant la conversion

alimentaire pour les animaux d'élevage. Pour pallier l'augmentation de la taille des troupeaux, une alimentation à base d'intrants végétaux fut alors introduite pour diminuer les coûts reliés à l'alimentation des animaux. Cependant, les aliments contenant des protéines animales semblaient contenir quelque chose que les moulées végétales ne possédaient pas. Cette substance non identifiée fut appelée AFP pour « animal protein factor ».

On se mit donc à la recherche de l'AFP qui semblait être la clef d'une alimentation efficace, surtout chez le porc et le poulet. On identifia très rapidement la vitamine B12 comme étant ce facteur promoteur de croissance. On se mit alors à supplémenter les moulées avec des sources de vitamine B12, notamment des extraits de microorganismes la produisant. On s'aperçut que les mycéliums de certains champignons séchés avaient un meilleur effet comme promoteur de croissance. Certaines souches de *Streptomyces* permettaient d'augmenter la croissance de 4% à 8% chez les animaux et de diminuer la quantité de nourriture nécessaire à la croissance des animaux de 2% à 5%. En y regardant de plus près, on s'aperçu que la substance active permettant ces résultats fort étonnants n'était pas la vitamine B12, mais bien des composés antimicrobiens produits par les microorganismes, notamment la chlortétracycline et les sulfamides. L'addition d'antibiotiques dans la moulée devint alors de plus en plus populaire et cette pratique ne cessa d'augmenter avec le temps. En 1945, la Federal Drug Administration (FDA) des États-Unis approuve l'usage des antibiotiques comme promoteur de croissance chez les animaux d'élevage. Elle est suivie en 1953 par les autorités du Royaume-Uni et par de nombreux autres pays <sup>16,48,96</sup>.

En 1960, le rapport du « Swann Committee » au Royaume-Uni vient sonner une cloche d'alarme quant à cette utilisation : elle pourrait générer un réservoir de microorganismes résistants aux antibiotiques. Ce rapport recommande donc que les antibiotiques utilisés soient ceux qui permettent une différence économiquement significative lors de l'élevage commercial, qui ont peu ou pas d'application chez les humains et qui ne créent pas de possible résistance pour les agents thérapeutiques utilisés en médecine humaine. Malheureusement, on croit alors que la résistance aux antibiotiques est

codée par des gènes chromosomiques seulement, ce qui laisse croire que l'échange de ces résistances est peu probable. On minimise donc la portée du rapport <sup>16</sup>.

Une série de décisions et d'événements viennent renforcer les craintes associées à l'utilisation des promoteurs de croissance. En 1986, la Suisse a banni tous les antibiotiques comme additifs alimentaires. En 1993, les entérocoques résistants à la vancomycine apparaissent; on les associe rapidement à l'utilisation de l'avoparcine, un antibiotique de la classe des glycopeptides, utilisé de routine dans l'industrie du poulet à griller. En 1995, le Danemark bannit l'avoparcine qui est ensuite retirée par l'Union-Européenne en 1997. La virginiamycine subit le même sort en 1998. En 1997, la FDA définit et limite la liste des antibiotiques pouvant être utilisés comme promoteurs de croissance. Les substances permises doivent absolument avoir un effet favorable démontré, être sans danger pour les êtres humains et les animaux, leur niveau et nature peuvent être contrôlés, n'être jamais utilisées chez les humains et ne pas être utilisées comme agent thérapeutique <sup>16</sup>. En 1999, l'Union-Européenne bannit finalement tous les promoteurs de croissance restant, soit la bacitracine, la spiramycine, la tylosine et la virginiamycine <sup>18</sup>.

L'effet du bannissement s'est fait sentir assez rapidement. Au Danemark, de 1996 à 2000, les ventes d'antibiotiques comme promoteurs de croissance sont passées de 106 tonnes métriques à zéro. Dans les années subséquentes, une diminution de la résistance à l'avoparcine, aux macrolides et à la virginiamycine a été observée chez les entérocoques. Cependant, la présence d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine est toujours rapportée chez l'humain. De plus, aucune diminution de la prévalence des infections à des entérocoquesrésistants n'a pu être démontrée. Il semblerait également que le retrait des antibiotiques comme promoteurs de croissance affecte la santé des animaux. Suite au bannissement en Europe, l'industrie du poulet a vu son cheptel être sévèrement atteint d'entérite nécrotique et de problèmes de développement des pattes et des os. Au Danemark, suite au retrait des antibiotiques comme promoteurs de croissance en 1999, on a observé une augmentation nette de l'utilisation des antibiotiques à titre de traitement. En 1996, la consommation était de 48 tonnes par année. Elle est passée à 94 tonnes en 2001 <sup>18</sup>.

### 6.1.3 Utilisation mondiale et canadienne

L'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) met en application la réglementation portant sur les substances médicamenteuses dont l'addition aux aliments du bétail est autorisée par la réglementation canadienne. Ces additifs sont répertoriés dans le Recueil des Notices sur les Substances Médicamenteuses. Plusieurs composés sont permis à titre de promoteur de croissance chez le poulet. On parle de l'acide arsalinique, de l'acide nitro-3-3-phénylarsonique, de la bacitracine, de la pénicilline procaine, des bambermycines, du chlorhydrate de chlorotétracycline, de la lincomycine, du chlorhydrate d'oxytétracycline et de la virginiamycine <sup>39</sup>. En 2003 aux États-Unis, plusieurs antibiotiques étaient toujours autorisés en élevage, sans ordonnance vétérinaire, dont 11 comme promoteur de croissance. Il s'agit de ceux utilisés au Canada, avec l'addition du Roxarsone. Parmi ces derniers, sept sont utilisés en médecine humaine : bacitracine, chlortétracycline, érythromycine, lincomycine, novobiocine, oxytétracycline et pénicilline <sup>48,83</sup>. En 1999, aux États-Unis, on rapporte que 16 millions de kilogrammes d'antibiotiques ont été utilisés en production animale dont 70 % sont utilisés dans un usage non thérapeutique. La situation au Canada est semblable à celle des États-Unis. Toutefois, très peu de données sont disponibles sur l'utilisation réelle des antibiotiques au Canada <sup>81</sup>. Jusqu'en 2000, la virginiamycine et la bacitracine ont été largement utilisées aux États-Unis chez le poulet à griller, surtout en combinaison avec des ionophores <sup>20</sup>.

### 6.1.4 Bacitracine

#### 6.1.4.1 Description

La bacitracine est un complexe de nature polypeptidique. Elle est souvent retrouvée en combinaison avec du zinc puisque ce dernier est essentiel à son activité biologique. La bacitracine est formée de trois polypeptides majeurs, A, B et C et d'au moins 13 autres mineurs. Elle a été isolée la première fois en 1945 chez *Bacillus licheniformis*. Elle est également produite par *Bacillus subtilis*. Elle stimulerait les enzymes pancréatiques, principalement les amylases et lipases <sup>31</sup>. Selon l'ACIA, la bacitracine de zinc peut être

utilisée comme promoteur de croissance, pour diminuer la mortalité des poussins et limiter les infections des poulets à *Clostridium perfringens*. Comme promoteur de croissance, elle doit être servie à 4,4 mg/kg d'aliment complet à l'exclusion de tout autre aliment médicamenteux. Elle ne doit pas non plus être utilisée avec des aliments liants (agents permettant la granulation de la moulée)<sup>39,67</sup>.

La bacitracine est très peu utilisée chez les humains à cause de ces effets toxiques, principalement aux reins. Sa principale utilisation est comme agent topique, sous forme de pommade ou de gouttes, et est souvent associée à la polymyxine ou à la néomycine. Elle n'est pas absorbée beaucoup dans le tractus intestinal. Elle peut donc être utilisée pour traiter les infections bactériennes entériques<sup>67,76</sup>.

#### 6.1.4.2 Mécanisme d'action et cible

La bacitracine empêche la déphosphorylation du C55-isoprenyl pyrophosphate, un transporteur entrant dans la synthèse du peptidoglycane, en inhibant une kinase chargée de sa déphosphorylation. Ce transporteur est normalement réutilisé. Cependant, il doit être sous forme déphosphorylée pour être utilisé par la cellule. En bloquant sa déphosphorylation, la bacitracine bloque le recyclage du transporteur et vient ainsi freiner la production de peptidoglycane. Elle est très efficace pour contrer les Gram positifs et son spectre d'action ressemble beaucoup à celui des pénicillines. Elle est utilisée contre le traitement des streptocoques  $\beta$ -hémolytique, streptocoques B et D, streptocoques  $\alpha$ -hémolytique, streptocoques anaérobies, pneumocoques, méningocoques, gonocoques, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Fusobacterium*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, actinomyces anaérobies, *Nocardia astéroïdes*, leptospires, *Treponema pallidum* et *Treponema pertenue*<sup>16,67</sup>.

Au niveau de la flore intestinale, cet antibiotique provoquerait la sélection des entérocoques, surtout *Enterococcus faecium*<sup>49</sup>. L'addition de bacitracine préviendrait également la nécrose entérique causée chez le poulet par *C.perfringens* lorsqu'utilisée à des doses de 200 et 400 mg/gallon d'eau d'abreuvoir<sup>78</sup>. Utilisée dans la nourriture à des

concentrations de l'ordre de 55 mg/kg, elle contrôle l'entérite nécrotique et améliore les performances zootechniques <sup>94</sup>. L'utilisation de bacitracine à 490 mg/kg dans la moulée seule augmenterait la colonisation de *Salmonella enterica* comparativement à la novobiocine utilisée à 300 mg/kg lorsque les oiseaux sont mis en contact avec environ 10<sup>6</sup> unités formant des colonies (CFU) <sup>58</sup>.

#### 6.1.4.3 Résistance

Il existe une problématique associée à la détermination de la concentration minimale inhibitrice de la bacitracine (CMI). Tous les laboratoires ne s'entendent pas sur quelle concentration minimale inhibitrice doit être employée pour définir quels isolats sont sensibles ou résistants. Selon la méthode utilisée et différentes études, ceci fait varier la prévalence des microorganismes résistants. Elle peut être aussi élevée que 60% chez les entérocoques du poulet et aussi basse que 1% selon les études réalisées <sup>16</sup>.

La résistance à la bacitracine a été démontrée chez les microorganismes producteurs de l'antibiotique. Chez *B. licheniformis*, la résistance est codée par la région *bcr*, définissant un transporteur ATPase unidirectionnel expulsant l'antibiotique. Un gène semblable a été décrit chez *E. coli*, soit le gène *bcrC<sub>ec</sub>* <sup>16,43</sup>. Chez *Bacillus subtilis*, la résistance est conférée par un transporteur codé par les gènes *yst* ainsi que par une protéine faisant compétition à la bacitracine lors de la déphosphorylation du C55-isoprenyl pyrophosphate codée par *ywoA* <sup>9</sup>. *Bacillus subtilis* possède également le gène *bcrC* qui code pour une phosphatase permettant la déphosphorylation du C55-isoprenyl pyrophosphate <sup>10</sup>.

Le gène *bacA*, retrouvé chez les souches de *E. coli*, conférerait la résistance au microorganisme au niveau du recyclage du C55-isoprenyl pyrophosphate. Il coderait pour une kinase très active et qui résiste à l'action inhibitrice de la bacitracine <sup>30</sup>. Le gène est chromosomal. *S. aureus* et *S. pneumoniae* possèderaient un gène analogue. Ce gène serait cependant présent chez certaines souches sensibles à la bacitracine. Chez *E. coli*, il existe d'autres gènes codant pour des undecaprenyl pyrophosphate phosphatases telles que *ypj* et *pgb* <sup>30</sup>.

Chez *Enterococcus* spp., la résistance aux antibiotiques est due à un système semblable à celui retrouvé chez *Bacillus*. Une région *bcr* code pour un transporteur unidirectionnel pour la bacitracine chez *E. faecalis* et serait régulée par le gène *bcrR*. Ce système contient les gènes *bcrA* (domaine de liaison de l'ATP), *bcrB* (domaine membranaire) et *bcrD* (kinase) agencés sur un opéron plasmidique transférable<sup>59</sup>.

Peu de résistance croisée a été observée à ce jour pour la bacitracine. Les entérocoques retrouvés sur les carcasses et dans les matières fécales des poulets vivants sont les plus résistants lorsque comparé aux souches isolées des autres animaux de consommation<sup>76</sup>.

**Tableau I : Principaux gènes impliqués dans la résistance à la bacitracine**

Mécanisme d'action	Gène	Microorganisme porteur
Transporteur ATPase	<i>bcr</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>E. coli</i>
	<i>yts</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Phosphatases	<i>bacA</i>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
	<i>ypj</i> , <i>pgb</i>	<i>E. coli</i>
	<i>bcrC</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Compétition	<i>ywoA</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

## 6.1.5 Virginiamycine

### 6.1.5.1 Description

La virginiamycine fait partie du groupe des streptogramines (synergistines), lequel fait partie de l'ensemble macrolide-lincosamide-streptogramine. Ce groupe comprend les pristinamycines, les mykamycines et les oestreomycines en plus des virginiamycines. Le groupe des streptogramines est divisé en deux classes, le groupe A contenant les lactones

macrocycliques (ex : virginiamycine M<sub>1</sub>) et le groupe B, les hexadepsipeptides (ex : virginiamycine S<sub>1</sub>). La virginiamycine est un composé naturel provenant de métabolites secondaires produits par *Streptomyces virginiae*. Les streptogramines sont peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques à divers degrés. Chaque groupe possède un effet bactériostatique lorsqu'il est employé seul. Lorsqu'une virginiamycine du groupe A est employée avec une autre du groupe B, leur effet est synergique et peut devenir bactéricide<sup>21</sup>.

Depuis des décennies, la virginiamycine est utilisée comme promoteur de croissance et comme agent pour combattre les infections du poulet à *Clostridium perfringens*, autant en Union-Européenne qu'aux États-Unis. Selon l'ACIA, la virginiamycine doit être donnée comme promoteur de croissance à 11 mg/kg d'aliment complet aux poulets à griller à partir de leur naissance jusqu'à l'atteinte du poids d'abattage. Il est interdit de donner cet antibiotique aux oiseaux dont les œufs sont destinés à la consommation et aux oiseaux de remplacement et de reproduction. La virginiamycine ne peut être utilisée avec des aliments agglutinants sous forme de granules<sup>39</sup>.

#### 6.1.5.2 Mécanisme d'action et cible

Les streptogramines agissent au niveau de la sous-unité 50 S du ribosome et interfèrent avec la synthèse protéique en s'opposant à l'incorporation de l'ARNt et en empêchant la traduction des ARNm. Plus précisément, les deux groupes de virginiamycine se lient au site P du ribosome 50S. Les composés du groupe A se lient au site du complexe peptidyle-transférase en l'absence d'ARNt. Le groupe A effectue son action inhibitrice au cours des premières phases de l'élongation en bloquant le lien entre le site P et le site A. Le groupe B peut se lier au ribosome 50S à n'importe quel moment de la synthèse. Il agit au niveau du tunnel de sortie des polypeptides. Il est impliqué plus tard dans la synthèse protéique et cause le relargage de chaînes polypeptidiques incomplètes<sup>100</sup>.

La liaison des streptogramines A entraîne un changement de conformation du ribosome qui augmente l'affinité des streptogramines B d'environ 100 fois<sup>68</sup>. On observe

un retard dans la reprise de la croissance lorsque des microorganismes exposés aux streptogramines ne le sont plus, sans doute dû à la forte liaison de l'antibiotique avec sa cible. Elle cible plus particulièrement les bactéries positives à la coloration de Gram. Une quantité de 55 mg/kg diminue considérablement le nombre de *C. perfringens* dans les intestins des poulets, réduisant la mortalité associée aux nécroses entériques. Aucun effet sur l'excrétion fécale des *Salmonella* n'a été noté <sup>16,100</sup>. La majorité des bactéries Gram négatives sont considérées résistantes, car non perméables à cette molécule <sup>22</sup>.

### 6.1.5.3 Résistance

Il n'existe pas de normes clairement établies permettant de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la virginiamycine <sup>14</sup>. Par le fait même, il est difficile de déterminer à partir de quelle concentration de virginiamycine les microorganismes sont considérés résistants. Selon différentes études, la prévalence des *E. faecium* résistants aux streptogramines varie de 0 à 74% <sup>16</sup>. La recherche des gènes de résistance semble donc un indicateur plus fiable de la résistance des microorganismes à la virginiamycine. De plus, la virginiamycine est insoluble, ce qui complique l'établissement de sa CMI. Pour évaluer la résistance aux streptogramines, on utilise plutôt le complexe quinupristine/dalfopristine, streptogramines modifiées dont la solubilité dans l'eau est plus élevée. La résistance aux streptogramines peut être médiée par une altération de la cible de l'antibiotique, l'inactivation de l'antibiotique ou par une pompe à efflux.

Le produit des gènes *erm* (soit *ermA*, B, C, D, E, F, G, Q et BP) modifie le ribosome par méthylation et empêcherait le lien des streptogramines du groupe B à ce dernier. La combinaison de streptogramines du groupe A et B reste cependant active due à leur effet synergique. La modification du ribosome peut entraîner la résistance à d'autres antibiotiques agissant à ce niveau. On parle alors d'une résistance à un phénotype précis soit à celui des Macrolides-Lincosamides-Streptogramines B (MLS<sub>B</sub>). L'expression des gènes *erm* peut être régulée par certains macrolides, dont l'érythromycine, ou être induite constitutivement <sup>11,12,17,68</sup>.

La résistance aux streptogramines peut également être causée par l'inactivation des molécules du groupe A, via des acétyl transférases, et celles du groupe B, via des lyases. Les acétyl transférases ajoutent un groupement acétyl à une portion hydroxyle des composés du groupe A. Ceci génère un encombrement stérique empêchant la liaison au ribosome. Les gènes *vat* codent pour des acétyl transférases. La résistance chez les entérocoques aux streptogramines est associée au gène *vatD*, anciennement désigné *satA* <sup>79</sup>. Un autre gène, *vatE*, anciennement *satG*, confère également la résistance chez ce microorganisme <sup>92</sup>. Les gènes *vatA*, *vatB* et *vatC* inactivent les composés du groupe A chez *Staphylococcus* <sup>2,4,32,98</sup>.

Les hydrolases viennent linéariser les streptogramines du groupe B en brisant un lien ester. Ce changement de conformation cause la perte d'activité de ce groupe de streptogramines. Des lyases, codées par les gènes *vgaA* et *vgaB*, sont retrouvées chez les staphylocoques ainsi que chez les entérocoques <sup>4,17,41,45,68,98</sup>.

Un autre mécanisme de résistance utilise l'expulsion constante de la virginiamycine par des pompes à efflux. Une pompe à efflux est codée par les gènes *vgaA* et *vgaB* chez *Staphylococcus*; elle est propre aux composés du groupe A <sup>3,1</sup>. Le gène *lsa* code pour une pompe spécifique aux molécules du groupe A, participant à la résistance intrinsèque aux streptogramines de *E. faecalis* <sup>86</sup>. Les gènes *msrA* et *msrB*, dont l'expression est induite par l'érythromycine, codent également pour une pompe expulsant les composés du groupe B chez *Staphylococcus* <sup>66,80</sup>. Un gène de forte homologie, *msrC*, a été retrouvé chez les entérocoques <sup>85</sup>.

Les gènes *vatD*, *vatE*, *ermB*, *vgaA*, *vatA* et *vgaB* sont les gènes les plus souvent retrouvés chez la population microbienne résistante aux streptogramines, mais leur prévalence peut varier selon les études. Les gènes *ermA* et *ermC* sont prédominants chez *Staphylococcus*, représentant 98% de la résistance <sup>50</sup>. Le gène *vatD* peut être transférable, et lié sur un plasmide au gène *ermB*, *in vitro* chez *Enterococcus faecium* lors d'essai de conjugaison sur papier filtre <sup>42</sup>.

**Tableau II : Principaux gènes impliqués dans la résistance à la virginiamycine**

Mécanisme d'action	Gènes	Microorganisme porteur
Acétyl transférase vs Groupe A	<i>vatA, vatB, vatC</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>vatD, vatE</i>	<i>Enterococcus</i>
Pompes à efflux vs Groupe A	<i>vgaA, vgaB</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>Lsa</i>	<i>E. faecalis</i>
Méthylation du ribosome vs Groupe B	<i>cfr</i>	<i>E. coli, S. aureus</i>
	<i>erm</i>	<i>Staphylococcus,</i> <i>Enterococcus,</i> <i>Streptococcus,</i> <i>Clostridium</i>
Efflux vs Groupe B	<i>msr</i>	<i>S. aureus, Enterococcus</i>
Hydrolyse vs Groupe B	<i>vgbA, vgbB</i>	<i>Staphylococcus,</i> <i>E. faecium</i>

## 6.2 Microorganismes d'intérêt pour l'étude

### 6.2.1 *Enterococcus* spp.

#### 6.2.1.1 Description générale

*Enterococcus* spp. est une bactérie Gram positive, faisant partie des bactéries produisant des acides lactiques. Elles sont non sporulées, capables de croître en atmosphère aérobie ou microaérobie, oxydases négatives et catalases négatives. Ce sont des microorganismes ubiquitaires. Leur température optimale de croissance est 35°C. Elles peuvent croître de 10°C à 45°C. Elles peuvent aussi croître dans un milieu contenant 6,5% de NaCl à pH 9,6 et survivent 30 minutes à une température de 60°C. La plupart des

bactéries du genre *Enterococcus* hydrolysent l'esculine en présence de 40% de sel biliaires<sup>37</sup>. *Enterococcus faecium* est fréquemment isolé dans les élevages porcins, bovins et aviaires, mais d'autres espèces d'entérocoques sont également retrouvées en grand nombre tel que *E. faecalis* et *E. cecorum*. Il peut également retrouver en élevage, en moins grand nombre, *E. gallinarum*, *E. durans/hirae*, *E. avium*, *E. mundtii* et *E. casseliflavus*. Chez l'humain, les espèces les plus souvent retrouvées dans l'intestin sont *E. faecium* et *E. faecalis*<sup>52</sup>. Ces microorganismes sont retrouvés dans plusieurs aliments, surtout ceux d'origine animale. Ils sont souvent utilisés comme organisme indicateur de contamination fécale. Étant donné leur grande prévalence, ils sont maintenant reconnus comme faisant partie de la microflore contaminante « normale » des viandes. Ils peuvent aussi être utilisés comme agent probiotique, comme supplément alimentaire ou comme culture de départ dans l'industrie de la transformation du lait<sup>37,52</sup>.

#### 6.2.1.2 Infections

*Enterococcus* spp. n'est pas un agent possédant une grande virulence. Il est plutôt la source de maladies nosocomiales opportunistes. Il est aux États-Unis, le 2<sup>e</sup> agent nosocomial en importance, l'agent fréquemment isolé des sites de chirurgie des soins intensifs et la 3<sup>e</sup> bactérie en importance isolée des infections sanguines. Il peut également causer des endocardites, des bactériémies, des méningites et des infections urinaires<sup>54</sup>.

#### 6.2.1.3 Résistances aux antibiotiques

Plusieurs entérocoques sont résistants aux antibiotiques. On note chez *Enterococcus* spp. des résistances acquises à la tétracycline, gentamicine, ampicilline, enrofloxacin, aux macrolides, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole, quinolone, aux glycopeptides et à la streptomycine. On parle de résistance intrinsèque aux isoxazolylpenicillines, cephalosporines, lincosamides, aux aminoglycosides (résistance faible) et polymixines<sup>15,37</sup>.

Une résistance à un glycopeptide précis, la vancomycine, a déjà été associée à l'utilisation massive d'un promoteur de croissance chez la volaille et le porc : l'avoparcine

<sup>77</sup>. La vancomycine est un antibiotique de nouvelle génération, utilisée en dernier recourt lors des infections bactériennes ne pouvant être traitée par d'autres antibiotiques <sup>52</sup>. Le VRE, « vancomycin resistant enterococci », n'était presque jamais isolé chez les poulets élevés sans utilisation d'avoparcine. Par contre, dans certaines fermes d'élevage de poulet à griller où l'avoparcine fut utilisée, 11 échantillons sur 12 étaient positifs pour le VRE <sup>91</sup>. Le signal d'alarme en Allemagne fut la présence de VRE dans une petite municipalité où il n'y avait aucun hôpital et dont la source de VRE suspectée était les fermes d'élevage <sup>96</sup>. Les GRE, « glycopeptide-resistant enterococci » sont devenus un problème majeur avec une prévalence élevée d'isolement dans les hôpitaux des États-Unis <sup>52</sup>. Une autre étude démontre l'absence des VRE dans les isolats des personnes strictement végétariennes ce qui suggère que l'acquisition des VRE hors du contexte hospitalier serait liée à la consommation de viande contaminée <sup>7</sup>.

Après l'interdiction de l'avoparcine dans l'Union-Européenne, une baisse significative de la prévalence des GRE chez les animaux, les humains hospitalisés ou non a été observée. Les États-Unis n'ont jamais approuvé son utilisation étant donné ses effets cancérogènes <sup>91</sup>. L'association entre l'avoparcine comme promoteur de croissance et la création de souches résistantes à la vancomycine est établie. Il se peut donc que d'autres promoteurs de croissance viennent eux aussi créer de la résistance aux antimicrobiens sur les élevages d'animaux de consommation.

Un nouvel antibiotique semi-synthétique à usage thérapeutique chez l'humain de la classe des streptogramines utilise une combinaison de quinupristine/dalfopristine (Q/D). C'est l'une des dernières armes utilisées contre les infections aux entérocoques multirésistants. Des études faites aux États-Unis, aux Pays-Bas et au Danemark ont démontré une fréquence élevée d'isolement d'entérocoques résistants à Q/D (Synercid) <sup>88</sup>. La résistance à Q/D, révélatrice de la résistance aux streptogramines, peut-être médiée par deux acétyl-transférases, *vatE* et *vatD*. Le gène *ermB* codant pour une 23s ARNr méthylase peut également être impliqué. Des isolats d'entérocoques résistants à Q/D ont été isolés chez les animaux dont l'alimentation contenait de la virginiamycine <sup>97</sup>.

La résistance aux streptogramines peut être acquise pour *E. faecium* et est considérée comme naturelle (intrinsèque, fait partie du génome normal) chez *E. faecalis* étant donné la présence du gène *lsa* codant pour un transporteur ABC (ABC-23). Les transporteurs ABC sont des pompes membranaires constituées de trois protéines chargée d'expulser les molécules pour lesquelles elles ont de l'affinité. Elles utilisent généralement l'ATP comme énergie pour créer le flux<sup>25,47,86</sup>. La CMI pour les streptogramines chez *E. faecium* est de 16 µg/ml<sup>15</sup>. On retrouve également des entérocoques résistants aux streptogramines possédant le gène *msrC* codant pour une pompe à efflux<sup>85</sup>.

*Enterococcus* spp. possède également des pompes à efflux. *EfrAB*, retrouvé chez *E. faecalis*, code pour une pompe conférant la résistance à plusieurs antibiotiques dont la structure n'est pas reliée : norfloxacin, ciprofloxacin, doxycycline, acriflavine, 4',6-diamidino-2-phenylindole, chlorure de tetraphenylphosphonium, daunorubicine et doxorubicine. Une augmentation de la CMI à l'arbekacine, novobiocine, daunorubicine, doxorubicine, au bromure d'éthidium et à la safranin O a également été observée<sup>56</sup>. *E. faecalis* possède également le gène *emeA* codant pour une pompe à efflux pour le norfloxacin (fluoroquinolone). Les mutants délétères ont vu leur sensibilité à l'acriflavine, ciprofloxacin, clindamycine, erythromycine et la novobiocine augmentée de 2 fois<sup>25,47</sup>.

Des entérocoques résistants à la bacitracine ont également été isolés de fèces de porcs et de poulets . Ils sont très souvent retrouvés chez le poulet vivant et sur leurs carcasses. Cependant, leur transmission du poulet à l'humain n'a pas été démontrée<sup>76</sup>. La résistance à la bacitracine chez les entérocoques semble être uniquement reliée aux gènes *bcr*<sup>59</sup>.

## **6.2.2 *Escherichia coli***

### **6.2.2.1 Description générale**

*E. coli* est un bacille Gram négatif membre de la grande famille des entérobactéries. Ils sont oxydase négative, dégradent le glucose par fermentation, sont anaérobies facultatives ainsi que mobiles. C'est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans la microflore du tube digestif des animaux et de l'humain et par conséquent souvent utilisée comme indicateur de contamination fécale <sup>23</sup>.

### **6.2.2.2 Infections**

Chez les humains, les souches de *E. coli* virulentes peuvent causer différentes maladies (colibacilloses). Par exemple, les souches entéropathogènes (EPEC) causent des diarrhées chez les jeunes enfants. Les souches entérotoxigènes (ETEC) causent des diarrhées sévères, dont la diarrhée du voyageur, dues à la production d'entérotoxines thermolabiles et/ou thermostables. Les *E. coli* entéroinvasives causent des dysenteries associées à des selles mucoïdes, contenant du matériel nécrotique et pouvant être sanguinolentes. Certaines souches peuvent également produire des colites hémorragiques lesquelles sont appelées maladie du hamburger. Les aliments contaminés dont la cuisson n'a pas été complétée peuvent alors transmettre les *E.coli* zoonotiques <sup>23</sup>.

Chez le poulet à griller, certains sérotypes peuvent causer des infections du tractus respiratoire et des tissus mous. On parle entre autre d'aérocerculite et de cellulite. Ces infections réduisent la consommation de nourriture par les animaux et les affaiblissent considérablement. Les infections à *E. coli* causent beaucoup de pertes économiques dans l'industrie avicole. L'infection est souvent traitée avec des fluoroquinolones, de la pénicilline et de la streptomycine <sup>51,99</sup>.

### **6.2.2.3 Résistances aux antibiotiques**

*E. coli* est un pathogène autant retrouvé chez les animaux que chez les humains. Il est donc souvent exposé aux agents antimicrobiens. Malheureusement, il devient de plus en

plus résistant aux antibiotiques utilisés autant en médecine humaine qu'à la ferme. Les souches de *E. coli* sont communément résistantes aux pénicillines à large spectre et au triméthoprimine et plus sensibles aux céphalosporines de troisième génération ainsi qu'au nitrofurantoïne. La résistance aux  $\beta$ -lactames de dernière génération ainsi qu'aux fluoroquinolones est en hausse constante depuis plusieurs années <sup>90</sup>. La résistance aux antibiotiques semble plus élevée en Amérique centrale et du sud, en Espagne et en Turquie comparativement aux États-Unis et à l'Europe centrale <sup>34</sup>. Les personnes en contact avec les animaux de la ferme sont plus susceptibles d'avoir une flore intestinale composée de *E. coli* résistants aux antibiotiques <sup>89</sup>.

*E. coli* peut devenir résistant aux fluoroquinolones suite à une mutation du gène *gyrA* ou par la présence du gène plasmidique *qnr*. Cette résistance est associée à l'utilisation de cet antibiotique pour contrôler les infections à *E. coli* <sup>72,99</sup>. *E. coli* peut aussi être résistant aux macrolides par le biais de la présence des gènes *erm* <sup>99</sup> et aux  $\beta$ -lactames par production d'une multitude de  $\beta$ -lactamases. Certaines  $\beta$ -lactamases sont même actives contre les dernières générations de céphalosporine et contre les combinaisons contenant des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Ce phénotype est appelé ESBL pour « extended spectrum  $\beta$ -lactamases ». Ces résistances sont plasmidiques et donc peuvent être transférées. Une grande variété de gènes codent pour cette résistance <sup>72,82</sup>.

On rapporte également des souches résistantes aux tétracyclines. Les gènes impliqués sont les gènes *tet*. Le produit des gènes protège le ribosome, lieu d'action des tétracyclines et peuvent également coder pour des pompes à efflux <sup>90</sup>.

On peut également retrouver chez *E. coli* une pompe à efflux, AcrAB, capable de transporter la tétracycline, le chloramphénicol, les  $\beta$ -lactamines, la novobiocine, l'acide fusidique, l'acide nalidixique et les fluoroquinolones. Cette pompe a aussi de l'affinité pour le SDS, le Triton X-100, les sels biliaires, certains colorants, certains désinfectants et même certains solvants <sup>55,101</sup>. *E. coli* possède au moins 20 gènes associés à des fonctions d'efflux, mais peu, en comparaison au système AcrAB, confèrent une résistance multiple. Les autres

systèmes conférant une résistance semblable à cette pompe à efflux sont EmrE et MdfA <sup>53</sup>.

Il a été rapporté que la résistance à la tétracycline, au sulfonamide et à la streptomycine est très élevée chez les souches de *E.coli* isolées du poulet à griller. Il a également été démontré que l'utilisation de l'oxytétracycline, de la sarafloxacine et de l'enrofloxacin ne sélectionne pas pour des résistances à des antibiotiques précis <sup>87</sup>. Les isolats du Canada peuvent être résistants à jusqu'à neuf antibiotiques <sup>27</sup>. Ils peuvent être fréquemment résistants à la tétracycline l'amoxicilline, le ceftiofure la spectinomycine et les sulfonamides <sup>26</sup>.

## 7 Article scientifique

### **Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolates from Commercial Broiler Chickens Receiving Growth-Promoting Doses of Bacitracin or Virginiamycin**

A. Thibodeau<sup>\*</sup>, S. Quessy<sup>\*</sup>, E. Guévremont<sup>†</sup>, A. Houde<sup>†</sup>, E. Topp<sup>‡</sup>, M. S. Diarra<sup>§</sup> and A. Letellier<sup>\*.1</sup>

<sup>\*</sup> Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; <sup>†</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Center, St-Hyacinthe QC, Canada; <sup>‡</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, London ON, Canada; <sup>§</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Agassiz BC, Canada

<sup>1</sup> Corresponding author: 3200 Sicotte street, St-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 2M2. Tel: (450) 773-8521 #1-8640, fax#: 450-778-8157, email: 

This paper is part of Alexandre Thibodeau master's thesis.

## 7.1 ABSTRACT

Antimicrobial agents such as zinc bacitracin (ZB) and virginiamycin (VG) are used as growth promoting agents (GP) in broiler chicken production to enhance feed efficiency. There are some concerns that this practice is promoting resistance to antimicrobial agents. The objective of this study was to evaluate the effect of the use of ZB and VG on the emergence of antimicrobial resistance (AMR) in a commercial broiler chicken farm. Three trials were each conducted using three different diets: one without antimicrobial agents, one containing VG and one with ZB. The average daily weight gain and average mortality were calculated for the three trials for each group and compared. Before and after a 34 day growing period, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp strains were isolated from litter as well as cloacal swabs and tested for their susceptibility to various antimicrobial agents. The presence of the VG resistance genes *vatD* and *ermB* and the bacitracin resistance gene *bcrR* in *Enterococcus* spp. isolates was then determined by PCR. Comparative quantification of *vatD* and *bcrR* genes in total DNA extracts from litter was done by SYBR Green Real-Time PCR (QPCR). VG and ZB did not have any effect on the average daily weight gain or mortality of the birds studied. *E. coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chickens receiving different diets with and without ZB or VG had varying levels of resistance to various antimicrobial agents over time. These GPs did not select for specific AMR in *Enterococcus*. The use of ZB and VG seemed to lower the percentage of *E. coli* isolates resistant to cephalothin, nalidixic acid and sulfamethoxazol. The presence of *bcrR* gene could not explain all resistant phenotypes to ZB. Other genes than *vatD* and *ermB* seemed to be involved in the resistance to VG. QPCR analysis indicated that the use of ZB and VG was not associated with *bcrR* gene in DNA extracts from litter but that the use of VG was associated with *vatD* presence.

## 7.2 INTRODUCTION

The emergence of AMR is now considered to be a serious public health threat. Agriculture practices still rely on antimicrobial agents for growth promotion and for the treatment and prevention of infectious diseases (1). The use of antimicrobial agents in animal husbandry is now considered to be associated with the development of antibiotic resistant foodborne pathogens (2, 3), since several bacteria isolated from food retail stores are resistant to multiple antimicrobial agents (4). *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. are often used in such studies as indicators of faecal contamination (5). They represent Gram negative and Gram positive bacterial populations respectively and are part of the normal bacterial flora of broiler chickens. They may also be resistant to many antimicrobial agents (6).

Antimicrobial agents given as GP are used in very low concentration and have been used since 1950 to improve zootechnical performances (1). While regulations have been put in place in Europe to reduce the use of antimicrobial agents for growth promotion (7), the broiler chicken industry in North America still wildly uses GP antimicrobial agents ZB and VG (8, 9).

Zinc Bacitracin is a polypeptidic antimicrobial agent produced by *Bacillus licheniformis*. It is a combination of 3 major and at least 13 minor polypeptides. It inhibits the dephosphorylation of C55-isoprenylpyrophosphate, blocking the recycling of this transporter needed for the production of the peptidoglycan cell wall. ZB is used in human medicine mainly as a topical ointment due to its nephrotoxicity (10).

Resistance to bacitracin in *Bacillus licheniformis* is caused by a unidirectional pump coded by the *bcr* genes. A similar mechanism of resistance has been observed in *E. coli* and *Enterococcus* spp. (11). Bacitracin resistance genes *bcr* of *Enterococcus* spp. are thought to be regulated by a recently discovered gene, *bcrR* (12). *E. coli* also possesses the *bacA* gene

that confers an additional mechanism of resistance to ZB as well as other kinases that dephosphorylate the transporter (13).

Virginiamycin is a member of the streptogramin antimicrobial agent class that is divided into two categories: group A which are macrocyclic lactones and group B which are hexadepsipeptides. Each group is bacteriostatic, but when used together, they act in synergy and become bactericidal. The growth promoter VG is a combination of these two classes, represented by VG M1 (group A) and VG S1 (group B) in a 70:30 ratio. It binds to ribosomal RNA 23S of the 50S ribosome sub-unit and inhibits protein production. The VG spectrum of action includes Gram positive as well as some Gram negative cocci (14).

Resistance to VG can be the result of target modification caused by *erm* genes. The *ermB* gene is often found in *Enterococcus* spp. and targets group B compounds. Modification of the 50S ribosome sub-unit can also cause resistance to macrolide and lincosamide creating a phenotype known as MLS<sub>B</sub> resistance (15). The efflux pump can also be associated with resistance to VG. Efflux pump resistance genes *msr* (16), efficient against group B compounds, and *vga* (17, 18), efficient against group A compounds, can be found in *Staphylococcus* and *Enterococcus* spp. (15). Finally, inactivation of VG by *vat* genes (19), targeting group A compounds, and *vgb* genes (20), targeting group B compounds, can cause resistance to VG in *Enterococcus* spp. (15).

Few studies in Canada have evaluated the effect of ZB and VG on the emergence of antimicrobial agent resistant bacteria in the broiler chicken and/or farm environment (21, 22). The aim of this study was to evaluate the potential of GPs ZB and VG to promote AMR in commensal bacteria *Enterococcus* spp. *E. coli* (via co-selection) as well as to increase the AMR gene reservoir in the environment of broiler chickens. In order to do so, broiler chickens were fed with or without ZB or VG. Resistance profiles of *Enterococcus* spp. and *E. coli* were evaluated at the beginning and at the end of a 34 day growing period. Presence

of different resistance genes related to the GP was also assessed in *Enterococcus* spp. isolates and the resistance genes *bcrR* and *vatD* copy number was compared in litter total DNA extracts by Real-Time PCR.

### 7.3 MATERIALS AND METHODS

#### 7.3.1 Farm Trials

This field study was undertaken on a commercial broiler chicken farm (F. Menard Inc.) situated in Farnham, Québec, Canada. The farm was divided into three separate floors each with a distinct feed system. Each floor was dedicated to one specific diet and housed 4000 female Ross broiler chickens at a density of 0.85 square foot per chicken. The diet types consisted of a standard commercial vegetal soy-corn diet with ZB added (Albac, 55 ppm, Alpharma Canada Corp., Ontario, Ca) or with VG added (Stafac 44, 22 ppm, Phibro Animal Health, Saskatchewan, Ca). Diets were given during the whole experiment. A control group, without GP was included in the study. Three consecutive trials were conducted and each trial was started on a different floor. The birds were fed and watered *ad libitum*. All birds were one day of age at the beginning of each trial, were vaccinated against Marek disease as well as pneumonia at the hatchery and weighted approximately 50 grams. Exact composition of the vaccines used at the hatchery was not available. Dead broilers were removed on a daily basis. Birds were studied for a period of 34 days. Biosecurity measures were put in place to avoid crosscontamination between treatments. Specific boots and equipments were used for each condition. Between each trial, the litter was removed and replaced with fresh material (mixed coniferous wood chips) and the floors were thoroughly cleaned as well as disinfected.

Cloacal and litter samples were collected for microbiological analysis from each of the three trials as follows. At the start of each trial, transport cases containing 150 day old chicks were swabbed upon arrival. On day 34, five samples each consisting of cloacal swabs

pooled from three birds were taken randomly from each section. Five portions of approximately 100 g of litter were taken randomly from each of the three sections on day 0 and day 34 of each trial. Prior to slaughtering, birds raised in the same diet condition were weighted altogether in the same transportation vehicle. Average daily weight gain (total weight of all birds\number of birds weighted\day of growth) and average mortality in all three trials were calculated and results between each condition compared.

### 7.3.2 Bacterial Isolation

*Enterococcus* spp. and *E. coli* were isolated from samples as follows. Briefly, for *E. coli*, samples were diluted in peptone buffered water (BD, Oakville, On, Ca) in a ratio of 1:9. Peptone buffered water was incubated at 37°C overnight and one loop was streaked on MacConkey Agar (Fisher Scientific, Ottawa, On, Ca). Typical *E. coli* colonies were isolated on 5% Sheep Blood Agar (Quélab, Montréal, Qc, Ca) and confirmed with triple iron sugar agar, citrate agar, oxidase and by catalase tests. One out of 10 isolates with typical biochemical patterns was further characterised on API 20E galleries (bioMérieux, Hazelwood, Missouri, USA) (23). For *Enterococcus* spp., samples were diluted in Enterococcosel broth (Fisher Scientific, Ottawa, On, Ca) in a 1:1 ratio. One loop of Enterococcosel broth was streaked on Enterococcosel Agar (Fisher Scientific, Ottawa, On, Ca) after an overnight incubation at 42°C. Typical *Enterococcus* spp. colonies were selected and identified by using Slanetz and Bartley Agar (Fisher Scientific, Ottawa, On, Ca), mannitol and arabinose fermentation and methyl- $\alpha$ -D-glycopyranoside test (23). Results for *Enterococcus* spp. include all results obtained from both *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* unless otherwise stated.

### 7.3.3 Antimicrobial resistance

All *Enterococcus* spp. (n=211) and *E. coli* (n=214) isolated from litter and from birds were tested for phenotypical AMR (Table 1). Resistance to selected antimicrobial agents (Oxoid, Nepean, On, Ca) was determined by disk diffusion according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (24). The following antimicrobial agents were used for all isolates: nalidixic acid (NA), amikacin (AK), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), ampicillin (AMP), apramycin (APR), bacitracin (B), cefoxitin (FOX), ceftiofur (XNL), ceftriaxon (CRO), cephalothin (KF), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP), clindamycin (DA), enrofloxacin (ENR), erythromycin (E), gentamycin (CN), kanamycin (K), neomycin (N), quinupristin/dalfopristin (QD), streptomycin (S), sulfamethoxazole (RL), tetracycline (TE), trimethoprim-sulfamethoxazole (STX) and vancomycin (VA). *Escherichia coli* ATCC #25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC #29212 were used as controls.

Bacitracin was used in the disk diffusion assay to evaluate ZB phenotypical resistance. VG was not accessible in disk format for the agar disk diffusion assay. Resistance to VG was then assessed using a minimal inhibitory concentration (MIC) agar dilution method. VG was extracted using acetone from Stafac 44, containing 44 g of virginiamycin per kg of Stafac 44, to a concentration of 20 mg virginiamycin/ml (25, 26). After extraction, acetone was filtered with a 0.22 µm sterile filter and added aseptically into 50°C non-solidified Mueller-Hinton Agar (Oxoid, Nepean, On, Ca) to obtain serial twofold dilutions of VG in agar plates ranging from 2 µg/ml to 256 µg/ml. Isolates were inoculated on plates to assess VG resistance. Breakpoint for resistance to VG was 8 µg/ml in the 2001 DANMAP report and used only for *Enterococcus faecium* (5). Since this study uses the growth promoter as a source of virginiamycin for the MIC essay and that results for *Enterococcus* spp. include both *E. faecalis* and *E. faecium* data, we choose a breakpoint by

looking at the distribution of MIC in our isolates. The MIC of VG used to determine the isolates resistance was 32 µg/ml, corresponding to one standard deviation over the means of the MIC obtained. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of *Enterococcus* spp. isolates for VG followed a Gaussian distribution. AMR profiles from *E. coli* and *Enterococcus* spp. were obtained and the percentages of resistant isolates were compared using *Escherichia coli* ATCC #25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC #29212 as controls strains.

#### 7.3.4 DNA Extracts

Bacterial isolates randomly selected from isolates found in litter and birds were grown overnight on 5% (v/v) Sheep Blood Agar (Quélab, Montréal, Qc, Ca). One loop of bacteria was resuspended in 200 µl of lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1.2% (v/v), pH 8.0) containing 10% (w/v) of Chelex-100 (Biorad, Mississauga, On, Ca) and then heated 8 minutes at 95°C. Samples were centrifuged at 5 000 x g for 2 minutes and supernatants were used directly for conventional PCR (27).

Total DNA extraction from litter (n=36) was achieved by centrifugation at 8000 x g for 10 minutes of 2 ml of litter thoroughly mixed 1:9 in Peptone Buffered Water. The pellet containing bacteria was washed with 1 ml of washing buffer (Tris-HCl pH 8.0, NaCl 150 mM). After another centrifugation step, the pellet was resuspended in 200 µl of lysis buffer supplemented with 2% (v/v) SDS and added to 30 mg of 0.1 mm glass beads (Biospecs, Bartlesville, Oklahoma, USA) in a 1.5 ml microfuge tube. Microfuge tubes were then vortexed 5 minutes using a Turbomixer (Fisher Scientific, Ottawa, On, Ca) to allow cell breakdown (28). Chelex-100 was added to obtain to a final concentration of 10% (w/v) after lysis. Tubes were then heated 8 minutes at 95°C. Tubes were cooled down for 2 minutes and then were centrifuged at 10 000 x g for 2 minutes. DNA in the supernatant was cleaned up and concentrated using the Qiagen DNAeasy Tissue kit (Mississauga, On, Ca). The DNA extraction protocol began at the proteinase K digestion step with incubation period at 70°C

of 15 minutes. Manufacturer's instructions were then followed. Prior to extraction, a loopfull of a *Enterococcus faecium* isolate (#crsv-ent01), previously characterized in our laboratory, containing *ermB*, *vatD* and *bcrR* genes was added to one litter sample as a positive control.

### 7.3.5 Polymerase Chain Reaction

GP resistant and susceptible phenotypes were used from day 0 (n=45) and day 34 (n=45) to determine the carriage of the selected growth promoting associated AMR genes by conventional PCR genes only in *Enterococcus* spp. Isolates. Sensible isolates were used to assess possible carrying of resistance gene who could be silent (29). PCRs for VG associated resistant genes *vatD* and *ermB* and for ZB associated resistance gene *bcrR* were performed using the Invitrogen *Taq* polymerase kit (Burlington, On, Ca) using 1 unit of *Taq* polymerase, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1 mM of dNTPs, 0.5 μM of each primer and 0.1 μg/μl of BSA. In house PCR primers (Table 2) were designed using GenBank sequences with the free access software PerlPrimer (30). Amplification conditions in an Eppendorf Mastercycler gradient system (Brinkman Instruments Canada, Mississauga, On, Ca) were as follows: initial denaturation step of 5 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 5 seconds at 95°C, 15 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 1), 5 seconds at 72°C and a final extension step of 2 minutes at 72°C. Amplicons were visualized after electrophoresis on 2% (w/v) agarose gels using SybrSafe (Invitrogen, Burlington, On, Ca). Positive controls for *vatD* and *ermB* were provided by Dr Michel Bergeron from Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ, Qc, Ca) and for *bcrR* provided by Dr Gregory M. Cook from New-Zealand University of Otago (9).

### 7.3.6 SYBR Green Real-Time PCR (QPCR)

The genes *bcrR* and *vatD*, commonly associated with GP resistance, were cloned following manufacturer's recommendations using the TopoTA cloning kit with

electrocompetent Top10 *E. coli* cells from Invitrogen. Positives clones were sequenced using Genomelab DTCS-Quick start kit from Beckman-Coulter (Mississauga, Ontario, Canada) using a Beckman CEQ 8000 automatic sequencer. Plasmids from selected clones were then extracted with the NucleoSpin<sup>R</sup> Plasmid kit from BioLynx Inc (Brockville, On, Ca). Plasmids were linearized with BamHI enzyme (Roche, Laval, Qc, Ca) and used for optimization, standardization and generation of standard curves ranging from  $10^6$  to  $10^1$  copies. QPCR assays were performed using the same primers than conventional PCR (Table 1). Stratagene Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Core Reagent Kit (VWR, Mont-Royal, Qc, Ca) was used as recommended by the manufacturer with primer concentrations of 750 nM. QPCR was performed using Stratagene Mx4000<sup>®</sup> system (Stratagene, La Jolla, On, Ca). Cycling conditions consisted of an initial denaturation step of 10 minutes at 95°C followed by 45 cycles of 5 seconds at 95°C, 15 seconds at the appropriate annealing temperature (Table 2) and 20 seconds at 72°C with 2 fluorescence acquisitions at 72°C. Temperature ramping rate was set to 2°C/second. Melting curve analysis was performed at the end of amplification using 1°C/minute for a 30 minute segment. Obtained threshold cycle (Ct) values were expressed as grams of extracted litter. Low Ct/g values correspond to high copy numbers of the target gene. Four litter samples retrieved at T=34 days for each feeding trial for each replicate were compared in duplicate on the same QPCR reaction plate.

### 7.3.7 Statistical analyses

Kruskal-Wallis statistical test was used to compare the average daily weight gain and average mortality of birds between each condition. The association test Cochran-Mantel-Haenszel was used to determine the relationship between feed and the resistance level and the relationship between time and resistance level using the FREQ procedures of the SAS Institute (SAS 2000). A linear mixed model was used for the QPCR experiments to assess significant differences between diets. The statistical significance was set at a  $P$  value of  $P < 0.05$ .

## 7.4 RESULTS

### 7.4.1 Average daily weight gain and average mortality

The average daily weight gain was respectively 64.4, 64.13 and 64.04 g/day for diet without antimicrobial agents, with ZB and with VG respectively. No significant differences were found between the various diet conditions. The average mortality rate was respectively 2.08, 1.80 and 1.76% for diet without antimicrobial agents, with ZB and with VG respectively. No significant differences were found between diet conditions.

### 7.4.2 Antimicrobial resistance profiles

The level of resistance at day 0 and day 34 was compared for each diet for each microorganism. For *E. coli*, significant variations in the percentage of isolates resistant to antimicrobial agents were found in all conditions (Table 3). All isolates were resistant to VG and ZB. For *Enterococcus* spp., a significant decrease and increase in the percentage of resistant isolates were observed in all types of diet (Table 4). Data showed that the percentage of resistance to four antimicrobial agents (bacitracin, erythromycin, quinupristin/dalfopristin and apramycin) increased regardless of the type of diet. The prevalence of isolates containing all four resistances was 66%. Resistance to VG and ZB in *Enterococcus* spp. isolates was also variable.

The level of resistance between diet groups was also evaluated at the end of each trial. For *E. coli*, some significant differences were found. Surprisingly, the percentage of resistant isolates to KF was higher in the control feed than in the ZB and VG feed. The abundance of resistant isolate to NA was higher in the control feed than in the ZB diet and higher percentage of resistant isolate to NA was found in the VG diet compared to the ZB diet. The isolates resistant to RL were more abundant in birds fed the control diet than the ZB diet. There was no significant effect of diet on the frequency of *Enterococcus* spp. resistant to any of the antibiotics tested.

#### 7.4.3 Presence of antimicrobial resistance genes

Screening of *Enterococcus* spp. isolates by PCR revealed the presence of *bcrR*, *vatD* and *ermB* in 50.5%, 14.0% and 67.0% of the isolates. Phenotypical resistance to ZB was observed in 52.0% of screened isolates, resistance to VG in 64.0% of screened isolates and resistance to QD in 70.0% of screened isolates.

#### 7.4.4 Real-Time PCR

Sequencing of *bcrR* and *vatD* cloned amplicons gave 100% of homology with target gene using both Blast (31) and ClustalW (32) alignment. Standard curve parameters obtained with the *bcrR* clone were  $y = -3.558 \cdot \text{LOG}(x) + 42.55$  with an efficacy of 91% and a regression coefficient of 0.999. Comparative quantification data for *bcrR* in the litters harvested at the end of the experiment gave the following Ct/g of extracted litter: diet without antimicrobial agents =134.62, ZB diet=132.78 and VG diet=131.03. As expected, only one amplification product was visible on the denaturation curve. When the Ct/g values for each diet were compared together, no significant difference was found for the presence of *bcrR* gene.

Standard curve parameters for the *vatD* clone were  $y = -4.531 \cdot \text{LOG}(x) + 49.85$  with a low efficacy of 66% but a regression coefficient of 0.988. Comparative quantification data

obtained from the same amplification plate for *vatD* in the litters harvested at the end of the experiment were 198.53, 200.69 and 185.16 Ct/g of extracted litter, respectively for diet without antimicrobial agents, ZB diet and VG diet. Once again, only one amplification product was visible on the denaturation curve. Statistical analysis revealed that litter extracts from VG diet contained significantly more *vatD* gene copies (lower Ct/g values) than the other two diets.

## **7.5 DISCUSSION**

### **7.5.1 Average daily weight gain and average mortality**

Average daily weight gain and mortality were evaluated to assess the impact of the use of ZB and VG supplemented diets on broiler production performances. In this study, the use of ZB and VG had no effect on the average daily weight gain and the average mortality of broiler chickens. These results are in accordance with other studies where no difference was observed for ZB and VG used as GP (33-35). On the other hand, other studies reported a positive effect of GP on zootechnical performances (36-39). These studies were made in laboratory conditions and sometimes used small quantities of birds. The field conditions, even with high biosecurity measures, as well as the great number of birds used (3 X 4000) might explain why no effects of ZB and VG were seen on the average daily weight gain and average mortality of the broilers. During this study, birds studied were not challenged by pathogens like *Clostridium perfringens*. It is therefore impossible to know if VG and ZB would have had a positive effect on sick birds.

### **7.5.2 Antimicrobial resistance profiles**

One objective of the present study was to determine if the use of GP would increase the reservoir of AMR in the commensal bacterial population of broiler chickens. In a similar experiment, McDermott et al. (40) observed an increase in the resistance to QD in *Enterococcus faecium* isolated from VG fed broiler chickens. This effect was not observed

in the present study. It is far more difficult to control all husbandry variables in a commercial-scale experiment than in a laboratory setting.

Percentages of resistance at T=0 days are not equivalently distributed in all test conditions like we thought it should be (Table 2 and Table 3). This might be due to an insufficient sample size. AMR still increased dramatically in time and statistical test showed significant changes in time and between diets conditions.

In this field study, a decrease in CN resistance was observed for ZB and VG diets. Decrease of resistance to CN in broiler chicken farm was also reported in a recent study (41). One possible explanation for CN decreased resistance would be the effect of a possible use of this antimicrobial at the hatchery level. Absence of gentamicin in the field study could have decreased the advantages conferred by gentamicin resistance and thus decreased presence of resistant isolates to gentamicin (41). This explanation could be applied to the other antimicrobial agents with decreased percentage of resistance found in the present study. Variations of AMR, over time, may also be associated to broiler age and the microbial ecological evolution in the growing period which could also be influenced by GPs.

Variation of the antimicrobial profiles may be also due to other factors than just the presence of GP. For example, it is known that some resistance to metals, like zinc, may coselect for AMR (42). In this study, zinc level found in ZB feed was not normalised in VG and control diets. Differences observed between ZB condition, the VG condition and the control condition may be due to an added effect of zinc rather than the sole presence of bacitracin.

Selection of phenotypical resistance to antimicrobial agent may be also due to coselection of physically linked gene by other factors than GP presence (43). For example, resistance gene *ermB* in *E. faecium* has been found physically linked with other important resistance gene (44).

Spread of the resistance to B, E, QD and APR may mainly be the result of the colonisation of the farm by specific strains of *Enterococcus* spp. (45). Clonal analyses of *Enterococcus* spp. isolates are required to verify this hypothesis.

*E. faecalis* have intrinsic resistance to VG since it posses the chromosomal resistance gene *lsa* (46). Because of this, those species are not often used in VG resistance studies. In this experiment, CMI of VG against *E. faecalis* varied from 32µg/ml to >256µg/ml, and resistance genes *vatD* and *ermB* were found in a variable prevalence in these isolates (data not shown). This is highlighting the fact that even naturally resistant bacteria may acquired resistance gene present in environment and thus should be considered more often in AMR studies. Monitoring of AMR could be assessed by global surveillance of important resistance genes (47).

### 7.5.3 Occurrence of antimicrobial resistance genes

Presence of GP associated resistance genes in our isolates was assessed and the PCR for *bcrR* and *vatD* used as a preliminary step in developing the QPCR assay. The prevalence of GP associated genes is variable in the poultry environment. To our knowledge, ZB resistance gene *bcrR* has only been found in *Enterococcus* spp. and its prevalence is currently unknown. The presence of streptogramin resistance gene *vatD* is variable, ranging from 0% to 100% in *Enterococcus* spp. while *ermB* presence also varies from 0% to 100% depending on the time and location of the study (40, 48-50).

The *bcrR* gene was not found in all phenotypically ZB resistant *Enterococcus* spp. isolates, suggesting that other genetic determinants are associated with this resistance. The *bcrR* gene was also found in a phenotypically ZB sensible strain, highlighting the fact that sensible strains should be included when assessing AMR gene occurrence.

Resistance to streptogramin cannot be explained only by the presence of the *vatD* gene or *ermB* gene since it was not found in all VG or QD resistant isolates. The presence of

only one of these genes is not likely to confer full resistance to streptogramin since they are targeting only one of the growth promotant components (51). Only 12.64% of the strains harboured both *vatD* and *ermB* genes (Data not shown). These findings suggest that other genes responsible for VG resistance may be present. Resistance prevalence to QD and VG in *Enterococcus* spp. did not always correlate, indicating that the chosen MIC of VG used to determine the isolates resistance could be lowered in further experiments. This may also explain why streptogramin resistance gene *ermB* was also found in some VG susceptible *Enterococcus* spp. isolates.

#### 7.5.4 Real-Time PCR

It is possible that changes observed by the use of indicator microorganisms would not reflect completely the impact of GP use on the various bacterial species. A QPCR was then developed for a comparative quantification in total DNA extracts of the resistance genes that may be present in other bacterial species. This approach has been used for the study of other antimicrobial agent resistance genes in other experiments (52, 53). To our knowledge this is the first time that this approach has been used to evaluate the ZB and VG resistance gene in the broiler chicken environment.

Lack of differences between conditions for *bcrR* comparative quantification is in accordance with the absence of selective pressure for bacitracin in *Enterococcus* spp. by diet conditions. ZB resistance gene *bcrR* has not been reported yet in bacteria other than *Enterococcus* spp. This gene may be present in other bacteria that might not have been selected by GP and thus also making *bcrR* gene repartition almost equal in all diets conditions. Other bacterial genus with various resistance levels to ZB should be evaluated for the presence of *bcrR* gene in order to compare the phenotypic results of ZB resistance with the results obtained by QPCR.

Diet containing VG did not seem to contribute to the selection of virginiamycin

resistant *Enterococcus* spp. but seemed to contribute to the selection of streptogramin resistance gene *vatD*. This result reinforces the hypothesis that resistance to VG in this experiment could not only be the result of *vatD* gene presence but also to the presence of many genes that are not necessarily selected by growth promoting doses of VG.

## 7.6 CONCLUSION

Based on our results, the antimicrobial agents ZB and VG used as GP does not increase the average daily weight gain or decrease the average mortality of broiler chickens. The GPs used in this study did not influence the overall resistance phenotype of commensal *E. coli* and *Enterococcus* spp. of broiler chicken. However, the use of VG may select for specific resistance gene in *Enterococcus* spp. This study also demonstrated that QPCR is a useful tool to monitor AMR in broiler litters and can be used efficiently in future experiments to quantify the risk posed by the presence of specific AMR genes in the broiler chicken farm context.

## 7.7 ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Poultry Industry Council of Canada and Agriculture and Agri-Food Canada through the Agriculture Policy Framework GAPs program. We would also like to thank Pierre Ward and Elyse Poitras from the Food Research and Development Centre, (St-Hyacinthe, Canada) for their technical assistance in molecular biology and Guy Beauchamp of the University of Montreal for his assistance with statistical analysis.

## 7.8 REFERENCES

1. 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;16:175-188.

2. Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, Anderson A, Barrett TJ. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004;15:78-85.
3. Mateu E, Martin M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001;48:569-581.
4. Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJ, Hilbert F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int J Food Microbiol* 2004;97:23-29.
5. DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, 2001. ISSN 1600-2032
6. da Costa PM, Oliveira M, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Vet Microbiol* 2007;120:122-131.
7. 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. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:159-161.
8. Fraser E, Stephen C, Bowie WR, Wetzstein M. Availability and estimates of veterinary antimicrobial use in British Columbia. *Can Vet J* 2004;45:309-311.
9. Viola C, DeVincent SJ. Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection in the United States. *Prev Vet Med* 2006;73:111-131.
10. Gouvernement du Canada, Résumé sur les médicaments permis dans les aliments du bétail., Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2005.  
<http://www.inspection.gc.ca/francais/anim/fcebet/mib-druse/f.html>.

11. Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreulx D, Chippaux M, Denizot F. *BcrC* from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* 2005;280:28852-28857.
12. Manson JM, Keis S, Smith JM, Cook GM. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3743-3748.
13. El Ghachi M, Derbise A, Bouhss A, Mengin-Lecreulx D. Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2005;280:18689-18695.
14. Yonath A. Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation. *Annu Rev Biochem* 2005;74:649-679.
15. Mukhtar TA, Wright GD. Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. *Chem Rev* 2005;105:529-542.
16. Singh KV, Malathum K, Murray BE. Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:263-266.
17. Allignet J, El Solh N. Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene* 1997;202:133-138.
18. Allignet J, Loncle V, el Sohl N. Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene* 1992;117:45-51.
19. Werner G, Witte W. Characterization of a new enterococcal gene, *satG*, encoding a putative acetyltransferase conferring resistance to Streptogramin A compounds. *Antimicrob*

Agents Chemother 1999;43:1813-1814.

20. Allignet J, Liassine N, el Solh N. Characterization of a staphylococcal plasmid related to pUB110 and carrying two novel genes, *vatC* and *vgbB*, encoding resistance to streptogramins A and B and similar antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1794-1798.

21. Pleydell EJ, Brown PE, Woodward MJ, Davies RH, French NP. Sources of variation in the ampicillin-resistant *Escherichia coli* concentration in the feces of organic broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:203-210.

22. Diarrassouba F, Diarra MS, Bach S, Delaquis P, Pritchard J, Topp E, Skura BJ. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J Food Prot* 2007;70:1316-1327.

23. Canada Go. The Compendium of Analytical Methods: Enumeration of Coliforms, Faecal Coliforms and of *E. coli* in Foods Using the HPB Method MFHPB-19, H. Canada, Volume 2, 2002.

24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; approved standard M31-S1, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA., 2004.

25. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. *J Clin Microbiol* 1998;36:1907-1911.

26. Cocito C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol Rev* 1979;43:145-192.

27. Giraffa G, Rossetti L, Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* 2000;42:175-184.

28. 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;68:5918-5924.
29. Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3003-3010.
30. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 2004;20:2471-2472.
31. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-3402.
32. Higgins DG. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol* 1994;25:307-318.
33. Donabedian S, Thal LA, Bozigar P, Zervos T, Hershberger E, Zervos M. Antimicrobial resistance in swine and chickens fed virginiamycin for growth promotion. *J Microbiol Methods* 2003;55:739-743.
34. Engberg RM, Hedemann MS, Leser TD, Jensen BB. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult Sci* 2000;79:1311-1319.
35. Pedroso AA, Menten JF, Lambais MR, Racanicci AM, Longo FA, Sorbara JO. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. *Poult Sci* 2006;85:747-752.
36. Brennan J, Skinner J, Barnum DA, Wilson J. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult Sci* 2003;82:360-363.

37. 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;72:2815-2823.
38. Miles RD, Butcher GD, Henry PR, Littell RC. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poult Sci* 2006;85:476-485.
39. Stutz MW, Johnson SL, Judith FR. Effects of diet and bacitracin on growth, feed efficiency, and populations of *Clostridium perfringens* in the intestine of broiler chicks. *Poult Sci* 1983;62:1619-1625.
40. McDermott PF, Cullen P, Hubert SK, McDermott SD, Bartholomew M, Simjee S, Wagner DD. Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed virginiamycin. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4986-4991.
41. Smith JL, Drum DJ, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1404-1414.
42. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 2006;14:176-182.
43. Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Anim Biotechnol* 2006;17:125-135.
44. Werner G, Hildebrandt B, Witte W. Linkage of *erm(B)* and *aadE-sat4-aphA-3* in multiple-resistant *Enterococcus faecium* isolates of different ecological origins. *Microb Drug Resist* 2003;9 Suppl 1:S9-16.
45. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Effect of avilamycin fed to chickens on *E. faecium* counts and on the selection of avilamycin-resistant *E. faecium* populations. *Microb*

Drug Resist 2005;11:170-177.

46. Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1845-1850.

47. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Phenotypic distinction in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains between susceptibility and resistance to growth-enhancing antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2569-2570.

48. Hayes JR, Wagner DD, English LL, Carr LE, Joseph SW. Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:123-126.

49. Jensen LB, Hammerum AM, Bager F, Aarestrup FM. Streptogramin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from production animals in Denmark in 1997. *Microb Drug Resist* 2002;8:369-374.

50. White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect* 2002;4:405-412.

51. Cocito C, Di Giambattista M, Nyssen E, Vannuffel P. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997;39 Suppl A:7-13.

52. Manuzon MY, Hanna SE, Luo H, Yu Z, Harper WJ, Wang HH. Quantitative assessment of the tetracycline resistance gene pool in cheese samples by real-time TaqMan PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1676-1677.

53. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol* 2006;40:7445-7450.

Table 1: Isolates distribution throughout the study

Replicate	<i>Enterococcus spp.</i> (Day=0)			<i>Enterococcus spp.</i> (Day=34)			<i>E. coli</i> (Day=0)			<i>E. coli</i> (Day=34)		
	ZB	VG	No additive	ZB	VG	No additive	ZB	VG	No additive	ZB	VG	No additive
1	11	8	10	11	13	12	7	11	9	14	13	15
2	15	12	16	14	13	11	16	16	13	16	14	16
3	13	13	12	9	9	9	12	13	12	9	9	10

Table 2: List of primers used in this study

Gene	Gene Bank Accession Number	Primers Sequence (5'-3')	Hybridisation Temperature (°C)	Amplicons Length (pb)
<i>ermB</i>	AY827545.1	F-CATTTAACGACGAAACTGGC R-GGAACATCTGTGGTATGGCG	55	400
<i>vatD</i>	L12033.1	F-CAAATCATAGAATGGATGGC R-TTTCGTTAGCAGGATTCC	53	251
<i>bcrR</i>	AY496968.1	F-GTTACCCTAACATGGAGTCG R-AAACATAACCGCCAACAGAG	55	215

Table 3: Significant antimicrobial resistance means variation over time (Day 0 vs Day 34) in *E. coli* for each type of diet

Diets	Antimicrobial Agents with Significant Increase of Resistant Isolates Percentage			Antimicrobial Agents with Significant Decrease of Resistant Isolates Percentage		
	Antimicrobial Agent	T= 0 (%)	T=34 (%)	Antimicrobial Agent	T= 0 (%)	T=34 (%)
No Additive	KF	5.50	43.00	CN	15.75	2.00
	SXT	0.00	17.67			
ZB	No significant antimicrobial			AMC	33.25	14.00
				AMP	82.50	27.33
				KF	31.25	15.67
VG	K	0.00	16.67	AMP	32.50	9.67
	N	0.00	9.67	CN	12.50	1.00
	NA	0.00	21.67			

Table 4: Significant antimicrobial resistance means variation over time (Day 0 vs Day 34) in *Enterococcus* for each type of diet

Diets	Antimicrobial Agents with Significant Increase of Resistant Isolates Percentage			Antimicrobial Agents with Significant Decrease of Resistant Isolates Percentage		
	Antimicrobial Agent	T= 0 (%)	T=34 (%)	Antimicrobial Agent	T= 0 (%)	T=34 (%)
No Additive	AK	68.50	94.33	ENR	17.75	0.00
	APR	67.75	91.33			
	B	35.25	67.33			
	E	18.00	72.13			
	K	80.75	97.33			
	N	58.75	91.33			
	QD	28.50	90.67			
	TE	72.75	97.33			
ZB	VG	58.00	79.33			
	APR	80.25	97.00	CN	46.75	29.00
	B	43.00	97.67			
	E	54.25	81.00			
	KF	20.00	58.00			
	QD	47.00	91.00			
	VG	62.25	86.67			
VG	AK	85.50	97.00			
	APR	77.25	97.33	ENR	12.50	0.00
	B	37.50	77.67			
	E	49.75	86.00			
	N	72.25	95.00			
	QD	63.50	93.67			

## 8 Discussion générale des résultats

### 8.1 Gain de poids quotidien moyen et mortalité moyenne

Les promoteurs de croissance sont utilisés en grande partie pour favoriser la croissance et améliorer les paramètres zootechniques comme le gain de poids moyen quotidien, la mortalité ou la conversion alimentaire. Plusieurs études ont été effectuées sur le sujet et le protocole la présente expérience mis au point selon elles.

Une de ces études par *Engberg et al (2000)*, comportait l'utilisation de 960 oiseaux élevés en parquets et répartis en huit réplicats, pour quatre conditions de nourriture : sans promoteurs de croissance, avec bacitracine de zinc à 22 mg/kg avec salinomycine à 60 mg/kg ou la bacitracine de zinc en combinaison avec la salinomycine. L'étude s'est déroulée sur 42 jours. Les résultats obtenus ont permis aux auteurs de conclure que lorsque la bacitracine de zinc était employée seule ou en combinaison avec de la salinomycine augmentait le gain de poids moyen quotidien des oiseaux <sup>31</sup>.

En 2003, *Brennan et al* ont évalué l'effet du BMD « Bacitracin Methylene Disacylate », avec ou sans narasine, sur l'entérite nécrotique causée par *Clostridium perfringens*. L'étude comportait 2 000 poulets élevés en parquets et séparés en cinq traitements : 1) sans *C. perfringens* et sans moulée médicamenteuse, 2) bactéries sans moulée médicamenteuse, 3) bactéries et BMD à 55 mg/kg, 4) bactéries et narasine à 70 mg/kg et 5) bactéries et moulée contenant BMD et narasine. L'étude comportait 41 jours de croissance et les poulets ont été nourris à partir du jour 0. Les résultats de cette étude ont fait la démonstration que lorsque les oiseaux sont sollicités par un pathogène, les promoteurs de croissance augmentent les performances zootechniques des poulets dans les 15 premiers jours de croissance des oiseaux<sup>13</sup>.

Dans une autre étude de *Pedroso et al (2006)*, une moulée supplémentée ou non de BMD à 27,5 mg/kg a été donnée à 1 200 poulets et ce jusqu'à 21 jours d'âge. Les poulets ont été élevés en parquets et les performances zootechniques des différents groupes comparés. Les performances des oiseaux élevés en parquets ont été augmentées par l'ajout des promoteurs de croissance <sup>74</sup>.

Dans une autre étude, *Donabedian et al (2003)* ont vérifié l'effet de l'ajout de virginiamycine à la moulée sur des poulets à griller. Huit poulets ont été nourris avec des doses sous-thérapeutiques de virginiamycine sur une période de 11 semaines et huit autres n'en n'ont pas reçu. Les deux groupes étaient séparés géographiquement. Aucun effet de la virginiamycine sur le gain de poids n'a été noté dans cette étude<sup>28</sup>.

Dans une étude supplémentaire, *Dumonceaux et al (2006)* ont utilisé 400 poulets distribués en 20 parquets, utilisant une litière provenant de poulets adultes n'ayant pas été nourris avec des antibiotiques, et d'autres qui ont été nourris avec une moulée contenant 22 mg/kg de virginiamycine ou non. L'étude a été réalisée sur une période de 50 jours. Les performances zootechniques ont été augmentées par l'ajout de virginiamycine dans les deux premières semaines de l'étude<sup>29</sup>.

L'effet de l'ajout de BMD et de virginiamycine sur les poulets à griller a également été évalué par *McDermott et al (2005)*. Dans cette recherche, on a utilisé 20 oiseaux par parquets. Le design expérimental comprenait 72 parquets permettant 24 réplicats de trois traitements : sans antibiotiques, BMD à 50 mg/kg pour la phase de début et 25 mg/kg pour la phase de croissance et virginiamycine à 20 mg/kg pour la phase de début et 10 mg/kg pour la phase de croissance. L'étude s'est déroulée sur sept semaines. Deux groupes de poulets ont été utilisés. Un groupe a été sacrifié dans le but de vérifier l'état du tractus digestif des oiseaux et un autre utilisé pour des expériences de gain de poids uniquement. Le deuxième groupe a vu un effet positif des promoteurs de croissance sur les performances des poulets à griller et l'autre groupe non (poulets sacrifiés)<sup>65</sup>.

En synthèse, il existe plusieurs études ayant porté sur l'effet des promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine. Par contre les méthodologies diffèrent d'une étude à l'autre. Nous avons considéré ces méthodologies dans le design expérimental de la présente étude. Cependant, nous avons apporté quelques modifications par rapport aux études déjà publiées. Dans notre étude, nous avons utilisé 3 réplicats de 4000 poulets par conditions. Plus de poulets ont été utilisés pour refléter les conditions des élevages commerciaux. C'est un nombre nettement supérieur au nombre utilisé dans les autres

études. La présente étude comporte moins de réplicats que la majorité des études citées précédemment. Nous avons suivi les oiseaux jusqu'au jour 34 contrairement aux autres études. Nous avons également commencé tous les cycles de production sur une nouvelle litière. Ceci est nécessaire puisque qu'une rotation des conditions de moulées a été effectuée entre les parquets des réplicats. Cette rotation des parquets, permettant d'éviter un effet lié à un enclos précis, n'a pas non plus été effectuée dans les autres études.

À la lumière de nos résultats, la présente étude suggère qu'en conditions terrain employant une bonne pratique d'élevage que l'utilisation des promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine n'a pas d'effet sur le gain de poids moyen quotidien et la mortalité moyenne dans l'élevage de poulets à griller, lorsqu'utilisés à des concentrations de 55 mg/kg et 22 mg/kg respectivement.

Il semble que l'utilisation de promoteurs de croissance ait affecté positivement, mais de façon marginale le taux de mortalité. Le taux de mortalité a toujours été plus élevé lorsque la moulée donnée aux poulets n'était pas supplémentée en antibiotiques. L'écart entre le plus haut et le plus bas taux de mortalité observés dans les trois réplicas était moindre pour le groupe traité avec de la virginiamycine (données non montrées). Les plus hauts taux de mortalité ont été observés en début de lot. Ceci est associé aux chocs (déshydratation, luminosité, température) subit par les poussins lors du transport. Il se peut que l'utilisation des promoteurs de croissance en début de croissance protège les poussins et jeunes poulets des effets néfastes du transport (immunité diminuée). La conversion alimentaire des oiseaux n'a pu être calculée car la quantité précise de moulée consommée par les oiseaux n'est pas connue. Nos résultats sont en accord avec une partie de la littérature, mais conteste d'autres études.

Quelques facteurs peuvent expliquer ces résultats relatifs gain de poids moyen quotidien mesuré et les différences observées avec la littérature. Les poulets ont été pesés en groupe, par condition, à la fin des périodes d'élevage. Ceci est différent des pesées individuelles utilisées dans la littérature. Cette méthode a été utilisée pour simplifier le pesage vu le grand nombre d'oiseaux présent dans les différentes conditions. Cette méthode

n'a pas généré beaucoup de données bien qu'un grand nombre d'oiseaux ait été pesé. Ceci diminue le pouvoir statistique de l'étude. Un plus grand nombre de réplicats et ainsi qu'une augmentation de la quantité de données générées permettrait sans doute d'augmenter le pouvoir statistique de l'étude et pourrait permettre l'observation de différences entre les groupes. Au niveau du gain de poids moyen quotidien, étant donné le peu de variation observé et le grand nombre d'oiseaux utilisés, on peut penser qu'augmenter le nombre de réplicats n'aurait cependant pas d'effet. Évaluer le gain de poids moyen quotidien après les deux premières semaines de croissance pourrait permettre de voir l'effet des promoteurs de croissance virginiamycine et bacitracine de zinc chez les poulets en jeune âge.

L'utilisation de bâtiments commerciaux ne permet pas la maîtrise de tous les paramètres de croissance et ce malgré une biosécurité très élevée. Les bâtiments étaient soumis à de bonnes pratiques d'élevage, ce qui se reflétait notamment par l'emploi de nouvelle litière pour tout nouvel élevage, l'emploi de couvre chaussure propre à l'entrée de tous les parquets et des opérations de lavage et de désinfection entre les lots de production. Dans des bâtiments commerciaux, il est difficile de contrôler la température externe, le taux d'humidité et la possible introduction de la maladie par des vecteurs tels les mouches et les rongeurs. Dans notre étude, le facteur sur lequel il était possible d'avoir le plus de contrôle était l'alimentation. L'utilisation de bâtiments commerciaux permet d'avoir un portrait plus réaliste des conditions terrain, tels qu'expérimentés par les producteurs de poulet à griller. Les études précédentes utilisent pour la plupart des bâtiments situés dans des centres de recherche ce qui leur permet de contrôler avec beaucoup plus de précision les paramètres de croissance des oiseaux. Les facteurs environnementaux des bâtiments commerciaux ont peut-être masqué l'effet des promoteurs de croissance sur la mortalité et le gain de poids moyen quotidien des oiseaux de l'étude. Aucun épisode de maladie n'a été détecté durant les expériences. Il est possible que les résultats observés aient été différents si cela avait été le cas tel qu'observé par *Brennan et al. (2003)* La présente expérience ne permet pas d'évaluer l'utilité des promoteurs de croissance en cas de maladie.

À la lumière de nos observations sur le gain de poids moyen quotidien et la mortalité moyenne des oiseaux, il est possible de croire que les promoteurs de croissance

virginiamycine et bacitracine de zinc, lorsque employés dans des conditions d'élevage similaires à celles employées dans l'étude, n'influencent pas le gain de poids moyen quotidien ni non plus la mortalité des oiseaux. Dans cette optique, les promoteurs de croissance pourraient être retirés puisque leur utilisation ne semble pas apporter des avantages marqués à l'élevage des poulets à griller. Ceci diminuerait les coûts d'exploitation des éleveurs. Cependant, l'expérience Européenne où on a assisté à une diminution du statu sanitaire des élevages après retrait total des promoteurs de croissance incite à agir avec prudence. Des études à long terme sont donc nécessaires pour bien évaluer les conditions optimales d'utilisations des promoteurs de croissance ainsi que les stratégies à employer pour les remplacer.

Si de bonnes pratiques d'élevages sont unanimement adoptées à travers le réseau des producteurs de volaille, les possibles effets néfastes sur la santé globale des poulets pourraient sans doute être évités ou du moins atténués. L'utilisation de bacitracine de zinc et de virginiamycine pourrait être continuée, mais à des doses thérapeutique lorsque la situation dans un élevage l'oblige. De plus, le nouvel engouement pour les produits bio par les consommateurs vient de plus en plus mettre de la pression sur les producteurs. Produire une viande sans promoteurs de croissance permettrait de combler se besoin. Une viande produite sans promoteurs de croissance permettrait de s'assurer également de passer les frontières sans l'éventuelle application de barrières tarifaires sous prétexte d'utilisation d'antibiotiques en élevage comme promoteurs de croissance.

## **8.2 Résistance phénotypique aux antibiotiques**

Pour répondre à l'objectif initial de vérifier l'apparition d'un potentiel réservoir phénotypique de résistance aux antibiotiques dans les populations de microorganismes indicateurs suite à l'administration de promoteurs de croissance, une série d'antibiogrammes utilisant la méthode de diffusion sur disque a été réalisée chez les microorganismes indicateurs. Pour une même condition de moulée, les pourcentages d'isolats (moyennes des trois réplicats) de *E. coli* et de *Enterococcus* spp. phénotypiquement résistants à un antibiotique donné, obtenus à la fin de l'expérimentation

(jour 34), ont été comparés avec ceux obtenus au début de l'étude (jour 0). Les pourcentages d'isolats résistant à un antibiotique donné retrouvés dans les différentes conditions de moulée ont par la suite été comparés deux à deux à la fin de l'expérience (jour 34). Ceci a été fait dans le but de vérifier dans un premier temps si la résistance à un antibiotique précis était modifiée après 34 jours d'élevage dans chacune des conditions de moulée et dans un deuxième temps si l'utilisation de VG, de ZB et la non utilisation de promoteurs de croissance modifie la résistance à certains antibiotiques précis.

### 8.2.1 *Escherichia coli*

Peu d'études ont jusqu'à présent été réalisées pour mettre en lumière l'effet de la bacitracine de zinc et de la virginiamycine sur la résistance phénotypique aux antibiotiques chez *E. coli*. Dans l'étude de *McDermott et al* (2005), l'utilisation de la virginiamycine ne semble pas augmenter le nombre ou la proportion de souches résistantes aux antibiotiques<sup>64</sup>. L'effet de l'utilisation de la bacitracine de zinc et de la virginiamycine sur la résistance aux antibiotiques des isolats de *E. coli* n'a pas encore été vérifiée, *E. coli* étant naturellement résistant à la bacitracine de zinc ainsi qu'à la virginiamycine. Une étude réalisée par *Diarrasoubba et al* en 2007 suggère que les promoteurs de croissance n'ont pas d'effet sur la sélection de phénotypes de résistance aux antibiotiques chez *E.coli*. Cette étude a été réalisée en utilisant des isolats provenant de fermes de poulets à griller utilisant de manière régulière des promoteurs de croissance<sup>27</sup>. Une étude plus précise effectuée également par le même groupe de recherche, *Diarra et al.*, suggère que la salinomycine influencerait positivement la résistance au ceftiofur, à la spectinomycine et à la gentamycine<sup>26</sup>.

Nous avons utilisé ce microorganisme car il est souvent employé dans les études sur la résistance aux antibiotiques (DANMAP et PICRA) comme microorganisme indicateur du niveau général d'antibiorésistance. De plus, bien qu'il soit naturellement résistance aux promoteurs de croissance étudiés, nous pensons qu'il se peut que la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* soit modifiée par des mécanismes de co-sélection dus à une pression directe des antibiotiques ou dus à une pression venant de la modification de la

population bactérienne de l'environnement des poulets à griller.

Chez *E. coli*, des diminutions ainsi que des augmentations des pourcentages d'isolats résistants à certains antibiotiques ont été observées lorsque l'on compare le jour 0 et le jour 34 au niveau du pourcentage de résistance à un antibiotique donné des isolats d'une condition (Table 3, page 45).

Une hypothèse expliquant la diminution du pourcentage d'isolats de *E. coli* résistant à la gentamicine peut être émise. En 2007, *Smith et al* rapportent que l'utilisation des antibiotiques dans un élevage de poulet à griller occasionne une diminution du nombre d'isolats résistants à la gentamicine durant l'expérience. Les auteurs suggèrent que l'utilisation du vaccin de Marek, contenant de la gentamicine selon les formulations, peut être à l'origine du phénomène <sup>87</sup>. Les poussins utilisés lors de la présente étude ont été vaccinés en couvoir contre la Maladie de Marek. Malheureusement, nous n'avons pas accès à la formulation de ce vaccin, mais il se peut que ce dernier contenait de la gentamicine. Étant donné que l'antibiotique n'a pas été utilisé dans l'élevage suivi, il est possible que les souches résistantes à la gentamicine générées par l'utilisation du vaccin de Marek en couvoir n'aient plus été sélectionnées favorablement vers la fin de l'expérience en l'absence de cette pression de sélection lors de l'élevage. Les souches résistantes à la gentamicine ont pu alors être remplacées par d'autres, ce qui pourrait expliquer en partie que moins de souches résistantes ont été isolées à la fin de l'élevage comparativement au début.

Il se peut également que la diminution de la résistance aux autres antibiotiques provienne de la sélection en couvoir de souches précises, causée par l'utilisation de molécules antibiotiques chez les poulets reproducteurs ou lors de l'éclosion des poussins. Suite à l'absence de ces pressions sélectives dans l'élevage, le nombre d'isolats résistants aux antibiotiques a pu chuter lors de l'expérimentation.

Les études précises effectuées au niveau des couvoirs, faisant état des bactéries résistantes aux antibiotiques ainsi que des gènes de résistances qu'elles transportent, n'ont pas été réalisées au Canada. Pourtant, les couvoirs sont le point de départ des poulets dans la chaîne alimentaire et donc une source potentielle de dissémination des bactéries résistantes.

Par exemple, dans le présent projet, *Salmonella* spp. a également été isolée. Lorsque les poussins étaient porteurs de salmonelles à leur arrivée, il était très facile d'en isoler de la litière et des oiseaux au jour 34. Lorsque les poussins n'étaient pas porteurs de salmonelles, peu de souches étaient retrouvées chez les oiseaux et la litière à la fin de l'expérience (données non montrées). Comprendre la dynamique des populations bactériennes du couvoir pourrait certainement aider à freiner la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques et minimiser le flux de gènes de résistance qui y est associé. Il se peut également que les variations de pourcentage de résistance aux antibiotiques aient été causées par une simple modification de la flore bactérienne des oiseaux ou une meilleure capacité de colonisation de certains isolats de *E. coli* ne contenant pas nécessairement de résistance aux antibiotiques.

Selon les résultats obtenus, il semble que l'utilisation de bacitracine de zinc et de virginiamycine diminue le pourcentage de résistance des isolats à certains antibiotiques. Il existe une différence significative pour trois antibiotiques (céphalotine, acide nalidixique et sulfaméthoxazol) entre les traitements à la fin de l'élevage, ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus par *McDermott et al.* (2005) (aucun changement des profils d'antibiorésistance des isolats de *E. coli*). Il se peut que la cause soit l'inhibition du transfert plasmidique par la bacitracine de zinc et la virginiamycine, celle-ci ayant déjà été rapportée dans la littérature par *Mathers et al* chez des souches de *E. coli*. Dans cette expérience, un plasmide contenant une résistance à la tétracycline, à l'ampiciline et au ciprofloxacine n'a pu être transféré par choc thermique lorsque des promoteurs de croissance, dont la bacitracine de zinc et la virginiamycine, sont mis en contact avec les souches <sup>62</sup>. Les éléments génétiques mobiles peuvent contenir des gènes de résistance aux antibiotiques <sup>87</sup>. L'inhibition de leur transfert par les promoteurs de croissance lors de l'expérimentation pourrait expliquer la diminution de la résistance aux antibiotiques dans l'élevage. La résistance à l'acide nalidixique chez *E. coli* peut être codée des gènes plasmidiques, *qnr* <sup>19</sup>. La résistance à la céphalotine (ESBL) être plasmidique <sup>82</sup> et la résistance au sulfaméthoxazol par les gènes *sul* peut l'être également <sup>75</sup>.

Le niveau de résistance à la bacitracine de tous les isolats de *E. coli* semblait la

même (pas de diamètre d'inhibition lors de la diffusion sur disque). Il en va de même pour la résistance à la virginiamycine (CMI > 128 µg/ml). Ceci suggère que les isolats n'ont pas acquis de mécanismes de résistance supplémentaires associés aux deux promoteurs de croissance utilisés. Les isolats pourraient être sérotyper et vérotyper pour vérifier si l'élevage a été colonisé par un sérotypotype particulier de *E. coli*.

### 8.2.2 *Enterococcus* spp.

Chez les isolats d'*Enterococcus* spp, des diminutions ainsi que des augmentations du nombre d'isolats résistants à certains antibiotiques (jour 0 vs jour 34) ont été observées dans les différents traitements (Table 4, page 46). Quatre résistance aux antibiotiques semblent en augmentation, peu importe les conditions de moulée utilisée : bacitracine, érythromycine, quinupristine/dalfopristine et apramycine.

Chez *Enterococcus*, dans notre étude, la diminution du pourcentage d'isolats résistants à certains antibiotiques (jour 0 vs jour 34) est peut-être causée par une sélection au couvoir de certaines souches résistantes aux antibiotiques tout comme pour *E. coli*. Les variations d'antibiorésistance peuvent également être simplement causé par une évolution dans le temps de la population bactérienne vers de souches ayant une capacité différente de colonisation des oiseaux selon leur âge et ayant des résistance aux antibiotiques différentes

57

L'augmentation observée du pourcentage d'isolats résistants à un noyau de quatre antibiotiques (B, E, APR, Q/D), peu importe la condition de moulée utilisée, suggère l'émergence dans tout l'élevage d'une souche particulière de *Enterococcus* spp. ayant colonisé le bâtiment.

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être liés à d'autres gènes. Par exemple, il a été démontré que le gène *ermB* est lié à un groupe de gène (*aadE-sat4-aphA-3*) chez *Enterococcus faecium* multi-résistants<sup>93</sup>. Certains gènes de résistances tel que *vatD* et *ermB* peuvent même être physiquement liés, soit retrouvés sur le même plasmide<sup>42</sup>. Il se peut que l'émergence observée de ces isolats résistants à des antibiotiques particuliers ne soit pas due uniquement à la pression sélective des promoteurs de croissance. Certains

mécanismes de résistances aux métaux peuvent être liés à des résistances aux antibiotiques tel la résistance au zinc et la résistance aux  $\beta$ -lactamines<sup>8</sup>. Étant donné que le facteur contrôlé dans l'étude était l'alimentation, il se peut que d'autres pressions, encore non identifiées, aient influencé la colonisation du bâtiment par des isolats particuliers.

Peu d'études se sont penchées sur la résistance associée aux promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine chez le poulet à griller. *Donabedian et al* en (2003) n'ont pas été en mesure d'effectuer d'association entre l'utilisation de virginiamycine et la présence de résistance à Q/D chez un petit échantillonnage de 17 souches de *E. faecium*<sup>28</sup>.

Dans une étude de *McDermott et al* réalisée en 2005, on tente de mieux comprendre l'impact de l'utilisation de la virginiamycine sur les entérocoques associés aux poulets à griller. Les antibiogrammes ont été effectués en utilisant la technique du Sensititre<sup>MD</sup>. Les résultats de l'étude ont permis de déduire que l'utilisation de virginiamycine sélectionne positivement pour des souches de *Enterococcus faecium* résistantes aux tétracyclines ainsi qu'à la quinupristine/dalfopristine (Q/D). La résistance à Q/D serait maintenue uniquement si une exposition constante des oiseaux à la virginiamycine est présente<sup>64</sup>. Aucune différence dans la résistance à Q/D, aux tétracyclines ou autres aux autres antibiotiques testés n'a été observée dans la présente étude. Ceci est en désaccord avec les conclusions tirées par l'étude de McDermott.

Il est impossible d'écarter la possible dissémination des souches à travers tout l'élevage, malgré les mesures de biosécurité élevées. Ceci pourrait expliquer la non visualisation d'une pression sélective sur les entérocoques.

L'utilisation de promoteurs de croissance, bien qu'elle ne semble pas sélectionner pour des phénotypes particuliers de résistance aux antibiotiques chez les entérocoques, dans une période limitée, fait néanmoins partie des facteurs participants à la dynamique de la ferme sélectionnant pour des souches résistantes aux antibiotiques. Pour vérifier si les résultats observés dans cette étude pour l'antibiorésistance sont causées par une souche particulière, une analyse de la clonalité des isolats recueillis devrait être faite en utilisant la

méthode du PFGE ou du MLST<sup>69,70</sup>. Pour vérifier les mécanismes de cosélection des gènes de résistance aux antibiotiques avec d'autres, des études plus approfondies seront nécessaires.

L'analyse de l'antibiorésistance a été effectuée chez *Enterococcus*, peu importe l'espèce présente. Dans plusieurs études, l'analyse de l'antibiorésistance générale et celle associée à la virginiamycine est faite uniquement pour *E. faecium*<sup>28,44,64</sup>. Dans la présente étude, une variation des CMI pour la résistance à la virginiamycine a été observée autant chez *E. faecium* ainsi que chez *E. faecalis* (données non montrées). Ceci suggère que les isolats des deux espèces possèdent divers mécanismes de résistance à un même antibiotique. L'analyse unique de *E. faecium* aurait pu mener à l'omission d'éléments importants de résistance à la virginiamycine se retrouvant chez *E. faecalis*<sup>84</sup>. Cette situation pourrait mener à la sous-évaluation du risque posé par la présence de gènes de résistance non exprimés dans l'environnement du poulet à griller. Il est vrai qu'un gène présent, mais non exprimé, ne confère pas automatiquement de résistance additionnelle à une bactérie le portant. Le danger, représenté par le gène de résistance à l'antibiotique, s'il n'est pas exprimé, n'est pas atténué étant donné la possibilité de transfert existant à un autre microorganisme pouvant alors devenir résistant à l'antibiotique à son tour.

### 8.3 Résistance génotypique aux antibiotiques

#### 8.3.1 PCR

Nous avons vérifié la présence de certains gènes associés à la résistance aux promoteurs de croissance chez les isolats de *E. coli* et *Enterococcus* spp. Ceci a permis de valider les résultats d'antibiorésistance phénotypique. Les PCR mis au point ont également servi à la création des PCR quantitatifs. Les analyses en PCR portaient sur les souches d'entérocoques étant donné que les gènes sélectionnés ne sont pas reconnus pour être retrouvés chez *E. coli*. Des souches résistantes et sensibles ont été sélectionnées aélatoirement de manière à ne pas passer à côté de gènes pouvant être silencieux<sup>33,73</sup>.

La prévalence du gène de résistance *bcrR* chez les entérocoques isolés de l'environnement du poulet à griller est méconnue. La prévalence de *vatd* et *ermB* varie

d'une étude à l'autre. Le gène de résistance *vatD* peut être retrouvé chez 0% à 100% des *Enterococcus* spp. Il en va de même pour *ermB* <sup>44,46,87</sup>.

Dans une étude similaire à la nôtre réalisée en 2005, des souches de *E. faecium* ont été criblées par PCR pour la résistance à la virginiamycine dans le but de détecter *vatD*, *vatE*, *vgb*, *erm* et *msrC*. Seul le gène *msrC* a été détecté chez 97% des souches <sup>64</sup>. Dans notre étude, nous avons évalué la présence de *vatD*, *ermB* et *bcrR*. Une courte étude préliminaire a d'abord été réalisée sur 25 isolats d'entérocoques et a révélé que ces gènes semblaient les plus prévalent chez la population d'entérocoques de la présente étude. Le gène *msrC* n'avait été identifié que dans une seule souche (données non montrées).

Pour *bcrR*, le gène ne se retrouvait pas chez tous les isolats résistants à la bacitracine, ce qui peut suggérer que d'autres mécanismes de résistance pourraient être en cause. En ce qui a trait à *ermB*, le gène était retrouvé chez des isolats classifiés comme sensibles à la virginiamycine. Il se peut que la CMI choisie (32 µg/ml) pour caractériser les isolats comme résistants ait été trop élevée. Le DANMAP en 2001 utilisait une valeur de 8 µg/ml <sup>24</sup>. La présence unique de *ermB* ne devrait pas conférer une résistance à la virginiamycine très élevée puisque ce gène ne cible que l'un des deux composés formant le promoteur de croissance <sup>22</sup>.

Les souches caractérisées comme sensibles à la virginiamycine, possédant le gène de résistance *ermB*, ne possédaient pas le gène *vatD*. D'autres gènes que *ermB* et *vatD* semblent avoir été impliqués dans la résistance à la virginiamycine dans notre étude chez *Enterococcus* puisque certains isolats hautement résistants ne possédaient aucun des deux gènes. Avant de conclure que la valeur de CMI retenue comme seuil de résistance était trop élevée, une analyse plus en profondeur devrait être effectuée pour vérifier la présence des autres déterminants de la résistance à la virginiamycine. Ceci permettrait de bien établir la CMI comme seuil de résistance pour les isolats d'*Enterococcus* spp.

La source de virginiamycine utilisée pour effectuer les antibiogrammes était le promoteur de croissance tel que disponible dans les meuneries. L'idéal aurait été d'avoir eu accès à une source purifiée de promoteur de croissance. Malheureusement, les compagnies

pharmaceutiques et distributeurs contactés n'ont pas voulu collaborer activement dans la présente étude. L'utilisation de molécules plus purifiées aurait peut-être permis d'établir une meilleure corrélation entre la présence des gènes de résistance et la CMI des isolats.

La microflore du poulet à griller est complexe et semble en constante évolution. Il serait important d'inclure à de futures études la quantification des autres genres bactériens présents, lesquels peuvent contenir eux aussi des gènes de résistance aux antibiotiques. La méthode du PCR en Temps-Réel permet la quantification générale des gènes ciblés. Il n'est donc pas nécessaire avec cette méthode de cultiver les autres genres bactériens pour vérifier la dynamique de gènes particuliers <sup>95</sup>.

### 8.3.2 PCR en Temps-Réel

Le PCR en Temps-Réel (ANNEXE I) a été développé dans le but de vérifier quantitativement si l'utilisation de promoteurs de croissance pouvait générer un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. La source d'ADN utilisée était l'ADN total extrait d'échantillons de litières souillées, échantillonnées à la fin des différents réplicats de l'expérience. Ceci nous a permis de quantifier les gènes peu importe la source dont ils provenaient; qu'ils soient associés à un microorganisme indicateur, sur des éléments génétiques transposables ou contenus dans des microorganismes où le gène n'a pas encore été identifiés.

Le séquençage de l'amplicon cloné qui contenait une séquence appartenant à *bcrR* s'est avéré homologue à 100% avec la séquence cible, en utilisant une analyse Blast et ClustalW. Un PCR en Temps-Réel a également été mis au point pour le gène de résistance *vatD*. Le fragment cloné de l'amplicon de *vatD* est homologue à 100% pour le brin Forward avec la séquence ciblée, en utilisant une analyse par Blast et ClustalW. La séquence du brin d'ADN inverse n'a pas pu être déterminée. Il existe des régions homologues entre le plasmide vecteur et le fragment de *vatd* devant être cloné. Ceci pourrait expliquer la diminution de l'efficacité du QPCR pour *vatd* ainsi que la difficulté de bien séquencer le brin reverse des clones sélectionnés.

Le PCR en Temps-Réel a déjà été utilisé pour quantifier le réservoir de gène de

résistance à la tétracycline retrouvé dans le fromage en utilisant la technologie Taqman<sup>60</sup>. Pour de ce qui est de l'utilisation de PCR en Temps-Réel avec SYBR Green pour quantifier les gènes de résistances *bcrR* et *vatD*, il s'agissait de la première étude à le faire, à notre connaissance.

Suite aux observations recueillies, aucune différence au niveau de la quantité de *bcrR* retrouvée dans les litières n'a pu être observée entre les groupes. Ceci est en accord avec les résultats de résistance phénotypiques suggérant que la ZB et VG ne sélectionnent pas pour des résistances à des antibiotiques précis.

Pour l'instant, *bcrR* n'a été isolé que chez *Enterococcus*. Il se peut qu'il se retrouve également chez d'autres genres bactériens n'ayant pas subi l'influence des conditions de moules utilisées. Ceci pourrait expliquer sa distribution équivalente, peu importe l'utilisation des promoteurs de croissance ou non.

L'analyse des résultats de PCR en Temps-Réel pour le gène de résistance *vatD* a permis d'observer qu'il y a eu lors de l'expérience une sélection en faveur de ce gène dans l'ADN total extrait des litières provenant du groupe traité avec de la virginiamycine. Chez *E. coli* et *Enterococcus*, il n'y a pas eu de sélection favorable pour une résistance à la virginiamycine, ce qui concorde avec les profils réalisés par antibiogrammes. L'opposition entre les deux résultats vient renforcer l'hypothèse que la variation de la résistance à la virginiamycine chez *Enterococcus* n'était pas uniquement liée à un gène de résistance précis. Il se peut également que le gène ne soit pas répandu dans plusieurs espèces bactériennes.

L'analyse de la résistance génotypique a révélé que d'autres gènes de résistance que ceux sélectionnés semblent présents dans l'élevage. L'ajout de ces autres gènes de résistance codant pour la résistance à la bacitracine et à la virginiamycine à fin de détection pourrait bonifier une future étude. L'analyse par PCR en Temps-Réel des litières recueillies à la fin des expériences a démontré que les promoteurs de croissance n'influencent pas la distribution du gène *bcrR*. Par contre, la virginiamycine semble sélectionner favorablement pour le gène de résistance *vatD*. Ces deux gènes ne sont malheureusement pas assez

représentatifs de la résistance globale aux deux promoteurs de croissance, puisqu'ils ne semblent pas être les seuls impliqués. Le gène *bcrR* code pour un régulateur d'un opéron associé au système de pompe bcr chez *Enterococcus*. L'emploi de gènes plus conservés entre les espèces possédant un mécanisme similaire de résistance, tel *bcrA* et *bcrB*<sup>71</sup>, aurait pu permettre d'obtenir un meilleur portrait de la résistance globale à la bacitracine.

Également, il aurait été possible d'utiliser des alignements de séquences multiples de gènes se retrouvant chez plusieurs genres bactériens pour dessiner des amorces universelles permettant l'obtention d'un portrait plus global de la résistance à un antibiotique donné. Souvent, pour une même résistance à un antibiotique, plusieurs de gènes peuvent être impliqués. L'obtention d'amorces universelles permettant de dresser un portrait génétique global d'une résistance à un antibiotique précis est presque utopique. Le PCR en Temps-Réel devrait alors être utilisé pour quantifier les gènes de résistance qui sont principalement impliqués dans la résistance aux antibiotiques ou causant une plus grande variété de résistance aux antibiotiques, soit ceux représentant le plus de risque pour la santé publique et vétérinaire.

La technologie du SYBR Green employée pour le PCR en Temps-Réel offre plusieurs avantages lorsque comparée à la technologie TaqMan : le coût est moins élevé et la technologie plus facile à utiliser. Cependant, puisqu'une seule valeur de fluorescence peut être acquise, soit la fluorescence totale dégagée par l'échantillon, l'emploi de plusieurs paires d'amorces donnant des amplicons différents est impossible. Ceci fait en sorte qu'aucun contrôle de qualité ne peut être inséré lors des extractions d'ADN pour permettre une normalisation de tous les échantillons. L'emploi d'une technologie permettant l'utilisation de plusieurs fluorochromes, tel le PCR en Temps-Réel Taqman, permettrait une telle normalisation.

## 9 Conclusions

À la lumière des différents résultats obtenus lors de cette étude, nous pouvons faire les observations suivantes :

Les promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine n'ont pas permis d'améliorer significativement le gain de poids moyen quotidien ou de diminuer la mortalité moyenne des poulets à griller dans les conditions de cette étude.

Les promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine n'ont pas causé la sélection d'isolats d'entérocoques résistants aux antibiotiques.

Une association entre le promoteur de croissance bacitracine de zinc et la réduction du pourcentage d'isolats de *E. coli* résistants à la céphalotine, à l'acide nalidixique et au sulfaméthoxazole a été observée

Les gènes de résistance au promoteur de croissance *vatD* et *ermB* ont été retrouvés dans la population d'entérocoques étudiée. D'autres gènes de résistance à la virginiamycine sont sans doute présents tels *vatE*, *vga* et *vgb*.

Le gène de résistance au promoteur de croissance *bcrR* a été retrouvé dans la population d'entérocoques étudiée. D'autres gènes de résistance à la bacitracine sont sans doute présents tels *bacA*, *ywoA* et *yts*.

La sélection du gène *bcrR* impliqué dans la résistance à la bacitracine par les promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine n'a pas été observée.

La sélection du gène de résistance à la virginiamycine, *vatD*, par le promoteur de croissance virginiamycine a été observée.

En résumé, il a été observé dans cette étude que les promoteurs de croissance bacitracine de zinc et virginiamycine, lorsqu'employés chez le poulet à griller dans la durée de cette étude, ne créent pas de réservoir de résistance phénotypique aux antibiotiques. Par contre, la virginiamycine semble sélectionner pour un gène de résistance, *vatD*. Ce mécanisme doit cependant être approfondi.

## 10 Bibliographie

- 1- Allignet, J., V. Loncle and N. el Sohl, 1992. Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene*, 117 (1): 45-51.
- 2- Allignet, J. and N. el Solh, 1995. Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, *vatB*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (9): 2027-2036.
- 3- Allignet, J. and N. El Solh, 1997. Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene*, 202 (1-2): 133-138.
- 4- Allignet, J., N. Liassine and N. el Solh, 1998. Characterization of a staphylococcal plasmid related to pUB110 and carrying two novel genes, *vatC* and *vgbB*, encoding resistance to streptogramins A and B and similar antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 42 (7): 1794-1798.
- 5- Anderson, A. D., J. M. Nelson, S. Rossiter and F. J. Angulo, 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb Drug Resist*, 9 (4): 373-379.
- 6- Angulo, F. J., N. L. Baker, S. J. Olsen, A. Anderson and T. J. Barrett, 2004. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis*, 15 (2): 78-85.
- 7- Bach Knudsen, K. E., 2001. Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animal diets. *Proc Nutr Soc*, 60 (3): 291-299.
- 8- Baker-Austin, C., M. S. Wright, R. Stepanauskas and J. V. McArthur, 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*, 14 (4): 176-182.
- 9- Bernard, R., P. Joseph, A. Guiseppi, M. Chippaux and F. Denizot, 2003. *YtsCD* and *YwoA*, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 228 (1): 93-97.
- 10- Bernard, R., M. El Ghachi, D. Mengin-Lecreulx, M. Chippaux and F. Denizot, 2005. *BcrC* from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem*, 280 (32): 28852-28857.
- 11- Berryman, D. I., M. Lyristis and J. I. Rood, 1994. Cloning and sequence analysis of *ermQ*, the predominant macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38 (5): 1041-1046.

- 12- Berryman, D. I. and J. I. Rood, 1995. The closely related *ermB-ermAM* genes from *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* (pAM beta 1), and *Streptococcus agalactiae* (pIP501) are flanked by variants of a directly repeated sequence. Antimicrob Agents Chemother, 39 (8): 1830-1834.
- 13- Brennan, J., J. Skinner, D. A. Barnum and J. Wilson, 2003. The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens. Poult Sci, 82 (3): 360-363.
- 14- Butaye, P., K. Van Damme, L. A. Devriese, L. Van Damme, M. Bael, S. Lauwers and F. Haesebrouck, 2000. In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. Int J Food Microbiol, 54 (3): 181-187.
- 15- Butaye, P., L. A. Devriese and F. Haesebrouck, 2001. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. Antimicrob Agents Chemother, 45 (5): 1374-1378.
- 16- 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 (2): 175-188.
- 17- Canu, A. and R. Leclercq, 2001. Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. Curr Drug Targets Infect Disord, 1 (2): 215-225.
- 18- Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin and I. Phillips, 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. J Antimicrob Chemother, 52 (2): 159-161.
- 19- Cattoir, V., L. Poirel and P. Nordmann, 2007. In-vitro mutagenesis of *qnrA* and *qnrS* genes and quinolone resistance in *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect, 13 (9): 940-943.
- 20- Chapman, H. D., P. Marsler and M. W. LaVorgna, 2004. The effects of salinomycin and roxarsone on the performance of broilers when included in the feed for four, five, or six weeks and infected with *Eimeria* species during the starter or grower phase of production. Poult Sci, 83 (5): 761-764.
- 21- Cocito, C., 1979. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. Microbiol Rev, 43 (2): 145-192.
- 22- Cocito, C., M. Di Giambattista, E. Nyssen and P. Vannuffel, 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. J Antimicrob Chemother, 39 Suppl A 7-13.
- 23- Couture, B. Bactériologie médicale. Ville Mont-royal, Québec: Décarie Éditeur inc,

1997, pages.

24- DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, 2001. ISSN 1600-2032.

25- Davis, D. R., J. B. McAlpine, C. J. Pazoles, M. K. Talbot, E. A. Alder, C. White, B. M. Jonas, B. E. Murray, G. M. Weinstock and B. L. Rogers, 2001. Enterococcus faecalis multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. J Mol Microbiol Biotechnol, 3 (2): 179-184.

26- Diarra, M. S., F. G. Silversides, F. Diarrassouba, J. Pritchard, L. Masson, R. Brousseau, C. Bonnet, P. Delaquis, S. Bach, B. J. Skura and E. Topp, 2007. Impact of Feed Supplementation with Antimicrobial Agents on Growth Performance of Broiler Chickens, Clostridium perfringens and Enterococcus Number, Antibiotic Resistant Phenotype, and Distribution of Antimicrobial Resistance Determinants in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol,

27- Diarrassouba, F., M. S. Diarra, S. Bach, P. Delaquis, J. Pritchard, E. Topp and B. J. Skura, 2007. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal Escherichia coli and Salmonella isolates from commercial broiler chicken farms. J Food Prot, 70 (6): 1316-1327.

28- Donabedian, S., L. A. Thal, P. Bozigar, T. Zervos, E. Hershberger and M. Zervos, 2003. Antimicrobial resistance in swine and chickens fed virginiamycin for growth promotion. J Microbiol Methods, 55 (3): 739-743.

29- Dumonceaux, T. J., J. E. Hill, S. M. Hemmingsen and A. G. Van Kessel, 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. Appl Environ Microbiol, 72 (4): 2815-2823.

30- El Ghachi, M., A. Derbise, A. Bouhss and D. Mengin-Lecreux, 2005. Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in Escherichia coli. J Biol Chem, 280 (19): 18689-18695.

31- Engberg, R. M., M. S. Hedemann, T. D. Leser and B. B. Jensen, 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. Poult Sci, 79 (9): 1311-1319.

32- Engel, H. W., N. Soedirman, J. A. Rost, W. J. van Leeuwen and J. D. van Embden, 1980. Transferability of macrolide, lincomycin, and streptogramin resistances between group A, B, and D streptococci, Streptococcus pneumoniae, and Staphylococcus aureus. J Bacteriol, 142 (2): 407-413.

33- Enne, V. I., A. A. Delsol, J. M. Roe and P. M. Bennett, 2006. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother, 50 (9): 3003-

3010.

34- Erb, A., T. Sturmer, R. Marre and H. Brenner, 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 26 (2): 83-90.

35- Fédération.des.producteurs.de.poulet.du.Canada, 2007. L'industrie. <http://www.poulet.ca>

36- Feighner, S. D. and M. P. Dashkevicz, 1987. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. Appl Environ Microbiol, 53 (2): 331-336.

37- Foulquie Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou and L. De Vuyst, 2006. The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol, 106 (1): 1-24.

38- Gouvernement.du.Canada. L'élevage du poulet et du dindon à griller au Canada.: 1991.

39- Gouvernement.du.Canada, 2005. Résumé sur les médicaments permis dans les aliments du bétail. Agence Canadienne d'Inspection des Aliments [http://www.inspection.gc.ca/francais/animal/feebet\\_mib.druse1f.shtml](http://www.inspection.gc.ca/francais/animal/feebet_mib.druse1f.shtml).

40- Graham, J. P., J. J. Boland and E. Silbergeld, 2007. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. Public Health Rep, 122 (1): 79-87.

41- Hammerum, A. M., L. B. Jensen and F. M. Aarestrup, 1998. Detection of the *satA* gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus faecium* from food-animals. FEMS Microbiol Lett, 168 (1): 145-151.

42- Hammerum, A. M., S. E. Flannagan, D. B. Clewell and L. B. Jensen, 2001. Indication of transposition of a mobile DNA element containing the *vat(D)* and *erm(B)* genes in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother, 45 (11): 3223-3225.

43- Harel, Y. M., A. Bailone and E. Bibi, 1999. Resistance to bacitracin as modulated by an *Escherichia coli* homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from *Bacillus licheniformis*. J Bacteriol, 181 (19): 6176-6178.

44- Hayes, J. R., D. D. Wagner, L. L. English, L. E. Carr and S. W. Joseph, 2005. Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA. J Antimicrob Chemother, 55 (1): 123-126.

45- Jensen, L. B., A. M. Hammerum, F. M. Aarestrup, A. E. van den Bogaard and E. E. Stobberingh, 1998. Occurrence of *satA* and *vgb* genes in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates of animal and human origins in the Netherlands. Antimicrob

Agents Chemother, 42 (12): 3330-3331.

46- Jensen, L. B., A. M. Hammerum, F. Bager and F. M. Aarestrup, 2002. Streptogramin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from production animals in Denmark in 1997. Microb Drug Resist, 8 (4): 369-374.

47- Jonas, B. M., B. E. Murray and G. M. Weinstock, 2001. Characterization of *emeA*, a *NorA* homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 45 (12): 3574-3579.

48- Jones, F. T. and S. C. Ricke, 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. Poult Sci, 82 (4): 613-617.

49- Kaukas, A., M. Hinton and A. H. Linton, 1988. The effect of growth-promoting antibiotics on the faecal enterococci of healthy young chickens. J Appl Bacteriol, 64 (1): 57-64.

50- Khan, A. A., M. S. Nawaz, S. A. Khan and R. Steele, 2002. Detection and characterization of erythromycin-resistant methylase genes in Gram-positive bacteria isolated from poultry litter. Appl Microbiol Biotechnol, 59 (2-3): 377-381.

51- Khan, A. A., M. S. Nawaz, C. Summage West, S. A. Khan and J. Lin, 2005. Isolation and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from poultry litter. Poult Sci, 84 (1): 61-66.

52- Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. Int J Food Microbiol, 88 (2-3): 123-131.

53- Kobayashi, A., H. Hirakawa, T. Hirata, K. Nishino and A. Yamaguchi, 2006. Growth phase-dependent expression of drug exporters in *Escherichia coli* and its contribution to drug tolerance. J Bacteriol, 188 (16): 5693-5703.

54- Koch, S., M. Hufnagel, C. Theilacker and J. Huebner, 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine, 22 (7): 822-830.

55- Kumar, A. and H. P. Schweizer, 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev, 57 (10): 1486-1513.

56- Lee, E. W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima and T. Tsuchiya, 2003. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother, 47 (12): 3733-3738.

57- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer and M. D. Lee, 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. Appl

Environ Microbiol, 69 (11): 6816-6824.

58- Manning, J. G., B. M. Hargis, A. Hinton, Jr., D. E. Corrier, J. R. DeLoach and C. R. Creger, 1994. Effect of selected antibiotics and anticoccidials on *Salmonella enteritidis* cecal colonization and organ invasion in Leghorn chicks. Avian Dis, 38 (2): 256-261.

59- Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith and G. M. Cook, 2004. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. Antimicrob Agents Chemother, 48 (10): 3743-3748.

60- Manuzon, M. Y., S. E. Hanna, H. Luo, Z. Yu, W. J. Harper and H. H. Wang, 2007. Quantitative assessment of the tetracycline resistance gene pool in cheese samples by real-time TaqMan PCR. Appl Environ Microbiol, 73 (5): 1676-1677.

61- Mateu, E. and M. Martin, 2001. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 48 (8): 569-581.

62- Mathers, J. J., S. R. Clark, D. Hausmann, P. Tillman, V. R. Benning and S. K. Gordon, 2004. Inhibition of resistance plasmid transfer in *Escherichia coli* by ionophores, chlortetracycline, bacitracin, and ionophore/antimicrobial combinations. Avian Dis, 48 (2): 317-323.

63- Mayrhofer, S., P. Paulsen, F. J. Smulders and F. Hilbert, 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. Int J Food Microbiol, 97 (1): 23-29.

64- McDermott, P. F., P. Cullen, S. K. Hubert, S. D. McDermott, M. Bartholomew, S. Simjee and D. D. Wagner, 2005. Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed virginiamycin. Appl Environ Microbiol, 71 (9): 4986-4991.

65- Miles, R. D., G. D. Butcher, P. R. Henry and R. C. Littell, 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. Poult Sci, 85 (3): 476-485.

66- Milton, I. D., C. L. Hewitt and C. R. Harwood, 1992. Cloning and sequencing of a plasmid-mediated erythromycin resistance determinant from *Staphylococcus xylosum*. FEMS Microbiol Lett, 76 (1-2): 141-147.

67- Ming, L. J. and J. D. Epperson, 2002. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. J Inorg Biochem, 91 (1): 46-58.

68- Mukhtar, T. A. and G. D. Wright, 2005. Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. Chem Rev, 105 (2): 529-542.

- 69- Murray, B. E., K. V. Singh, J. D. Heath, B. R. Sharma and G. M. Weinstock, 1990. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol, 28 (9): 2059-2063.
- 70- Nallapareddy, S. R., R. W. Duh, K. V. Singh and B. E. Murray, 2002. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 40 (3): 868-876.
- 71- Ohki, R., K. Tateno, Y. Okada, H. Okajima, K. Asai, Y. Sadaie, M. Murata and T. Aiso, 2003. A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. J Bacteriol, 185 (1): 51-59.
- 72- Paterson, D. L., 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Infect Control, 34 (5 Suppl 1): S20-28; discussion S64-73.
- 73- Patino, L. A., M. Chippaux, P. Courvalin and B. Perichon, 2005. Silencing of glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405 by novobiocin. Antimicrob Agents Chemother, 49 (4): 1419-1425.
- 74- Pedroso, A. A., J. F. Menten, M. R. Lambais, A. M. Racanicci, F. A. Longo and J. O. Sorbara, 2006. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. Poult Sci, 85 (4): 747-752.
- 75- Perreten, V. and P. Boerlin, 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicrob Agents Chemother, 47 (3): 1169-1172.
- 76- Phillips, I., 1999. The use of bacitracin as a growth promoter in animals produces no risk to human health. J Antimicrob Chemother, 44 (6): 725-728.
- 77- Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston and J. Waddell, 2004. Antibiotic use in animals. J Antimicrob Chemother, 53 (5): 885; author reply 886.
- 78- Prescott, J. F., R. Sivendra and D. A. Barnum, 1978. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. Can Vet J, 19 (7): 181-183.
- 79- Rende-Fournier, R., R. Leclercq, M. Galimand, J. Duval and P. Courvalin, 1993. Identification of the *satA* gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. Antimicrob Agents Chemother, 37 (10): 2119-2125.
- 80- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg and J. C. Wootton,

1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. Mol Microbiol, 4 (7): 1207-1214.
- 81- Sarmah, A. K., M. T. Meyer and A. B. Boxall, 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere, 65 (5): 725-759.
- 82- Shah, A. A., F. Hasan, S. Ahmed and A. Hameed, 2004. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. Res Microbiol, 155 (6): 409-421.
- 83- Shea, K. M., 2003. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? Pediatrics, 112 (1 Pt 2): 253-258.
- 84- Simjee, S., D. G. White, J. Meng, D. D. Wagner, S. Qaiyumi, S. Zhao, J. R. Hayes and P. F. McDermott, 2002. Prevalence of streptogramin resistance genes among *Enterococcus* isolates recovered from retail meats in the Greater Washington DC area. J Antimicrob Chemother, 50 (6): 877-882.
- 85- Singh, K. V., K. Malathum and B. E. Murray, 2001. Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. Antimicrob Agents Chemother, 45 (1): 263-266.
- 86- Singh, K. V., G. M. Weinstock and B. E. Murray, 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. Antimicrob Agents Chemother, 46 (6): 1845-1850.
- 87- Smith, J. L., D. J. Drum, Y. Dai, J. M. Kim, S. Sanchez, J. J. Maurer, C. L. Hofacre and M. D. Lee, 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. Appl Environ Microbiol, 73 (5): 1404-1414.
- 88- Soltani, M., D. Beighton, J. Philpott-Howard and N. Woodford, 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. Antimicrob Agents Chemother, 44 (2): 433-436.
- 89- Teuber, M., 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. Cell Mol Life Sci, 56 (9-10): 755-763.
- 90- von Baum, H. and R. Marre, 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. Int J Med Microbiol, 295 (6-7): 503-511.

- 91- Wegener, H. C., F. M. Aarestrup, L. B. Jensen, A. M. Hammerum and F. Bager, 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. Emerg Infect Dis, 5 (3): 329-335.
- 92- Werner, G. and W. Witte, 1999. Characterization of a new enterococcal gene, *satG*, encoding a putative acetyltransferase conferring resistance to Streptogramin A compounds. Antimicrob Agents Chemother, 43 (7): 1813-1814.
- 93- Werner, G., B. Hildebrandt and W. Witte, 2003. Linkage of *erm(B)* and *aadE-sat4-aphA-3* in multiple-resistant *Enterococcus faecium* isolates of different ecological origins. Microb Drug Resist, 9 Suppl 1 S9-16.
- 94- Wicker, D. L., W. N. Iscrigg and J. H. Trammell, 1977. The control and prevention of necrotic enteritis in broilers with zinc bacitracin. Poult Sci, 56 (4): 1229-1231.
- 95- Wise, M. G. and G. R. Siragusa, 2007. 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, 102 (4): 1138-1149.
- 96- Witte, W., 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. Int J Antimicrob Agents, 16 Suppl 1 S19-24.
- 97- Witte, W., 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. Int J Antimicrob Agents, 14 (4): 321-325.
- 98- Wright, G. D., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev, 57 (10): 1451-1470.
- 99- Yang, H., S. Chen, D. G. White, S. Zhao, P. McDermott, R. Walker and J. Meng, 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol, 42 (8): 3483-3489.
- 100- Yonath, A., 2005. Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation. Annu Rev Biochem, 74 649-679.
- 101- Yu, E. W., J. R. Aires and H. Nikaido, 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. J Bacteriol, 185 (19): 5657-5664.
- 102- Zhao, S., D. G. White, B. Ge, S. Ayers, S. Friedman, L. English, D. Wagner, S. Gaines and J. Meng, 2001. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol, 67 (4): 1558-1564.

## 11 ANNEXE I

Figure 1 : Courbe standard utilisée lors du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène *bcrR*

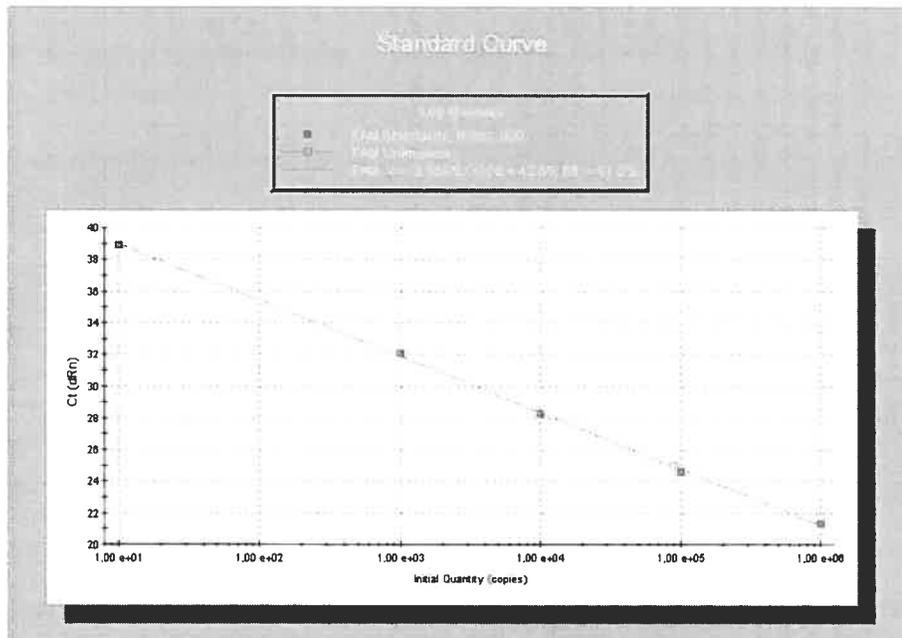
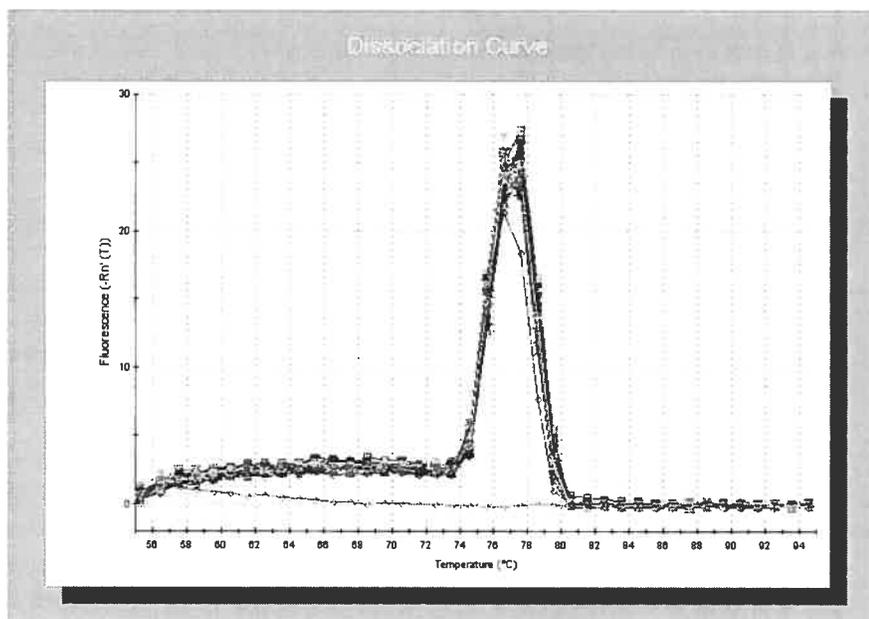
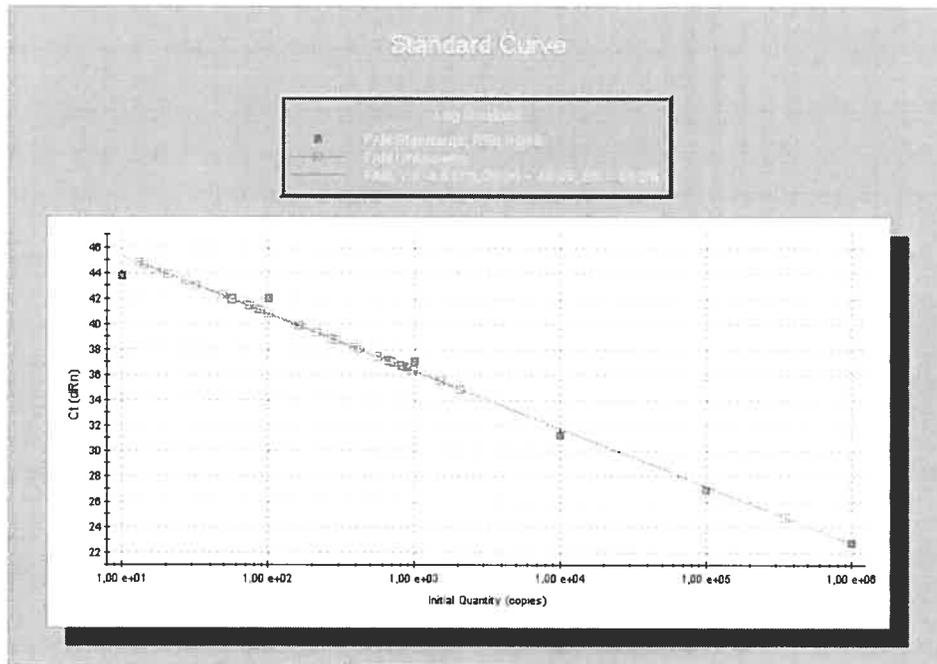


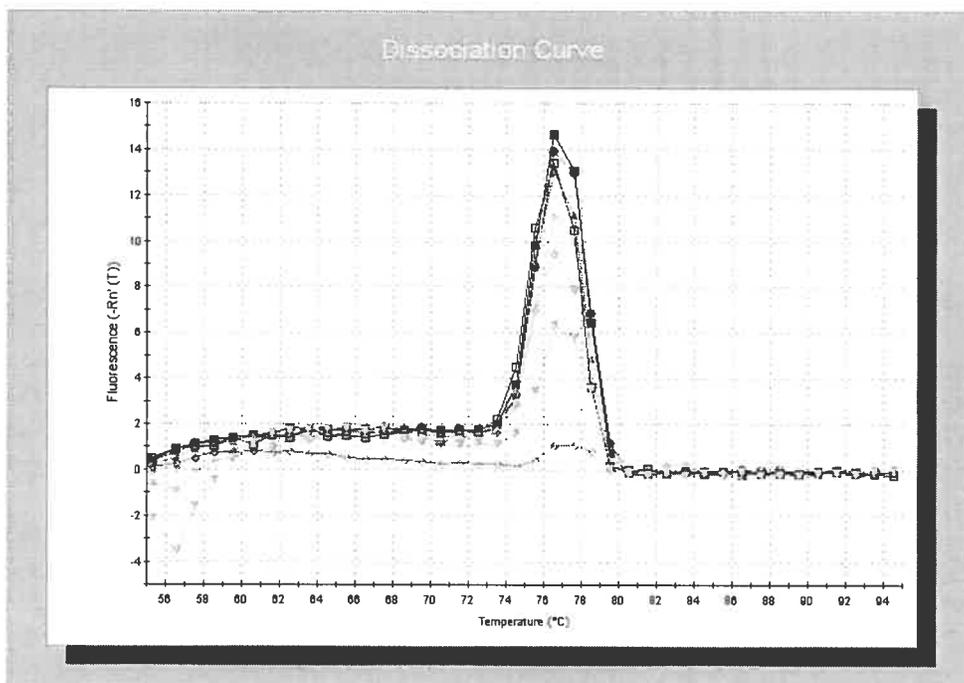
Figure 2 : Courbe de dénaturation du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène *bcrR*



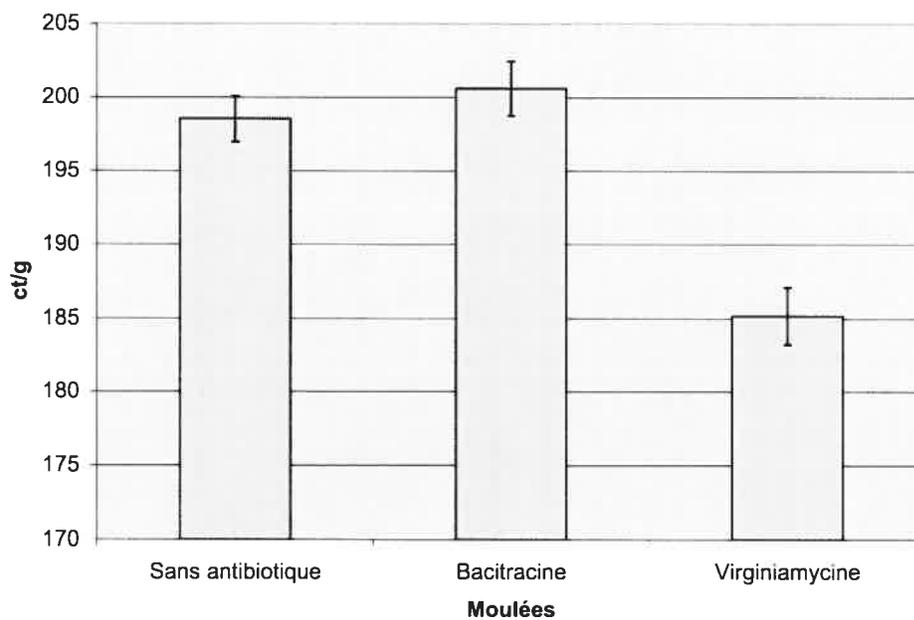
**Figure 3 : Courbe standard utilisée lors du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène *vatD***



**Figure 4 : Courbe de dénaturation du PCR en Temps-Réel pour quantifier le gène *vatD***



**Figure 5 : Quantification du gène de résistance à la virginiamycine *vatD* tel qu'obtenu par PCR en Temps-Réel**



## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Alexandre Thibodeau		
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Thibodeau, Alexandre., Quesy, Sylvain., Houde, Alain., Guévremont, Évelyne., Topp, Edd., Diarra, Moussa Sory., Letellier, Ann.	
Effect of Growth Promoters Zinc Bacitracin and Virginiamycin on the Antibiotic Resistance Profiles of Enteric Bacteria from Broiler Chicken: a Field Study.	
Poultry Science	En voie de soumission

### DÉCLARATION DES COAUTEURS

*A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Alexandre Thibodeau inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **EFFET DES PROMOTEURS DE CROISSANCE BACITRACINE DE ZINC ET VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE LA MICROFLORE INTESTINALE DU POULET À GRILLER : ÉTUDE TERRAIN***

Quesy, Sylvain		20/04/07
Letellier, Ann		25/04/07
Houde Alain		
Guévremont Evelyne		
Diarra Moussa Sory		
Topp Edward		

## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Alexandre Thibodeau		
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Thibodeau, Alexandre., Quessy, Sylvain., Houde, Alain., Guévremont, Évelyne., Topp, Edward., Diarra, Moussa Sory., Letellier, Ann.	
Effect of Antibiotic Growth Promoters zinc Bacitracin and Virginiamycin on the Antibiotic Resistance reservoir of Broiler Chicken: a Field Study.	
Poultry Science	En voie de soumission

### DÉCLARATION DES COAUTEURS

*À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Alexandre Thibodeau inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **EFFET DES PROMOTEURS DE CROISSANCE BACITRACINE DE ZINC ET VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES SUR LA MICROFLORE DU POULET À GRILLER : ÉTUDE TERRAIN***

Quessy, Sylvain		
Letellier, Ann		
Houde Alain		2007/04/15
Guévremont Évelyne		
Diarra Moussa Sory		
Topp Edward		

## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Alexandre Thibodeau		
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Thibodeau, Alexandre., Qussy, Sylvain., Houde, Alain., Guévremont, Évelyne., Topp, Edward., Diarra, Moussa Sory., Letellier, Ann.	
Effect of Antibiotic Growth Promoters Zinc Bacitracin and Virginiamycin on the Antibiotic Resistance reservoir of Broiler Chicken: a Field Study.	
Poultry Science	En voie de soumission

### DÉCLARATION DES COAUTEURS

*A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Alexandre Thibodeau inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre EFFET DES PROMOTEURS DE CROISSANCE BACITRACINE DE ZINC ET VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES SUR LA MICROFLORE DU POULET À GRILLER : ÉTUDE TERRAIN*

Qussy, Sylvain		
Letellier, Ann		
Houde Alain		
Guévremont Évelyne		2007-04-16
Diarra Moussa Sory		
Topp Edward		

## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant		
Alexandre Thibodeau		
Signature		
M.Sc.		
Sciences vétérinaires		Microbiologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Thibodeau, Alexandre; Quessy, Sylvain; Houde, Alain; Guévremont, Évelyne; Topp, Edward; Diarra, Moussa Sory; Letellier, Ann.	
Effect of Antibiotic Growth Promoters Zinc Bacitracin and Virginiamycin on the Antibiotic Resistance reservoir of Broiler Chicken: a Field Study.	
Poultry Science	En voie de soumission

### DÉCLARATION DES COAUTEURS

<p><i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Alexandre Thibodeau inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre <b>EFFET DES PROMOTEURS DE CROISSANCE BACITRACINE DE ZINC ET VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES SUR LA MICROFLORE DU POULET À GRILLER : ÉTUDE TERRAIN</b></i></p>		
Quesy, Sylvain		
Letellier, Ann		
Houde Alain		
Guévremont Evelyne		
Diarra Moussa Sory		April 18, 2007
Topp Edward		

FAX # 1 - 450 - 778 - 8157

**ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE**

**IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT**

Alexandre Thibodeau		
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

**DESCRIPTION DE L'ARTICLE**

Thibodeau, Alexandre., Quessy, Sylvain., Houde, Alain., Guévremont, Évelyne., Topp, Edward., Diarra, Moussa Sory., Letellier, Ann.		
Effect of Antibiotic Growth Promoters Zinc Bacitracin and Virginiamycin on the Antibiotic Resistance reservoir of Broiler Chicken: a Field Study.		
Poultry Science		En voie de soumission

**DÉCLARATION DES COAUTEURS**

*À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Alexandre Thibodeau inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **EFFET DES PROMOTEURS DE CROISSANCE BACITRACINE DE ZINC ET VIRGINIAMYCINE SUR LES PROFILS DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES SUR LA MICROFLORE DU POULET À GRILLER : ÉTUDE TERRAIN***

Quessy, Sylvain				
Letellier, Ann				
Houde Alain				
Guévremont Évelyne				
Diarra Moussa Sory				
Topp Edward				17/4/2007

