

Université de Montréal

Impacts de divers régimes d'élevage sur l'abondance des gènes de résistance et sur le
microbiote cæcal de poulets de chair au Québec

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Par

Catherine Turcotte

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)

en sciences vétérinaires, option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Avril 2020

© Catherine Turcotte, 2020

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Impacts de l'utilisation et du retrait des antibiotiques sur l'abondance des gènes de résistance
et sur le microbiote cæcal de poulets de chair au Québec**

Présenté par

Catherine Turcotte

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Caroline Côté

Présidente-rapporteuse

Marie-Lou Gaucher

Directrice de recherche

Sylvain Quessy

Codirecteur

Alexandre Thibodeau

Codirecteur

Edward Topp

Codirecteur

Cécile Aenishaenslin

Membre du jury

Résumé

Le problème croissant de l'antibiorésistance fait en sorte que l'utilisation systématique des antibiotiques en production animale n'est plus considérée comme une pratique raisonnable et viable. De plus, la préservation de l'efficacité des antibiotiques représente un enjeu majeur pour la santé publique et la santé animale. Les Producteurs de poulet du Canada ont élaboré et mis en place une stratégie de réduction de l'utilisation des antibiotiques ayant comme objectif ultime d'éliminer l'utilisation préventive des antibiotiques d'importance en médecine humaine dans les productions de poulets à griller et de dindons. Alors que l'on sait que la réduction des antibiotiques en élevage de poulets de chair est associée à une augmentation de l'incidence d'entérite nécrotique causée par *Clostridium perfringens*, dont une proportion de cette population bactérienne produit l'entérotoxine qui peut engendrer des conséquences sur la santé humaine, il est difficile de prédire les impacts réels d'une telle stratégie sur les écosystèmes complexes que sont l'intestin des oiseaux et les élevages commerciaux de poulets de chair. Les principaux objectifs de la présente étude étaient donc de quantifier l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques, d'évaluer la présence de *C. perfringens* et de son entérotoxine et de caractériser la composition du microbiote cæcal dans les bâtiments de six fermes commerciales de poulets de chair, au Québec. À court terme (15 mois), les bâtiments de ces fermes ont été soumis à un régime conventionnel ou à un régime sans antibiotiques. Puis, à long terme (6 ans), les bâtiments ont utilisé un régime promouvant une utilisation judicieuse des antibiotiques ou un régime conventionnel. La mise en place d'un régime sans antibiotiques pendant une période de 15 mois n'a pas permis d'observer une réduction de l'abondance de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, contrairement à l'utilisation judicieuse des antibiotiques pendant 6 ans. Le retrait des antibiotiques à court terme et l'utilisation judicieuse à long terme ont modifié la composition du microbiote cæcal, les familles de *Ruminococcaceae* et de *Lachnospiraceae* étant influencées négativement, en plus de diminuer les performances zootechniques et d'augmenter les populations de *C. perfringens* à court terme. Le régime conventionnel à long terme dans les élevages commerciaux de poulets de chair a été associé à une augmentation de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dans de nombreuses fermes. Cette étude met en évidence les

impacts potentiels des différents régimes d'élevage en production avicole et aidera à orienter les futures politiques afin de réduire l'utilisation des antibiotiques et ultimement contrer le phénomène de la résistance aux antibiotiques.

Mots-clés : Poulets de chair, Retrait des antibiotiques, Gène de résistance, Résistance aux antibiotiques, Microbiote, Régime conventionnel, Régime sans antibiotiques, Utilisation judicieuse des antibiotiques, Santé, *Clostridium perfringens*.

Abstract

The ever-increasing problem of antibiotic resistance makes routine use of antibiotics in animal production no longer considered as a reasonable and viable practice. Preserving the effectiveness of antibiotics represents a major challenge for public and animal health. The Chicken Farmers of Canada have developed and are implementing an Antimicrobial Use Reduction Strategy which ultimate goal is eliminating the preventive use of medically-important antibiotics in broiler chicken and turkey productions. While it is known that the reduction of antibiotics in broiler chicken farms is associated with an increase in the incidence of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*, to which a proportion of this bacterial population produces the enterotoxin who can also generates consequences for human health, very little is known about the real overall impact of an antibiotic use reduction strategy in complex ecosystems such as the bird intestine or the commercial broiler chicken farm. The main objectives of the present study were to quantify the abundance of antibiotic resistance genes, to assess the presence of *Clostridium perfringens* and his enterotoxin and to characterize the composition of the cæcal microbiota in broiler chicken flocks from six commercial farms located in Québec and submitted to either a short-term conventional or drug-free program (15 months) or a long-term conventional or judicious antibiotic use program (six years). Implementing an antibiotic-free program over a 15-month period did not reduce the abundance of many antibiotic resistance-encoding genes, whereas a judicious use of antibiotics over six years did. The short-term antibiotic withdrawal and the long-term judicious use strategy altered the cæcal microbiota composition, with *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* families being negatively impacted, in agreement with the lower production performance and with the increased *C. perfringens* populations observed for farms phasing out the use of antibiotics in a short-term antibiotic withdrawal. Adopting a long-term conventional rearing program on commercial broiler chicken farms selected for specific antibiotic resistance-encoding genes in many barns. This study highlights the potential impacts of different rearing programs in poultry production and will help guide future policies in order to reduce the use of antibiotics and ultimately reduce the phenomenon of antibiotic resistance.

Keywords: Commercial broiler chickens, Antibiotic withdrawal, Resistance gene, Antibiotic resistance, Microbiota, Conventional program, Drug-free program, Judicious antibiotic use, Health, *Clostridium perfringens*.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	13
Liste des sigles et abréviations.....	15
Remerciements.....	17
Introduction.....	18
Recension de la littérature.....	21
2.1 L'utilisation des antibiotiques en industrie avicole au Canada.....	22
2.1.1 Les réformes multisectorielles portant sur l'utilisation des antibiotiques.....	22
2.1.2 L'utilisation des antibiotiques, d'hier à aujourd'hui.....	25
2.1.3 Les alternatives aux antibiotiques.....	27
2.2 La résistance aux antibiotiques.....	29
2.2.1 Les perspectives historiques de l'antibiorésistance.....	29
2.2.2 Les principes de l'antibiorésistance.....	30
2.2.3 La résistance aux antibiotiques en médecine avicole.....	32
2.2.3.1 Les antibiotiques de catégorie 1 et les mécanismes de résistance associés ...	33
2.2.3.1.1 Fluoroquinolones et céphalosporines de 3 ^e génération.....	33
2.2.3.1.2 Polymyxines.....	33
2.2.3.2 Les antibiotiques de catégorie 2 et les mécanismes de résistance associés....	34
2.2.3.2.1 Lincosamides, Macrolides et Streptogramines.....	34

2.2.3.2.2	Pénicillines.....	36
2.2.3.2.3	Triméthoprim et sulfamides.....	36
2.2.3.3	Les antibiotiques de catégorie 3 et les mécanismes de résistance associés....	37
2.2.3.3.1	Aminocyclitols	37
2.2.3.3.2	Bacitracine.....	38
2.2.3.3.3	Tétracyclines.....	39
2.2.4	La résistance aux antibiotiques dans une perspective de santé publique	40
2.3	Les impacts de la réduction des antibiotiques.....	40
2.3.1	L'antibiorésistance et les gènes de résistance aux antibiotiques.....	40
2.3.2	Les pathogènes alimentaires zoonotiques.....	42
2.3.2.1	<i>Clostridium perfringens</i> entérotoxigène.....	44
2.3.3	Les populations bactériennes indicatrices issues du microbiote intestinal.....	45
2.4	Le microbiote intestinal du poulet.....	46
2.4.1	Les rôles du microbiote	47
2.4.2	L'étude du microbiote.....	49
2.4.2.1	Le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S	49
2.4.2.2	Les analyses bio-informatiques.....	50
2.4.3	Les facteurs qui modulent le microbiote	52
2.4.4	La composition du microbiote cæcal	54
2.4.4.1	L'impact de l'utilisation des antibiotiques sur le microbiote cæcal	56
	Hypothèses et objectifs.....	59
	Article scientifique.....	61
4.1	Abstract	63
4.2	Introduction.....	64

4.3	Material and methods.....	66
4.3.1	Study Design.....	66
4.3.2	Sample collection	66
4.3.3	DNA extraction from cæcal samples.....	67
4.3.4	Detection of gene targets.....	67
4.3.5	Quantification of antibiotic resistance gene targets	68
4.3.6	16S rRNA gene amplicon sequencing.....	69
4.3.7	Data analysis and statistics.....	71
4.4	Results	73
4.4.1	Detection of gene targets.....	73
4.4.2	Quantification of antibiotic resistance gene targets	73
4.4.3	16S rRNA gene amplicon metagenomic sequencing	76
4.5	Discussion.....	78
4.6	Tables	86
4.7	Figures.....	91
4.8	Supplementary Material	96
	Discussion.....	118
5.1	Méthodologie.....	119
5.1.1	Sélection des fermes participantes.....	119
5.1.2	Nombre de fermes participantes	120
5.1.3	Information relative à la régie et l'utilisation des antibiotiques entre 2012 et 2018	120
5.1.4	Échantillonnage.....	121
5.1.5	Analyse du microbiote cæcal	121

5.2	Résultats	122
5.2.1	Gènes de résistance aux antibiotiques	122
5.2.2	<i>Clostridium perfringens</i> et son entérotoxine	124
5.2.3	Microbiote cæcal.....	125
5.2.3.1	Diversité alpha	125
5.2.3.2	Diversité bêta	126
5.2.3.3	Communautés microbiennes.....	128
5.3	Perspectives	130
	Conclusions.....	133
	Références bibliographiques.....	135

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau 1. – Stratégie de l’UAM mise en place par les PPC (adapté des PPC, 2018) (2).....24

Tableau 2. – Classification des souches de *C. perfringens* selon la présence des gènes codant pour les toxines majeures (adapté de Rood et al., 2018) (88).....44

Article scientifique

Table 1. – Sample treatment and PCR detection results.....86

Table 2. – A) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices between conventional and drug-free flocks after the 15-month study (sampling time point one) using a linear mixed model. B) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices, six years after the 15-month study (sampling time point two), between flocks from barns that adopted a long-term judicious use strategy (judicious), flocks that continued the conventional rearing program (continued) and flocks that reintroduced antibiotics after the 15-month study (reintroduced) using a linear mixed model.....87

Table 3. – A) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices, for farms C, D, E and F, between barns sampled after the 15-month study (sampling time point one) and six years later (sampling time point two) using a linear mixed model. B) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices, for farms A and B, between barns at sampling time points one and two, using a linear mixed model.....88

Table 4. – Bacterial members associated with the drug-free program after the 15-month study using MaAsLin2 at the genus level.....89

Table 5. – Bacterial members associated with the judicious use of antibiotics, for farms A and B, six years after the 15-month study using MaAsLin2 at the genus level.....90

Supplementary Material

Table S1. – Primers and reaction conditions for gene targets PCR amplification.....	97-98
Table S2. – Primers, probes and conditions for qPCR amplifications.....	99
Table S3. – Bacterial members associated with the drug-free program after the 15-month study using MaAsLin2 at the OTU level.....	101-103
Table S4. – Bacterial members associated with the rearing programs, at sampling time point two, using MaAsLin2 at the OTU level.....	104-116
Table S5. – Bacterial members associated with the reintroduction of antibiotics, at sampling time point two, using MaAsLin2 at the genus level.....	117

Liste des figures

Revue de littérature

Figure 1. – Proportion des antibiotiques utilisés chez les poulets de chair au Canada, en 2016, avec la catégorisation des antimicrobiens de Santé Canada (adaptée du PICRA, 2018) (3, 20) ...	26
Figure 2. – Structure de l'intégron de classe 1 (adaptée de Drouin et al., 2002) (42).....	31
Figure 3. – Densité et composition du microbiote intestinal du poulet (adaptée de Yadav et al., 2019) (24)	55

Article scientifique

Figure 1. – Difference of resistance gene targets between drug-free and conventional flocks for each farm at sampling time point one.....	91
Figure 2. – Difference of resistance gene targets between paired flocks sampled from conventional barns at sampling time point one and sampling time point two.....	92
Figure 3. – Difference of resistance gene targets between paired flocks sampled from drug-free barns at sampling time point one and sampling time point two.....	93
Figure 4. – Difference of resistance gene targets at sampling time point two between flocks of a same participating farm that adopted either a conventional rearing program or a program for judiciously using antibiotics after the completion of the 15-month study period, considering the barn that was on a drug-free program during the 15-month study period as the comparison reference unit.....	94
Figure 5. – Beta diversity calculated with Jaccard index using ADONIS test with a significance level of 0.05.....	95

Supplementary Material

Figure S1. – Study design.....96

Figure S2. – Beta diversity calculated with Bray-Curtis index using ADONIS test with a
significance level of 0.05.....100

Liste des sigles et abréviations

ACMV : Association canadienne des médecins vétérinaires

ARNr : ARN ribosomal

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPE : Entérotoxine de *Clostridium perfringens*

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

OMVQ : Ordre des médecins vétérinaires du Québec

OTU : Unité taxonomique opérationnelle

PICRA : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

PPC : Producteurs de poulet du Canada

UAM : Utilisation d'antimicrobiens

UP : Undecaprénol monophosphate

UPP : Undecaprényl pyrophosphate

À mon amour et ma famille, ce que j'ai de plus précieux

Remerciements

Merci à ma directrice Marie-Lou Gaucher de m'avoir confié ce si beau projet. Merci pour ta confiance, ton écoute, ta compréhension, ton support et ton positivisme. Merci de m'avoir partagé ta passion pour la recherche.

Merci à mon codirecteur Alexandre Thibodeau de m'avoir supportée et encouragée dans cette grande aventure. Merci pour ta disponibilité, tes conseils et ton enthousiasme.

Merci à mon codirecteur Sylvain Quessy de m'avoir épaulée dans mon cheminement à la maîtrise. Merci pour votre grande générosité et vos précieux conseils.

Merci à mon codirecteur Edward Topp de m'avoir accueillie chaleureusement et m'avoir partagé de nombreuses connaissances. Merci pour votre support tout au long de mon parcours.

Merci aux membres de mon comité conseil pour votre support ainsi qu'aux membres du jury pour l'évaluation de ce travail.

Merci à tous (tes) mes amis (es) et membres de la Chaire de recherche en salubrité des viandes pour votre aide au laboratoire. Merci pour ces belles amitiés et ces beaux souvenirs.

Merci à la Faculté de médecine vétérinaire, plus spécifiquement au comité des bourses des cycles supérieurs, ainsi qu'au Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole de m'avoir attribué de nombreuses bourses d'études. J'aimerais également remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur support financier au projet.

Merci aux fermes ayant accepté de participer à ce projet.

Merci à mon amour et ma famille de m'avoir encouragée à entreprendre ce projet et de m'avoir supportée en cours de route. Je vous aime. XXX

Introduction

L'industrie de la volaille au Canada fait face à un vent de changement depuis quelques années en ce qui a trait à l'utilisation des antibiotiques. Par ailleurs, l'utilisation des antibiotiques à titre de promoteurs de croissance et en prévention des maladies n'est plus considérée comme une pratique responsable étant donné l'ampleur du phénomène de résistance aux antibiotiques (1). La difficulté, voire l'incapacité à traiter les infections résistantes aux antibiotiques, menace la santé et le bien-être animal. De plus, le risque de transmission de pathogènes zoonotiques résistants aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques par la chaîne alimentaire représente un enjeu important pour la santé du consommateur (2).

Afin de s'engager dans la lutte contre l'antibiorésistance, en 2012, les Producteurs de poulet du Canada (PPC) ont mis en place la *Stratégie de réduction de l'utilisation d'antimicrobiens* (UAM) ayant pour objectif d'éliminer progressivement l'utilisation préventive des antibiotiques de catégorie 1, 2 et 3, selon la classification de Santé Canada (3), en 2014, 2019 et 2020, respectivement (2). Cependant, considérant les connaissances limitées sur le sujet, il est difficile de prédire quelles seront les retombées à long terme d'une telle stratégie sur la résistance aux antibiotiques dans les élevages commerciaux de poulets de chair. De plus, la réduction préventive des antibiotiques comporte de nombreux défis en ce qui a trait à la gestion de la santé des oiseaux. Cette réduction semble augmenter l'incidence de l'entérite nécrotique causée par *Clostridium perfringens*, causant alors des problèmes de santé importants ainsi que des impacts négatifs sur les performances dans les élevages commerciaux de poulets de chair (4). L'augmentation de l'incidence de *C. perfringens* dans les élevages de poulets de chair pourrait s'avérer un enjeu de santé publique considérant le potentiel zoonotique de ce pathogène et de son entérotoxine. Afin de mieux comprendre les impacts de la réduction des antibiotiques sur l'hôte, l'étude du microbiote intestinal représente une avenue prometteuse, puisque les interactions entre les microorganismes du microbiote ont des effets sur l'hôte et influencent notamment le système immunitaire, l'apport nutritionnel et la colonisation par des pathogènes (5).

Dans le but de mieux répondre à ces différentes problématiques, les trois principaux objectifs de ce projet étaient de quantifier l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques, de détecter la présence de *C. perfringens* et de son entérotoxine et de caractériser le microbiote

cæcal de poulets de chair issus d'élevages commerciaux au Québec selon différents régimes d'utilisation des antibiotiques et différentes périodes de temp

Recension de la littérature

2.1 L'utilisation des antibiotiques en industrie avicole au Canada

2.1.1 Les réformes multisectorielles portant sur l'utilisation des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être utilisés en industrie animale à des fins de promotion de la croissance, de prévention et de traitement des maladies (6). Par contre, l'utilisation excessive des antibiotiques, critiquée par certains (7), contribue au développement de l'antibiorésistance. La diminution de l'efficacité des antibiotiques et le développement limité de nouvelles molécules sont par ailleurs inquiétants. À cet effet, le gouvernement du Canada s'est mobilisé et a lancé son premier plan d'action en 2015, précédé du cadre d'action fédéral en 2014 afin d'harmoniser les actions des différents ministères en ce qui a trait à la gestion de l'antibiorésistance (8, 9). Puis, en 2017, l'Agence de la santé publique du Canada a publié son cadre d'action pancanadien, en cohérence avec l'approche « Une seule santé », afin de coordonner les actions et favoriser la collaboration des différents secteurs impliqués dans la lutte contre l'antibiorésistance, dont le secteur privé comme l'industrie et les organismes non gouvernementaux (10). Toujours dans l'optique d'uniformiser les actions à l'échelle canadienne contre l'antibiorésistance, en décembre 2018, le gouvernement du Canada a retiré les allégations de promotions de la croissance sur les étiquettes des produits antimicrobiens (11). Également, depuis cette date, l'emploi des antimicrobiens d'importance en médecine humaine, auparavant vendus en vente libre partout au Canada sauf au Québec, nécessite la supervision et l'ordonnance d'un médecin vétérinaire (11).

Devant le besoin d'une surveillance vétérinaire sur l'utilisation des antibiotiques au Canada et afin de guider les provinces et les territoires qui régissent la profession vétérinaire, en collaboration avec différents partenaires en santé animale, l'association canadienne des médecins vétérinaires (ACMV) a élaboré le document *Surveillance vétérinaire de l'utilisation des antimicrobiens – Un cadre de travail pancanadien pour les normes professionnelles régissant les médecins vétérinaires* (12). Ce document émet des recommandations, propose plusieurs normes et définit le rôle des vétérinaires. Ceux-ci jouent un rôle déterminant quant à la gestion de l'antibiorésistance. Ils possèdent les connaissances et les compétences nécessaires pour prescrire des traitements adéquats (antibiotiques) basés sur un portrait clinique. Les vétérinaires ont la

responsabilité d'utiliser les antibiotiques de façon judicieuse et ils doivent considérer la catégorisation des antimicrobiens de Santé Canada. En fonction de l'indication et de la disponibilité des antibiotiques utilisés en remplacement pour le traitement d'infections en médecine humaine, les antibiotiques sont classés en 4 catégories allant de très haute importance (catégorie 1), haute importance (catégorie 2), moyenne importance (catégorie 3) et faible importance (catégorie 4) (3). Ainsi, pour les antibiotiques de très haute importance (catégorie 1), ceux-ci sont utilisés en priorité pour le traitement d'infections graves en santé humaine et les molécules alternatives au traitement sont rares ou absentes. Il est alors primordial de préserver l'efficacité de ces molécules (3). De plus, à la suite d'une des recommandations du cadre de travail pancanadien, l'ACMV et le Conseil canadien des registraires vétérinaires (CCRV) ont élaboré *La cascade décisionnelle thérapeutique pour la sécurité des animaux et du public*. Appuyée par l'Ordre des médecins vétérinaires du Québec (OMVQ), la cascade encadre l'utilisation des préparations magistrales et propose d'utiliser des produits vétérinaires éprouvés et selon les directives de l'étiquette de prime abord, suivi de l'utilisation des produits vétérinaires approuvés en dérogation aux directives de l'étiquette (13). Également, puisque la réalisation de formations continues fait partie de la responsabilité des vétérinaires, il est important d'offrir des formations sur l'utilisation judicieuse des antibiotiques. L'OMVQ, en 2015, a d'ailleurs imposé aux médecins vétérinaires une formation obligatoire de 6 heures à ce sujet, du jamais vu au Canada jusque-là (14).

À l'échelle provinciale, le Québec participe activement à une utilisation plus responsable des antibiotiques. Proactives, plusieurs organisations ont collaboré à la mise en place du *Plan d'action sur l'antibiogouvernance 2017-2022* afin de favoriser l'utilisation judicieuse des antibiotiques dans le domaine vétérinaire et bioalimentaire. La surveillance, l'éducation, la réglementation, la prévention sont des exemples de sujets ciblés (15). Tous les partenaires participants visent la réalisation de certains de ces objectifs d'ici 2022. Par exemple, issu de ce plan, le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) a lancé le 25 février 2019 une nouvelle réglementation encadrant et restreignant l'utilisation des antibiotiques de catégorie 1 chez les animaux de consommation (16).

Les initiatives pour la lutte contre la résistance aux antibiotiques viennent de part et d'autre et n'excluent pas l'industrie avicole. Motivés à préserver un lien de confiance avec le consommateur et les gouvernements et à protéger la santé animale et publique, les PPC ont mis en place une stratégie sur l'UAM (Tableau 1, p.24). Celle-ci a concrètement interdit l'utilisation préventive des antibiotiques de catégorie 1 et 2 d'importance en médecine humaine le 15 mai 2014 et le 1^{er} janvier 2019 respectivement (2, 17). L'arrêt préventif des antibiotiques de catégorie 3 est également prévu à la fin de l'année 2020 (2). L'utilisation des antibiotiques de catégorie 4 et les anticoccidiens ne sont pas visés par cette stratégie puisqu'ils ne sont pas utilisés en médecine humaine. Tous ces changements ciblent l'utilisation préventive des antibiotiques et tentent un rapprochement vers une utilisation plus judicieuse de ces derniers, limitant dans ce cas leur utilisation à des fins thérapeutiques seulement (18). La réussite de la stratégie de l'UAM repose sur le respect de l'engagement des PPC à ne pas utiliser les antibiotiques de façon préventive selon la stratégie de l'UAM, un critère faisant partie de la grille d'audit de leur Programme de soins aux animaux *Élevé par un producteur canadien à la ferme*, un programme s'assurance qualité. Les auditeurs des PPC s'assurent que les PPC respectent et appliquent le programme (19). Annuellement, ceux-ci audient 25% des fermes, ce qui fait en sorte que toutes les fermes du Canada sont auditées après 4 ans.

Catégorisation des antimicrobiens selon Santé Canada	Antimicrobiens	Utilisation préventive
1	Fluoroquinolones	Arrêt en 2014
	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	
	Lincosamides-aminocyclitols	
	Lincosamides	
2	Aminoglycosides	Arrêt à la fin 2018
	Macrolides	
	Pénicillines	
	Streptogramines	
	Triméthoprim-sulfamides	
3	Bacitracine	Arrêt prévu à la fin 2020
4	Flavophospholipols	Non ciblés par la stratégie de l'UAM des PPC
	Ionophores	

Tableau 1. – Stratégie de l'UAM mise en place par les PPC (adapté des PPC, 2018) (2)

2.1.2 L'utilisation des antibiotiques, d'hier à aujourd'hui

Au cours des dernières années, le secteur avicole au Canada a fait face à beaucoup de changements en ce qui a trait à l'utilisation des antibiotiques, notamment à cause de la stratégie de l'UAM et du retrait des allégations de promotion de la croissance sur les étiquettes des produits antimicrobiens. Il n'en demeure pas moins que la principale raison de l'utilisation des antibiotiques est la prévention des maladies (20). Avant l'interdiction d'utiliser les antibiotiques de catégorie 1 en 2014 par la stratégie des PPC, le ceftiofur était utilisé de routine au couvoir pour prévenir les infections néonatales alors que l'enrofloxacin servait à l'occasion en élevage pour le traitement de conditions d'origine bactérienne. À compter de 2014, le ceftiofur a été remplacé par la lincomycine-spectinomycine et par la gentamicine, des antibiotiques de catégorie 2 (20). Selon les données amassées par le programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA), issues de 136 fermes sentinelles, la proportion des différents antibiotiques utilisés soit dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par injection en 2016 chez les poulets de chair, au Canada, est présentée à la Figure 1 (p.26) (20). Elle dresse le portrait de l'utilisation des antibiotiques avant l'interdiction préventive des antibiotiques de catégories 2 par le biais de la stratégie de l'UAM, laquelle limitait alors l'utilisation de la lincomycine, de la lincomycine-spectinomycine, de la gentamicine, de la virginiamycine, de la pénicilline G procaine et de la tylosine. Depuis le 1^{er} janvier 2019, les antibiotiques utilisés pour la prévention des maladies sont les antibiotiques de catégorie 3, dont la bacitracine et les antibiotiques de catégorie 4 comprenant les anticoccidiens et les antibiotiques non classés comme l'avilamycine. L'interdiction de l'utilisation des antibiotiques de catégorie 3 pour la prévention des maladies est toutefois prévue à la fin 2020 (2).

En ce qui concerne l'échantillonnage effectué par le PICRA pour la collecte de données au Canada, il est pertinent de mentionner que l'échantillonnage est fait auprès d'un certain nombre de fermes sentinelles au Canada et que certaines provinces ne sont pas représentées. Toutefois, cet échantillonnage demeure représentatif de l'industrie avicole, car plusieurs critères d'inclusion et d'exclusion sont appliqués. De plus, toutes les fermes incluses dans l'échantillonnage sont sous le même régime de gestion de l'offre et sont sous le même programme d'assurance qualité. De

ce fait, les facteurs liés à l'industrie varient peu à travers le Canada, ce qui permet d'assurer une bonne représentativité des résultats.

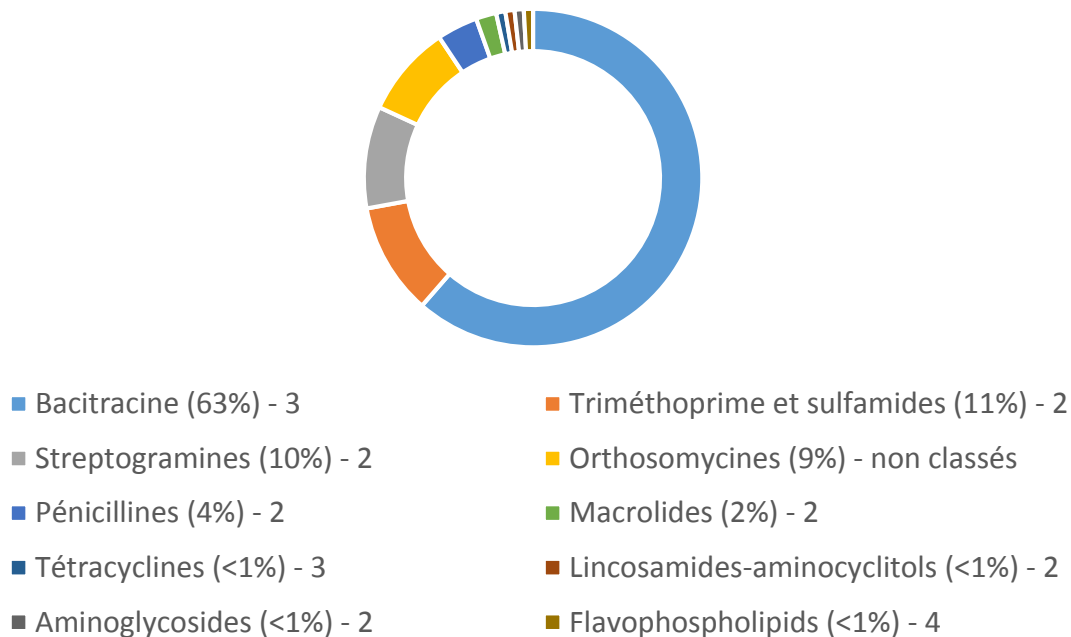


Figure 1. – Proportion des antibiotiques utilisés chez les poulets de chair au Canada, en 2016, avec la catégorisation des antimicrobiens de Santé Canada (adaptée du PICRA, 2018) (3, 20)

En ce qui a trait aux antibiotiques utilisés en traitement chez les poulets de chair, les pénicillines, le triméthoprime et les sulfamides figurent parmi les choix courants. Selon les directives de l'étiquette, parmi les pénicillines, la pénicilline G potassique est homologuée pour le traitement de l'entérite nécrotique causé par *Clostridium perfringens* (21). L'amoxicilline est utilisée pour le traitement de maladies, telle la colibacillose causée par *Escherichia coli*, entre autres. Puis, les sulfamides sont homologués, notamment, pour le traitement de la coccidiose chez les poulets par une administration dans l'eau de boisson. De plus, la combinaison triméthoprime-sulfamides peut être utilisée pour le traitement des infections causées par *C. perfringens* et *E. coli* (21).

En ce qui concerne les promoteurs de croissance, selon les rapports annuels du PICRA, leur utilisation était en baisse constante entre 2014 et 2016, passant de 4% à moins de 1 % (20, 22).

Cette diminution progressive était possiblement associée aux changements annoncés par la stratégie de l'UAM à l'époque (20). Comme mentionné plus haut, l'utilisation des promoteurs de croissance a été interdite en 2018 au Canada.

Les producteurs de poulets peuvent faire le choix d'élever leurs oiseaux sans antibiotiques. Cependant, la proportion du marché au Canada est minime pour l'élevage de poulets sans antibiotiques. Considérant que la production de ces produits nécessite des coûts de production plus importants que l'élevage conventionnel, le consommateur n'est pas prêt à payer plus cher ces produits (données de l'industrie avicole, 2020). Pour ce faire, les éleveurs sont contraints de ne recourir à aucun antibiotique ni anticoccidien pour la promotion de la croissance, la prévention et le traitement des maladies. Cependant, cette méthode d'élevage recherchée par les consommateurs entraîne des enjeux de santé et de bien-être pour les animaux, notamment associés au contrôle de l'entérite nécrotique (4). Il est alors nécessaire pour les élevages conventionnels (face à la diminution progressive de l'utilisation préventive des antibiotiques) et sans antibiotiques de mettre en place des solutions alternatives à l'utilisation des antibiotiques.

2.1.3 Les alternatives aux antibiotiques

Avec la présente stratégie de réduction de l'UAM, la mise en place de mesures préventives est un élément clé afin de mieux contrôler les maladies comme l'entérite nécrotique. La disponibilité et l'accessibilité à la moulée et à l'eau, ainsi que le contrôle de l'éclairage et de la température sont des composantes importantes de la régie à considérer dans la première semaine de vie des oiseaux puisque celles-ci favorisent une bonne santé des poussins. Cela a par le fait même des répercussions positives sur la croissance des oiseaux dans les semaines suivantes (2). La vaccination anticoccidienne au couvoir, l'acidification de l'eau et l'utilisation d'additifs alimentaires sont d'autres exemples(4). Plusieurs additifs alimentaires peuvent être utilisés. Parmi ceux-ci, on compte les probiotiques, les prébiotiques, les acides organiques, les enzymes exogènes et les huiles essentielles (23).

Les probiotiques sont considérés comme des cultures bactériennes uniques ou mixtes ayant des propriétés bénéfiques pour l'hôte. Les bactéries productives d'acide lactique dont *Bifidobacterium* sp. et *Lactobacillus salivarius* sont des exemples (24). Leurs modes d'action

incluent notamment la compétition pour l'accès à la paroi digestive et aux nutriments offrant alors une protection contre la prolifération des pathogènes, la régulation du système immunitaire, la prévention de l'inflammation et l'amélioration de la croissance (24). L'utilisation de l'acide lactique par les bactéries productrices d'acide butyrique expliquerait ce dernier mode d'action puisque le butyrate est un acide organique bénéfique pour la croissance (23).

Les prébiotiques sont des ingrédients non digestibles ajoutés à l'alimentation afin de modifier et stimuler de façon ciblée le métabolisme et la composition de certaines populations du microbiote dont les *Lactobacillus* spp. (23). De cette façon, les prébiotiques peuvent avoir des effets comparables aux probiotiques. La majorité des prébiotiques utilisés sont des oligosaccharides et leurs modes d'action varient selon la nature du produit. Notamment, chez les poulets de chair, les mannanoligosaccharides ont une affinité avec les récepteurs d'*E. coli* et de *Salmonella* spp., ce qui prévient l'attachement de ces bactéries à la muqueuse et permet leur élimination dans les matières fécales (23).

Les acides organiques sont des composantes des plantes et des tissus animaux. Ils sont aussi des produits de fermentation issus du microbiote cæcal des poulets. On compte parmi eux notamment l'acide lactique, l'acide propionate et l'acide butyrique (24). Ils ont chacun leur rôle. Par exemple, au niveau du foie, le propionate est converti en glucose. Celui-ci est ensuite utilisé comme source d'énergie pour l'hôte (24). Le butyrate, lui, représente une source d'énergie pour les cellules épithéliales de l'intestin et stimule la prolifération cellulaire (23).

Les enzymes exogènes comme les protéases, les amylases et les lipases sont des exemples d'enzymes utilisées. Elles sont d'ailleurs utilisées pour différentes raisons, notamment, afin de compléter l'arsenal enzymatique de l'animal et lui permettre de bénéficier au maximum des aliments ingérés (24). Notamment, l'administration d'une combinaison de xylase, amylase et protéase chez des poulets de chair semble favoriser la digestion des fibres améliorant ainsi les performances des oiseaux, dont le gain de poids moyen quotidien (25).

Les plantes peuvent présenter diverses propriétés et grâce à des procédés physiques, il est possible d'extraire l'huile essentielle des plantes. Celles-ci peuvent avoir notamment des propriétés antibactériennes ou des impacts positifs sur la croissance des poulets. Par ailleurs, des

études *in vitro* ont démontré que le thymol, l'eugénol et le carvacrol présentaient des activités antibactériennes importantes contre *E. coli* et *Salmonella Typhimurium* (26). De plus, dans une étude menée chez des poulets de chair, la supplémentation de thym ou d'origan de 10 à 20 grammes par Kilo de nourriture a permis d'améliorer les performances, dont le gain de poids et le taux de conversion alimentaire (27).

2.2 La résistance aux antibiotiques

2.2.1 Les perspectives historiques de l'antibiorésistance

Le phénomène de la résistance aux antibiotiques remonte à bien avant la découverte et l'utilisation des antibiotiques au début du 20^e siècle (28). La découverte de gènes de résistance dans le pergélisol datant de plusieurs milliers d'années le confirme d'ailleurs (29). Malgré le manque de certitude face à l'origine temporelle des antibiotiques, l'apparition de la résistance est probablement survenue au même moment que les premiers antibiotiques produits par certains genres bactériens (29). L'étude de l'adaptation des microorganismes dans l'environnement permet de mieux comprendre l'évolution de l'antibiorésistance. Pour la plupart, les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des microorganismes comme les actinomycètes que l'on trouve dans le sol (28). Aujourd'hui, il nous est possible de synthétiser les antibiotiques qui sont alors produits sous des formes semi-synthétiques et synthétiques (8). Selon la théorie de Charles Darwin, à l'origine, les antibiotiques étaient libérés à des fins de compétition dans l'environnement afin d'inhiber la croissance d'autres microorganismes dans les mêmes écosystèmes. Puis, exposés aux antibiotiques dans l'environnement, les microorganismes auraient développé des résistances pour leur permettre de survivre. Selon une autre hypothèse, à l'origine, les gènes de résistance aux antibiotiques, formant le résistome (une collection de matériel génétique échangeable par transfert horizontal), seraient probablement issus des microorganismes producteurs d'antibiotiques qui auraient développé des gènes de résistance afin de se protéger contre leurs propres antibiotiques (28, 30). Malgré le fait que la résistance aux antibiotiques existe depuis très longtemps, l'utilisation des antibiotiques en agriculture, en médecine humaine et en médecine vétérinaire aurait contribué à amplifier le phénomène (28). Aux Pays-Bas, une étude a d'ailleurs quantifié l'abondance de 18 gènes de résistance aux

antibiotiques entre 1940 et 2008 dans le sol. Les résultats ont permis d'observer une augmentation de l'abondance des gènes de résistance par rapport à l'an 1940. Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation des antibiotiques en agriculture et en médecine contribue au phénomène de l'antibiorésistance (31).

2.2.2 Les principes de l'antibiorésistance

Comme nous l'avons vu plus haut, le résistome est ancien et il évolue grâce à différentes forces. La pression de sélection varie en fonction du degré d'exposition des microorganismes aux antibiotiques et contribue à enrichir et disperser les gènes constituant le résistome (32, 33). En plus de la pression de sélection, l'antibiorésistance peut être influencée par le type d'antibiotique utilisé (propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques), la présence de gènes de résistance et la capacité d'intégrer et d'exprimer du matériel génétique à travers différents hôtes bactériens (6). Le résistome présente deux types de résistance : la résistance innée et la résistance acquise. La résistance innée est une résistance naturelle que possèdent des bactéries pour un ou des antibiotiques donnés. La structure de la paroi bactérienne (bactérie à Gram positif et Gram négatif) ou la présence systématique d'un gène de pompe à efflux chez une espèce ou une souche bactérienne sont des exemples pouvant donner lieu à des résistances intrinsèques qui se transmettent verticalement lors de la réplication cellulaire (28, 34, 35).

D'un autre côté, la résistance acquise est générée par l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal ou par des mutations. En présence d'un stress, comme la présence d'antibiotiques, il est intéressant de noter que les bactéries tendent à muter davantage et sont conséquemment susceptibles de développer des mécanismes de résistance (30). Outre les mutations, l'acquisition de mécanismes de résistance peut se faire par le transfert horizontal de matériel génétique par transformation, transduction ou conjugaison. La transformation est un phénomène où la bactérie absorbe de l'ADN libre de son environnement, lequel est issu de cellules mortes. La transduction met en jeu le transfert de matériel génétique non viral par l'intermédiaire d'un bactériophage. Transportant jusqu'à 100 000 paires de bases, le bactériophage peut transférer son bagage génétique chez un spectre plutôt étroit d'hôtes, car cela dépend des récepteurs qu'il peut reconnaître à la surface bactérienne (36, 37). La

conjugaison représente le transfert entre microorganismes de matériel génétique comme les plasmides et les transposons par l'intermédiaire d'un pilus sexuel (32).

Les plasmides, les transposons et les intégrons ont une faible spécificité d'hôte (38) et leur capacité d'emmagasiner de nombreux gènes de résistance joue un rôle majeur dans le développement rapide de bactéries multirésistantes (39). La combinaison de ces éléments génétiques est également possible. Alors, un plasmide peut être composé d'un transposon, lui-même constitué d'un intégron (30). Les intégrons sont des éléments génétiques qui s'intègrent dans des éléments génétiques comme les chromosomes, les plasmides et les transposons. Comparativement au chromosome, les plasmides et les transposons comportent davantage d'intégrons associés à la résistance aux antibiotiques. Ceci contribue à la dispersion de la résistance. À l'intérieur de l'intégron peuvent se loger plusieurs cassettes de gènes à la suite de l'autre. Celles-ci contiennent un nombre restreint de gènes. L'insertion des cassettes de gènes se fait grâce à l'intégrase *IntI*. La séquence de l'intégrase est d'ailleurs utilisée pour regrouper les intégrons en différentes classes, dont les intégrons de classe 1 à 5 (40, 41). Les intégrons de classe 1 sont les plus importants puisqu'ils contiennent beaucoup de gènes de résistance et ils sont rencontrés chez plusieurs agents pathogènes. Considérant ceci, seuls les intégrons de classes 1 seront présentés de façon détaillée. Une forte proportion des intégrons de classe 1 contiennent une région conservée exprimant les gènes *qacEΔ1* et *sul1* leur procurant une résistance contre les ammoniums quaternaires utilisés comme désinfectant et les sulfamides, respectivement (40). Le gène *orf5* se trouve aussi sur le segment conservé 3', mais sa fonction est inconnue (Figure 2, p. 31) (40).

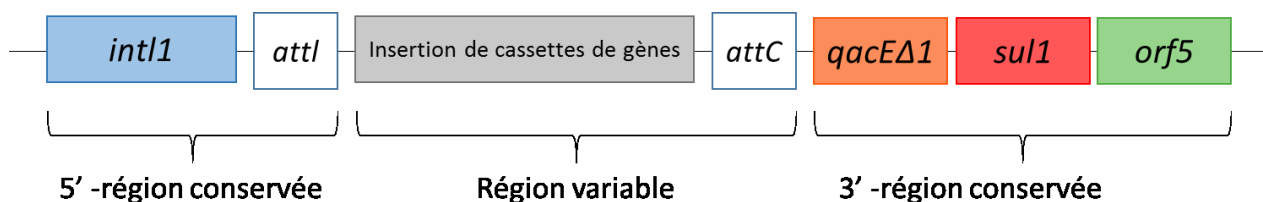


Figure 2. – Structure de l'intégron de classe 1 (adaptée de Drouin et al., 2002) (42)

L'acquisition de résistance par mutation ou transfert horizontal peut se traduire par différents mécanismes comme la modification de la cible de l'antibiotique, la modification enzymatique de

l'antibiotique, l'activation de pompe à efflux afin de sortir l'antibiotique de la cellule, la modification de la perméabilité cellulaire afin de limiter l'entrée de l'antibiotique dans la cellule ou la protection de la cible via la production de protéines (34).

2.2.3 La résistance aux antibiotiques en médecine avicole

Le PICRA et le Programme québécois d'antibiosurveillance vétérinaire sont des systèmes de surveillance au niveau fédéral et provincial, respectivement. Ils surveillent les profils de résistance de certaines bactéries entériques retrouvées chez les humains et les animaux, dont *Salmonella* spp. et *E. coli* (43). À travers les différents rapports publiés, il est possible d'observer différentes tangentes qui suivent la stratégie des PPC. Depuis 2014, le PICRA relève une décroissance progressive de la résistance des *Salmonella* spp. et des *E. coli* à la ceftriaxone (un antibiotique de catégorie 1 utilisé en médecine humaine, similaire au ceftiofur) provenant d'isolats de poulets de chair à la ferme, à l'abattoir et au détail (20). Comme mentionné précédemment, l'interdiction des antibiotiques de catégorie 1 a mené à l'utilisation d'antibiotiques alternatifs comme la gentamicine et la lincomycine-spectinomycine dans les couvoirs canadiens. Conséquemment, le Programme québécois d'antibiosurveillance vétérinaire a présenté dans son plus récent rapport, en 2018, une augmentation de la résistance des *E. coli* à la gentamicine comparant la période 2004-2013 et la période 2014-2018. Par ailleurs, l'utilisation curative du triméthoprim-sulfadiazine est courante pour le traitement de la colibacillose causée par le *E. coli* aviaire pathogène et le programme québécois a recensé une augmentation de la résistance des *E. coli* au triméthoprim/sulfaméthoxazole entre la période 2004-2013 et la période 2014-2018 (44). Bref, ces résultats basés sur le profil phénotypique de résistance des bactéries démontrent bien l'influence de la pression de sélection exercée par l'utilisation des antibiotiques et laissent espérer des résultats intéressants devant les changements que met actuellement de l'avant l'industrie avicole.

La résistance phénotypique traduit généralement la présence de gènes de résistance aux antibiotiques, mais l'inverse n'est pas toujours vrai, puisque l'expression de ceux-ci peut être influencée par certains facteurs environnementaux et génétiques (45). La combinaison de certaines mutations peut moduler la résistance phénotypique. Par exemple, pour un *E. coli*

résistant à la ciprofloxacine, la mutation du gène *parC* n'induit pas de changement de la concentration minimale inhibitrice (CMI) alors que la mutation du gène *gyrA* augmente celle-ci. Par contre, lorsque les deux mutations surviennent en même temps, cette CMI est augmentée davantage, ce qui démontre bien l'effet des interactions génétiques sur la résistance phénotypique (45, 46). Bien que la présence de gène de résistance n'induit pas nécessairement une résistance phénotypique, la présence de gène de résistance est un bon moyen de suivre l'évolution du résistome selon les différentes forces qui l'influencent. Un éventail de gènes de résistance existe. La compréhension du contexte actuel de l'industrie avicole, la connaissance approfondie des mécanismes de résistance des différentes classes d'antibiotiques et la catégorisation des antibiotiques d'importance en santé humaine ont guidé le choix des gènes retenus pour la présente étude.

2.2.3.1 Les antibiotiques de catégorie 1 et les mécanismes de résistance associés

2.2.3.1.1 Fluoroquinolones et céphalosporines de 3^e génération

En plus de suivre les profils de résistance à la ceftriaxone de bactéries indicatrices, le PICRA a recensé un arrêt complet de l'utilisation de l'enrofloxacin et du ceftiofur depuis 2014 (20). Avec l'information déjà disponible et la surveillance continue de ceux-ci, nous avons jugé que la recherche de gènes de résistance pour ces antibiotiques n'apporterait pas de bénéfice supplémentaire à ce que fait déjà le PICRA.

2.2.3.1.2 Polymyxines

La polymyxine E aussi connue sous le nom de colistine est un antibiotique de dernier recours utilisé en médecine humaine lors d'infections multi-résistantes associées à des bactéries à Gram négatif (47, 48). Non homologuée au Canada pour utilisation chez les animaux, la colistine peut toutefois être utilisée par un vétérinaire pour traiter la diarrhée post-sevrage chez le porc, par exemple (49). La colistine agit au niveau de la paroi cytoplasmique des bactéries à Gram négatif. L'antibiotique génère des déséquilibres osmotiques et engendre finalement la lyse cellulaire. Les premières résistances découvertes à la colistine étaient issues de mutations chromosomiques et permettaient de modifier les lipopolysaccharides présents dans la paroi cellulaire (47). Les 5 gènes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* et *mcr-5* sont connus pour procurer une

résistance à la colistine (50). De plus, une récente étude sur des souches d'*E. coli* provenant d'animaux de consommation, en Chine, a rapporté la découverte d'un plasmide habitant le gène *mcr-1* (48). Sachant maintenant que la résistance à colistine peut être transmise entre les bactéries par transfert horizontal, la surveillance de *mcr-1* autant chez les animaux que chez les humains fait l'objet d'un intérêt grandissant (50).

2.2.3.2 Les antibiotiques de catégorie 2 et les mécanismes de résistance associés

2.2.3.2.1 Lincosamides, Macrolides et Streptogramines

Les lincosamides sont des antibiotiques avec un spectre d'action dirigé vers les bactéries à Gram positif et les bactéries anaérobies (51). Les macrolides ont une action contre les bactéries à Gram positif, les bactéries sans paroi cellulaire comme les mycoplasmes et les microorganismes unicellulaires (52). Les streptogramines agissent contre les bactéries à Gram positif et sont composées de deux groupes : les streptogramines A et les streptogramines B. Ensemble, elles ont un effet synergique (53). Avant le 1^{er} janvier 2019, la virginiamycine, une streptogramine composée des groupes A et B, était utilisée en prévention en médecine avicole pour la prévention de l'entérite nécrotique (21, 54). Les lincosamides, les macrolides et les streptogramines partagent le même mécanisme d'action. Ils inhibent la synthèse des protéines en se fixant sur la sous-unité 50S des ribosomes dans la cellule bactérienne (52).

Les méthylases de l'ARNr, les enzymes altérant l'antibiotique et les pompes à efflux sont les 3 principaux mécanismes de résistance des lincosamides, des macrolides et des streptogramines. Par rapport aux méthylases de l'ARNr, 42 gènes *erm* codent pour la résistance aux lincosamides, aux macrolides et aux streptogramines B (7). Le gène *erm(B)* est le plus répandu. On peut le retrouver chez un vaste éventail d'hôtes comme les bactéries à Gram positif et négatif et les bactéries aérobies et anaérobies. On rencontre ce gène sur des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les plasmides. Le gène *erm(B)* est souvent retrouvé conjointement avec d'autres gènes de résistances comme *vat(D)* (streptogramines A), *tet(M)* (tétracyclines) ou *lnu(A)* (lincosamides) (52). Ainsi, considérant ces informations et tenant compte du fait que la tylosine, la lincomycine et la virginiamycine étaient utilisées en prévention au Canada jusqu'à la fin 2018, l'étude du gène *erm(B)* nous a semblé intéressante.

En ce qui a trait à l'altération enzymatique de l'antibiotique, 4 types d'enzymes peuvent altérer les antibiotiques : les phosphorylases, les estérases, les lyases et les transférases. Les gènes *vat* et *Inu* codent pour des transférases. Un total de 7 gènes *vat* sont connus allant de *vat(A)* à *vat(G)* suivant l'ordre des lettres de l'alphabet (55). Les gènes *vat(D)* et *vat(E)*, retrouvés chez des bactéries à Gram positif dont *Enterococcus faecium*, codent pour une acétyltransférase et procurent une résistance aux streptogramines A (56). Par ailleurs, des liens génétiques entre *vat(D)* et *erm(B)*, puis *vat(E)* et *erm(B)* ont été retrouvés chez *E. faecium* provenant d'animaux de consommation (57). De plus, 7 gènes *Inu* sont connus jusqu'à présent (55). Comme les autres *Inu*, le gène *Inu(B)* procure une résistance aux lincosamides et aux streptogramines A. Il est retrouvé chez plusieurs bactéries comme *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *E. faecalis* et *E. faecium* (51, 52, 58). Ces deux dernières font partie du microbiote intestinal des animaux comme la volaille et sont des indicatrices de contamination fécale (58). Les gènes *vgb(A)* et *vgb(B)* sont les 2 seuls gènes qui codent pour une lyase (hydrolase) et ils engendrent une résistance aux streptogramines B. Ces gènes sont souvent retrouvés chez des bactéries à Gram positif (52, 57). De plus, un portage conjoint des gènes *vat(D)* et *vgb(A)* est possible. Cela génère alors une résistance aux streptogramines A et B (52).

Les pompes à efflux sont le 3^e mécanisme relié à la résistance aux lincosamides, macrolides et streptogramines. Les gènes *vga(A)* et *vga(B)* codent pour des pompes à efflux. Ils procurent une résistance aux streptogramines A et le portage du gène *vga(A)* procure une résistance supplémentaire aux lincosamides (55). Ils sont retrouvés chez des staphylocoques (57).

Plusieurs mécanismes de résistance spécifiques ont été décrits ci-haut, comme la résistance aux streptogramines A et B. Afin de conférer de la résistance à la virginiamycine, seulement la résistance à la composante A est nécessaire. Cependant, une résistance aux 2 composantes pourrait engendrer un plus grand niveau de résistance. Ce phénomène repose sur le mécanisme d'action des 2 groupes de streptogramines qui agissent en synergie. Les streptogramines A se lient en premier lieu au ribosome. Cette liaison engendre une modification structurale du ribosome et facilite l'attachement des streptogramines B par la suite (53, 54). Ainsi, l'étude de la prévalence des gènes associés à une résistance directe ou croisée aux

streptogramines A est pertinente considérant que les streptogramines représentent 10% des antibiotiques administrés aux poulets de chair au Canada (20).

2.2.3.2.2 Pénicillines

En 1928, Alexander Fleming a découvert le tout premier antibiotique : la pénicilline G. Cette découverte a révolutionné le monde médical. Cet antibiotique agit en se liant de façon irréversible aux protéines de liaison des pénicillines situées dans la paroi cellulaire. Conséquemment, cela empêche la formation de la couche de peptidoglycane, un constituant de la paroi cellulaire bactérienne qui maintient la forme et l'osmolarité cellulaire. La bactérie devient ainsi vulnérable à la lyse cellulaire (59).

Ce mécanisme d'action antibactérien est seulement efficace envers les bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif ont une résistance innée pour la pénicilline G et d'autres bêta-lactamines. Puisque la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée d'une membrane externe, leurs protéines de liaison des pénicillines ne sont pas accessibles. De plus, certaines bactéries à Gram négatif produisent des bêta-lactamases (59).

L'utilisation de la pénicilline G a engendré l'apparition de souches résistantes produisant des bêta-lactamases. Ainsi, de nouvelles générations de bêta-lactamines ont été développées comme les céphalosporines de 3^e génération. Cependant, des résistances ont rapidement émergé après leur utilisation (59).

Chez le poulet de chair au Canada, depuis le début de l'année 2019, les pénicillines sont utilisées à des fins curatives seulement. Selon le dernier rapport annuel 2016 du PICRA, l'utilisation des pénicillines représentait 4% des antibiotiques totaux administrés aux poulets de chair (20).

2.2.3.2.3 Triméthoprim et sulfamides

Le triméthoprim et les sulfamides sont des antibiotiques synthétiques. Utilisés en combinaison, ils sont considérés comme des antibiotiques de catégorie 2 selon Santé Canada. Utilisés séparément, ils sont classés comme des antibiotiques de moyenne importance (catégorie 3) (3). Ces deux antibiotiques à large spectre interrompent le cycle de l'acide folique à des niveaux

différents. Les sulfamides inhibent l'enzyme déhydroptéroate synthétase et le triméthoprimé inhibe l'enzyme dihydrofolate réductase. Privée de sa vitamine, la croissance bactérienne sera inhibée (60, 61). Chez le poulet de chair au Canada, en 2016, le triméthoprimé et les sulfamides représentaient 11% des antibiotiques totaux administrés. Toutefois, les sulfamides sont souvent utilisés seuls (21, 61).

En ce qui concerne la résistance aux sulfamides, l'expression de gènes de résistance modifiant l'enzyme déhydroptéroate synthétase permet de compléter la synthèse de l'acide folique (60). Jusqu'à présent, 4 gènes de résistance sont connus : *sul1*, *sul2*, *sul3* et *sul4*. Dernièrement découvert, *sul4* a été retrouvé dans un intégron de classe 1 (62). Les gènes *sul1* et *sul2* sont les principaux gènes impliqués dans la résistance aux sulfamides. Leur localisation sur des éléments génétiques mobiles telle que celle de *sul1* sur de la région conservée de l'intégron de classe 1 facilite leur dispersion dans le résistome bactérien (Figure 2, p. 31) (21, 60).

2.2.3.3 Les antibiotiques de catégorie 3 et les mécanismes de résistance associés

2.2.3.3.1 Aminocyclitols

La spectinomycine fait partie des aminocyclitols. Cet antibiotique inhibe la synthèse protéique en se liant au ribosome bactérien. La résistance à la spectinomycine peut impliquer 3 mécanismes différents. L'inactivation enzymatique par l'adényltransférase est le mécanisme le plus souvent rencontré (63). Il y a 2 groupes d'enzymes : les enzymes AAD(3)(9) procurent une résistance à la spectinomycine et à la streptomycine alors que les enzymes du groupe AAD(9) engendrent une résistance seulement à la spectinomycine (63). Par ailleurs, dans une récente étude ontarienne menée sur des poulets de chair au Québec, une association a été observée entre les gènes *addA* et *aac(3)-VI* (gène de résistance pour la gentamicine), ceux-ci étant tous deux retrouvés sur l'intégron de classe 1. Cela suggère que l'utilisation de la lincomycine-spectinomycine pourrait contribuer à la sélection de gènes de résistance à la gentamicine (64).

Au Canada, l'emploi de la spectinomycine seule n'est pas homologué chez le poulet de chair (2, 21). Utilisée avec la lincomycine, la combinaison sera classée parmi les antibiotiques de haute importance en médecine humaine (catégorie 2). Avant l'interdiction de l'utilisation préventive des antibiotiques des catégories 2 par les PPC le 1^{er} janvier en 2019, la combinaison

lincomycine-spectinomycine était utilisée dans les couvoirs, par injection *in ovo* ou par injection sous-cutanée, pour la prévention des infections néonatales du poussin causées par *E. coli*. Selon le PICRA, la combinaison lincomycine-spectinomycine représentait moins de 1 % des antibiotiques totaux administrés chez les poulets de chair en 2016 (20).

2.2.3.3.2 Bacitracine

La bacitracine a un spectre d'action contre les bactéries à Gram positif et inhibe la synthèse de la paroi bactérienne. La bacitracine séquestre l'undecaprényl pyrophosphate (UPP) en formant des complexes et prévient la déphosphorylation de l'UPP en undecaprényl monophosphate (UP). L'UP est un transporteur et celui-ci achemine les unités composées de sucres et de peptides pour la synthèse des peptidoglycane de la paroi cellulaire (65).

Plusieurs mécanismes de résistance ont été observés chez des bactéries à Gram positif et négatif (65). Dans la littérature, 4 mécanismes principaux de résistance contre la bacitracine sont décrits (66). Le premier, maintenant répandu chez d'autres genres bactériens, a été initialement observé chez *E. coli* et était associé à l'expression du gène *uppP*, anciennement nommé *bacA* (66). Ce gène code pour l'enzyme undecaprényl pyrophosphate phosphatase. Cette enzyme permet de générer l'UP à partir de l'UPP (66). Comme deuxième mécanisme de résistance, des mutations peuvent avoir lieu et empêcher la synthèse d'exopolysaccharides. Les bactéries, lors de la synthèse de la paroi cellulaire, secrètent des polysaccharides attachés à la paroi cellulaire et des exopolysaccharides non attachés à la paroi. Ces derniers ne sont pas essentiels à la synthèse de la paroi cytoplasmique et ils concurrencent pour l'UP. L'inhibition des exopolysaccharides permet alors une plus grande disponibilité du transporteur pour la synthèse du peptidoglycane membranaire (66, 67). Le système de pompe à efflux par l'expression des gènes *bcrA*, *bcrB* et *bcrC* est un troisième mécanisme de résistance. Décrit chez *Bacillus licheniformis*, un homologue du transporteur ABC est observé chez *C. perfringens* et *E. faecalis*, entre autres (68). Le quatrième mécanisme de résistance à la bacitracine implique le gène *bcrD* qui exprime la production excessive de l'enzyme undecaprényl pyrophosphate phosphatase. Celle-ci convertit l'UPP en UP et permet ainsi la synthèse de la paroi cellulaire (66).

Il est également possible d'observer, notamment chez *E. faecalis* et *C. perfringens*, la présence de l'opéron *bcrABD*. Celui-ci est constitué du transporteur ABC (gènes *bcrAB*) et du gène *bcrD* (65). Formant le groupe de gènes *bcrABDR*, le gène régulateur *bcrR* détecte la présence de la bacitracine et contrôle l'expression de l'opéron (69). Selon des études sur *C. perfringens* et *Enterococcus* spp., la présence du régulateur ne serait pas essentielle pour procurer une résistance à la bacitracine. De plus, les gènes *bcrA* et *bcrB* seraient suffisants pour permettre une résistance à la bacitracine. Les gènes *bcrABDR* ont été observés autant sur le chromosome bactérien que sur des plasmides (68, 69).

Il a récemment été démontré, avec l'étude des concentrations minimales inhibitrices, que le gène *mcr-1* associé à la résistance à la colistine conférerait une résistance croisée à la bacitracine. La colistine et la bacitracine sont deux antibiotiques peptidiques (70). La bacitracine est un antibiotique utilisé pour la prévention de l'entérite nécrotique et représente plus de la moitié des antibiotiques administrés aux poulets de chair (Figure 1, p. 26) (20, 21). Ainsi, l'utilisation importante de la bacitracine pourrait favoriser la persistance de *mcr-1* dans l'environnement, tout comme sa transmission plasmidique (70).

2.2.3.3.3 Tétracyclines

Les tétracyclines ont un large spectre d'action. Elles sont efficaces, notamment, contre les bactéries à Gram positif et négatif et les protozoaires. Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en empêchant l'attachement de l'ARNt sur le ribosome. Elles sont utilisées en production avicole pour le traitement de la colibacillose, notamment, et leur faible coût encourage leur utilisation (7). Toutefois, leur utilisation était très faible selon le dernier rapport du PICRA (20). Codée par plus de 59 gènes *tet* (7), la résistance aux tétracyclines est très répandue, puisqu'on peut retrouver ces gènes de résistance dans presque tous les genres bactériens (71). Leur présence sur des éléments génétiques mobiles et les nombreux liens génétiques réunissant plusieurs gènes *tet* avec d'autres gènes de résistance contribuent à maintenir et disperser les gènes dans le résistome bactérien (7).

2.2.4 La résistance aux antibiotiques dans une perspective de santé publique

L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire, en médecine humaine et en agriculture contribue à maintenir et disperser les gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que les bactéries résistantes entre les différentes niches écologiques exposées. Ce vaste réservoir inclut entre autres les humains, les animaux, les aliments, l'eau, le sol et la faune. Ces niches sont par ailleurs interdépendantes (72).

Les humains représentent un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques pour les animaux (73), tout comme les animaux de consommation représentent un réservoir pour les humains. Des souches résistantes de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. et *Campylobacter* spp. sont des exemples de bactéries résistantes communément rencontrées en médecine humaine et les résistances associées à ces pathogènes entériques sont influencées par l'utilisation des antibiotiques chez les animaux (72). La contamination humaine peut avoir lieu par contact direct avec l'animal, par contact indirect avec des matières contaminées (urine, salive, matières fécales) ou par l'ingestion d'aliments contaminés (viandes, lait, œufs, eau, fruits et légumes) (6). Lors d'une exposition, la bactérie peut être éliminée par le système immunitaire. Toutefois, pendant son passage transitoire, la bactérie résistante pourra transmettre ses gènes de résistance par transfert horizontal aux bactéries commensales ou aux pathogènes de l'hôte (6). Dans d'autres circonstances, la bactérie peut réussir à coloniser et infecter l'hôte (6). Ces infections représentent un danger pour la santé publique, car elles peuvent être plus difficiles à traiter à cause de la diminution ou l'absence d'efficacité des antibiotiques. De plus, lors de résistance aux antibiotiques, l'incidence, la sévérité des infections et le coût nécessaire au traitement peuvent être plus importants (72).

2.3 Les impacts de la réduction des antibiotiques

2.3.1 L'antibiorésistance et les gènes de résistance aux antibiotiques

La stratégie de l'UAM des PPC et le retrait des allégations de promotion de la croissance sur les étiquettes par le gouvernement du Canada sont des exemples de mesures visant à lutter contre l'antibiorésistance. Depuis l'arrêt des antibiotiques de catégorie 1 en industrie avicole, la

résistance à la ceftriaxone des *Salmonella* spp. et des *E. coli* d'origine aviaire a diminué au Canada (20), mais qu'en sera-t-il des autres catégories d'antibiotiques ? À l'exception de ces données, il est difficile de prévoir les impacts de la stratégie de l'UAM sur l'antibiorésistance, car aucune étude canadienne n'a évalué les impacts de la réduction des antibiotiques en conditions commerciales chez les poulets de chair. Toutefois, une étude menée au Royaume-Uni s'est intéressée aux impacts de la réduction des antibiotiques chez les animaux sur le taux d'infections résistantes humaines. À l'aide de modèles mathématiques, plusieurs scénarios ont montré que la réduction des antibiotiques chez les animaux avait peu d'impacts sur l'antibiorésistance chez les humains (74).

La réversibilité de l'antibiorésistance observée par exemple par le PICRA pour certains microorganismes indicateurs bactériens pourrait s'expliquer par le *fitness cost* imposé aux bactéries résistantes aux antibiotiques. Habituellement, l'acquisition de gènes de résistance et le maintien de ceux-ci dans le bagage génétique bactérien affectent négativement l'efficacité de croissance des bactéries (75). À partir de ce concept, il a été démontré à l'aide de modèles mathématiques et d'études *in vitro* que l'arrêt des antibiotiques pourrait permettre aux bactéries sans résistance de surpasser les bactéries résistantes. Ces dernières pourraient alors graduellement diminuer au profit des bactéries non résistantes. Par ailleurs, le temps requis pour réduire la quantité des bactéries résistantes serait inversement proportionnel au coût imposé aux bactéries résistantes par les gènes de résistance (32). Toutefois, si la pression de sélection devait apparaître à nouveau, même si une très faible proportion du gène habitait la population microbienne, l'abondance des bactéries résistantes augmenterait, et ce, rapidement (32). De plus, ces études expérimentales ont également démontré que le *fitness cost* n'était pas le seul facteur à influencer la résistance aux antibiotiques (32, 75).

Suivant la théorie darwinienne, les bactéries résistantes s'adaptent afin de concurrencer avec les autres bactéries du milieu. De ce fait, elles peuvent acquérir des mutations compensatoires qui leur permettent d'améliorer leur taux de croissance tout en préservant leurs gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, en absence d'antibiotiques, le taux de croissance de ces bactéries pourrait se maintenir ou même augmenter (32). Le portage conjoint des gènes de résistance représente également un défi en ce qui a trait à la diminution de l'antibiorésistance.

Les liens génétiques reliant plusieurs gènes, tels que retrouvés sur des éléments génétiques mobiles, permettent de maintenir ceux-ci grâce à la sélection d'un seul de ces gènes. C'est pourquoi il n'est pas efficace de diminuer un seul antibiotique ou une seule classe d'antibiotiques lors de mesures visant à contrer l'antibiorésistance (32). L'intégron de classe 1 est un exemple pertinent, puisque celui-ci contient une région conservée pouvant contenir les gènes *qacEΔ1* et *sul1*, en plus de capturer et d'exprimer d'autres cassettes de gènes (76, 77). Ainsi, lors de la présence de ces deux gènes de résistance chez une bactérie, l'utilisation seule des ammoniums quaternaires comme désinfectant dans les élevages de poulets de chair permet de maintenir le portage de l'intégrons de classe 1 chez les bactéries. Cela se traduit alors par le maintien des résistances aux antibiotiques exprimées par les autres gènes portés sur cet intégron de classe 1, dont la résistance aux sulfamides, des antibiotiques couramment utilisés en industrie avicole (21).

2.3.2 Les pathogènes alimentaires zoonotiques

Pour le consommateur, la chaîne alimentaire représente une voie de transmission pour les pathogènes alimentaires zoonotiques bactériens comme *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *C. perfringens* (6, 78). La diminution de l'utilisation conventionnelle des antibiotiques avec la mise en place de la stratégie de l'UAM pourrait influencer la présence de ces pathogènes au niveau du microbiote des animaux, et par le fait même, au long de la chaîne alimentaire (79).

Campylobacter est un microorganisme dit commensal chez les oiseaux et c'est pourquoi il est détecté dans tous les types de régies pour la plupart des études s'étant intéressées à documenter sa présence (80). Par contre, dans la littérature, des variations de prévalence sont notables en fonction des différents régimes d'utilisation des antibiotiques. Aux États-Unis et en Europe, des études ont observé une augmentation de la prévalence de *Campylobacter* spp. et de *C. jejuni* dans les fermes de poulets élevés sans antibiotiques (élevages biologiques) comparativement aux fermes avec une utilisation conventionnelle des antibiotiques (81, 82). L'accès à l'extérieur pourrait également contribuer à l'augmentation de cette prévalence par l'exposition des poulets à des sources environnementales de *Campylobacter* (83). Dans la même lignée, au Québec, lors d'une étude menée à la Chaire de recherche en salubrité des viandes, des chercheurs se sont intéressés à la présence de *Campylobacter jejuni* dans des élevages de poulets de chair sans

antibiotiques et certifiés biologiques. Cette étude a estimé une prévalence égale à 50% dans les élevages de poulets biologiques, un résultat supérieur à la prévalence de ce pathogène pour des troupeaux conventionnels, estimée précédemment à 35% (83, 84). Ceci pourrait mener à une augmentation de l'exposition du consommateur à *Campylobacter jejuni*, au Québec, lors de consommation ou de manipulation de viande de poulet biologique (83). Somme toute, considérant les connaissances que nous avons acquises pour ce pathogène, il ne nous semblait pas utile de réévaluer la prévalence de *Campylobacter* dans le présent projet.

Les animaux, dont la volaille, représentent un réservoir important de *Salmonella* et l'excrétion de cette bactérie peut avoir lieu par les matières fécales (72). Quelques études seulement ont évalué la prévalence de *Salmonella* en fonction d'une régie avec ou sans antibiotiques (85). Selon une étude systématique et une méta-analyse, l'hétérogénéité des résultats entre des fermes biologiques et conventionnelles et le nombre restreint d'études sur le sujet ne permettaient pas d'émettre des conclusions chez le poulet de chair, chez la poule pondeuse et même chez le porc (85). Toutefois, ce type d'études comporte certaines limites considérant la grande diversité des publications incluses et analysées. Bref, la caractérisation de la prévalence de *Salmonella* en fonction de la réduction des antibiotiques semble être un besoin devant l'absence de consensus dans la littérature.

En 2011, également menée à la Chaire de recherche en salubrité des viandes, une étude s'est intéressée, entre autres, à la prévalence de *C. perfringens* dans des élevages commerciaux de poulets de chair soumis à des régimes conventionnels et sans antibiotiques (4). Les résultats ont montré que les troupeaux sans antibiotiques présentaient une incidence d'entérite nécrotique clinique et sous-clinique plus élevée et un taux d'isolement des *C. perfringens* plus élevé comparativement aux troupeaux conventionnels (4). Suite à ce projet, une seconde étude s'est intéressée à la dynamique des populations de *C. perfringens* dans les troupeaux de poulets de chair élevés sans antibiotiques en santé ou atteints d'entérite nécrotique. Parmi les résultats obtenus, il a été démontré que les troupeaux possédant une plus grande diversité de *C. perfringens* étaient davantage prédisposés à développer l'entérite nécrotique (1). Dans cette étude, la diversité des souches a été évaluée entre autres par l'analyse de nombreux gènes de virulence dont le gène *cpe* codant pour l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* (CPE)

responsable de toxi-infections alimentaires chez l'humain. Le typage des souches de cette étude n'a pas révélé la présence du gène *cpe* (1).

2.3.2.1 *Clostridium perfringens* entérotoxigène

C. perfringens est responsable d'infections intestinales chez les humains et figure parmi les 3 pathogènes alimentaires d'importance au Canada. De plus, la viande, dont le poulet, représente la principale source d'exposition pour le consommateur (86). Notamment, les carcasses de poulet lors des procédés d'abattage, dont l'éviscération, pourraient être contaminées par du contenu digestif (86). Basée sur le portage des gènes codant pour 6 toxines majeures, il est possible de classer les souches de *C. perfringens* en 7 toxinotypes allant de A à G (Tableau 2, p.44) (87).

Toxines	Alpha	Bêta	Epsilon	Iota	CPE	NetB
Toxinotypes						
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	±	-
D	+	-	+	-	±	-
E	+	-	-	+	±	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Tableau 2. – Classification des souches de *C. perfringens* selon la présence des gènes codant pour les toxines majeures (adapté de Rood et al., 2018) (88)

La toxine alpha, détenant un rôle important lors d'infection, est produite par toutes les souches de *C. perfringens*. De ce fait, la détection de cette toxine permet systématiquement d'identifier la présence de la bactérie (89). L'entérotoxine CPE est, quant à elle, un facteur de virulence d'intérêt en santé publique puisqu'elle cause des symptômes gastro-intestinaux et est

responsable de la majorité des éclosions à *C. perfringens* (89). Par ailleurs, le gène *cpe* codant pour cette toxine peut se retrouver au niveau du chromosome ou sur un plasmide (87).

Au Québec, il a récemment été démontré à la Chaire de recherche en salubrité des viandes que l'exposition du consommateur à *C. perfringens* entérotoxigène, via la consommation de viande de poulet, est à considérer (86). En effet, parmi les résultats présentés, une prévalence globale de 10% du gène *cpe* sur les 379 carcasses échantillonnées de poulet de chair en abattoir, au Québec, a été détectée. Toutefois, cette étude a été réalisée auprès de seulement 2 abattoirs. Des études supplémentaires portant sur les réservoirs et les voies de transmission de *C. perfringens* entérotoxigène permettront de mieux comprendre les facteurs qui influencent sa présence et sa distribution de la ferme à la table (86). Ainsi, considérant que les troupeaux de poulets de chair sans antibiotiques présentent une incidence d'entérite nécrotique plus élevée et des populations de *C. perfringens* plus importantes, il devenait pertinent d'évaluer la présence de ce pathogène et de sa toxine CPE dans des lots restreignant l'utilisation des antibiotiques.

2.3.3 Les populations bactériennes indicatrices issues du microbiote intestinal

Selon de nombreuses publications scientifiques (85), la résistance phénotypique et génotypique aux antibiotiques est étudiée sur un nombre limité de microorganismes intestinaux dont *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* et *E. faecium* qui présentent tous un profil zoonotique (85). Les profils de résistance phénotypique sont déterminés par culture bactérienne en mesurant la concentration minimale inhibitrice tandis que les profils de résistance génétique sont établis par approche moléculaire telle que la PCR (58, 77, 85). Dans le cadre du présent projet, afin d'obtenir une vision globale des gènes de résistance retrouvés dans la communauté microbienne cæcale, la détection des gènes de résistance aux antibiotiques à partir de l'ADN extrait des matières cæcales des poulets de chair échantillonnés a été privilégiée.

Au Canada, des chercheurs se sont intéressés aux impacts de la réduction des antibiotiques sur les bactéries résistantes aux antibiotiques d'origine animale ou humaine en caractérisant leur profil de résistance phénotypique ou génotypique (90). Dans cette étude systématique et méta-analyse, les bactéries étudiées incluaient, entre autres, *Campylobacter*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes* et les entérobactéries. Parmi les

publications sélectionnées, 55% portaient sur l'espèce aviaire (poulets de chair, dindons, poules pondeuses) (90). Également en majorité, les échantillons de matières fécales ou cœcales, ainsi que les écouvillons cloacaux représentaient 59% des types d'échantillons totaux, suivis des échantillons de viande/carcasses à 30%, de lait à 11%, des écouvillons nasaux à 6%, des œufs à 4% et des échantillons de source inconnue à 2%. Une proportion considérable des publications incluses dans cette étude n'étaient pas en lien avec le projet faisant l'objet de ce mémoire (90). Néanmoins, selon cette étude systématique et méta-analyse, la conclusion est claire : la diminution de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux de consommation permet de diminuer la présence des bactéries résistantes isolées de ceux-ci (90).

À partir de ces résultats, les auteurs ont procédé à une seconde étude afin de mieux caractériser les impacts de différents régimes d'utilisation des antibiotiques sur le phénomène de l'antibiorésistance (18). Il a été démontré que l'arrêt d'un seul antibiotique ou d'une seule classe d'antibiotiques n'était pas suffisant pour diminuer la résistance, alors qu'une restriction plus globale de plusieurs antibiotiques permettait de réduire significativement l'antibiorésistance. L'arrêt total des antibiotiques et l'arrêt des antibiotiques à des fins préventives (promotion de la croissance, utilisation prophylactique et métaphylactique) présentaient des résultats semblables avec une diminution de 15% et 10% des isolats résistants, respectivement, justifiant l'intérêt d'appliquer des régimes moins restrictifs et plutôt responsables quant à l'utilisation des antibiotiques. Selon les auteurs, l'utilisation responsable des antibiotiques semble être une méthode plus appropriée à adopter en comparaison avec l'arrêt complet des antibiotiques (18). Ces observations sont intéressantes puisque l'arrêt complet des antibiotiques et l'utilisation des antibiotiques à des fins curatives seulement étaient des régimes utilisés dans le présent projet. Par ailleurs, cette étude pourrait laisser présager des résultats intéressants concernant la stratégie de l'UAM des PPC.

2.4 Le microbiote intestinal du poulet

Le microbiote intestinal, par définition, inclut tous les microorganismes du système digestif, dont les virus, les protozoaires, les champignons et les bactéries (91, 92). La composition de cette communauté microbienne varie tout au long du tractus digestif à partir de l'œsophage, en

passant par le jabot, le proventricule, le gésier, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, les cæca, le colon et finalement le cloaque (24). Les différentes conditions environnementales associées notamment au pH, au niveau d'oxygène, à la présence d'enzymes digestives influencent le microbiote d'un compartiment à l'autre (91). La digestion et l'absorption des nutriments ont surtout lieu entre le duodénum et l'iléon (93). Ensuite, les éléments non digérés ou non absorbés comme la cellulose, l'amidon et d'autres polysaccharides sont acheminés aux cæca (94). Ce sont des sites de fermentation importants d'acides gras à chaînes courtes. Disponibles alors pour l'hôte, les acides gras à chaînes courtes ont des impacts positifs sur la santé et les performances zootechniques des oiseaux et seront discutés dans la section suivante (94, 95). Parmi les différents compartiments du système digestif, les cæca possèdent la plus grande diversité et richesse microbienne, ainsi qu'un temps de transit prolongé allant jusqu'à 20 heures comparativement à 2.5 heures pour le système digestif supérieur. Ces nombreux facteurs favorisent la stabilité de cet environnement (92, 94). Toutefois, une grande portion de la population microbienne des cæca demeure inconnue, ce qui accroît le besoin de caractériser davantage cette population afin de mieux comprendre ses rôles (94).

2.4.1 Les rôles du microbiote

La symbiose entre l'hôte et le microbiote intestinal est essentielle. Cette interaction avec le microbiote influence l'intégrité et la fonctionnalité du tractus digestif, ainsi que la santé et les performances zootechniques de l'oiseau. Le microbiote détient plusieurs rôles qui ont des impacts parfois positifs, parfois négatifs sur l'hôte (92).

Le microbiote est bénéfique puisqu'il produit divers composés nutritifs disponibles pour l'oiseau comme des vitamines (K et B), des acides aminés et des acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, lactate, butyrate) issus des microorganismes des cæca et du colon (24, 92). En plus de contribuer à la synthèse de glucose, lorsqu'ils sont absorbés par l'oiseau, les acides gras à chaîne courte stimulent la prolifération de l'épithélium intestinal et augmentent la surface d'absorption des nutriments (24). Ensuite, par compétition pour l'accès à la paroi digestive et aux nutriments, la communauté microbienne offre une protection contre la prolifération des pathogènes. La sécrétion d'acides organiques et de composés antimicrobiens comme les

bactériocines empêche également la croissance des pathogènes (24). Les acides gras à chaîne courte ont un effet bactéricide grâce à leur pH acide, ce qui nuit à la colonisation de l'environnement par des pathogènes, dont *Salmonella* (96, 97). Sous la forme non dissociée, ils peuvent traverser la paroi cellulaire des bactéries et une fois dans le cytoplasme, celui-ci ayant un pH neutre, les acides organiques peuvent se dissocier en ions et en protons, inhibant alors les activités cellulaires (23). D'autre part, la présence du microbiote intestinal stimule le système immunitaire et contribue à la sécrétion de mucus. Ce dernier forme une barrière entre le microbiote et l'épithélium du système digestif (24). Localisées au niveau de la lamina propria, sous l'épithélium, diverses molécules ou cellules immunologiques, dont des cytokines, anticorps, des lymphocytes T et B et des cellules phagocytaires sont présentes (5, 24). Celles-ci préviennent la croissance excessive de la communauté microbienne lorsque la couche de mucus et l'épithélium sont traversés par des microorganismes. Ces processus immunitaires contrôlés évitent une réponse inflammatoire exagérée et confèrent une protection contre les pathogènes (24).

Par contre, le microbiote peut générer un certain fardeau métabolique pour l'hôte. En plus de concurrencer pour les nutriments, le microbiote engendre un renouvellement rapide de l'épithélium intestinal, ce qui nécessite une demande importante d'énergie et de protéines pour l'hôte. L'augmentation de la production de mucine (constituant la couche de mucus) et de la synthèse d'immunoglobulines comme les IgA et IgG associées à la présence du microbiote représentent d'autres dépenses énergétiques et protéiques. Puis, le catabolisme des acides biliaires par le microbiote, notamment par les *Lactobacillus*, diminue la disponibilité des lipides pour l'hôte (98). Ce catabolisme combiné avec la sécrétion de métabolites toxiques issus du métabolisme des acides aminés (ammoniaque, amines, phénols, crésol et indoles) dans le tractus intestinal bas influence négativement la croissance des poulets (24). Les bactéries du genre *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus* et *Streptococcus* sont des exemples de bactéries ayant des activités protéolytiques dans le tractus digestif bas (93). Dans ce compartiment, globalement, les bactéries préfèrent les sources de carbohydrates aux protéines. Lorsque les sources de fibres sont épuisées, les bactéries fermentent les protéines comme source d'énergie, générant des

métabolites toxiques (93). Somme toute, il n'en demeure pas moins que le microbiote présente beaucoup plus d'avantages que d'inconvénients pour les oiseaux (92).

2.4.2 L'étude du microbiote

2.4.2.1 Le séquençage des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S

Avant l'arrivée des techniques à haut débit de séquençage, il y a environ une dizaine d'années, l'étude du microbiote intestinal se faisait principalement grâce à la culture bactérienne (99). Cette méthode représente, encore aujourd'hui, le *gold standard* pour le diagnostic et la caractérisation des microorganismes (99). Pour réaliser cette technique, un microorganisme (bactérie ou champignon) est inoculé sur un milieu nutritif et sélectif. Ce dernier est ensuite incubé sous différentes conditions (température, temps, oxygène), puis des tests biochimiques doivent souvent être réalisés afin de confirmer le genre et ensuite déterminer l'espèce (100). Toutefois, la complexité à reproduire les milieux propices à la croissance (milieux nutritifs, co-cultures, milieu anaérobie strict) et le temps important à investir, notamment, ont favorisé le développement de méthodes indépendantes à la culture bactérienne à partir de l'ADN extrait (95, 99). Aujourd'hui, plusieurs méthodes de séquençage peuvent être utilisées et chacune comporte des avantages et des inconvénients (101). Sans avoir une résolution ou une profondeur de lecture aussi grande que celles offertes par le séquençage métagénomique (l'ensemble des gènes présents), le séquençage à partir d'un gène marqueur représente la méthode idéale pour l'étude du microbiote et permet d'obtenir une vue d'ensemble, à moyenne résolution, d'une communauté microbienne (101). Cette méthode rapide et moins onéreuse, utilisée dans la présente étude, consiste à séquencer un gène marqueur commun à la communauté d'intérêt, préalablement amplifié par méthode PCR (101). Différents marqueurs peuvent être utilisés comme le gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S pour les bactéries, le gène codant pour l'ARNr 18S pour les eucaryotes et le *nuclear ribosomal internal transcribed spacer* (ITS) pour les champignons (94). Pour caractériser les communautés microbiennes, dont le microbiote intestinal de poulet, l'ARNr 16S est le marqueur le plus utilisé (94, 95). Cela s'explique par le fait qu'il est présent dans la majorité des bactéries, sa fonction n'a pas changé avec le temps et il a une longueur assez courte (1500 pb) (102). Le gène codant pour l'ARNr 16S est constitué de 9

régions variables et de 10 régions conservées. Les régions conservées permettent la création d'amorces dites « universelles » alors que les régions variables, dont la séquence est propre aux différentes espèces bactériennes, sont utilisées pour distinguer les différentes bactéries constituant une communauté. Dans la littérature, les régions utilisées pour la caractérisation du microbiote chez le poulet sont principalement les régions V1, V3 et V4, ou les combinaisons V1-V3, V3-V4 ou V3-V5 (94). Malgré l'influence du marqueur utilisé sur les résultats, ceux-ci demeurent représentatifs de la communauté microbienne échantillonnée (101). La région V4 est la région la plus fréquemment utilisée pour le séquençage bactérien dans la littérature, et par souci de standardisation, cette région a été sélectionnée pour le présent projet (103).

Une fois l'amplification par réaction PCR du gène marqueur effectuée, différentes technologies de séquençage peuvent être utilisées dont Roche 454, Illumina MiSeq et Illumina HiSeq (24). Le séquençage Illumina MiSeq surpasse la plate Roche 454, puisqu'il offre une profondeur de lecture environ 10 fois plus grande, génère beaucoup moins d'erreurs et permet d'effectuer le travail à moindres coûts (104). La technologie MiSeq est surtout appliquée pour les petits fragments d'ADN, comme la région V4 de l'ARNr 16S, et permet de générer jusqu'à 25 millions de paires de lectures mesurant 300 paires de bases (103). Parmi ses différentes caractéristiques, la plateforme Illumina HiSeq possède une profondeur de lecture d'au moins 300 millions de paires de lectures, ce qui surpasse la plateforme MiSeq (103). Par contre, l'utilisation de la technologie HiSeq présente un défi pour l'assemblage (regroupement des lectures en un seul fragment), considérant le nombre important de lectures de plus petites tailles générées comparativement à la technologie MiSeq (103, 105). Bien que la plateforme MiSeq offre une qualité de résolution moyenne du microbiote en comparaison avec le séquençage de tous les gènes du microbiote, celle-ci demeure une méthode de choix à utiliser afin d'obtenir une vue d'ensemble du microbiote (101).

2.4.2.2 Les analyses bio-informatiques

Malgré le faible taux d'erreurs de la plateforme Illumina MiSeq (101), il est nécessaire d'assurer la qualité des séquences brutes obtenues à l'aide de différents logiciels, tel que Mothur (94). De ce fait, les séquences ambiguës, trop longues et les chimères sont retirées (106). Les chimères sont des hybridations de séquences (formées par 2 fragments PCR dont l'amplification

est incomplète) et si conservées, elles sont considérées à tort comme de nouveaux microorganismes (107). Ensuite, les séquences sont classées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs). Les séquences avec une ressemblance de 97%, un taux généralement accepté dans la littérature comme indicateur de l'espèce, sont alors regroupées sous le même OTU (101). Principalement utilisées et décrites, les bases de données publiques GreenGenes, Silva et Ribosomal Database Project sont utilisées afin de faire l'assignation taxonomique des OTU (101). Malgré le fait que l'assignation taxonomique puisse varier entre les différentes bases de données, habituellement, une seule base de données est utilisée pour faire l'assignation taxonomique (108). L'assignation taxonomique se limite au genre, le classement à l'espèce étant peu fiable.

À partir des résultats de séquençage, il est alors possible d'étudier les caractéristiques du microbiote avec l'analyse de la diversité alpha et bêta.

L'étude de la diversité alpha tient compte de la richesse qui représente le nombre d'OTUs différents dans un échantillon et de l'*evenness* qui décrit la distribution de ces OTUs (109). Plusieurs indices peuvent être utilisés pour le calcul de la diversité alpha et, selon ces indices, la considération ou l'influence de la richesse et de l'*evenness* varient. L'indice *OTU observed* est le plus simple et figure parmi les plus utilisés. Cet indice est intéressant puisqu'il reflète le nombre d'OTUs différents dans un échantillon, sans considérer l'*evenness* (109), et permet donc de comparer la richesse des échantillons. L'indice de Shannon est aussi fréquemment utilisé pour l'étude du microbiote et tient compte de la richesse et de l'*evenness* en proportions égales (109). L'indice de Simpson est différent de l'indice précédent et prend davantage en considération l'*evenness* que la richesse. Il mesure la probabilité que 2 microorganismes choisis au hasard appartiennent à la même espèce (110). Une variante de cet indice, l'inverse Simpson, est aussi couramment utilisée (110). Bien qu'il en existe d'autres, les indices présentés offrent des résultats différents. Il est alors important de les utiliser en complémentarité afin d'éviter de mauvaises interprétations (110).

Contrairement à la diversité alpha qui s'intéresse aux échantillons individuellement, la diversité bêta mesure une distance correspondant à la différence ou la ressemblance entre 2

échantillons ou 2 groupes d'échantillons (109). Ceci signifie que la diversité bêta doit être recalculée à chaque fois que de nouveaux groupes d'échantillons doivent être comparés entre eux. La diversité bêta est représentée par une matrice à deux ou trois dimensions, ce qui facilite la visualisation de la structure du microbiote (101). Le graphique *non-metric multidimensional scaling* (NMDS) est un exemple de représentation graphique de ces matrices. Différents indices peuvent être utilisés dont l'indice de Jaccard et l'indice de Bray-Curtis (109). Ceux-ci sont complémentaires puisque l'indice de Bray-Curtis considère l'abondance des OTUs et l'indice de Jaccard tient plutôt compte de la présence et de l'absence des OTUs (101). Par ailleurs, il est important d'étudier la diversité bêta conjointement à la diversité alpha, car cette approche permet d'observer des changements dans la composition et la structure de la communauté bactérienne (109).

Il est aussi possible de caractériser différents membres microbiens et leur abondance avec l'utilisation de modèles statistiques comme des analyses multivariées à modèle linéaire (MaAsLin) (101, 106). Ces analyses permettent d'assigner des biomarqueurs à des conditions notamment, dans le cadre du présent projet, les différents facteurs liés au régime d'élevage, dont le retrait des antibiotiques ou l'utilisation conventionnelle des antibiotiques.

2.4.3 Les facteurs qui modulent le microbiote

Plusieurs facteurs influencent le microbiote des poulets, et ce, à différents degrés (5). Parmi les facteurs intrinsèques à l'oiseau, l'âge est un des facteurs les plus importants à considérer lors de l'élaboration d'une étude (92). Le microbiote, à partir de l'éclosion du poussin, est très dynamique et grandement influencé par la communauté bactérienne de l'environnement auquel le poussin est exposé. Puis, autour de 30 jours d'âge, le microbiote se stabilise (91, 93). Il est donc préférable de procéder à des méthodes d'échantillonnage après cette période. La section du tractus digestif est également un point majeur à considérer puisque chaque section est constituée d'une population microbienne particulière (voir section 2.4.4). Comme discuté précédemment, les cæca représentent des sites d'étude intéressants puisqu'ils possèdent la plus grande diversité microbienne et comptent jusqu'à 10^{12} bactéries par gramme de matières fécales (24). Certains estiment que 90% de cette population est encore inconnue, ce qui renforce l'intérêt

d'étudier le microbiote cæcal (91). De plus, le microbiote intestinal est influencé par le sexe et la race de l'oiseau, en plus de varier en fonction de l'individu. Par ailleurs, les maladies causées par certains pathogènes entériques, comme les coccidies et *C. perfringens* influencent aussi le microbiote intestinal (91).

En ce qui concerne les facteurs extrinsèques modulant le microbiote intestinal, l'alimentation représente un facteur crucial (24). En effet, la composition des aliments administrés influence le microbiote des oiseaux. Par exemple, lorsque l'apport en protéine est trop important, la grande disponibilité de celles-ci favorise la croissance des *C. perfringens* et prédispose à l'entérite nécrotique (94). Les antibiotiques administrés via l'aliment ont également des impacts importants sur le microbiote intestinal et par le fait même sur les performances et la santé des oiseaux. Ces effets ont d'ailleurs été démontrés dans une étude menée à la Chaire de recherche en salubrité des viandes, où l'arrêt des antibiotiques sur une période de 15 mois a augmenté l'incidence de l'entérite nécrotique des poulets, en plus d'augmenter le taux de conversion alimentaire et de diminuer le gain de poids quotidien des oiseaux (4). Grâce à leur effet bactéricide ou bactériostatique, les antibiotiques contribueraient à diminuer les populations microbiennes du microbiote, augmentant alors la disponibilité des nutriments pour l'hôte (24). De plus, la diminution de la population microbienne contribuerait à diminuer la production de métabolites toxiques et le catabolisme des acides biliaires (24). Avec la réduction de l'utilisation des antibiotiques, les probiotiques, les prébiotiques, les acides organiques, les enzymes et les huiles essentielles sont des alternatives utilisées (24). Aucune de celles-ci ne s'est toutefois montrée aussi efficace que les antibiotiques pour le maintien de la santé et des performances chez les oiseaux, mais elles présentent néanmoins des effets positifs (1, 24). Par exemple, une étude menée à la Chaire de recherche en salubrité des viandes a observé, après l'administration d'acides organiques et d'huiles essentielles chez des poulets de chair, une diminution significativement des *Campylobacter jejuni* de 0.7 log au niveau des cæca (111). Plusieurs autres facteurs liés à la régie d'élevage influencent le microbiote, dont la luminosité, la litière (type, réutilisation), la ventilation, la densité animale, la température ambiante, le protocole de vaccination et la rotation des antibiotiques utilisés (5). Le couvoir d'où proviennent les poussins a aussi un impact sur le microbiote intestinal, car celui-ci est influencé par l'environnement à

l'éclosion (5). La ferme peut également avoir une influence sur le microbiote intestinal puisque la régie d'élevage varie d'une ferme à l'autre ou d'un producteur à l'autre (112). Dans une autre étude, il a également été démontré que pour un même bâtiment, à travers le temps, la diversité bêta des lots étudiés de poulet de chair variait. Les variations climatiques étaient la principale hypothèse proposée par les auteurs pour expliquer ces résultats. Comme hypothèses secondaires, des changements au niveau de la régie, dont l'origine des oiseaux (couvoir) et l'alimentation, étaient des exemples de facteurs qui auraient pu influencer le microbiote des lots issus d'un même bâtiment dans le temps (112).

Comme discuté, beaucoup de facteurs interagissent avec le microbiote. Cela engendre un manque d'uniformité dans la littérature et complexifie l'étude et la compréhension du microbiote intestinal de poulet. Cela illustre entre autres le besoin de standardiser les études (95). Jusqu'à présent, plusieurs études basées sur le séquençage de l'ARNr 16S se sont intéressées aux impacts de différents paramètres comme les additifs alimentaires, la race, le sexe et les promoteurs de croissance (94). Cependant, face aux présentes réformes au Canada, la caractérisation du microbiote intestinal des volailles en fonction de la réduction de l'utilisation des antibiotiques représente un besoin non comblé (113).

2.4.4 La composition du microbiote cæcal

Constitué de plus de 900 espèces bactériennes, le microbiote intestinal est composé à environ 85% de bactéries à Gram positif (24, 94). Comme mentionné précédemment, la composition du microbiote varie en fonction de la section du tractus digestif (Figure 3, p.55). Toutefois, le microbiote intestinal doit être considéré comme un ensemble puisque chacune des sections interagit avec l'autre (94).

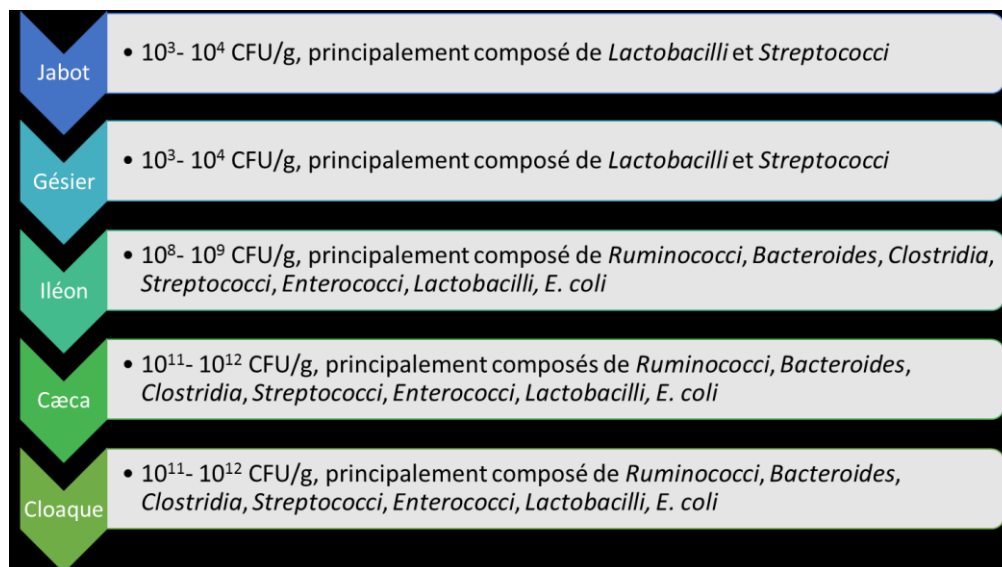


Figure 3. – Densité et composition du microbiote intestinal du poulet (adaptée de Yadav et al., 2019)
(24)

Pour les cæca de poulets de chair, ils sont constitués majoritairement de bactéries anaérobies strictes. Les Firmicutes représentent le phylum le plus important du microbiote cæcal et incluent, notamment, les familles de *Ruminococaceae*, de *Lachnospiraceae* et de *Lactobacillaceae* (92). Selon Apajalahti et al. 2016, voici la proportion des principaux microorganismes constituant le microbiote cæcal des poulets de chair. Les *Lachnospiraceae* et les *Ruminococcaceae* représentent respectivement 47% et 19% du microbiote cæcal (114). Ceux-ci seraient bénéfiques pour l'hôte puisqu'ils fermentent les composés non digérés en acide gras à chaîne courte, dont le butyrate (93). Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* constituent 10% du microbiote et produisent différents acides gras à chaînes courtes, dont l'acide lactique, ainsi que des bactériocines (24, 114). Ces deux derniers ont par ailleurs des activités bactériostatiques ou bactéricides (24). Les bactéries appartenant à la famille *Bifidobacteriaceae* constituent 10% du microbiote cæcal et contribuent à la production de l'acide lactique et de l'acide acétique (114). Les *Coriobacteriaceae* appartenant au phylum Actinobacteria représentent 7% du microbiote cæcal et pourraient être impliqués dans le métabolisme des gras (114). Finalement, les bactéries du genre *Bacteroides* constituent environ 2% du microbiote (114). Les *Bacteroides* sont des producteurs très efficaces d'acides gras à chaîne courte à partir des hydrates de carbone (98). Par

ailleurs, selon d'autres auteurs, une proportion du microbiote cæcal serait constituée de bactéries appartenant au phylum Proteobacteria comme *Campylobacter* et *Escherichia* (92).

Plusieurs microorganismes étant difficilement cultivables, leur rôle exact dans la biologie du système digestif reste incertain. De plus, plusieurs séquences de *Lachnospiraceae* ne peuvent être identifiées au niveau taxonomique du genre (111). De manière générale, la composition du microbiote cæcal des oiseaux est très différente d'une étude à l'autre étant donné tous les facteurs pouvant affecter sa composition. Ceci s'additionne également à l'influence du traitement des échantillons et aux analyses bio-informatiques, lesquelles peuvent aussi affecter les résultats (92, 94).

2.4.4.1 L'impact de l'utilisation des antibiotiques sur le microbiote cæcal

L'étude du microbiote est complexe. Une multitude de facteurs modulent celui-ci et devant le manque de standardisation des études, il est difficile de cerner ce qui constitue la portion essentielle ou commune du microbiote (le cœur), ainsi que les microorganismes ayant des impacts sur la santé des oiseaux (112, 115, 116). Devant les présents changements de l'industrie avicole, il faut caractériser le microbiote en fonction de la réduction des antibiotiques, afin de mieux comprendre cet écosystème et mettre en place des stratégies alternatives efficaces (113). Il est donc important de multiplier les études sur le sujet de manière à dégager des tangentes générales.

Plusieurs études se sont intéressées aux impacts sur le microbiote des promoteurs de croissance, dont la bacitracine, communément utilisée à travers le monde (98). À travers les études, les résultats sur la diversité alpha sont variables. Pour certaines, la diversité alpha diminue (115), augmente (98) ou ne change pas ou presque pas (116, 117). La diminution de la diversité alpha secondaire à l'utilisation des antibiotiques pourrait s'expliquer par la suppression d'une fraction du microbiote suite aux effets bactéricides ou bactériostatiques de ces composés (24). D'autre part, une augmentation de la diversité alpha pourrait s'expliquer par la croissance de divers microorganismes dans une niche inoccupée par des bactéries sensibles aux antibiotiques (116). L'absence de changement pourrait être une démonstration de la stabilité du microbiote (92).

Par contre, en ce qui a trait à la diversité bêta, les études présentent généralement des changements de structure associés à l'utilisation des antibiotiques (98, 113, 115), malgré quelques publications qui n'ont pas observé de différence (116, 117). Alors que les changements de la composition du microbiote pourraient être associés aux différents facteurs, dont les antibiotiques, l'absence de changement pourrait encore une fois démontrer la grande stabilité du microbiote cæcal (116). L'absence de différence entre les groupes pourrait aussi masquer des changements au niveau des populations de microorganismes plus rares (117) ou démontrer une résistance du microbiote face aux antibiotiques utilisés (116). Il se pourrait également que les changements réels soient occultés par d'autres variables non répertoriées par les auteurs.

Lorsqu'on regarde de plus près la composition et l'abondance des communautés microbiennes, plusieurs changements ont été observés dans une étude réalisée chez des poulets de chair d'un jour d'âge nourris d'une diète contenant différents promoteurs de croissance (bacitracine, tylosine, virginiamycine, monensin et salinomycine) pendant une période de 14 jours (115). Les promoteurs de croissance ont engendré des changements des *Clostridiales*, incluant les *Lachnospiraceae*, les *Ruminococcaceae* et les *Clostridiaceae*. Les membres de ces deux dernières familles ont d'ailleurs été favorisés avec l'usage des promoteurs de croissance, alors que les *Lachnospiraceae* semblaient diminués (115). Les auteurs ont également observé des changements au niveau des producteurs d'acide lactique, où les *Enretococcus* augmentaient avec l'utilisation des promoteurs de croissance, alors que le seul OTU associé aux *Lactobacillus* diminuait pour 4 des 5 promoteurs de croissance. Bref, selon cette étude, l'utilisation des promoteurs de croissance favoriserait les bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte et pourrait diminuer les bactéries associées au catabolisme des sels biliaires, offrant alors davantage d'énergie à l'hôte par l'absorption des acides gras à chaîne courte et des lipides (115).

Dans le même sens, une autre étude a caractérisé le microbiote cæcal de poulets de chair de 25 jours d'âge auxquels des promoteurs de croissance ont été administrés dans la nourriture (bacitracine et avilamycine) pendant 10 jours (98). L'utilisation de la bacitracine a été associée à une augmentation de la diversité alpha et un changement significatif de la structure du microbiote. Les auteurs ont observé plusieurs variations, dont une diminution des *Lactobacillus* principalement associée à la diminution de *Lactobacillus salivarius*. Selon les auteurs, cette

diminution suivie de la prolifération d'autres microorganismes pourrait expliquer l'augmentation de la diversité alpha. Ils ont également noté une augmentation des *Clostridiales* associée à une augmentation des *Faecalibacterium* (98). Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude précédente puisqu'on observe conjointement une augmentation des *Ruminococaceae* (*Faecalibacterium*) et une diminution des *Lactobacillus*.

Bref, considérant les différents facteurs pouvant influencer le microbiote intestinal, l'analyse de celui-ci est complexe. De plus, devant le problème grandissant de l'antibiorésistance et les différentes politiques de réduction de l'utilisation des antibiotiques, dont la stratégie de l'UAM des PPC, il est important de multiplier les études sur le sujet afin de mieux comprendre les impacts d'une réduction des antibiotiques sur le microbiote cæcal des poulets de chair

Hypothèses et objectifs

La présente revue de littérature a permis de souligner le besoin et l'importance de documenter les impacts associés à la réduction de l'utilisation des antibiotiques. L'actuelle stratégie de l'UAM des PPC vise à réduire l'utilisation préventive des antibiotiques. Cependant, selon les données scientifiques actuelles, il est difficile de prédire quels seront les impacts d'une telle réforme sur l'antibiorésistance, sur le pathogène animal et zoonotique *C. perfringens* et sur le microbiote cæcal des poulets de chair élevés en conditions commerciales.

L'hypothèse du projet était la suivante :

La diminution de l'utilisation des antibiotiques à court et à long terme diminuera l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques et modulera les populations bactériennes du microbiote cæcal dont *C. perfringens*.

Les bâtiments de six fermes commerciales de poulets de chair, au Québec, ont été soumis à un régime conventionnel ou à un régime sans antibiotiques pendant une courte période de 15 mois (premier échantillonnage après cette première période), puis à un régime conventionnel ou à un régime visant une utilisation judicieuse des antibiotiques pendant une longue période de 6 ans (deuxième échantillonnage après cette deuxième période). À partir de la collecte et de l'analyse des matières cæcales de poulets de chair issus de ces fermes, l'étude comportait les objectifs suivants :

- 1- Quantifier les gènes de résistance aux antibiotiques
 - a. Comparer les bâtiments d'une même ferme pour chaque échantillonnage
 - b. Comparer un même bâtiment entre les deux échantillonnages
- 2- Détecter la présence de *C. perfringens* et de son entérotoxine
- 3- Caractériser le microbiote cæcal
 - a. Comparer les régimes d'élevage pour chaque échantillonnage
 - b. Comparer les résultats entre les deux échantillonnages

Article scientifique

Soumis à *Frontiers in Veterinary Science*

Impacts of short-term antibiotic withdrawal and long-term judicious antibiotic use on resistance gene abundance and caecal microbiota composition on commercial broiler chicken farms in Québec

Catherine Turcotte¹, Alexandre Thibodeau¹, Sylvain Quessy¹, Edward Topp^{2,3}, Guy Beauchamp⁴, Philippe Fravallo^{1,5}, Marie Archambault⁶, Marie-Lou Gaucher^{1*}

¹ Research Chair in Meat Safety, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

² London Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, London, ON, Canada

³ Department of Biology, University of Western Ontario, London, ON, Canada

⁴ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

⁵ Pôle Agroalimentaire du Cnam, Conservatoire national des arts et métiers, Ploufragan, France

⁶ Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

***Correspondence :**

Marie-Lou Gaucher

marie-lou.gaucher@umontreal.ca

4.1 Abstract

The ever-increasing problem of antibiotic resistance makes routine use of antibiotics in animal production no longer considered as a reasonable and viable practice. The Chicken Farmers of Canada have developed and are implementing an Antimicrobial Use Reduction Strategy which has the ultimate goal of eliminating the preventive use of medically-important antibiotics in broiler chicken and turkey production. However, very little is known about the real overall impact of an antibiotic use reduction strategy in complex ecosystems such as the bird intestine or the commercial broiler chicken farm. The main objectives of the present study were to compare the abundance of antibiotic resistance-encoding genes, characterize the intestinal microbiota composition, and evaluate the presence of *Clostridium perfringens*, in six commercial poultry farms adopting short-term antibiotic withdrawal and long-term judicious use strategy. Implementing an antibiotic-free program over a 15-month period did not reduce the abundance of many antibiotic resistance-encoding genes, whereas the judicious use of antibiotics over six years did. The short-term antibiotic withdrawal and the long-term judicious use strategy altered the intestinal microbiota composition, with Ruminococcaceae and Lachnospiraceae families being negatively impacted, in agreement with the lower production performance and with the increased *C. perfringens* populations observed for farms phasing out the use of antibiotics. Adopting a conventional rearing program on commercial broiler chicken farms selected for specific antibiotic resistance-encoding genes in many barns. This study highlights the potential impacts of different rearing programs in poultry production and will help guide future policies in order to reduce the use of antibiotics while maintaining production performance.

Keywords: commercial broiler chickens, antibiotic withdrawal, resistance gene, microbiota, conventional program, drug-free program, judicious antibiotic use, health.

4.2 Introduction

In animal husbandry, antibiotics are used to prevent and to treat infections, as growth promoting claims for antibiotics are no longer permitted in Canada (118). However, the ever-increasing problem of antibiotic resistance makes routine use of these medicines in animal production no longer considered as a responsible approach (1). To mitigate the development of antibiotic resistance, the commitment of stakeholders coming from different sectors such as governmental agencies, the food-producing animal industry and the medical field involving veterinarians and physicians is essential (21). In order to guide the veterinary use of antibiotics and to preserve the effectiveness of those compounds, the World Health Organization established the List of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine in 2005, a list that is reviewed periodically (119). Comprising three different categories, this list classifies antibiotics as being important, highly important, or critically important for human health (119). Canada has established criteria for the categorization of antibiotics, from category 1 to category 4, according to their decreasing human medical importance (120). In September 2017, Canada launched its pan-Canadian action plan which aims to harmonize the actions of all stakeholders who have a role to play in addressing the antimicrobial resistance problem (121). The Chicken Farmers of Canada are implementing an Antimicrobial Use Reduction Strategy designed to eliminate the preventive use of medically-important antibiotics in broiler chicken and turkey productions (122). The preventive use of category 1 antibiotics was voluntarily banned in May 2014, followed by a prohibition on the use of category 2 antibiotics since the end of 2018. Furthermore, the ban on the preventive use of category 3 antibiotics is to enter into force for Canadian poultry producers at the end of 2020, but this date is currently being reviewed. When monitoring the impacts of these voluntary changes in antimicrobial use at the farm, slaughterhouse and retail levels, available data from the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance is extremely useful. Surveillance data revealed that stopping the preventative use of ceftiofur, a third-generation cephalosporin, in Canadian hatcheries was associated with a lower prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates resistant to ceftriaxone, an antimicrobial compound belonging to the same class of antibiotics (123). In addition, previously in Europe, several countries banned the use of nonessential antibiotics in animal food such as growth promoters in

order to reduce the selection of resistance genes forming the farm resistome. In Denmark, antibiotics growth promoters withdrawal has been associated with a decrease of antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* chicken broilers isolates (124). Although these are encouraging observations in targeted indicator bacteria, the global impact of an antibiotic use reduction strategy in complex ecosystems such as the bird intestine, or the commercial broiler chicken farm remains to be better documented.

The implementation of the Chicken Farmers of Canada's Antimicrobial Use Strategy has been associated with various challenges including production losses, and disease issues such as necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. Thus, the identification of alternative strategies to antibiotics to keep disease challenges under control and to maintain production performances is essential (4). To date, none of the available alternatives has proven to be as effective as antibiotics in maintaining avian gut health on commercial farms and their contribution to the fight against antibiotic resistance is still to be documented. The contribution of antibiotics to the long-term shaping of microbial communities and to the resistome of the intestine of commercial birds and consequently of poultry houses needs to be better described in order to properly assess the global impacts of the Chicken Farmers of Canada's Antimicrobial Use Reduction Strategy and to identify valuable replacement options.

A previous study conducted by our group on different commercial broiler chicken farms aimed to compare a conventional rearing program including an antibiotic and anticoccidial-based diet to a drug-free program that was implemented over a 15-month period. In the absence of in-feed antibiotics and anticoccidials, different alternatives were used including essential oil-based products added to the feed, organic and inorganic acids in the drinking water, and a coccidiosis vaccination approach at the hatchery level (4). Rearing broiler chickens using this drug-free program significantly impacted production performance, the frequency of occurrence of necrotic enteritis, and the abundance and richness of the *C. perfringens* populations (1, 4). Now, six years after the close of this field study, some of the participating farms are using antibiotics judiciously, whereas some other farms went back to a conventional rearing program after completion of the 15-month study period. Thus, there is now the opportunity to revisit these farms, and compare the impacts of varied antibiotic use settings in a commercial context.

The objectives of the present study were to evaluate the abundance of antibiotic resistance-encoding genes, the presence of *C. perfringens*, and the composition of the intestinal microbiota in commercial poultry farms adopting either short-term antibiotic withdrawal (15 months) or long-term judicious antibiotic use strategy (six years).

4.3 Material and methods

4.3.1 Study Design

The farm selection was based on a previous study conducted by our group (10). Six (defined herein as farms A, B, C, D, E and F) of the eight farms that took part of a previous 15-month study conducted six years ago agreed to participate in the current study.

In July 2012, at the end of the 15-month study, four farms (designated as farms C, D, E and F) decided to reintroduce a conventional program (using antibiotics) in their drug-free barn (designated as “reintroduced” throughout the text), while the control barn on those farms was kept on a conventional program during both the 15-month study period and thereafter (designated as “continued” throughout the text). Those farms were then considered as having undertaken a short-term antibiotic withdrawal. The two other farms (designated as farms A and B or as “judicious” throughout the text) moved on from a conventional rearing program and from a drug-free rearing program in their control and test barns, respectively, to a program for responsibly using antibiotics in both rearing facilities, meaning that antibiotics were kept only as a therapeutic option for birds when needed (Figure S1, p.96).

4.3.2 Sample collection

At the end of the 15-month study conducted between May 2011 and July 2012 (designated as sampling time point one throughout the text), 12 birds were randomly selected from each of the 12 participating barns, for a total of 144 birds. Birds harvested at the end of the rearing cycle were euthanized by cervical dislocation. The cæcal content of the birds was sampled directly on farm, frozen in liquid nitrogen and transported to the laboratory. Samples were stored at -80°C for further analysis.

The same 12 barns were visited a second time in the autumn 2018 (designated as sampling time point two throughout the text) for caecal sampling at the end of the rearing period. Using the same sampling protocol, 12 birds were randomly selected from each barn, for a total of 144 birds.

This protocol was approved by the Comité d'éthique sur l'utilisation des animaux (CÉUA) of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (project number 19-Rech-1970).

4.3.3 DNA extraction from caecal samples

In a 2-ml screw cap tube containing 500 mg of 0.1mm silica spheres (MP Biomedical, Solon, OH, USA), 200 mg of caecal content and 700 µl of lysis buffer (Tris-HCl 500 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, NaCl 100mM, SDS 1% (w/v)) were mixed together. A 900 µl volume of lysis buffer was used as a negative control. A mechanical lysis step was performed using a FastPrep-24™ 5G Instrument (MP Biomedical) for three runs of 60 seconds each, at 6 m/s. Samples were kept on ice during 5 min between each run. A second step involving thermal lysis was carried out on the samples that were heated for 20 min at 95°C and kept 5 min on ice at the end of the procedure. The supernatant was collected after a centrifugation at 18 000 *g* for 15 min and a standard phenol/chloroform purification protocol was used to complete the DNA extraction (111). The DNA concentration of each sample was measured using a QFX Fluorometer (Froggabio, Toronto, ON) and the purity of those samples was assessed using a Nanodrop 1000 (Fisher, Ottawa, ON) device. DNA samples were stored at -20°C until analysis.

4.3.4 Detection of gene targets

DNA samples were screened for the presence of 12 antibiotic resistance genes for which the selection was either based on the use of antibiotics in commercial broiler chicken flocks in Canada or according to their importance for human medicine. The presence of the genes encoding the *C. perfringens* alpha toxin (*plc*) and enterotoxin (*cpe*) was also investigated in order to evaluate the impact of a short-term antibiotic withdrawal and of a long-term judicious use strategy on the presence of this animal and zoonotic pathogen. A total of 14 genes were investigated using different protocols (Table S1, p.97-98). All gene targets were PCR amplified in

a 25 µl reaction with 2.5 µl of 10× PCR buffer (Biobasic, Markham, ON), 0.2 µM of dNTPs (Biobasic), 1.5 or 2 mM of MgSO₄ (Biobasic), 1 or 1.25 U of Taq DNA polymerase High purity (Biobasic), template DNA and different concentrations of specific primers (Invitrogen / Life Technologies, Burlington, ON). Using a Mastercycler® nexus thermocycler (Eppendorf Canada, Mississauga, ON), cycling conditions were as followed: a hot start step, followed with denaturation, annealing and extension cycles and a final elongation step. Specific gene cycling conditions are presented in Table S1 (p.97-98). A volume of 10 µl of each PCR product was subjected to gel electrophoresis using a 0.7% to 2% agarose gel (agarose concentration was established according to gene size) containing 0.01% SYBR Safe DNA gel stain (Fisher, Ottawa, ON). PCR product was visualized under UV light using a 100 bp DNA ladder (Track it; Fisher).

Bacterial strains used as positive controls were grown overnight on 5% sheep blood agar plates (Fisher, Ottawa, ON) at 37 °C under aerobic conditions for *Enterococcus faecium* (positive for *erm*(B), *vat*(D)), *E. faecium* (positive for *erm*(B) and *vat*(E)), *Salmonella* Heidelberg (positive for *Int11*), *Enterococcus faecalis* #7 (positive for *Inu*(B)), *Escherichia coli* ECL21264 (positive for *sul1*) and under anaerobic conditions (AnaeroGen sachet, Fisher) for *C. perfringens* c1261_A (positive for *bcrABDR* genes) and *C. perfringens* AHL 155 (positive for *plc* and *cpe* genes). For DNA extraction, fives colonies were suspended in 50 µl of a 6% Chelex solution (Bio Rad, Saint-Laurent, QC), heated at 56°C for 25 min and at 95°C for 10 min. The DNA-containing supernatant was collected after centrifugation at 18 000 *g* for 5 min and used in PCR reactions. The positive control used for the *mcr-1* gene PCR amplification was DNA extracted from an French livestock *E. coli* strain expressing both a phenotype and a genotype of colistin resistance (125). The positive controls used for the PCR detection of *vga*(A) and *vgb*(A) was the plasmid pBluescript II SK+ (Biobasic) including the DNA fragment amplified with the primers of the resistance gene target.

4.3.5 Quantification of antibiotic resistance gene targets

The abundance of selected resistance gene targets was determined by qPCR as previously described (126-128). Gene targets *bcrA*, *bcrB*, *Inu*(B) and *vat*(E) genes were quantified using a Roche LC96 Real Time PCR thermocycler (Roche Canada, Laval, QC) with LightCycler® 96 System Software, version 1.1. The gene targets *erm*(B), *int11* and *sul1* were quantified using a Bio-Rad

CFX96 real-time PCR instrument with Bio-Rad CFX Manager software, version 3.0. Primers (Invitrogen / Life Technologies), Hydrolysis probes (Sigma-Aldrich, Toronto, ON) and cycling conditions are listed in Table S2 (p.99). Reactions were performed in a 25 µl reaction volumes using the Brilliant II QPCR Master Mix (Agilent, Toronto, ON) for TaqMan PCR and the Brilliant II SYBR Green® Low ROX QPCR Master Mix (Agilent) for SYBR Green PCR (Agilent). Two microliters of DNA template (10 ng of DNA) were added to each reaction and sterile water was used to reach the final volume. Each reaction, including the negative control, was run in triplicate.

The abundance of each gene in all experimental samples was determined using a standard curve. For the *erm(B)*, *int1* and *sul1* gene targets, respectively, the DNA fragment amplified with the primers of the gene target was cloned into the pSC-A-amp/kan plasmid using the StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent), before being used to transform *E. coli* competent cells from the StrataClone SoloPack (Agilent).

For *bcrA*, *bcrB*, *Inu(B)* and *vat(E)* gene targets, each standard curve was constructed using the plasmid pBluescript II SK+ (Biobasic) including the DNA fragment amplified with the primers of the gene target. For purification, the plasmid was linearized with the Not1-HF enzyme (New England Biolabs, Whitby, ON) for 2 hours at 37°C and ran on a 1.5% agarose gel with SYBR Safe DNA gel stain (Fisher). The linearized plasmid was recovered using the QIAquick gel extraction kit (Quiagen, Montréal, QC). The plasmid DNA concentration was measured using a QFX Fluorometer (Froggabio) and the number of plasmid copies was calculated. The plasmid was diluted using a 10-fold serial dilution approach and these dilutions were used for the standard curve construction.

4.3.6 16S rRNA gene amplicon sequencing

Sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene was performed using the Illumina MiSeq platform. DNA was extracted from the caecal contents of all 288 birds. The 144 samples from the sampling time point one were multiplexed with controls for sequencing in one lane. The 144 samples from the sampling time point two and controls were sequenced in a separate lane. Libraries were prepared using a Mastercycler® nexus (Eppendorf Canada) with the forward primer 5'- ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA - 3' and the reverse primer 5'-

TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3' (Invitrogen / Life Technologies) (129). Following the manufacturer's instructions with some modifications, the amplification of the 292 bp segment was performed using 6 µl of 5X SuperFi™ Buffer (Fisher, Ottawa, Ontario), 6 µl of 5X SuperFi™ GC Enhancer (Fisher), 0.6 µl of 10 mM dNTP mix (Fisher), 0.9 µl of 20 µM primers (Invitrogen/Life Technologies), 0.6 µl of 20 mg/ml Pierce™ bovine serum albumin (Fisher), 0.3 µl of 2U/µl Platinum SuperFi DNA Polymerase (Fisher) and 1.5 µl of DNA (15 ng) for a total reaction volume of 30 µl. Total volume was completed with sterile water. Sterile water was used as negative control and the ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Cedarlane, Burlington, ON) was used as positive control. Cycling conditions were as follows: a hot start step of 5 min at 95°C, followed with 23 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C, and 3 min at 72°C and a final elongation step of 10 min at 72°C. A volume of 10 µl of the PCR product was submitted to electrophoresis using 1.5% agarose gel containing 0.01% SYBR Safe DNA gel stain (Fisher). PCR product was visualized under UV light using a 1 kb DNA ladder (Track it; Fisher).

Two libraries were prepared and sequenced separately. The first library was made up of 144 samples, six negative controls (one for each farm to validate the quality of the DNA extraction procedure), one negative control (sterile water) and one positive control (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard). The second library consisted of 144 samples, six negative controls (one for each farm to validate the quality of the DNA extraction procedure), two negative controls (sterile water) and one positive control (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard). Libraries were sent to the Génome Québec Innovation Centre (Montreal, QC) for DNA sequencing using an Illumina MiSeq PE250 platform (Illumina, San Diego, CA).

As previously described by Larivière-Gauthier et al., (2017), with some modifications, the obtained sequences were cleaned using MOTHUR v. 1.14.3 (106). Reads that were too long or ambiguous were eliminated and the Silva database v.132 was used to align unique sequences. Chimeras were discarded using the VSEARCH tool (130) and reads were clustered into operational taxonomic units, with a 3% dissimilarity (OTUs). Mothur-formatted Ribosomal database project trainset version 16 was used to classify the obtained OTUs. Further data analysis was done using RStudio (version 1.2.5033, 2019) with the following packages: phyloseq, vegan, dplyr, scales, grid,

reshape2, igraph, ape, gplots, lme4, phangorn, plotly, tidyr, data.table, Maaslin2, ggplot2, stringr and devtools.

In order to avoid the presence of OTUs found only in a single flock, sequences that were present in more than 12 samples for each sampling time point analyzed were retained for biomarker analysis. To characterize the microbial communities associated with the different rearing programs and sampling time points, MaAsLin2 (Multivariate Association with Linear Models) was used in RStudio (131).

4.3.7 Data analysis and statistics

For qPCR values, the detection limit for quantification was set at one copy per reaction. For values below this limit, a 0.9 gene copy value per reaction was chosen to calculate the average copy number of each sample ran in triplicate. This average was converted into a number of gene copies/ng of DNA and resulting values were expressed on both a weight basis (raw values) and a ratio referenced to the total bacterial content of the sample according to the 16S rRNA gene copy number. GraphPad Prism (v8.0.2, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) was used to prepare the figures.

A first analysis using a linear mixed model measured changes in the mean of the log-transformed qPCR copy number of the 16S rRNA gene, considering the sampling time point, the rearing program and the interaction between both as fixed effects and the farm as a random variable. Farms A and B were not included in this analysis as they were not using antibiotics at sampling time point two.

A second statistical analysis using a linear mixed model and considering the farm as a random effect analyzed the fixed effect of the rearing programs on the mean of the log-transformed qPCR raw values and ratios at sampling time point one for each gene target. The same model was used for sampling time point two and also excluded farms A and B that did not use antibiotics.

A third analysis using a linear mixed model measured changes in the mean of the log-transformed qPCR raw values and ratios of each gene target, considering the sampling time point

and program variables as fixed effects, and the farm as a random variable. Again, farms A and B were not included in this analysis. A priori contrasts were performed to compare mean values at each sampling time point and to compare means at sampling points one and two among programs. For these comparisons, the Benjamini-Hochberg sequential procedure was used to adjust the alpha level downward. The familywise error rate was set at 5%.

A fourth analysis considered each farm separately. A linear model was used to analyze changes in the mean of the log-transformed qPCR raw values and ratios for each gene target as a function of sampling points and rearing programs, followed by the use of a priori contrasts, as described above.

For the 16S rRNA amplicon metagenomic sequencing analyses, the alpha and the beta diversity indices were calculated using Rstudio. For alpha diversity analyses, the richness and the evenness were measured using diversity indices of OTU observed, Shannon and inverse Simpson.

To analyze the fixed effect of the rearing program on the mean of alpha diversity indices for sampling time points one and two, a linear mixed model with the farm as a random effect was used.

To measure the effect of the sampling time point on the mean of alpha diversity indices, a linear mixed model was used considering the rearing program, the sampling time point and the interaction between both as a fixed effects and the farm as a random variable. Again, farms A and B were excluded from this analysis due to their different status regarding antimicrobial use. For farms A and B, a linear mixed model was also used considering the farm as a random variable and the rearing program as a fixed effect. For both analyses, a priori contrasts, as described above, were used. Statistical analyses were performed using SAS v.9.4 (Cary, N.C.).

For the beta diversity analysis, distances between samples were displayed by Non-metric multidimensional scaling (NMDS) graphs and calculated using the Jaccard and Bray-Curtis indices. Statistical differences between groups were calculated using the ADONIS test, with a significance level of 0.05.

4.4 Results

4.4.1 Detection of gene targets

DNA samples were screened individually or as pooled samples for the presence of 14 genes. Based on the positive detection of *bcrA*, *bcrB*, *erm(B)*, *int11*, *Inu(B)*, *sul1* and *vat(E)*, those gene targets were then quantified by qPCR (Table 1, p.86).

No quantitative approach was performed on *bcrR*, *vga(A)*, *vgb(A)*, *vat(D)*, *mcr-1*, *cpe* and *plc* genes. Pools were all found positive for the presence of *bcrA*, *bcrB* and *bcrR* genes. Only *bcrA* and *bcrB* were submitted to the quantitative PCR approach as the presence of the *bcrR* regulator gene is not essential in conferencing a bacitracin resistance phenotype in bacteria carrying the bacitracin resistance operon (69). Attempts to evaluate the presence of *vga(A)* and *vgb(A)* genes were also made but non-specific amplification issues have prevented the use of a quantitative approach to describe the presence of these genes. From a total of 72 DNA pools, the *vat(E)* gene was kept for the following quantitative analyzes as 72% of the pooled samples were found positive for the presence of this gene, while only 4% of the samples screened were positive for *vat(D)*. All the pools screened were negative for the presence of *mcr-1* and all the 288 individual samples screened were negative for the presence of the *cpe* gene. For the detection of the *C. perfringens* alpha toxin-encoding gene (*plc*), a total of 48 samples, from the 288 tested individually, were identified as positive (Table 1, p.86).

4.4.2 Quantification of antibiotic resistance gene targets

A quantitative PCR approach was used to establish the relative abundance of *bcrA*, *bcrB*, *erm(B)*, *int11*, *Inu(B)*, *sul1*, *vat(E)* and 16S rRNA gene targets. After a short-term antibiotic withdrawal of 15 months, the relative abundance of *sul1* or *int11* or both genes, decreased significantly in the drug-free flocks of four farms out of the six sampled (Figure 1, p.91).

For some of the flocks sampled from farms A and B at sampling time point two, a long-term judicious use strategy (six years) was associated with a decrease in the relative abundance and the absolute copy number of some antibiotic resistance-encoding genes, namely *bcrA*, *bcrB*, *erm(B)*, *Inu(B)* and *vat(E)* (Figure 2 p.92, Figure 3 p.93). In contrast, routine use of antibiotics over

a six-year period on farms C, D, E and F was associated, for some of the sampled flocks, with an increase in the relative abundance and in the absolute copy number of many of the resistance gene targets, namely *bcrA*, *bcrB*, *erm(B)*, *int11*, *lnu(B)*, *sul1* and *vat(E)* (Figure 2 p.92, Figure 3 p.93).

Regarding the variability of the 16S rRNA gene target abundance according to rearing programs and sampling time points, a linear mixed model showed no differences. A second analysis grouping the six conventional flocks and the six drug-free flocks at sampling time point one showed an increase in the relative abundance ($p=0.0074$) and the absolute copy number ($p=0.0232$) of *erm(B)* in drug-free flocks. A third analysis investigating the impacts of a short-term antibiotic withdrawal and a long-term conventional rearing programs (excluding farms A and B) on the abundance of antibiotic resistance-encoding genes showed that only the abundance of *bcrB* expressed as raw values increased ($p=0.0082$) when using a long-term conventional program.

When considering the farm as the unit of analysis, the mean abundance of each gene target was compared between the conventional and drug-free flocks at sampling time point one for each participating farm. As presented in Figure 1 (p.91), the relative abundance expressed as a ratio of the antibiotic resistance gene target to the 16S rRNA content of the samples showed, for drug-free flocks, a decrease of *bcrA*, *int11* and *sul1* on farm F, of *bcrB* on farm A, of *int11* on farms B and E and of *sul1* on farm C. In contrast, *erm(B)* and *sul1* increased on farms C and D, respectively. In the drug-free flocks sampled, raw values revealed a decrease of *int11*, *sul1* and *vat(E)* for farm B and a decrease for *sul1* only on farm C. In contrast, *bcrA* increased for farm A and C, whereas *sul1* increased for farm D.

Considering the farm as the unit of analysis and the barn that was on a drug-free program during the 15-month study period as the comparison reference unit, the mean relative abundance of each gene target was compared at sampling time point two between flocks of a same participating farm that had adopted either a conventional rearing program or a program for judiciously using antibiotics after the completion of the 15-month study period (Figure 4, p.94). For farms A and B, ratios and raw values obtained for the antibiotic resistance gene targets measured showed a decrease of *vat(E)* for farm A. For farms C, D, E and F, ratios and raw values

showed a decrease for *bcrA*, *erm(B)* and *Inu(B)* genes and for *bcrA* and *Inu(B)*, respectively, on farm C. As opposed, ratios and raw values showed an increase for *sul1* and for *sul1* and *int11*, respectively, on farm D.

Considering the farm as the unit of analysis, the mean relative abundance of each gene target was compared between sampling time points one and two, considering two categories of barns: barns using a conventional rearing program at both sampling time points (farms C, D, E and F) and barns moving from a conventional program at sampling time point one to a program for judiciously using antibiotics after the 15-month study period (farms A and B). In Figure 2 (p.92), for farms A and B, ratios showed a decrease for *erm(B)* and *vat(E)* on both farms and of *bcrA* and *bcrB* on farm A. For farms C, D, E and F, the relative abundance increased for *bcrA*, *bcrB* and *Inu(B)* on farms C, D and E. The *int11* and *sul1* genes increased on farms C and D, whereas an increase of *erm(B)* and *vat(E)* was noted for farms D and E and farm D, respectively. As opposed, *Inu(B)* decreased on farm F. For farms A and B, raw values for *vat(E)* showed a decrease on both farms, whereas raw values of *bcrA* gene increased on farm B. Raw values also showed an increase for *bcrA* on farms C, D and F, and for *bcrB* on farms C, D, E and F. Raw values for *int11* and *sul1* and for *erm(B)* all showed an increase for farms C and D and for farms D and F, respectively. An increase of *Inu(B)* and *vat(E)* genes was only observed for farm D. In contrast, raw values showed a decrease for *vat(E)* in farm C.

Considering the farm as the unit of analysis, the mean relative abundance of each gene target was compared between sampling time points one and two, considering two categories of barns: drug-free barns at sampling time point one going back to a conventional rearing program (farms C, D, E and F) and drug-free barns at sampling time point one moving to a program for responsibly using antibiotics (farms A and B) after the 15-month study period. As shown in Figure 3 (p.93), for farms A and B, the relative abundance expressed as a ratio showed a decrease for *bcrB* and *erm(B)* on both farms and for *bcrA*, *Inu(B)* and *vat(E)* on farm A. In contrast, *int11* increased on farm B. For farms C, D, E and F, the relative abundance showed an increase for *bcrA* and *bcrB* on all four farms. Ratio values for *erm(B)* and *vat(E)* increased for farms D and E, for *int11* and *sul1* on farms C, D and F and for *Inu(B)* on farm E. As opposed, *erm(B)* and *vat(E)* decreased for farm C. Raw values of the antibiotic resistance gene target presented a decrease for *bcrA*,

erm(B), *Inu(B)* and *vat(E)* on farm A, whereas an increase for *bcrA*, *bcrB*, *intl1* and *sul1* was shown for farm B. For farms C, D, E and F, raw values showed an increase for *bcrA*, *bcrB* on farms D and F, for *intl* and *sul1* on farms C, D and F and of *vat(E)* on farm D. In contrast, raw values presented a decrease for *bcrA* on farm E and for *erm(B)* and *vat(E)* on farm C.

4.4.3 16S rRNA gene amplicon metagenomic sequencing

The two sequenced libraries, one for each sampling time point, were both analyzed at the same time on Mothur. Positive controls corresponded to the theoretical composition of the ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard. A total of 192, 168 and 190 sequences were obtained for the three negative controls made from sterile water. The average of the sequences obtained for the 12 negative controls from DNA extraction was 1893 sequences and the highest and lowest numbers of sequences obtained were 11 798 and 11. Positive and negative controls were excluded for the rest of the data analysis. Among the 288 samples left, an average of 34 661 sequences was obtained per sample and a total of 37 325 OTUs were detected. The highest and lowest numbers of sequence obtained in a sample were 64 131 and 10 107. Considering the distribution of sequences, 10 samples were excluded from the analysis due to a low number a sequences (below 15 000).

Comparing the conventional and the drug-free flocks sampled at sampling time point one (Table 2, p.87), the OTU observed and the Shannon indices showed no significant difference. In contrast, according to the inverse Simpson index, conventional flocks showed a higher alpha diversity when compared to drug-free flocks.

For sampling time point two (Table 2, p.87), the alpha diversity indices were compared between flocks sampled from barns using antibiotics judiciously, and barns that continued and reintroduced the antibiotics after the 15-month study. All indices showed that conventional flocks that kept using a conventional rearing protocol after the 15-month study period had a higher alpha diversity than flocks that reintroduced antibiotics after a short-term antibiotic withdrawal. In addition, considering the Shannon and inverse Simpson indices, conventional flocks still using a conventional rearing protocol after the 15-month study period had a higher alpha diversity than flocks from farms that adopted a long-term program for judiciously using antibiotics. No

differences were noted between flocks that reintroduced antibiotics after a short-term antibiotic withdrawal and flocks from farms A and B that moved to a long-term program for responsibly using antibiotics.

The alpha diversity indices were compared between the two sampling time points (Table 3, p.88). For all farms, results showed that the richness at sampling time point two, according to the OTU observed index, was greater than the sample diversity observed at sampling time point one. In contrast, the inverse Simpson index showed that the alpha diversity was greater at sampling time point one than at sampling time point two for farms A and B (Table 3, p.88).

For beta-diversity, sampled flocks were compared according to different rearing programs and sampling time points and visualized with a NMDS. Using the Jaccard (Figure 5, p.95) and Bray-Curtis (Figure S2, p.100) indices, the ADONIS test was performed. Comparing the conventional and drug-free flocks at sampling time point one, the distance matrix showed the presence of two distinct groups. For sampling time point two, the NMDS showed a distinct structure for flocks sampled from barns that adopted a long-term strategy for judiciously using antibiotics, flocks that continued the conventional rearing program and flocks that reintroduced antibiotics after a short-term antibiotic withdrawal. In addition, the beta-diversity was measured between all samples from the two sampling time points. Regardless of the rearing program, samples collected from sampling time point one showed a pattern of aggregation while samples collected at sampling time point two presented a scattered profile. Finally, for each distance matrix, using a different scale, it was possible to distinguish each sampled flock from a sampled farm and each farm from one another.

In order to identify associations with biomarkers, MaAsLin2 was used according to the rearing program at sampling time point one (conventional and drug-free barns) and two (continued, reintroduced, judicious barns). For sampling time point one, 92 OTUs were identified by MaAsLin2, from which 52 OTUs were positively associated with the drug-free program (Table S3, p. 101-103). At the genus level, nine taxa were significantly enriched with the drug-free program, whereas 10 taxa were significantly reduced with the drug-free program (Table 4, p.89). For sampling time point two, 258 OTUs were positively or negatively associated with the rearing

programs (Table S4, p.104-116). At the genus level, three taxa were significantly increased, whereas 11 taxa were significantly reduced with the judicious antibiotic use (Table 5, p.90). According to flocks from barns that reintroduced antibiotics after the 15-month study, *Sporobacter*, *Ruminococcus 2* and *Odoribacter* were found to be positively associated, whereas *Lachnospiraceae* unclassified, *Romboutsia* and *Coriobacteriaceae* unclassified were negatively associated (Table S5, p.117).

4.5 Discussion

This study, conducted on six commercial broiler chicken farms in Québec, highlights the effects of a short-term antibiotic withdrawal and long-term judicious use strategy, as well as the conventional antibiotic use, on the dynamics of antibiotic resistance genes and on the caecal bacterial community of broilers.

This study illustrated that for commercial broiler chicken farms, moving to a drug-free program over a 15-month period did not significantly reduce the relative abundance and the absolute copy number of many antibiotic resistance-encoding genes found in bird intestinal contents. Notwithstanding the decrease of *int11* and *sul1* observed in some drug-free flocks that may be due of a higher fitness cost associated with the carriage of these genes (32). This decrease could also be attributed to a decrease in the selective pressure considering that the use of quaternary ammonium compounds and of sulfonamides may have influenced the persistence of class 1 integrons, which can carry both *sul1* and *qac* resistance genes (77). For instance, a Swedish work studied the impacts of the voluntary restriction on the use of trimethoprim-containing drugs over a two-year period in Kronoberg County. The results showed a marginal effect on the trimethoprim resistance observed for *E. coli* strains from human urinary tract infections (132). The relative ineffectiveness of such an intervention to significantly impact the antibiotic resistance problem could be explained by the co-selection of antibiotic resistance-encoding genes through the use of other antibiotics or to the low fitness cost associated with the carriage of genes encoding trimethoprim resistance in bacteria (132). In environments such as broiler chicken farms where the intestinal microbiota corresponds to a signature of the environmental bacterial communities, the fitness cost is considered as one of the most important factors guiding the

reduction in the frequency of antibiotic resistance bacteria (32, 133). A decrease in the global antibiotic resistance problem at the community level is then predicted to be measurable years after antibiotic restriction (133). However, the acquisition of compensatory mutations improving fitness for bacteria can jeopardize the reversibility of antimicrobial resistance (32). Despite the lack of evidence on the rate at which resistant bacteria increase or decrease, according to the results of the current study, it could be hypothesized that stopping antibiotics at the farm level over a 15-month period is too short to observe a significant decrease in the abundance of antibiotic resistance genes in the complex ecosystems that are poultry barns for the evaluated genes. The low fitness cost of carrying resistance determinants, the occurrence of compensatory mutations in these bacterial communities or the use of compounds co-selecting for some resistance determinants probably acted as main drivers. Also, the fact that participating farms of the current study followed the guidelines of the On-farm food safety program of the Chicken Farmers of Canada requiring that farmers wash and disinfect the barn only once a year might have influenced the dynamics of the measured resistance genes on those farms (134). It could also be hypothesized that the use of antibiotics such as spectinomycin-lincomycin at the hatchery level during the 15-month study period could have contributed to the persistence of some genetic determinants encoding resistance to sulfonamides that are harboured on mobile genetic elements along with *aadA*, a spectinomycin resistance gene (64).

Consistent with previous studies (116, 117), birds submitted to either a conventional or to a drug-free program over a 15-month period did not show major differences for the alpha diversity. Only the inverse Simpson alpha diversity index was marginally increased in conventional flocks, illustrating the stability of the caecal microbiota (92). In contrast, alpha diversity analyzes showed interesting changes when comparing flocks from barns using a long-term judicious program with a long-term conventional program (including continued or reintroduced) at sampling time point two. As shown in Table 2 (p.87), the alpha diversity of birds from flocks raised using a conventional program during and after the 15-month study period was greater than the one observed for birds sampled from flocks that reintroduced antibiotics or adopted a judicious program after the 15-month study period. These observations are in agreement with a previous study where the use of bacitracin increased the richness and the evenness of the chicken caecal microbiota by reducing

dominant microorganisms, such as *Lactobacillus* (98). However, no association between *Lactobacillus* and rearing program was documented in the present study. It could be hypothesized that the long term use of a wide variety of antibiotics, as well as the rotation of these compounds in time, could have depleted some sensitive microorganisms, which in turn could have promoted the growth of other microorganisms. At sampling time point two, it is worth mentioning that no change in the alpha diversity was detected between flocks from barns that had adopted a judicious antibiotic use program and those that had reintroduced antibiotics after the 15-month study. It could be hypothesized that using a conventional program during a longer period of time would have allowed for the caecal microbiota to diversify further in flocks where antibiotics were reintroduced after the 15-month study.

For the caecal community structure, the beta diversity between conventional and drug-free flocks at sampling time point one was significantly different. In addition, at sampling time point two, the beta diversity was significantly different between flocks sampled from barns that adopted a long-term strategy for judiciously using antibiotics, those that continued the conventional rearing program and those that reintroduced antibiotics after a short-term antibiotic withdrawal. These results are not surprising considering the previous observations of the antibiotic treatment effects on the bacterial community composition of the chicken caecum (98, 115). Results illustrated that a short-term antibiotic withdrawal and a long-term judicious use strategy mainly negatively affected *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* which are the 2 main families forming the caecal microbiota (114). *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* members have the ability to ferment and digest carbohydrates and produce small chain fatty acids such as butyrate (94, 114). In a previous work, among 16 butyrate producers from the *Firmicutes*, the clostridial clusters IV and XIVa were associated with the largest production of butyrate (135). Butyrate is an important source of energy for the intestinal epithelium and helps maintain its barrier function by regulating the proliferation of enterocytes (93). In addition to having a negative effect on the colonization of *C. perfringens* (136), it was also found that butyrate enhances performances as evidenced by an increased body weight (137). These last findings were associated with a decreased of *Lactobacillus* and an increase of the ratio of villus height to crypt depth (137). For both sampling time points, antibiotic restriction significantly decreased

Clostridium IV and *Intestinimonas*. The *Clostridium* cluster IV members includes *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* and *Anaerofilum* genera (138). These results are consistent with previous research work in which *Clostridium* IV members were enriched by the use of antimicrobial growth promoters (115). With regards to *Lachnospiraceae*, unclassified members at sampling time point one and *Blautia*, *Clostridium* XIVb and *Ruminococcus* 2 at sampling time point two were significantly decreased with both a short-term antibiotic withdrawal and a long-term judicious use strategy. Thus, these members were more abundant in birds raised with a conventional program. These results are in agreement with those of Costa et al. (2017), who also observed that *Clostridium* XIVb was significantly enriched with enramycin, a polypeptide antibiotic used at growth-promoting doses (117). In addition, both short-term antibiotic withdrawal and long-term judicious use strategy were significantly associated with a decrease of *Anaeroplasma*, a member of the caecal microbiota for which the role remains unclear (94, 139). Overall, these results suggest that restricting the use of antibiotics tends to decrease the abundance of bacterial populations producing butyrate, which could then affect bird performances and *C. perfringens* colonisation. These assumptions are consistent with the results obtained during the previous 15-month study. Indeed, this previous study showed that raising commercial broiler chickens using a drug-free program was negatively impacting the production performance and significantly increasing the occurrence of necrotic enteritis (4). However, due to the low number of farms within each antibiotic use program, the current study did not try to correlate production performances to the microbiota composition at sampling time point two.

Findings of the current study showed significant changes in the abundance of many antibiotic resistance genes depending on both the rearing program and the sampling time point (Figure 2 p.92, Figure 3 p.93). For farms A and B which adopted a long-term judicious antibiotic use strategy, a marked decrease in the abundance of various antibiotic resistance genes was observed, whereas this abundance increased for farms using antibiotics on a long-term basis. While minor changes such as a decrease of *int1* and *su1* in some drug-free flocks were observed between barns using either a drug-free or a conventional program after the 15-month study, the six-year period markedly influenced the abundance of many resistance genes, as predicted by Levin (2001), who examined results of studies that used mathematical models to estimate the

time needed for bacterial communities to show reversibility in their antibiotic resistance profile (133). Despite the fact that only two farms adopted a program for judiciously using antibiotics, results from these farms showed a potential impact of addressing the problem of antibiotic resistance by reducing the large-scale use of these compounds, as demonstrated by a systematic review and meta-analysis (18). In contrast, the long-term and routine use of antibiotics on four farms of the current study correlated with a global increase in the abundance of antibiotic resistance-encoding genes. These observations, believed to be influenced by the antibiotic selection pressure, are in agreement with some observations made at the bacterial strain level where the use of some antibiotics was associated with an increase in the prevalence of resistant bacteria to these antibiotics or other antibiotics by co-selection (64, 77). For example, since the voluntary ban on ceftiofur imposed by the poultry industry in Canada in 2014, a mix of spectinomycin and lincomycin was used at the hatchery level to prevent infectious diseases in chicks during the first few days of life (64). It has been reported that the co-selection and selection pressure generated by the preventive use of these two antibiotics at the hatchery level could have selected for gentamicin resistance (64). In addition, the genetic linkage between *vat(E)* and *erm(B)*, previously identified in *E. faecium* from European poultry isolates could have contributed to the co-selection of these genes as these appear to be part of a same transposon (140, 141). Similarly, the use of quaternary ammonium compounds as sanitizers in poultry barns and of sulfonamides for the treatment of bacterial infections in commercial broilers could have contributed to the spread of class 1 integrons and could explain the significant increase in the abundance of both *int11* and *sul1* in farms B, C, D and F of the current study (Figure 3, p.93). Indeed, class 1 integrons can carry both *sul1* and *qac* genes, in addition to being able to capture other resistance genes, such as *aadA* (64, 77).

When comparing sampling time points one and two, a closer examination of the relative abundance and the absolute copy numbers of the targeted genes revealed that the abundance of *vat(E)* decreased markedly in farms A and B, an observation that was not made for the other genes measured. Encoding for an acetyltransferase resulting in streptogramin A resistance in the carrying microorganism, *vat(E)* is found in *Enterococcus faecium*, a microorganism that is part of the intestinal microbiota of broiler chickens (56, 58). As the *vat(E)* gene has been found on

transferable plasmids (56), a great negative fitness cost associated with the carriage of this gene by a microorganism or a decrease in the rate of horizontal transfer for this mobile genetic element could both explain the decrease in the abundance of this gene observed on farms reducing the use of antibiotics. However, the rate of horizontal transfer of genes is difficult to predict, just as trends in horizontal antibiotic gene transfer according to the antibiotic exposure levels (142). For farm B (Figure 3, p.93), results showed an increase for genes associated with bacitracin and sulfonamide resistances. Considering that this farm had adopted a judicious antibiotic program for several years and that the restriction of the preventive use of antibiotics is a main predisposing factor for the occurrence of necrotic enteritis and of other concomitant bacterial infections (4), these results could reflect an increase in the therapeutic use of these compounds for the treatment of diseased commercial broilers (21). When comparing flocks between sampling time points one and two, results showed a significant increase in the abundance of five to seven targeted genes for farm D and we could presume that this increasing trend would be attributed to the antibiotic regimen used on this farm over the past six years. In addition, the abundance of the *bcrA* and *bcrB* genes increased or decreased jointly in different farms (Figure 2 p.92, Figure 3 p.93). These observations can be explained by the fact that these two genes are found on the *bcrABDR* operon (69).

This study illustrated an increase in the richness in the samples between points one and two, as well as a marked dispersion of the samples on the NMDS, which was probably attributed to some changes in farm management practices after completion of the 15-month study. Indeed, as all participating farms that adopted a standardized protocol for chick, feed, water and litter supply, and for coccidiosis management during the 15-month study went back to their previously highly diverse management practices once completing the study, this probably contributed to the changes observed in the caecal microbiota of broiler chickens. As previously described, many farm management factors can influence bird gut microbiota between flocks (5). According to the findings of the present study, it could be hypothesized that a standardization of farm management practices through a common rearing program could normalize the cecum bacterial community composition.

Results pertaining to the detection of the *C. perfringens* alpha toxin-encoding gene were quite unexpected since only 17% of the samples were found positive for the presence of *plc*. In healthy broiler chickens, since the cecum is the main colonization site for *C. perfringens* and because the alpha toxin gene is recognized as a hallmark of all *C. perfringens*, a 100% positivity rate was anticipated (89, 143). This low prevalence suggests that the number of *C. perfringens* in the samples screened was below the previously reported detection limit of 10^3 bacteria per gram of fecal content (89). Failure to detect the *cpe* gene can therefore be explained since only between 1% and 5% of *C. perfringens* population is known to be enterotoxigenic (144). Interestingly, as the *C. perfringens* population increases during a necrotic enteritis outbreak (143), more than half of the positive samples for the presence of the *plc* gene were identified from flocks experimenting short-term antibiotic withdrawal and long-term judicious use strategy that are recognized to increase the risk of occurrence for this disease.

In conclusion, results from the current study showed that moving to a drug-free program over a 15-month period does not seem to be sufficient to reduce the abundance of many antibiotic resistance-encoding genes, while the judicious use of antibiotics over many years seems to do so. The short-term antibiotic withdrawal and the long-term judicious use strategy changed the bird intestinal microbiota composition, where *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* families were negatively impacted, which could be correlated with negative performances and the increase of *C. perfringens* populations. Results also illustrated that adopting a conventional rearing program on commercial broiler chicken farms selected specific antibiotic resistance-encoding genes in many barns. This study highlights the potential impacts of different rearing programs in poultry production and will help develop future policies by guiding science-based decisions on how the use of antibiotics in broiler chicken production should be reduced while maintaining production performance. Reducing antibiotics and using them solely as a therapeutic option could help preserve the effectiveness of these precious tools by contributing to curb the global antibiotic resistance problem.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

MG and AT elaborated the study design. CT and AT made the experiments. GB performed the statistical analyses. All the authors analyzed the results, wrote this manuscript and approved the publication of this work.

Funding

This study was supported by funding from the NSERC (#520873-17) and the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA). The Comité des bourses des cycles supérieurs also supported this project by awarding scholarships.

Acknowledgments

The authors are very grateful for the support given by Charlotte Braley, Guillaume Larivière-Gauthier, Fanie Shedleur-Bourguignon, William P. Thériault, Amandine Maurin, Mélodie Langlais, Nicole Trottier, Saoussen Sfaxi, Nicolas Nantel-Fortier, Ilhem Meniaï, Jessika Beauchemin, Mathieu Bellerose, Yuan-Ching Tien, Jessica Subirats, Andrew Scott and Tam T Tran. Special thanks to Dr. Marie Archambault and Dr. John Fairbrother for sharing bacterial strains, and to the six participating farms.

4.6 Tables

Gene	Sample treatment	Detection result (%)
<i>bcrA</i>	From 288 samples pooled in groups of 6 or 4 samples	100
<i>bcrB</i>		
<i>bcrR</i>	From 288 samples pooled in groups of 4 samples	100
<i>vat(D)</i>		4
<i>vat(E)</i>		72
<i>mcr-1</i>		0
<i>lnu(B)</i>	From 288 individual samples	34
<i>cpe</i>		0
<i>plc</i>		17
<i>erm(B)</i>	From 246 individual samples	100
<i>sul1</i>	From 48 individual samples	69
<i>intl1</i>		92
<i>vga(A)</i>	From 12 individual samples	non-specific amplification
<i>vgb(A)</i>		

Table 1. – Sample treatment and PCR detection results.

	Observed	Shannon	InvSimpson
A) Sampling time point one			
Conventional	409.45 (16.99)	4.44 (0.11)	38.87 (4.95)
Drug-free	421.12 (16.99)	4.36 (0.11)	32.98 (4.95)
p-value	0.13	0.11	0.03
B) Sampling time point two			
Judicious	494.94 (28.88)	4,19 (0.07)	24,14 (2.77)
Reintroduced	524.08 (21.11)	4,26 (0.05)	24,85 (2.20)
Continued	573.10 (21.11)	4,56 (0.05)	38.67 (2.20)
p-values			
*Judicious vs reintroduced	0.42	0.40	0.84
*Judicious vs continued	0.03 ^a	<.0001	<.0001
*Reintroduced vs continued	<.0001	<.0001	<.0001

Table 2. – A) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices between conventional and drug-free flocks after the 15-month study (sampling time point one) using a linear mixed model. B) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices, six years after the 15-month study (sampling time point two), between flocks from barns that adopted a long-term judicious use strategy (judicious), flocks that continued the conventional rearing program (continued) and flocks that reintroduced antibiotics after the 15-month study (reintroduced) using a linear mixed model.

^a Not statistically significant after the alpha level was adjusted downward.

*The p-values are for the indicated pairwise comparisons.

	Observed	Shannon	InvSimpson
All sampling time points			
A) Farms C, D, E and F			
Sampling time point one			
Conventional	419.17 (17.56)	4.49 (0.09)	40.36 (4.40)
Drug-free	415.71 (17.56)	4.36 (0.09)	31.40 (4.40)
Sampling time point two			
Continued	573.10 (17.46)	4.56 (0.09)	38.67 (4.38)
Reintroduced	524.08 (17.46)	4,26 (0.09)	24,85 (4.38)
p-value			
*Conventional vs continued	<.0001	0.53	0.72
*Drug-free vs reintroduced	<.0001	0.32	0.16
B) Farms A and B			
Sampling time point one			
Conventional	393.05 (13.71)	4.35 (0.16)	35.89 (8.48)
Drug-free	438.05 (13.71)	4.36 (0.16)	36.92 (8.48)
Sampling time point two			
Judicious ^a	492.58 (13.13)	4.22 (0.16)	25.93 (8.42)
Judicious ^b	497.29 (13.13)	4.17 (0.16)	22.34 (8.42)
p-value			
*Conventional vs judicious ^a	<.0001	0.21	0.04
*Drug-free vs judicious ^b	0.002	0.05	0.003

Table 3. – A) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices, for farms C, D, E and F, between barns sampled after the 15-month study (sampling time point one) and six years later (sampling time point two) using a linear mixed model. B) Comparison by columns of mean (SEM) alpha diversity indices, for farms A and B, between barns at sampling time points one and two, using a linear mixed model.

^a Was on a conventional rearing program at sampling time point one.

^b Was on a drug-free program at sampling time point one.

*The p-values are for the indicated pairwise comparisons.

Drug-free program	Taxa	Coefficient	SE
Positively associated	<i>Holdemania</i>	0,0003	0,0001
	<i>Anaerofilum</i>	0,0004	0,0001
	<i>Ruminococcus 2</i>	0,0007	0,0002
	Proteobacteria unclassified	0,0009	0,0002
	<i>Enterococcus</i>	0,0067	0,0022
	<i>Parasutterella</i>	0,0111	0,0029
	<i>Akkermansia</i>	0,0178	0,0053
	<i>Odoribacter</i>	0,0611	0,0158
	<i>Bacteroides</i>	0,0669	0,0339
	Negatively associated	<i>Bacteroidales</i> unclassified	-0,0328
<i>Lachnospiraceae</i> unclassified		-0,0243	0,0061
<i>Clostridiales</i> unclassified		-0,0229	0,0072
Firmicutes unclassified		-0,0186	0,0102
Subdoligranulum		-0,0183	0,0086
<i>Clostridium IV</i>		-0,0073	0,0040
<i>Anaeroplasma</i>		-0,0038	0,0012
<i>Intestinimonas</i>		-0,0012	0,0006
<i>Coriobacteriaceae</i> unclassified		-0,0007	0,0001
<i>Anaerotruncus</i>	-0,0002	0,0001	

Table 4. – Bacterial members associated with the drug-free program after the 15-month study using MaAsLin2 at the genus level. The positively associated genera are significantly more abundant in the drug-free than conventional program. The negatively associated genera are significantly less abundant in these drug-free flocks. Taxonomic assignment at genus level was not possible for unclassified members.

Judicious use of antibiotics	Taxa	Coefficient	SE
Positively associated	<i>Sporobacter</i>	0,0001	< 0,0001
	<i>Butyricoccus</i>	0,0124	0,0034
	<i>Butyricimonas</i>	0,0162	0,0010
Negatively associated	<i>Ruminococcaceae</i> unclassified	-0,0365	0,0119
	<i>Blautia</i>	-0,0086	0,0035
	<i>Clostridium</i> IV	-0,0068	0,0020
	<i>Clostridium</i> XIVb	-0,0056	0,0022
	<i>Clostridia</i> unclassified	-0,0052	0,0011
	<i>Intestinimonas</i>	-0,0038	0,0012
	<i>Romboutsia</i>	-0,0016	0,0007
	<i>Anaeroplasma</i>	-0,0011	0,0003
	<i>Ruminococcus</i> 2	-0,0004	0,0001
	<i>Coriobacteriaceae</i> unclassified	-0,0003	0,0001
<i>Coriobacteriaceae</i> unclassified	-0,0002	0,0001	

Table 5. – Bacterial members associated with the judicious use of antibiotics, for farms A and B, six years after the 15-month study using MaAsLin2 at the genus level. The positively associated genera are significantly more abundant with the judicious than conventional program (including barns that continued and reintroduced antibiotics after the 15-month study). The negatively associated genera are significantly less abundant in flocks using a judicious program. Taxonomic assignment at genus level was not possible for unclassified members.

4.7 Figures

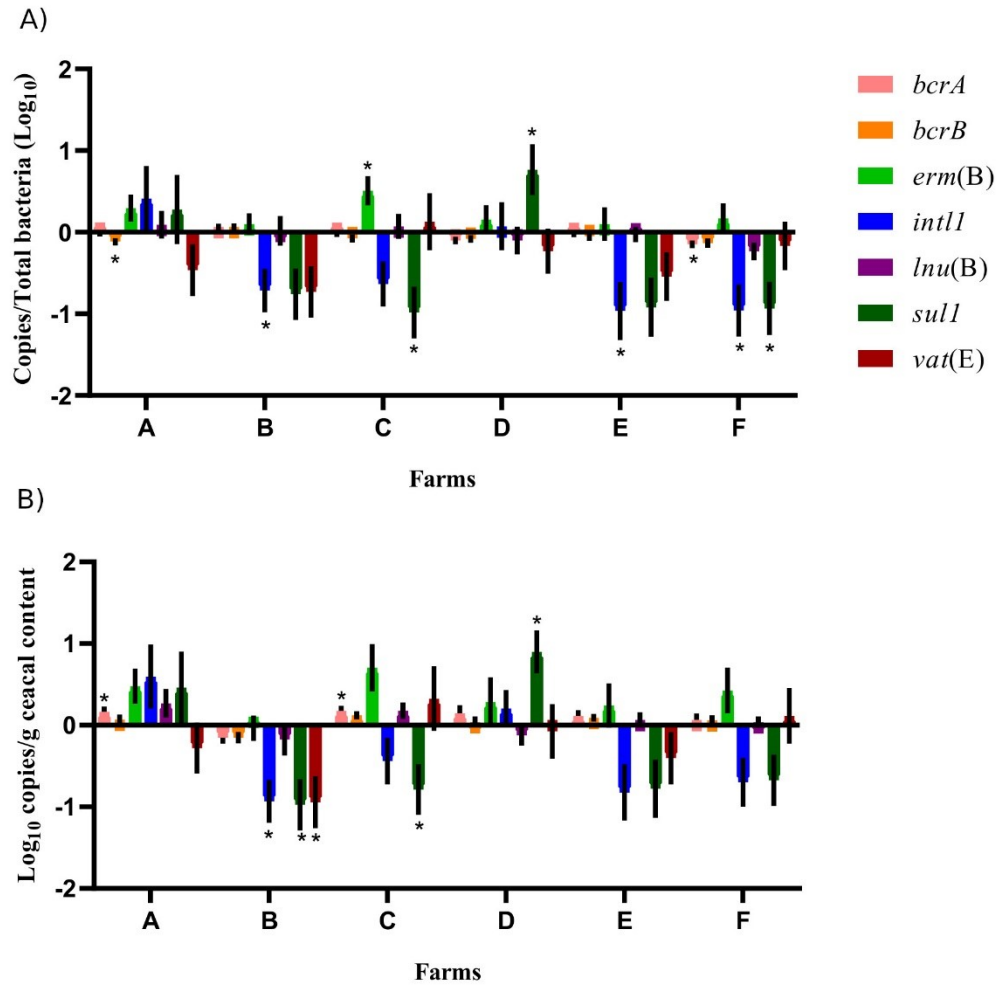


Figure 1. – Difference of resistance gene targets between drug-free and conventional flocks for each farm at sampling time point one. Negative results indicate a decrease of gene target and positive results indicate an increase of gene target in drug-free flocks. Data are presented as the mean (SEM) of 12 replicates. For the quantitative approach, each sample was run in triplicate (n=3). A) Values are expressed on a ratio referenced to the total bacterial content of samples (16S rRNA). B) Values are expressed on a weight basis (raw values). *Significant values are lower than the alpha level adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

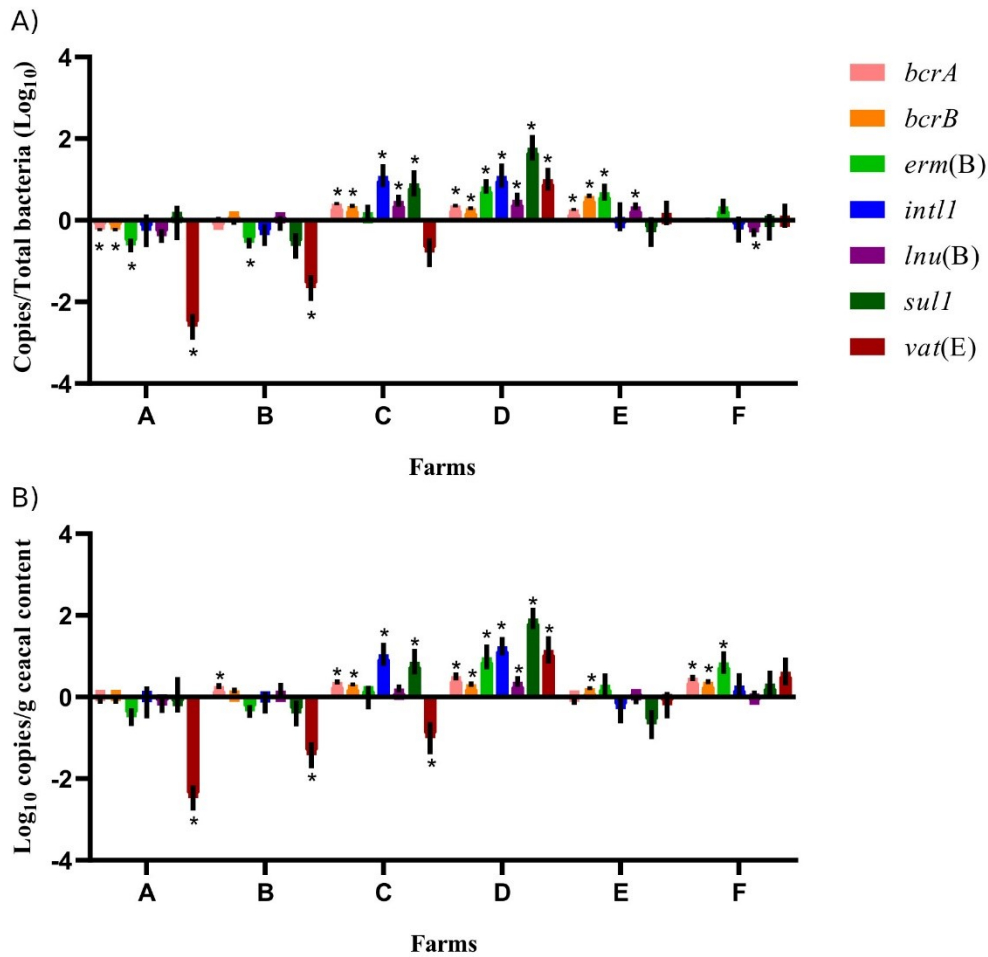


Figure 2. – Difference of resistance gene targets between paired flocks sampled from conventional barns at sampling time point one and sampling time point two. At sampling time point one, conventional barns from farms C to F remained on a conventional rearing program after the 15-month study period whereas barns from farms A and B moved to a program for judiciously using antibiotics. Negative results indicate a decrease of gene target and positive results indicate an increase of gene target in the sampled flock at sampling time point two. Data are presented as the mean (SEM) of 12 replicates. For the quantitative approach, each sample was run in triplicate (n=3). A) Values are expressed on a ratio referenced to the total bacterial content of samples (16S rRNA). B) Values are expressed on a weight basis (raw values). *Significant values are lower than the alpha level adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

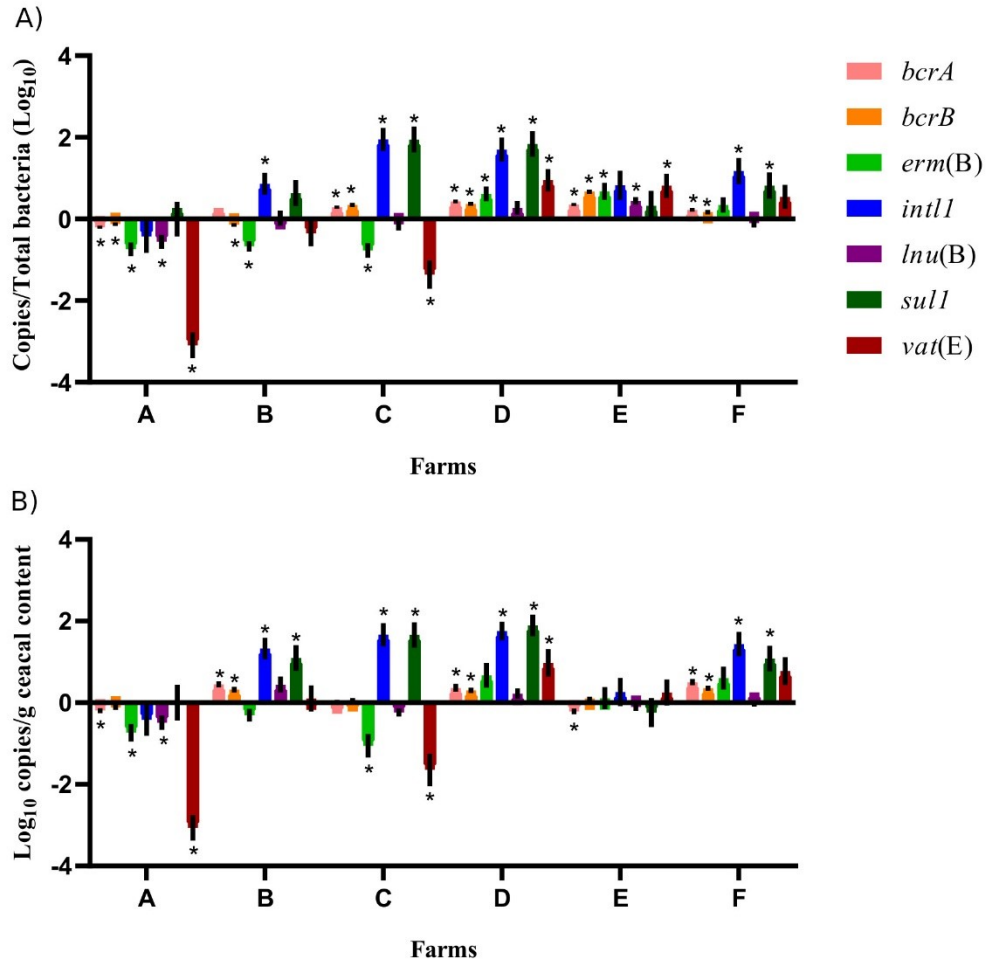


Figure 3. – Difference of resistance gene targets between paired flocks sampled from drug-free barns at sampling time point one and sampling time point two. Drug-free barns from farms C to F went back to a conventional rearing protocol after the 15-month study period, whereas drug-free barns from farms A and B moved to a program for judiciously using antibiotics. Negative results indicate a decrease of gene target and positive results indicate an increase of gene target in the sampled flock at sampling time point two. Data are presented as the mean (SEM) of 12 replicates. For the quantitative approach, each sample was run in triplicate (n=3). A) Values are expressed on a ratio referenced to total bacterial content of samples (16S rRNA). B) Values are expressed on a weight basis (raw values). *Significant values are lower than the alpha level adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

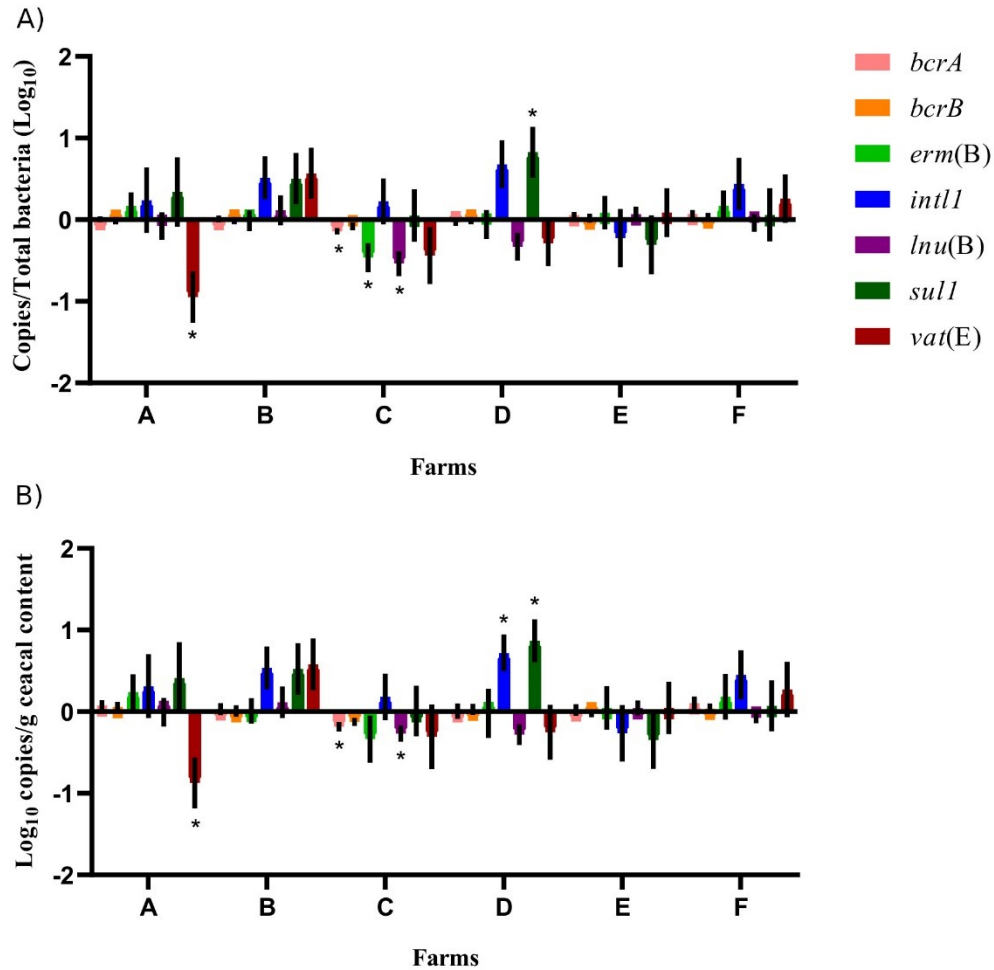


Figure 4. – Difference of resistance gene targets at sampling time point two between flocks of a same participating farm that adopted either a conventional rearing program or a program for judiciously using antibiotics after the completion of the 15-month study period, considering the barn that was on a drug-free program during the 15-month study period as the comparison reference unit. Negative results indicate a decrease of gene target and positive results indicate an increase of gene target in the flock sampled at sampling time point two used as a reference unit. Data are presented as the mean (SEM) of 12 replicates. For the quantitative approach, each sample was run in triplicate (n=3). A) Values are expressed on a ratio referenced to total bacterial content of samples (16S rRNA). B) Values are expressed on a weight basis (raw values).

*Significant values are lower than the alpha level adjusted with the Benjamini-Hochberg method.

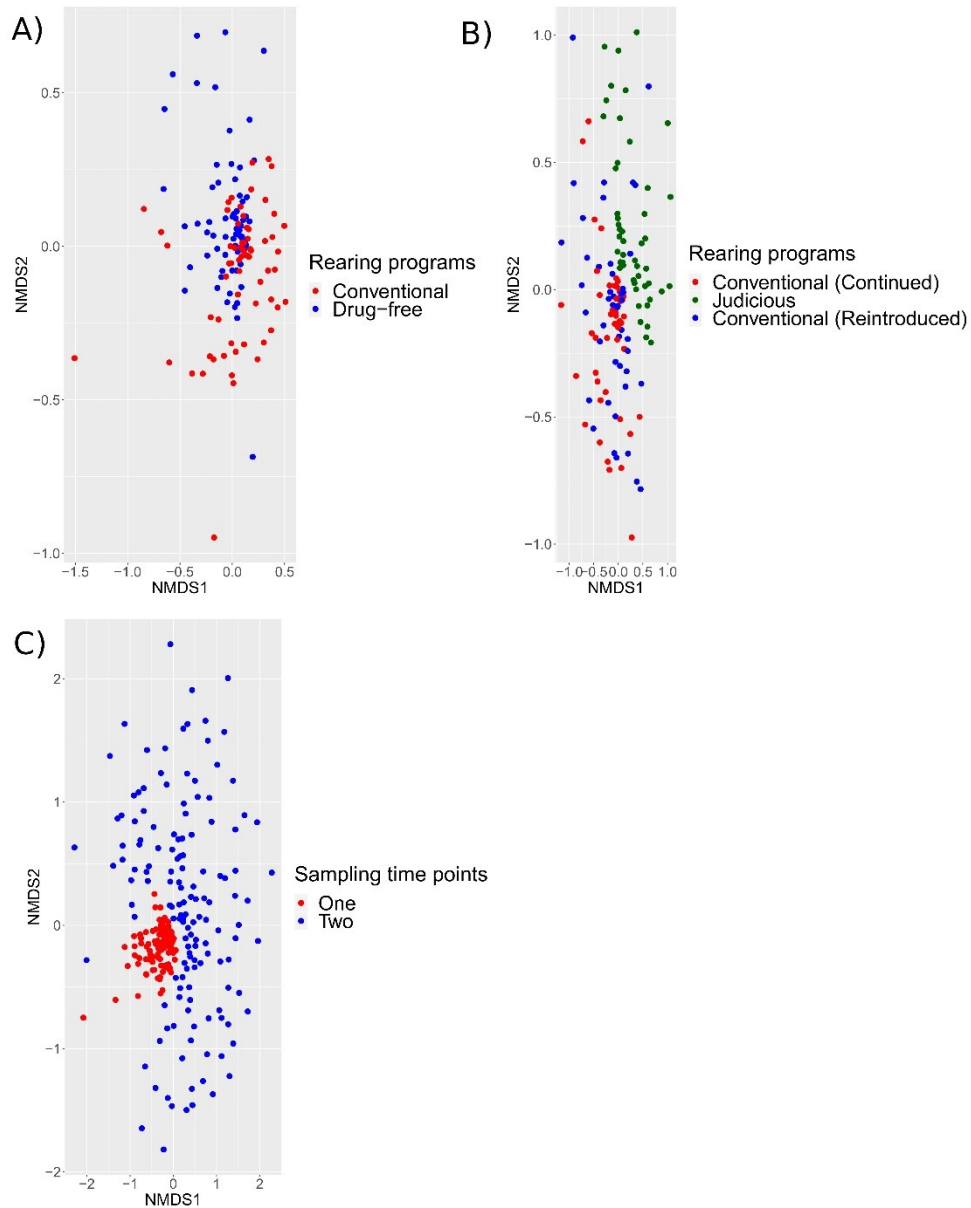


Figure 5. – Beta diversity calculated with Jaccard index using ADONIS test with a significance level of 0.05. All comparison were statistically significant ($p < .0001$). Each point represented one bird sampled. A) Differences between conventional and drug-free programs at sampling time point one. B) Difference between flocks, at sampling time point two, from barns that adopted a long-term strategy for judiciously using antibiotics, barns that continued the conventional rearing program and barns that reintroduced antibiotics after a short-term antibiotic withdrawal. C) Differences between sampling time points one and two.

4.8 Supplementary Material

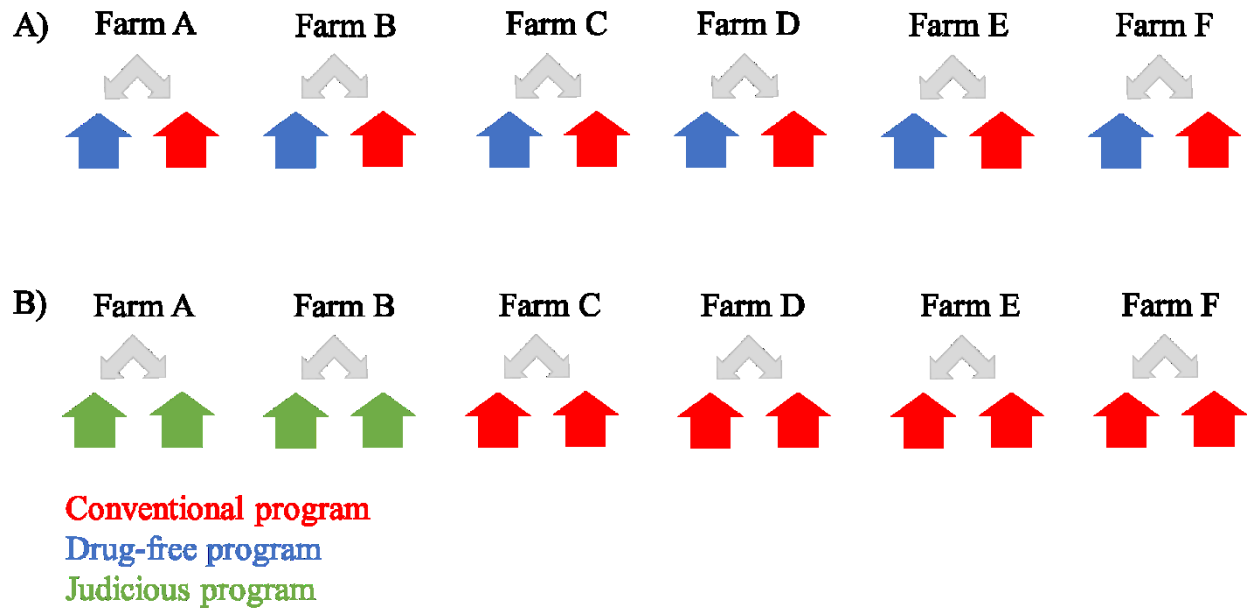


Figure S1. – Study design A) During the 15-month study, for each participating farm, one barn was on a drug-free program and one barn was on a conventional program. B) After the 15-month study, farms C, D, E and F reintroduced a conventional program in their drug-free barn, while the control barn on those farms was kept on a conventional program. Farms A and B moved to a program for responsibly using antibiotics in both rearing facilities.

Gene	Primer name	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	Cycling conditions	25ul reaction mixture	References			
bcrA	<i>bcrA</i> _CP-F	GGCAATACCAAGCCGTTGCTTCAT	408	1 cycle of 5 min at 94°C; 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C	5µl of DNA was added to 2.5 µl of 10 x PCR buffer, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM MgSO ₄ , 320 nM of each primer and 1 U of Taq DNA polymerase	(66)			
	<i>bcrA</i> _CP-R	TTACGAAGCGATACGGAACAGCCA							
bcrB	<i>bcrB</i> _CP-F	ATAGGTGGCTGTCCACGGATACAA	247						
	<i>bcrB</i> _CP-R	CGTTTGTGGGCTATATGACGCTGT							
bcrR	<i>bcrR</i> _CP-F	AAGGGCGGTTACATAGGGTTGTCT	379						
	<i>bcrR</i> _CP-R	ATGTCTGCTATCGGGCGAAGAACT							
cpe	GAP11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	154	1 cycle of 5 min at 95°C; 45 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 30 sec at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C	3 µl of DNA was added to 2.5 µl of 10 x PCR buffer, 0.2 mM of dNTPs, 2 mM MgSO ₄ , 200 nM of each primer and 1 U of Taq DNA polymerase	(89)			
	GAP12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC							
erm(B)	ermB-F	AAAACCTACCCGCCATACCA	139						
	ermB-R	TTTGCGTGTTCATTGCTT							
intl1	F6	GCATCCTCGGTTTTCTGG	457						
	R6	GGTGTGGCGGGCTTCGTG							
Inu(B)	LINB1	CCTACCTATTGTTTGTGGAA	945				1 cycle of 5 min at 94°C; 35 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 54°C, and 1 min at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C	5µl of DNA was added to 2.5 µl of 10 x PCR buffer, 0.2 mM of dNTPs, 2 mM MgSO ₄ , 150 nM of each primer and 1.25 U of Taq DNA polymerase	(51, 58)
	LINB2	ATAACGTTACTCTCCTATTC							
mcr-1	CLR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309						
	CLR5-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG							
plc	Cper-plc508-F	CCGTTGATAGCGCAGGACA	219						
	Cper-plc508-R	CCCAACTATGACTCATGCTAGCA							

				30 sec at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C	of dNTPs, 2 mM MgSO ₄ , 200 nM of each primer and 1 U of Taq DNA polymerase	
<i>sul1</i>	F R	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCTCGGTCTC	822	1 cycle of 5 min at 94°C; 35 cycles of 60 sec at 94°C, 60 sec at 53°C, and 60 sec at 72°C; 1 cycle of 5 min at 72°C	5µl of DNA was added to 2.5 µl of 10 x PCR buffer, 0.2 mM of dNTPs, 2 mM MgSO ₄ , 200 nM of each primer and 1 U of Taq DNA polymerase	(77, 128)
<i>vat(D)</i>	satA-1 satA-2	GCTCAATAGGACCAGGTGTA TCCAGCTAACATGTATGGCG	272	1 cycle of 3 min at 94°C; 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C; 1 cycle of 10 min at 72°C	See <i>Inu(B)</i> gene	(54, 58)
<i>vat(E)</i>	satG-1 satG-2	ACTATACCTGACGCAAATGC GGTTCAAATCTTGGTCCG	512	1 cycle of 5 min at 94°C; 30 cycles of 25 sec at 94°C, 40 sec at 52°C, and 50 sec at 72°C; 1 cycle of 6 min at 72°C	See <i>Inu(B)</i> gene	(54, 58)
<i>vga(A)</i>	vga-1 vga-2	AGTGGTGGTGAAGTAACACG CTTGCTCCTCCGGAATAC	660	See <i>vat(D)</i> gene	See <i>Inu(B)</i> gene	(54)
<i>vgb(A)</i>	vgb-1 vgb-2	TACAGAGTACCCACTACCGA TCAATTCCTGCTCCAGCAGT	570	1 cycle of 3 min at 94°C; 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 52°C, and 1 min at 72°C; 1 cycle of 10 min at 72°C	See <i>Inu(B)</i> gene	(54)

Table S1. – Primers and reaction conditions for gene targets PCR amplification.

Gene target	Primer name	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	Cycling conditions	References
Universal bacteria, <i>rrnS</i>	BACT1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	123	(Bio-Rad CFX96)	(128, 147)
	PROK1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT		1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 35s at 59°C	
	TM1389F	HEX-CTTGTACACACCCCGTC-BHQ1			
<i>bcrA</i>	<i>bcrA</i> _CP-F <i>bcrA</i> _CP-R	GGCAATACCAAGCCGTTGCTTCAT TTACGAAGCGATACGGAACAGCCA	408	(Roche LC96) 1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 61°C; 1 cycle of 10s at 95°C, 60s at 65°C and 1s at 97°C	(66)
<i>bcrB</i>	<i>bcrB</i> _CP-F <i>bcrB</i> _CP-R	ATAGGTGGCTGTCCACGGATACAA CGTTTGTGGGCTATATGACGCTGT	247	(Roche LC96) 1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 63°C; 1 cycle of 10s at 95°C, 60s at 65°C and 1s at 97°C	(66)
<i>erm(B)</i>	<i>ermB</i> -F <i>ermB</i> -R	AAAACCTACCCGCCATACCA TTTGCGTGTTCATTGCTT	139	(Bio-Rad CFX96) 1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 65°C; 65°C to 95°C increment of 1°C for 5s	(128, 145)
<i>intl1</i>	<i>Intl1</i> -F2	TCGTGCGTCGCCATCACA	67	(Bio-Rad CFX96)	(128, 148)
	<i>Intl1</i> -R2	GCTTGTCTACGGCACGTTTGA		1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 62°C; 65°C to 95°C increment of 1°C for 5s	
<i>lnu(B)</i>	LINB1 LINB2	CCTACCTATTGTTGTGGAA ATAACGTTACTCTCTATTC	945	(Roche LC96) 1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 58°C; 1 cycle of 10s at 95°C, 60s at 65°C and 1s at 97°C	(51)
<i>sul1</i>	<i>sul1</i> -F	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT	105	(Bio-Rad CFX96)	(127, 128)
	<i>sul1</i> -R	GAAGAACCGCACAAATCTCGT		1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 64°C; 65°C to 95°C increment of 1°C for 5s	
<i>vat(E)</i>	<i>satG</i> -1 <i>satG</i> -2	ACTATACCTGACGCAAATGC GGTTCAAATCTTGGTCCG	512	(Roche LC96) 1 cycle of 10 min at 95°C; 40 cycles of 15s at 95°C and 60s at 60°C; 1 cycle of 10s at 95°C, 60s at 65°C and 1s at 97°C	(54)

Table S2. – Primers, probes and conditions for qPCR amplifications.

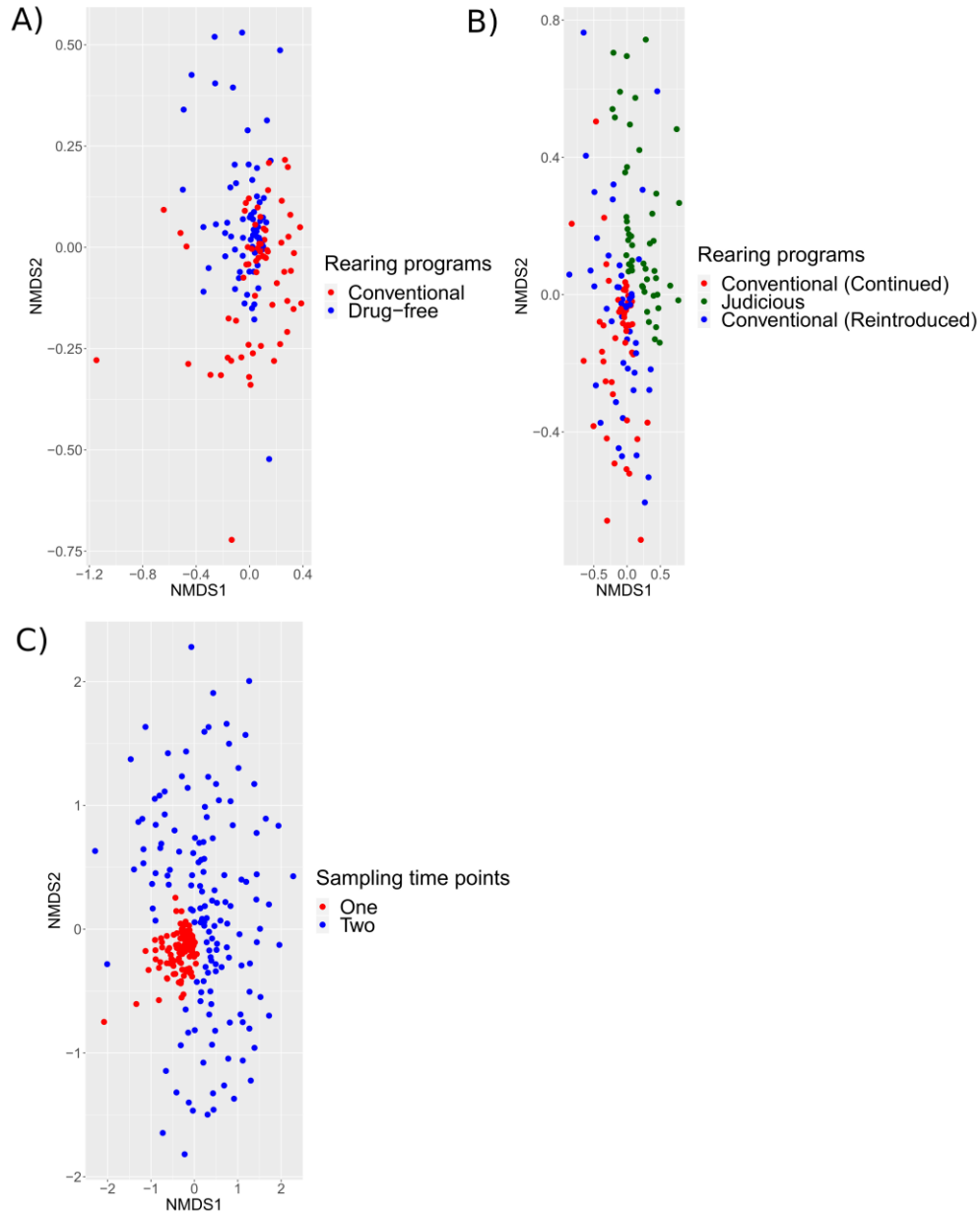


Figure S2. – Beta diversity calculated with Bray-Curtis index using ADONIS test with a significance level of 0.05. All comparisons were statistically significant ($p < .0001$). Each point represented one bird sampled. A) Differences between conventional and drug-free programs at sampling time point one. B) Difference between flocks, at sampling time point two, from barns that adopted a long-term judicious use strategy, barns that continued the conventional rearing program and barns that reintroduced antibiotics after a short-term antibiotic withdrawal. C) Differences between sampling time points one and two.

Taxa	Coefficient	SE
B,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Bacteroidales_uncl,Bacteroidales_uncl,Otu00007	-0,032752	0,005955
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum,Otu00013	-0,015128	0,007514
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00084	-0,008660	0,004099
B,Firmicutes,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Otu00053	-0,006701	0,003338
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Butyricoccus,Otu00080	-0,006242	0,001488
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00101	-0,004496	0,000921
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVa,Otu00061	-0,003935	0,001483
B,Tenericutes,Mollicutes,Anaeroplasmatales,Anaeroplasmataceae,Anaeroplasma,Otu00122	-0,003772	0,001187
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00067	-0,003727	0,001554
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00056	-0,003103	0,001523
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00152	-0,002807	0,000650
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00077	-0,002122	0,000674
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00117	-0,002057	0,000653
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00208	-0,001862	0,000239
B,Firmicutes,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Otu00205	-0,001400	0,000197
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00200	-0,001398	0,000419
B,Firmicutes,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Otu00222	-0,001396	0,000270
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00243	-0,001393	0,000438
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscillibacter,Otu00106	-0,001383	0,000520
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00250	-0,001283	0,000151
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00133	-0,001166	0,000446
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00288	-0,001134	0,000371
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcus,Otu00187	-0,001064	0,000268
B,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Erysipelotrichaceae_uncl,Otu00043	-0,001027	0,000363
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00271	-0,000863	0,000249
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00214	-0,000830	0,000339
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00167	-0,000780	0,000327
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00254	-0,000736	0,000183
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00209	-0,000688	0,000291
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00272	-0,000547	0,000146
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00213	-0,000528	0,000269
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00352	-0,000407	0,000075
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00422	-0,000371	0,000057
B,ActinoB,ActinoB,CorioBles,CorioBceae,CorioBceae_uncl,Otu00386	-0,000365	0,000066
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00404	-0,000334	0,000066
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00380	-0,000260	0,000076
B,ActinoB,ActinoB,CorioBles,CorioBceae,CorioBceae_uncl,Otu00466	-0,000258	0,000059
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00392	-0,000253	0,000076

B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00451	-0,000251	0,000049
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Anaerotruncus,Otu00312	-0,000241	0,000096
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00507	-0,000177	0,000018
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00568	-0,000176	0,000047
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00342	-0,000133	0,000063
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00607	0,000113	0,000019
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_uncl,Clostridia_uncl,Clostridia_uncl,Otu00589	0,000125	0,000014
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00585	0,000128	0,000014
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00539	0,000183	0,000045
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00448	0,000185	0,000050
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00526	0,000215	0,000023
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00408	0,000250	0,000069
B,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Holdemania,Otu00433	0,000252	0,000054
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_III,Otu00435	0,000276	0,000049
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00424	0,000276	0,000074
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00361	0,000290	0,000053
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00427	0,000304	0,000040
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00349	0,000357	0,000099
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Anaerofilum,Otu00321	0,000373	0,000088
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00360	0,000391	0,000179
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00362	0,000420	0,000095
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00420	0,000427	0,000139
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00226	0,000431	0,000092
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00327	0,000476	0,000067
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00313	0,000488	0,000093
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscilibacter,Otu00290	0,000539	0,000071
B,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Erysipelotrichaceae_uncl,Otu00102	0,000619	0,000204
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00276	0,000649	0,000189
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Ruminococcus2,Otu00258	0,000662	0,000156
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00317	0,000744	0,000191
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00301	0,000828	0,000200
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00270	0,000864	0,000109
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00268	0,000875	0,000296
B,ProteoB,ProteoB_uncl,ProteoB_uncl,ProteoB_uncl,ProteoB_uncl,Otu00225	0,000923	0,000241
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Pseudoflavonifractor,Otu00201	0,000931	0,000215
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00306	0,000963	0,000322
B,Firmicutes,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Otu00194	0,000997	0,000180
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00256	0,001030	0,000191
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00202	0,001042	0,000144

B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00158	0,001048	0,000163
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00216	0,001427	0,000448
B,Firmicutes,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Firmicutes_uncl,Otu00203	0,001548	0,000404
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_uncl,Otu00124	0,001806	0,000739
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00140	0,001839	0,000427
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00112	0,002827	0,000781
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum,Otu00125	0,003300	0,000670
B,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,B_uncl,Otu00107	0,003433	0,000736
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00130	0,003580	0,000919
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Blautia,Otu00147	0,003638	0,000903
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_uncl,Otu00079	0,003996	0,001248
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_uncl,Clostridiales_uncl,Otu00088	0,005009	0,001922
B,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Enterococcaceae,Enterococcus,Otu00058	0,006746	0,002229
B,ProteoB,BetaproteoB,Burkholderiales,Sutterellaceae,Parasutterella,Otu00011	0,011086	0,002948
B,Verrucomicrobia,Verrucomicrobiae,Verrucomicrobiales,Verrucomicrobiaceae,Akkermansia,Otu00022	0,017810	0,005260
B,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00028	0,021493	0,007789
B,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Odoribacter,Otu00003	0,061067	0,015814
B,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Bacteroidaceae,Bacteroides,Otu00001	0,075074	0,030693

Table S3. – Bacterial members associated with the drug-free program after the 15-month study using MaAsLin2 at the OTU level. The positively associated genera are significantly more abundant in the drug-free than conventional program. The negatively associated genera are significantly less abundant in drug-free flocks.

taxa	Rearing programs	coefficient	SE
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00025	Judicious	-0,010362	0,001305
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum,Otu00016	Judicious	-0,008222	0,003583
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Blautia,Otu00017	Judicious	-0,007762	0,003461
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00021	Judicious	-0,006684	0,002207
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00029	Judicious	-0,006198	0,002748
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00066	Judicious	-0,005921	0,001293
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00067	Judicious	-0,005398	0,001231
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00028	Judicious	-0,005352	0,002506
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00035	Judicious	-0,004929	0,001594
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Enterococcaceae,Enterococcus,Otu00058	Reintroduce d	-0,004043	0,001898
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00047	Judicious	-0,003952	0,001915
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00025	Reintroduce d	-0,003729	0,001305
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00064	Judicious	-0,003688	0,001193
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00034	Judicious	-0,003636	0,001093
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00032	Judicious	-0,003555	0,001604
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00113	Judicious	-0,003177	0,000813
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00042	Reintroduce d	-0,002852	0,001121
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00066	Reintroduce d	-0,002604	0,001293
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00077	Judicious	-0,002369	0,000913
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00088	Judicious	-0,002315	0,000785
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00154	Judicious	-0,002304	0,000564

Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00215	Judicious	-0,002290	0,001032
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00162	Judicious	-0,002229	0,000390
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00060	Judicious	-0,002131	0,001009
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Otu00192	Judicious	-0,002114	0,000845
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00131	Judicious	-0,002085	0,000691
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Peptostreptococcaceae,Romboutsia,Otu00184	Reintroduce d	-0,001924	0,000680
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00068	Reintroduce d	-0,001915	0,000609
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Intestinimonas,Otu00111	Judicious	-0,001874	0,000450
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00054	Judicious	-0,001813	0,000512
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Peptostreptococcaceae,Romboutsia,Otu00184	Judicious	-0,001589	0,000680
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00135	Reintroduce d	-0,001527	0,000561
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00054	Reintroduce d	-0,001489	0,000512
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00135	Judicious	-0,001381	0,000561
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00169	Judicious	-0,001378	0,000420
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00199	Judicious	-0,001302	0,000245
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00082	Judicious	-0,001190	0,000556
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Otu00190	Judicious	-0,001148	0,000268
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Otu00190	Reintroduce d	-0,001148	0,000268
Bacteria,Tenericutes,Mollicutes,Anaeroplasmatales,Anaeroplasmataceae,Anaeroplasma,Otu00122	Judicious	-0,001140	0,000257
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00100	Judicious	-0,001134	0,000189

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00210	Judicious	-0,001053	0,000354
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00195	Judicious	-0,001019	0,000352
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00200	Judicious	-0,000966	0,000244
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00101	Reintroduce d	-0,000947	0,000481
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00160	Judicious	-0,000930	0,000173
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00281	Judicious	-0,000930	0,000305
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00281	Reintroduce d	-0,000930	0,000305
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00137	Judicious	-0,000928	0,000391
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00209	Judicious	-0,000905	0,000377
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00264	Judicious	-0,000895	0,000312
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00161	Judicious	-0,000846	0,000417
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00282	Judicious	-0,000825	0,000239
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00282	Reintroduce d	-0,000825	0,000239
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00231	Judicious	-0,000763	0,000155
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00231	Reintroduce d	-0,000763	0,000155
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00245	Judicious	-0,000756	0,000116
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00245	Reintroduce d	-0,000756	0,000116
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00218	Judicious	-0,000694	0,000133
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00327	Judicious	-0,000679	0,000245

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00208	Reintroduce	-0,000672	0,000216
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00255	Judicious	-0,000613	0,000172
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00255	Reintroduce	-0,000613	0,000172
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00293	Judicious	-0,000584	0,000175
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00293	Reintroduce	-0,000584	0,000175
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00331	Judicious	-0,000584	0,000198
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00253	Judicious	-0,000583	0,000131
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00249	Judicious	-0,000573	0,000221
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00249	Reintroduce	-0,000573	0,000221
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00179	Judicious	-0,000568	0,000299
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00250	Judicious	-0,000548	0,000157
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscillibacter,Otu00289	Judicious	-0,000541	0,000156
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00234	Judicious	-0,000534	0,000219
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00291	Judicious	-0,000529	0,000265
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00256	Judicious	-0,000526	0,000252
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00197	Judicious	-0,000518	0,000107
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00100	Reintroduce	-0,000494	0,000189
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00276	Judicious	-0,000483	0,000062
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00241	Judicious	-0,000459	0,000191
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00246	Judicious	-0,000455	0,000100

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00246	Reintroduce d	-0,000455	0,000100
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00376	Judicious	-0,000453	0,000156
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00376	Reintroduce d	-0,000453	0,000156
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00472	Judicious	-0,000447	0,000094
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscillibacter,Otu00398	Judicious	-0,000444	0,000069
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Gordonibacter,Otu00334	Judicious	-0,000443	0,000094
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00375	Judicious	-0,000437	0,000134
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00375	Reintroduce d	-0,000437	0,000134
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00270	Reintroduce d	-0,000426	0,000142
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00389	Judicious	-0,000402	0,000098
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00389	Reintroduce d	-0,000402	0,000098
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00369	Reintroduce d	-0,000396	0,000110
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Blautia,Otu00244	Judicious	-0,000396	0,000148
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00159	Judicious	-0,000379	0,000148
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Ruminococcus2,Otu00258	Judicious	-0,000372	0,000107
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Blautia,Otu00188	Judicious	-0,000369	0,000121
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00514	Judicious	-0,000369	0,000159
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Otu00340	Judicious	-0,000368	0,000094
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00349	Judicious	-0,000362	0,000142
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00349	Reintroduce d	-0,000362	0,000142
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00322	Judicious	-0,000359	0,000105

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00186	Reintroduce d	-0,000346	0,000146
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00248	Judicious	-0,000342	0,000147
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00220	Judicious	-0,000330	0,000122
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00271	Judicious	-0,000306	0,000094
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00271	Reintroduce d	-0,000306	0,000094
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00424	Judicious	-0,000302	0,000072
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Coriobacteriaceae_unclassified,Otu00386	Judicious	-0,000299	0,000042
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Coriobacteriaceae_unclassified,Otu00386	Reintroduce d	-0,000299	0,000042
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00353	Judicious	-0,000292	0,000058
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00317	Judicious	-0,000289	0,000107
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00260	Judicious	-0,000288	0,000100
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00432	Judicious	-0,000273	0,000063
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00388	Judicious	-0,000263	0,000060
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00412	Judicious	-0,000257	0,000091
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00371	Reintroduce d	-0,000257	0,000065
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00401	Judicious	-0,000250	0,000088
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00369	Judicious	-0,000243	0,000110
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00422	Judicious	-0,000234	0,000043
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00422	Reintroduce d	-0,000234	0,000043
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Anaerotruncus,Otu00312	Judicious	-0,000233	0,000065

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00586	Judicious	-0,000231	0,000051
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00408	Judicious	-0,000230	0,000091
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00448	Judicious	-0,000230	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00342	Judicious	-0,000229	0,000112
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00393	Judicious	-0,000227	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00393	Reintroduce d	-0,000227	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00434	Judicious	-0,000225	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00470	Judicious	-0,000221	0,000034
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Oscillibacter,Otu00443	Judicious	-0,000218	0,000083
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00361	Judicious	-0,000212	0,000092
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcus,Otu00363	Judicious	-0,000187	0,000026
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcus,Otu00363	Reintroduce d	-0,000187	0,000026
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00360	Judicious	-0,000184	0,000068
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00557	Judicious	-0,000183	0,000054
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00557	Reintroduce d	-0,000183	0,000054
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00452	Judicious	-0,000175	0,000021
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00452	Reintroduce d	-0,000175	0,000021
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00455	Judicious	-0,000170	0,000040
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00538	Judicious	-0,000167	0,000024
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00538	Reintroduce d	-0,000167	0,000024
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00469	Judicious	-0,000159	0,000069

Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00469	Reintroduce	-0,000159	0,000069
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00492	Judicious	-0,000155	0,000031
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00492	Reintroduce	-0,000155	0,000031
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00417	Reintroduce	-0,000154	0,000057
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00365	Judicious	-0,000151	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00445	Judicious	-0,000149	0,000026
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00445	Reintroduce	-0,000149	0,000026
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00498	Reintroduce	-0,000147	0,000040
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00486	Judicious	-0,000147	0,000030
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00419	Judicious	-0,000146	0,000024
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_III,Otu00435	Reintroduce	-0,000145	0,000035
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00496	Judicious	-0,000145	0,000051
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_III,Otu00462	Judicious	-0,000141	0,000042
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00440	Judicious	-0,000141	0,000045
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00567	Judicious	-0,000141	0,000024
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00567	Reintroduce	-0,000141	0,000024
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00493	Reintroduce	-0,000140	0,000057
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00520	Judicious	-0,000136	0,000012
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00520	Reintroduce	-0,000136	0,000012
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00547	Judicious	-0,000129	0,000016

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00547	Reintroduce d	-0,000129	0,000016
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00487	Judicious	-0,000129	0,000031
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00527	Judicious	-0,000127	0,000020
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00527	Reintroduce d	-0,000127	0,000020
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00723	Judicious	-0,000119	0,000025
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00723	Reintroduce d	-0,000119	0,000025
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00592	Judicious	-0,000115	0,000017
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00495	Judicious	-0,000112	0,000023
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00495	Reintroduce d	-0,000112	0,000023
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00473	Judicious	-0,000109	0,000023
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00473	Reintroduce d	-0,000109	0,000023
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00695	Judicious	-0,000104	0,000020
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00695	Reintroduce d	-0,000104	0,000020
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00600	Judicious	-0,000103	0,000016
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00600	Reintroduce d	-0,000103	0,000016
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00365	Reintroduce d	-0,000100	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00286	Judicious	-0,000094	0,000037
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00595	Judicious	-0,000092	0,000019
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00687	Judicious	-0,000092	0,000012
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00687	Reintroduce d	-0,000092	0,000012

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00521	Reintroduce d	-0,000085	0,000018
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00521	Judicious	-0,000085	0,000018
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Clostridium_IV,Otu00447	Judicious	-0,000081	0,000041
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00607	Judicious	-0,000080	0,000009
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00607	Reintroduce d	-0,000080	0,000009
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00470	Reintroduce d	-0,000079	0,000034
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00451	Judicious	-0,000078	0,000035
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00548	Judicious	-0,000073	0,000008
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00548	Reintroduce d	-0,000073	0,000008
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Otu00589	Judicious	-0,000070	0,000007
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Clostridia_unclassified,Otu00589	Reintroduce d	-0,000070	0,000007
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00605	Judicious	-0,000068	0,000014
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Gordonibacter,Otu00543	Judicious	0,000070	0,000031
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Sporobacter,Otu00579	Judicious	0,000071	0,000014
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00576	Judicious	0,000073	0,000007
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Sporobacter,Otu00579	Reintroduce d	0,000091	0,000014
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Coriobacteriaceae_unclassified,Otu00466	Reintroduce d	0,000099	0,000026
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00598	Judicious	0,000108	0,000018
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00578	Reintroduce d	0,000124	0,000023
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00438	Judicious	0,000132	0,000030

Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Gordonibacter,Otu00476	Judicious	0,000134	0,000022
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00518	Judicious	0,000154	0,000026
Bacteria,Actinobacteria,Actinobacteria,Coriobacteriales,Coriobacteriaceae,Coriobacteriaceae_unclassified,Otu00466	Judicious	0,000154	0,000026
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00610	Judicious	0,000159	0,000042
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00343	Judicious	0,000174	0,000039
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00346	Reintroduce	0,000203	0,000063
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00488	Judicious	0,000212	0,000044
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00409	Judicious	0,000231	0,000031
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00380	Judicious	0,000247	0,000102
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00501	Reintroduce	0,000272	0,000101
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00378	Reintroduce	0,000278	0,000052
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00364	Judicious	0,000280	0,000081
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00410	Judicious	0,000286	0,000055
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00284	Judicious	0,000312	0,000117
Bacteria,Firmicutes,Bacilli,Lactobacillales,Lactobacillaceae,Lactobacillus,Otu00212	Judicious	0,000320	0,000055
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Ruminococcus2,Otu00258	Reintroduce	0,000365	0,000107
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00265	Reintroduce	0,000375	0,000188
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00328	Judicious	0,000386	0,000085
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00285	Judicious	0,000390	0,000148
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00540	Judicious	0,000406	0,000084

Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00367	Reintroduce	0,000427	0,000075
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00285	Reintroduce	0,000472	0,000148
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00243	Judicious	0,000473	0,000128
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00377	Judicious	0,000493	0,000118
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00203	Reintroduce	0,000495	0,000116
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00280	Reintroduce	0,000539	0,000130
Bacteria,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Bacteria_unclassified,Otu00307	Reintroduce	0,000584	0,000233
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00216	Judicious	0,000604	0,000095
Bacteria,Proteobacteria,Proteobacteria_unclassified,Proteobacteria_unclassified,Proteobacteria_unclassified,Proteobacteria_unclassified,Otu00225	Reintroduce	0,000731	0,000216
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00236	Reintroduce	0,000907	0,000294
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00242	Judicious	0,001037	0,000255
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Anaerotruncus,Otu00183	Reintroduce	0,001062	0,000448
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00158	Reintroduce	0,001065	0,000468
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Anaerostipes,Otu00182	Judicious	0,001091	0,000493
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00335	Judicious	0,001136	0,000464
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00163	Reintroduce	0,001154	0,000213
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00178	Judicious	0,001244	0,000248
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Clostridium_XIVb,Otu00130	Judicious	0,001314	0,000218
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00180	Reintroduce	0,001369	0,000488
Bacteria,Firmicutes,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Firmicutes_unclassified,Otu00194	Judicious	0,001878	0,000686
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum,Otu00055	Judicious	0,001881	0,000570

Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Faecalibacterium,Otu00158	Judicious	0,001932	0,000468
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Butyricoccus,Otu00080	Judicious	0,002513	0,001254
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00084	Judicious	0,002733	0,000743
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00174	Judicious	0,003322	0,001335
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Odoribacter,Otu00075	Reintroduce d	0,003431	0,000965
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Lachnospiraceae,Lachnospiraceae_unclassified,Otu00115	Judicious	0,003699	0,000854
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00036	Judicious	0,003703	0,001057
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Clostridiales_unclassified,Clostridiales_unclassified,Otu00144	Judicious	0,004156	0,000822
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Ruminococcaceae_unclassified,Otu00079	Reintroduce d	0,004369	0,001594
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Butyricoccus,Otu00044	Judicious	0,005212	0,000994
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Rikenellaceae,Alistipes,Otu00119	Reintroduce d	0,005262	0,001052
Bacteria,Firmicutes,Clostridia,Clostridiales,Ruminococcaceae,Subdoligranulum,Otu00013	Judicious	0,005890	0,002883
Bacteria,Firmicutes,Erysipelotrichia,Erysipelotrichales,Erysipelotrichaceae,Clostridium_XVIII,Otu00071	Judicious	0,008784	0,004251
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Bacteroidaceae,Bacteroides,Otu00009	Judicious	0,014459	0,007067
Bacteria,Bacteroidetes,Bacteroidia,Bacteroidales,Porphyromonadaceae,Butyricimonas,Otu00039	Judicious	0,016226	0,001033

Table S4. – Bacterial members associated with the rearing programs, at sampling time point two, using MaAsLin2 at the OTU level. Negative values are negatively associated to the rearing program indicated and positive values are positively associated to the rearing program indicated.

reintroduction of antibiotics	Taxa	Coefficient	SE
Positively associated	<i>Sporobacter</i>	0,0001	0,0000
	<i>Ruminococcus 2</i>	0,0004	0,0001
	<i>Odoribacter</i>	0,0034	0,0010
Negatively associated	<i>Lachnospiraceae</i> unclassified	-0,0106	0,0044
	<i>Romboutsia</i>	-0,0019	0,0007
	<i>Coriobacteriaceae</i> unclassified	-0,0003	0,0001

Table S5. – Bacterial members associated with the reintroduction of antibiotics, at sampling time point two, using MaAsLin2 at the genus level. At the end of the 15-month study, drug-free barns from farms C, D, E and F reintroduced the antibiotics. The positively associated genera are significantly more abundant in barns that reintroduced the antibiotics than barns that continued or judiciously used antibiotics. The negatively associated genera are significantly less abundant in barns that reintroduced the antibiotics. Taxonomic assignment at genus level was not possible for unclassified members.

Discussion

L'antibiorésistance est un problème criant, face auquel des mesures doivent être mises en place afin de préserver l'efficacité des antibiotiques et, ultimement, la santé publique et animale. La stratégie de l'UAM des PPC, déjà en vigueur depuis 2014, vise l'arrêt de l'utilisation préventive des antibiotiques d'importance en santé humaine appartenant aux catégories 1, 2 et 3 d'ici 2020, et ce, à l'échelle canadienne. Cependant, pour le poulet de chair, bien que les résultats du PICRA soient encourageants en ce qui a trait à la résistance phénotypique décroissante d'isolats de *Salmonella* et d'*E. coli* pour la ceftriaxone, un analogue du ceftiofur utilisé en médecine humaine (20), la mise en place de cette stratégie est encore trop récente pour pouvoir juger de ses retombées à long terme quant au phénomène de l'antibiorésistance. De plus, le contrôle des maladies entériques, dont l'entérite nécrotique, représente un défi de taille pour l'industrie avicole face à l'interdiction de l'utilisation de nombreux antibiotiques appartenant aux catégories 1 à 3 (4). Une meilleure compréhension des impacts du retrait des antibiotiques sur le microbiote est d'ailleurs primordiale afin de mieux contrôler la santé digestive des oiseaux en lien avec cette nouvelle stratégie. Les objectifs de la présente étude étaient de quantifier l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques, d'évaluer la présence de *C. perfringens* et de son entérotoxine et de caractériser la composition du microbiote cæcal dans les bâtiments de six fermes commerciales de poulets de chair.

5.1 Méthodologie

5.1.1 Sélection des fermes participantes

La sélection des élevages commerciaux de poulets de chair inclus dans la présente étude était basée sur un précédent projet réalisé par notre groupe de recherche (4). En effet, à la Chaire de recherche en salubrité des viandes, en 2011, une étude a été conduite auprès de 8 élevages commerciaux de poulets de chair, afin d'évaluer, entre autres, les impacts d'un régime avec et sans antibiotiques sur la prévalence de l'entérite nécrotique et sur les performances zootechniques (4). Pour se faire, deux bâtiments par ferme avaient été respectivement soumis à un régime conventionnel (avec antibiotiques) et à un régime sans antibiotiques pendant 15 mois. À la fin de l'étude pour 6 des 8 fermes participantes, le contenu cæcal des 12 oiseaux d'environ 35 jours d'âge sélectionnés aléatoirement avait été récolté pour chacun des bâtiments et

conservé à -80 degrés Celsius pour de futures analyses. En 2018, pour le présent projet, ces mêmes 6 fermes ont accepté de participer à un second échantillonnage.

5.1.2 Nombre de fermes participantes

À la fin de la première étude, en 2012, les fermes participantes, n'ayant plus de contraintes associées à l'étude, ont adopté la régie d'élevage de leur choix. Puis, lors du deuxième échantillonnage à l'automne 2018, nous avons constaté que 2 fermes participantes faisaient une utilisation judicieuse des antibiotiques, c'est-à-dire qu'elles n'utilisaient plus les antibiotiques pour des fins de prévention des maladies ou de promotion de la croissance, et ce, depuis la fin de l'étude en 2012. En d'autres mots, entre 2012 et 2018, les antibiotiques dans ces 2 fermes ont été utilisés à des fins curatives seulement. Ces circonstances ont permis de créer un *design* expérimental original et intéressant permettant de comparer une utilisation judicieuse à long terme des antibiotiques à une utilisation conventionnelle. Cependant, un certain manque de validité externe est à considérer pour l'étude étant donnée le nombre limité de fermes participantes.

5.1.3 Information relative à la régie et l'utilisation des antibiotiques entre 2012 et 2018

L'étude de 15 mois menée entre 2011 et 2012 a soumis les bâtiments des fermes participantes à un protocole strict. Cependant, après cette dernière étude, sauf le fait que l'on connaisse le type de régime utilisé entre 2012 et 2018 (judicieux ou conventionnel), la liste exacte des antibiotiques ayant été utilisés en rotation dans les différentes fermes au cours des 6 dernières années n'est pas disponible, ni les rotations ayant été effectuées. Il devient alors difficile d'expliquer avec précision les différents changements observés dans chacune des fermes, notamment pour les gènes de résistance aux antibiotiques.

Comme mentionné ci-haut, après l'étude de 15 mois, il n'y a pas eu de contrôle de la régie pour les fermes participantes. Considérant que le microbiote est influencé par divers facteurs, l'absence de la standardisation de la régie d'élevage est un facteur limitant en ce qui a trait à la

comparaison des résultats entre les fermes pour le deuxième échantillonnage en 2018 et aussi à la comparaison des résultats entre les deux échantillonnages de 2012 et de 2018.

5.1.4 Échantillonnage

Pour chacun des bâtiments, le contenu cæcal de 12 oiseaux sélectionnés au hasard a été récolté. Selon les travaux de Larivière-Gauthier et al. (article en préparation), ce nombre d'échantillons permet une bonne représentativité du microbiote intestinal du lot d'oiseaux échantillonné. De plus, les oiseaux ont été échantillonnés à la fin du cycle de production. Considérant que le microbiote cæcal se stabilise autour de 30 jours d'âge, cela a donc permis d'uniformiser les résultats (91, 93).

5.1.5 Analyse du microbiote cæcal

L'absence de standardisation de la méthodologie lors de l'étude du microbiote, incluant notamment l'extraction d'ADN et le choix des amorces pour l'amplification de l'ADN avant le séquençage, complexifie l'analyse du microbiote intestinal et la comparaison des études entre elles (92, 94). De ce fait, afin d'assurer la qualité de l'analyse du microbiote dans ce présent projet, la méthodologie a été basée sur la littérature actuelle. En ce qui a trait à l'extraction d'ADN, la pureté de l'ADN a été vérifiée avec le Nanodrop 1000 (Fisher, Ottawa, ON) afin de détecter la présence de contaminants dont les acides organiques. Ces derniers nuisent à l'amplification de l'ADN par PCR (99). En ce qui a trait au choix des amorces, considérant que certains biais peuvent survenir, dont des faux négatifs par l'absence d'amplification de certains fragments d'ADN associés à des microorganismes spécifiques, nous avons sélectionné des amorces démontrées efficaces pour l'analyse du microbiote (99). Caporaso et al. ont élaboré un protocole de séquençage avec les plateformes Illumina HiSeq2000 et MiSeq, utilisant les amorces 515FP1-CS1F et 806RP1-CS2R pour la région V4 du gène codant pour l'ARNr 16S (129). Ce protocole a démontré des résultats constants et représentatifs des communautés étudiées et a permis de standardiser davantage les méthodes de séquençage. De ce fait, ces amorces ont été utilisées dans le présent projet. Ces mêmes amorces ont d'ailleurs été utilisées dans d'autres études menées à la Chaire de recherche en salubrité des viandes (106, 149).

5.2 Résultats

5.2.1 Gènes de résistance aux antibiotiques

Notre étude n'a pas pu démontrer de différences entre l'utilisation d'un régime avec et sans antibiotiques après une période de 15 mois sur l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques ciblés, celle-ci exprimée en valeur absolue et sous forme de ratio. Néanmoins, considérant la diminution significative des valeurs exprimées sous forme de ratio pour les gènes *int11* et *sul1* dans 4 bâtiments soumis à un régime sans antibiotiques après 15 mois, les résultats semblent refléter le début d'une décroissance de l'abondance des gènes de résistance. Tenant en compte les résultats du PICRA sur la résistance phénotypique à la ceftriaxone d'isolats de *Salmonella* et d'*E.coli* chez les poulets de chair suite à l'arrêt du ceftiofur en 2014 au Canada, il était attendu d'observer une diminution des gènes de résistance aux antibiotiques rapidement, soit après 15 mois, ce qui n'a pas été le cas (20). Cependant, en se basant sur les travaux de Levin montrant que le *fitness cost* est la principale force influençant le phénomène de l'antibiorésistance au niveau des communautés bactériennes comme celles retrouvées dans les élevages de poulets de chair par exemple, le temps nécessaire pour diminuer la résistance aux antibiotiques se mesurerait alors plutôt en années (133). Cela appuie les résultats obtenus dans notre étude, où l'abondance de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques a diminué dans les 2 fermes ayant adopté une utilisation judicieuse des antibiotiques pendant 6 ans. Malgré la participation de seulement 2 fermes avec ce type d'utilisation des antibiotiques, ces observations sont positives en ce qui a trait aux impacts de la réduction des antibiotiques.

Ces données relatives à la diminution des gènes de résistance aux antibiotiques dans ces 2 fermes sont par ailleurs en accord avec la conclusion d'une étude systématique et méta-analyse canadienne, laquelle indiquait que la diminution de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux de consommation est efficace afin de diminuer la présence des bactéries résistantes isolées de ceux-ci (18). Cette publication recommandait d'ailleurs une utilisation plus judicieuse des antibiotiques plutôt qu'une restriction stricte de ceux-ci. Cette recommandation selon notre étude semble d'ailleurs pertinente considérant les résultats obtenus pour les 2 fermes ayant adopté une utilisation judicieuse des antibiotiques.

Les résultats de la présente étude sont également comparables à différentes observations européennes obtenues suite aux mesures limitant l'utilisation des antibiotiques chez les animaux (124). Au Danemark, l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques à des fins préventives a eu lieu en 1994, alors que l'arrêt de l'utilisation des promoteurs de croissance s'est déroulé progressivement entre 1995 et 1999. Les Danois ont par la suite observé, entre 1996 et 2008, une diminution importante de la résistance des *E. faecium* isolés de poulets de chair envers la vancomycine, les macrolides et l'avilamycine (124).

Lorsqu'on observe plus spécifiquement les gènes étudiés dans le présent projet, on constate que le gène *vat(E)* a diminué considérablement en 2018 dans les bâtiments faisant une utilisation judicieuse des antibiotiques à long terme (Figure 2, p.92). Ces résultats portent à croire que ce gène retrouvé notamment chez *E. faecium* pourrait incomber une charge métabolique supplémentaire, faisant ainsi diminuer de façon importante l'abondance de *vat(E)* (56).

Après l'étude de 15 mois en 2012, hormis les 2 fermes ayant adopté une utilisation judicieuse des antibiotiques, les fermes participantes se sont retournées vers une utilisation conventionnelle des antibiotiques. Après une période de 6 ans, les résultats ont démontré une nette augmentation de l'abondance pour une majorité des gènes de résistance aux antibiotiques sur ces fermes. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des antibiotiques sur le long terme génère une pression de sélection et contribue à augmenter l'abondance des gènes de résistance. Ce type d'observation a d'ailleurs déjà été démontré à la suite de l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques de catégorie 1 en industrie avicole, en 2014. L'augmentation de l'utilisation de la lincomycine en combinaison avec la spectinomycine en remplacement du ceftiofur dans les couvoirs a été corrélée avec une augmentation de la résistance d'isolats d'*E. coli* à la gentamicine. Il semblerait que cette augmentation concomitante soit associée au portage conjoint des gènes conférant une résistance à la gentamicine et à la spectinomycine sur un même intégron de classe 1 (64).

Par ailleurs, les résultats de la présente étude ont démontré une augmentation concomitante des gènes *sul1* et *int11* dans de nombreux bâtiments (Figure 3, p.93). Considérant qu'une majorité des intégrons de classe 1 possèdent la région conservée 3' contenant les gènes

qacEΔ1 et *sul1*, il est probable que le maintien de l'intégrons de classe 1 au sein du résistome par l'utilisation de sulfamides, d'ammoniums quaternaires, de gentamicine, de spectinomycine ou autres antibiotiques aient permis de maintenir conjointement les gènes *sul1* et *int11*.

De plus, l'augmentation du gène *sul1* entre 2012 et 2018 a été notée dans différents bâtiments faisant une utilisation judicieuse et conventionnelle des antibiotiques (Figure 3, p.93). Considérant que les sulfamides figurent parmi les choix courants de traitement en industrie avicole, notamment pour les infections à *E. coli* et la coccidiose (21), il est probable que l'utilisation curative des sulfamides ait généré une pression de sélection pour le gène *sul1*. Selon les résultats du rapport 2018 du *Programme québécois d'antibiosurveillance vétérinaire*, entre les périodes 2004-2013 et 2014-2018, les isolats d'*E. coli* d'origine aviaire présentaient une augmentation significative de la résistance phénotypique envers le triméthoprim et le sulfaméthoxazole (44). Ces observations sont ainsi en accord avec les nôtres.

5.2.2 *Clostridium perfringens* et son entérotoxine

C. perfringens produit diverses toxines permettant ainsi de classer cette bactérie en plusieurs toxinotypes. Parmi les différentes toxines, la toxine alpha est produite par toutes les souches de *C. perfringens* (87). De ce fait, la détection de cette toxine permet systématiquement d'identifier la présence de la bactérie (89). Dans notre étude, la détection par PCR de la toxine alpha par amplification du gène *plc* a permis d'obtenir seulement 17% d'échantillons positifs. Considérant que *C. perfringens* est un membre du microbiote cæcal chez des oiseaux en santé (143), en théorie, un taux de 100% de positivité était attendu. Cela suggère donc que le nombre de *C. perfringens* présent dans les échantillons était sous la limite de détection d'environ 10^3 bactéries par gramme de contenu intestinal (89).

Concernant la détection des *C. perfringens* entérotoxigène par l'amplification du gène *cpe*, aucun échantillon positif n'a été détecté. Par contre, considérant les résultats obtenus pour la détection de la toxine alpha, ces résultats ne sont pas surprenants. En plus d'avoir été probablement sous la limite de détection, la proportion des *C. perfringens* entérotoxigènes représente une faible proportion de la population des *C. perfringens*, soit entre 1% à 5% (144). Ensemble, ces facteurs ont possiblement contribué à l'absence de détection de ce gène.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont plutôt surprenants considérant les résultats d'une publication suisse (150). À partir de 59 échantillons de matières fécales de poulets de chair récoltés à l'abattoir, après avoir effectué des techniques de détection et de dénombrement, les auteurs ont isolé *C. perfringens* et identifié des souches entérotoxigènes dans respectivement 80% et 10% des échantillons. De plus, parmi les échantillons, 33 comportaient 10^3 - 10^4 *C. perfringens* par gramme de matières fécales ou plus, alors que 26 échantillons comportaient 10^2 - 10^3 *C. perfringens* par gramme de matières fécales ou moins (150). Selon ces hauts comptes bactériens et considérant la limite de détection qui se situe autour de 10^3 bactéries par gramme matières fécales pour le gène *plc*, il est étonnant d'avoir seulement détecté 17% et 0% d'échantillons positifs pour les gènes *plc* et *cpe*.

5.2.3 Microbiote cœcal

5.2.3.1 Diversité alpha

Les résultats de diversité alpha après une période de 15 mois n'ont pas démontré de différences marquées entre le régime conventionnel et le régime sans antibiotiques. Par contre, après une période de 6 ans, plusieurs différences étaient présentes en ce qui a trait à la richesse et l'abondance des OTUs détectés. Les résultats (Table 2, p.87) semblent suggérer que l'utilisation conventionnelle des antibiotiques dans le temps favorise l'augmentation de la diversité alpha du microbiote cœcal. En effet, issus des échantillons de matière cœcale récoltés en 2018, les indices mesurés pour les bâtiments faisant une utilisation judicieuse des antibiotiques étaient inférieurs à ceux des bâtiments ayant réintroduit les antibiotiques après l'étude de 2012. Les indices de ces derniers étaient également inférieurs à ceux des bâtiments ayant toujours utilisé les antibiotiques. Cependant, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les indices des bâtiments ayant adopté une utilisation judicieuse des antibiotiques ou ayant réintroduits les antibiotiques. On peut avancer l'hypothèse qu'une plus longue utilisation conventionnelle des antibiotiques dans ces bâtiments ayant réintroduit les antibiotiques aurait permis au microbiote de se diversifier davantage et aurait permis d'obtenir des différences significatives en comparaison avec les indices des bâtiments faisant une utilisation judicieuse des antibiotiques.

Comme discuté ci-haut, l'utilisation conventionnelle des antibiotiques semble contribuer à l'augmentation de la diversité alpha. Ces résultats concordent avec une précédente étude démontrant une augmentation de la diversité alpha du microbiote cæcal lors de l'utilisation de la bacitracine en promotion de la croissance chez des poulets (98). Considérant que la bacitracine, un antibiotique de catégorie 3 d'importance en médecine humaine, est utilisée dans les élevages de poulets de chair pour la prévention de l'entérite nécrotique notamment (21), il est probable que l'utilisation de cet antibiotique, en rotation avec d'autres antibiotiques, ait affecté négativement certaines populations microbiennes sensibles aux antibiotiques. Par conséquent, cela a possiblement permis à d'autres populations de croître et ainsi d'augmenter la diversité alpha du microbiote cæcal des poulets à l'étude (116).

Après l'analyse individuelle de la diversité alpha des échantillons récoltés en 2012 et en 2018, cette même diversité a été mesurée pour l'ensemble des échantillons recueillis aux 2 périodes (Table 3, p.88). Les résultats ont montré que le microbiote des oiseaux échantillonnés en 2012 avait une richesse inférieure à celle des oiseaux échantillonnés 6 ans plus tard. Il est probable que cette différence soit associée à l'effet du protocole de l'étude conduite pendant 15 mois, entre 2011 et 2012, où les 6 fermes participantes avaient été soumises à ce même protocole qui visait entre autres un contrôle strict de la régie d'élevage, dont la standardisation de la composition de la diète, l'acidification de l'eau, l'utilisation d'une luminosité entre 60 et 100 lux et l'installation de 3 à 4 pouces de litière avant l'arrivée du lot de poussins. À la fin de cette étude en 2012, les fermes sont retournées vers leurs pratiques d'élevage respectives et distinctes, ce qui a pu contribuer à augmenter la richesse, c'est-à-dire le nombre d'OTUs différents détectés. Bref, ces résultats suggèrent que le contrôle uniforme de la régie permet une standardisation du microbiote. Néanmoins, d'autres facteurs pourraient influencer la diversité alpha, au même titre que la diversité bêta. Ceux-ci seront discutés à la page suivante.

5.2.3.2 Diversité bêta

Les résultats de diversité bêta ont montré des différences significatives entre les lots soumis à un régime avec ou sans antibiotiques après une période de 15 mois. La diversité bêta était également différente entre les lots échantillonnés en 2018 issus des fermes judicieuses, issus des bâtiments ayant réintroduit les antibiotiques après l'étude en 2012 et issus des bâtiments

ayant toujours utilisés les antibiotiques. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec plusieurs études, où les traitements antibiotiques affectent la composition du microbiote (98).

De plus, les résultats générés par NMDS ont démontré une forte influence de la ferme sur la composition du microbiote, puisque tous les échantillons récoltés dans une même ferme, pour chaque période, étaient regroupés ensemble. Les résultats ont également démontré une forte influence du bâtiment sur le microbiote puisqu'une séparation entre chaque lot issu d'un bâtiment différent était visible sur NMDS. Ces différences pourraient également être associées à l'effet du lot, puisqu'en plus de ces dernières observations, des différences entre les lots issus d'un même bâtiment étaient notables. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec une étude ayant démontré que la composition du microbiote intestinal de différents lots d'oiseaux soumis aux mêmes conditions variait significativement (151). Le *design* expérimental de la présente étude complexifie l'analyse des résultats puisqu'il devient difficile de savoir si les différences observées sont alors associées aux régimes d'utilisation des antibiotiques ou plutôt liées à l'effet du bâtiment ou du lot d'oiseaux.

Les résultats de diversité bêta ont également montré des différences significatives entre les échantillons récoltés en 2012 et en 2018. Graphiquement, les points représentant chacun le contenu cæcal d'un oiseau étaient très rapprochés en 2012, alors que 6 ans plus tard, les points étaient beaucoup plus dispersés (Figure 5, p.95 et Figure S2, p.100). Il est intéressant de noter que ces résultats concordent avec ceux de la diversité alpha (Table 3, p.88), démontrant une augmentation de la richesse du microbiote des oiseaux entre 2012 et 2018. Il est possible que ces résultats illustrent les impacts de la standardisation de la régie d'élevage sur le microbiote cæcal des poulets de chair.

En comparaison avec la littérature, l'effet du temps sur le microbiote intestinal a d'ailleurs déjà été observé. Dans une récente étude, les auteurs ont comparé la diversité bêta, notamment, celle du microbiote cæcal de lots de poulets de chair élevés sans antibiotiques provenant de 4 fermes, échantillonnés à 3 moments différents dans l'année, soit 3 cycles de production. Les résultats ont démontré une différence marquée de la composition du microbiote des lots de poulets échantillonnés aux 3 moments différents (112). Malgré le fait que ces fermes suivaient

sensiblement le même protocole en ce qui a trait à l'alimentation et à l'absence de l'utilisation des antibiotiques, il est possible que les différences observées entre les lots à travers le temps soient associées aux variations climatiques, à des changements alimentaires, à des modifications de la régie d'élevage ou à des changements associés aux couvoirs (112). Ainsi, comme décrit ci-haut, il est probable que ces facteurs aient également contribué aux changements de structure du microbiote cæcal des échantillons récoltés en 2012 et en 2018. La présence de certaines maladies dont l'entérite nécrotique aurait également pu influencer la composition du microbiote dans le présent projet, comme cela a déjà été documenté (143).

5.2.3.3 Communautés microbiennes

L'étude des communautés microbiennes au genre bactérien a permis d'observer une diminution des *Ruminococcaceae* et des *Lachnospiraceae* lors de la réduction des antibiotiques. L'analyse du microbiote, à partir des échantillons récoltés à la fin de l'étude de 15 mois, en 2012, a associé négativement au régime sans antibiotiques les genres *Subdoligranulum*, *Clostridium IV*, *Intestinimonas* et *Anaerotruncus*, tous appartenant à la famille des *Ruminococcaceae*. Les *Lachnospiraceae* non classés au genre ont également été négativement associés au régime sans antibiotiques, signifiant alors que ces microorganismes étaient plus abondants avec le régime conventionnel. De plus, les *Proteobacteria* non classés au genre ont été positivement associés avec l'utilisation d'un régime sans antibiotiques. Ces bactéries pourraient être considérées comme un biomarqueur de dysbiose (152). La dysbiose réfère à une perturbation de la composition du microbiote accompagnée d'une inflammation intestinale (153). Selon des études menées chez des souris et des humains, une association a été observée entre une recrudescence des *Proteobacteria* et une structure instable du microbiote liée notamment à un état pathologique ou à un problème métabolique (152). Chez les poulets de chair, il est supposé que les antibiotiques, dont les promoteurs de croissance, permettraient de prévenir la dysbiose (154).

Concernant l'analyse des communautés microbiennes à partir des échantillons récoltés en 2018, les genres *Clostridium IV*, *Intestinimonas* et des *Ruminococcaceae* non classés au genre ont été négativement associés à l'utilisation judicieuse des antibiotiques, tout comme plusieurs genres bactériens appartenant à la famille des *Lachnospiraceae* incluant *Blautia*, *Clostridium XIVb*, *Ruminococcus2* et des *Lachnospiraceae* non classés au genre. Ces bactéries étaient ainsi moins

abondantes avec l'utilisation judicieuse des antibiotiques qu'avec l'utilisation conventionnelle de ceux-ci, que ce soit pour les échantillons issus des bâtiments ayant réintroduit ou continué les antibiotiques après l'étude de 15 mois.

Le cæcum, grâce à sa grande diversité microbienne, est un lieu important de digestion et de fermentation des carbohydrates en acides gras à chaîne courte (93, 94). Le butyrate, un acide gras à chaîne courte, est un important produit de fermentation puisqu'il représente la source d'énergie principale des entérocytes (93). Les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* sont par ailleurs des microorganismes impliqués dans la fermentation et la production des acides gras à chaîne courte, dont le butyrate (114). De plus, les acides gras à chaîne courte ont une influence sur la santé et les performances (95). En ce qui a trait plus particulièrement au butyrate, il a été démontré que l'utilisation d'acide butyrique dans l'alimentation des oiseaux diminuait la colonisation de l'intestin par *C. perfringens* (136). Aussi, dans une autre étude, l'administration de butyrate de sodium améliorait les performances zootechniques, dont le gain de poids des oiseaux (137). Ainsi, les résultats de notre étude suggèrent que la diminution des antibiotiques est défavorable pour certains microorganismes fermenteurs et pourrait avoir des répercussions négatives sur la santé et les performances zootechniques des oiseaux. D'ailleurs, lors de l'étude de 15 mois complétée en 2012, il avait été démontré que l'utilisation d'un régime sans antibiotiques avait des impacts négatifs sur les performances zootechniques et augmentait l'incidence d'entérite nécrotique dans les fermes commerciales de poulets de chair, des observations corrélant avec les résultats de l'étude actuelle (4). D'autre part, considérant que la diminution de l'utilisation des antibiotiques puisse prédisposer à une dysbiose, il est possible que certaines populations bactériennes bénéfiques aient diminué au profit de communautés néfastes chez les poulets issus des bâtiments sans antibiotiques ou avec une utilisation judicieuse des antibiotiques (154). On pourrait avancer l'hypothèse que les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* ont diminué au profit de *C. perfringens*, malgré l'absence de tels résultats concernant *C. perfringens* avec les analyses MaAsLin2.

Il est également intéressant de souligner qu'une association négative entre *Anaeroplasma* et la réduction des antibiotiques autant à court et à long terme a été observée dans la présente étude. Ce genre bactérien est considéré comme un pathogène opportuniste. C'est une bactérie à Gram négatif et avec les lipopolysaccharides contenus dans la paroi de ces bactéries, il est possible que les bactéries du genre *Anaeroplasma* provoquent une inflammation intestinale (155). Par ailleurs, chez le poulet de chair, les impacts du stress thermique (chaleur) sur le microbiote cæcal ont révélé une augmentation des *Anaeroplasma* (156). Toutefois, dans notre étude, il semble que la diminution de l'utilisation des antibiotiques contribue à diminuer leur population.

5.3 Perspectives

Cette première étude visant à étudier les impacts de l'utilisation conventionnelle et du retrait des antibiotiques sur l'abondance des gènes de résistance et sur le microbiote cæcal de poulets de chair au Québec avait un *design* expérimental unique et a permis d'obtenir des résultats encourageants en ce qui a trait à la gestion de l'antibiorésistance. Par ailleurs, la méthodologie utilisée dans le présent projet a été basée sur la littérature scientifique. Néanmoins, afin d'améliorer cette étude, quelques éléments méthodologiques auraient pu être modifiés. Ces points pourront être appliqués lors des prochaines études sur les gènes de résistance aux antibiotiques et le microbiote cæcal. D'abord, considérant que le microbiote associé à la muqueuse est différent du microbiote associé au contenu cæcal, l'échantillonnage de la muqueuse cæcale aurait contribué à l'amélioration de l'étude du microbiote (139).

Il serait également intéressant dans de futures études de porter une attention particulière au genre bactérien *Anaeroplasma*, afin de mieux définir son rôle et ses implications au sein du microbiote de poulets de chair.

Afin d'améliorer la validité externe de l'étude, l'augmentation du nombre de fermes participantes aurait pu être effectuée lors de l'échantillonnage. Toutefois, le choix des fermes a été basé sur une étude précédente (4). De plus, pour de futures études, le nombre de bâtiments échantillonnés par régime d'utilisation des antibiotiques pourrait être augmenté, afin de mieux dégager les différences et mieux valider l'effet du bâtiment et l'effet du lot. Considérant alors le

bâtiment comme unité d'échantillonnage, un échantillonnage de 8 bâtiments pour chaque régime d'utilisation des antibiotiques pourrait être un nombre cible, selon les travaux de Larivière-Gauthier et al. (article en préparation).

Aussi, comme mentionnés précédemment, les résultats ont démontré un effet bâtiment et un effet lot. Afin d'éviter ces effets lors des prochaines études, deux traitements différents dans un même bâtiment pourraient être mis en place, et ce, en divisant le parquet en 2. De plus, afin de mieux documenter l'effet du bâtiment sur le microbiote cæcal, des oiseaux appartenant au même lot pourraient être élevés dans des bâtiments différents, avec les mêmes traitements. Finalement, afin de mieux décrire l'effet lot, il serait possible d'échantillonner des oiseaux appartenant à différents lots, élevés dans un même bâtiment, en divisant le parquet selon le nombre de lots comparés.

Par ailleurs, la documentation des différents antibiotiques administrés aux oiseaux entre 2012 et 2018 aurait bonifié l'analyse des résultats. Par exemple, pour les fermes qui ont utilisé les antibiotiques de façon conventionnelle entre 2012 et 2018, l'hypothèse d'une augmentation de la pression de sélection a été mise de l'avant. La connaissance des antibiotiques ayant contribué à cette pression aurait permis de mieux comprendre les changements observés dans chacune des fermes pour les différents gènes.

En ce qui concerne la détection des gènes de résistance aux antibiotiques par approche PCR, des contraintes de temps et de disponibilité des échantillons ont limité la détection de certains gènes de résistance à un nombre restreint d'échantillons alors que pour certains gènes, la détection a été effectuée sur des échantillons regroupés. L'utilisation d'une méthode uniforme pour chacun des gènes, notamment la détection individuelle des 288 échantillons, aurait amélioré la clarté et la précision des résultats.

Par ailleurs, bien que le séquençage par Illumina MiSeq ait été la méthode de choix pour l'atteinte des objectifs du présent projet, l'utilisation d'une approche par méta-génomique comme le *shotgun metagenomics* aurait offert une profondeur de lecture plus grande. Cela aurait permis d'étudier davantage de gènes de résistance aux antibiotiques et aurait permis une analyse

plus détaillée (au-delà du gène marqueur amplifié) des populations microbiennes cœcales, dont la prédiction de certaines fonctions par l'identification notamment de gènes de virulence (105).

Finalement, un des objectifs de cette étude était de détecter la présence de *C. perfringens* dont *C. perfringens* entérotoxigène, puisque ce dernier est responsable d'infections intestinales d'origine alimentaire chez l'humain (87). Selon les résultats obtenus dans notre étude, le contenu des échantillons semblait être sous la limite de détection. De ce fait, il aurait été pertinent, lors des échantillonnages de 2012 et de 2018, de récolter des échantillons frais de matières cœcales et de procéder à un enrichissement, suivi d'une culture bactérienne sur gélose au sang en condition d'anaérobiose. Comme décrit précédemment, afin d'isoler et identifier des souches de *Clostridium perfringens*, les colonies produisant une hémolyse des globules rouges auraient pu être soumises à une coloration de Gram et un « reverse CAMP test » (4). Toutefois, pour l'identification des souches entérotoxigènes, cette technique n'est pas appropriée puisqu'une majorité de ces souches ne produisent pas cette double hémolyse caractéristique à cause de l'absence du gène *pfoA* chez une très forte proportion des souches de *C. perfringens* entérotoxigène (157). De plus, comme la proportion des souches entérotoxigènes est faible comparativement aux autres souches de *C. perfringens* dans les échantillons, l'isolement par culture est difficile. La méthode par *hydrophobic grid membrane filter-colony hybridization* (HGFMF-CH) est d'ailleurs une approche intéressante et précédemment utilisée afin d'isoler les souches possédant le gène *cpe* (158, 159). Ces différentes étapes auraient peut-être permis de détecter quelques échantillons positifs et associer ceux-ci à des régions d'élevage particulières.

Conclusions

Ce projet a permis de décrire pour une première fois les impacts de la réduction des antibiotiques à court et à long terme sur l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques et sur le microbiote cæcal de poulets de chair issus d'élevages commerciaux au Québec. Les conclusions de cette étude sont nombreuses. Malgré le fait que nous n'avons pas pu démontrer de différences entre l'utilisation d'un régime avec et sans antibiotiques après une période de 15 mois sur l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques ciblés, nous avons démontré que :

- L'utilisation des antibiotiques à des fins curatives seulement, pendant une période de 6 ans, soit à long terme, diminue l'abondance de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques.
- L'utilisation conventionnelle des antibiotiques pendant une période de 6 ans, soit à long terme, augmente l'abondance de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques.
- L'utilisation judicieuse à long terme des antibiotiques diminue la diversité alpha, alors que l'utilisation conventionnelle des antibiotiques augmente cette diversité.
- La diminution des antibiotiques, à court et à long terme, est défavorable à certains genres bactériens appartenant aux familles de *Ruminococcaceae* et de *Lachnospiraceae*, des microorganismes producteurs d'acides gras à chaîne courte.
- La standardisation de la régimie semble contribuer à uniformiser le microbiote cæcal.
- La ferme, le bâtiment, le lot et le temps ont une influence sur la composition microbienne cæcale.

Les résultats de cette étude soulignent l'importance du développement de stratégies alternatives aux antibiotiques afin de promouvoir un microbiote intestinal favorable à la santé des oiseaux et aux performances zootechniques. De plus, cette étude laisse présager des impacts positifs par rapport à la réduction de l'utilisation des antibiotiques au sein des élevages commerciaux de poulets de chair et la gestion de l'antibiorésistance au Québec et au Canada.

Références bibliographiques

1. Gaucher M-L, Perron GG, Arsenault J, Letellier A, Boulianne M, Quessy S. Recurring Necrotic Enteritis Outbreaks in Commercial Broiler Chicken Flocks Strongly Influence Toxin Gene Carriage and Species Richness in the Resident *Clostridium perfringens* Population. *Front in Microbiol.* 2017;8(881).
2. Les Producteurs de poulet du Canada. La stratégie sur l'UAM : une ordonnance pour le changement novembre 2018 [Consulté le 18 avril 2020]. Available from: https://www.producteursdepoulet.ca/wp-content/uploads/2018/11/AMU-Magazine-insides_FR-Issue2-web.pdf.
3. Santé Canada. Catégorisation des médicaments antimicrobiens basée sur leur importance en médecine humaine 2009 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments-veterinaires/resistance-antimicrobiens/categorisation-medicaments-antimicrobiens-basee-leur-importance-medecine-humaine.html>.
4. Gaucher ML, Quessy S, Letellier A, Arsenault J, Boulianne M. Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poult Sci.* 2015;94(8):1791-801.
5. Diaz Carrasco JM, Casanova NA, Fernandez Miyakawa ME. Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection? *Microorganisms.* 2019;7(10).
6. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17(6):431-7.
7. Marosevic D, Kaevska M, Jaglic Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage - a review. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24(2):338-44.
8. Agence de la santé publique du Canada. Résistance et recours aux antimicrobiens au Canada cadre d'action fédéral. Ottawa (Ontario) octobre 2014.
9. Agence de la santé publique du Canada. Plan d'action fédéral sur la résistance et le recours aux antimicrobiens au Canada prolongement du cadre d'action fédéral. Ottawa (Ontario) mars 2015.
10. Agence de la santé publique du Canada. Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation : un cadre d'action pancanadien. Ottawa (Ontario) août 2017.
11. Santé Canada. Utilisation responsable des antimicrobiens importants sur le plan médical chez les animaux Ottawa (Ontario) 2018 [Consulté le 18 avril 2020]. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/resistance-aux-antibiotiques-antimicrobiens/animaux/actes/utilisation-responsable-antimicrobiens.html>.
12. Association canadienne des médecins vétérinaires. Surveillance vétérinaire de l'utilisation des antimicrobiens– Un cadre de travail pancanadien pour les normes professionnelles régissant les médecins vétérinaires 2016 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.veterinairesauCanada.net/documents/un-cadre-de-travail-pancanadien>.
13. Association canadienne des médecins vétérinaires. La cascade décisionnelle thérapeutique pour la sécurité des animaux et du public 2015 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.veterinairesauCanada.net/documents/la-cascade-decisionnelle-therapeutique>.
14. Noël P. Avril 2015 : Les médecins vétérinaires du Québec, chefs de file dans la lutte contre l'antibiorésistance 23 avril 2015 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from:

<https://www.omvq.qc.ca/presse/communiqué-de-presse/25-avril-2015-les-medecins-veterinaires-du-quebec-chefs-de-file-dans-la-lutte-contre-lantibioresistance.html?page=1>.

15. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ). Antibio-gouvernance dans le milieu vétérinaire et le secteur bioalimentaire 2019 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from:

<https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/antibio/Pages/Antibio-gouvernance.aspx>.

16. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ). Fiche d'information La lutte contre l'antibiorésistance 2019 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Santeanimale/Antibioresistance/Fiche_lutte_Antibioresistance.pdf.

17. Les Producteurs de poulet du Canada. Antibiotiques 2020 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.producteursdepoulet.ca/les-antibiotiques/>.

18. Tang KL, Caffrey NP, Nobrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Comparison of different approaches to antibiotic restriction in food-producing animals: stratified results from a systematic review and meta-analysis. *BMJ Glob Health*. 2019;4(4):e001710.

19. Les Producteurs de poulet du Canada. Audit par un tiers 2020 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.producteursdepoulet.ca/auditeurs-qualifies/>.

20. Gouvernement du Canada. Agence de la santé publique du Canada. Rapport annuel 2016 du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). Guelph (Ontario) 2018.

21. Agunos A, Léger D, Carson C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *Can Vet J*. 2012;53(12):1289-300.

22. Gouvernement du Canada. Agence de la santé publique du Canada. Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) 2014 - Rapport annuel - Résumé 2016 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/surveillance/programme-integre-canadien-surveillance-resistance-antimicrobiens-picra/picra-2014-rapport-annuel-resume.html>.

23. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J*. 2011;187(2):182-8.

24. Yadav S, Jha R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *J Anim Sci Biotechnol*. 2019;10(1):2.

25. Singh AK, Berrocoso JFD, Dersjant-Li Y, Awati A, Jha R. Effect of a combination of xylanase, amylase and protease on growth performance of broilers fed low and high fiber diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2017;232:16-20.

26. Zhai H, Liu H, Wang S, Wu J, Kluentner A-M. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*. 2018;4(2):179-86.

27. Abdel-Wareth AAA, Kehraus S, Hippenstiel F, Südekum KH. Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 2012;178(3):198-202.

28. Perry J, Waglechner N, Wright G. The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6).

29. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477:457.
30. Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martínez-Solano L, et al. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;33(1):44-65.
31. Knapp CW, Doling J, Ehlert PA, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol*. 2010;44(2):580-7.
32. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(4):260-71.
33. Perry JA, Wright GD. Forces shaping the antibiotic resistome. *Bioessays*. 2014;36(12):1179-84.
34. Wright GD. The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov*. 2010;5(8):779-88.
35. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6):287-92.
36. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000;405:299.
37. Burrus V, Waldor MK. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol*. 2004;155(5):376-86.
38. de la Cruz F, Davies J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*. 2000;8(3):128-33.
39. Sun D. Pull in and Push Out: Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Front Microbiol*. 2018;9:2154.
40. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(4):757-84.
41. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(8):608-20.
42. Drouin F, Mélançon J, Roy PH. The IntI-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. *J Bacteriol*. 2002;184(6):1811-5.
43. Gouvernement du Canada. Agence de la santé publique du Canada. Rapport annuel 2013 du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) 2015 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/surveillance/programme-integre-canadien-surveillance-resistance-antimicrobiens-picra/picra-2013-rapport-annuel.html>.
44. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ). Rapport annuel 2018 de la surveillance passive de l'antibiorésistance au Québec 2018 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Santeanimale/Antibioresistance/Rapportannuel2018SurveillancepassivedeantibioresistanceauQuebec.pdf>.
45. Hughes D, Andersson DI. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):374-91.
46. Huseby DL, Pietsch F, Brandis G, Garoff L, Tegehall A, Hughes D. Mutation Supply and Relative Fitness Shape the Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*. 2017;34(5):1029-39.

47. MacNair CR, Stokes JM, Carfrae LA, Fiebig-Comyn AA, Coombes BK, Mulvey MR, et al. Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nature Communications*. 2018;9(1):458.
48. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(2):161-8.
49. Mohamed Rhouma JMF, Francis Beaudry, Ann Letellier, Cécile Crost (CRIPA). Diarrhée post-sevrage porcine : comment éviter la colistine 2018 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://www.cripamagazineweb.com/single-post/2018/02/15/Diarrh%C3%A9e-post-sevrage-porcine-comment-%C3%A9viter-la-colistine>.
50. Chalmers G, Davis K, Poljak Z, Friendship R, Mulvey M, Deckert A, et al. A method to detect *Escherichia coli* carrying the colistin-resistance genes mcr-1 and mcr-2 using a single real-time polymerase chain reaction and its application to chicken cecal and porcine fecal samples. *Can J Vet Res*. 2018;82:312-5.
51. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo M-S, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, et al. A new resistance gene, linB, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(4):925-9.
52. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;282(2):147-59.
53. Korczynska M, Mukhtar TA, Wright GD, Berghuis AM. Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus*; by virginiamycin B lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(25):10388.
54. Soltani M, Beighton D, Philpott-Howard J, Woodford N. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):433-6.
55. Roberts MC. Table 2. Efflux and Inactivating Genes, Originally modified from AAC 1999 43:2823-30 with permission from ASM Journals 2019 [Consulté le 19 avril 2020]. Available from: <https://faculty.washington.edu/marilynr/ermweb2.pdf>.
56. Werner G, Klare I, Witte W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. *Int J Med Microbiol*. 2002;292(2):81-94.
57. De Graef EM, Decostere A, De Leener E, Goossens H, Baele M, Haesebrouck F. Prevalence and mechanism of resistance against macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Enterococcus faecium* isolates from food-producing animals and hospital patients in Belgium. *Microb Drug Resist*. 2007;13(2):135-41.
58. Tremblay CL, Letellier A, Quessy S, Boulianne M, Daignault D, Archambault M. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of tetO and ermB genes. *J Food Prot*. 2011;74(10):1639-48.
59. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. 2017;90(1):135-45.
60. Heuer H, Focks A, Lamshöft M, Smalla K, Matthies M, Spiteller M. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008;40(7):1892-900.

61. Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol Biotechnol.* 2002;20(3):261-83.
62. Razavi M, Marathe NP, Gillings MR, Flach CF, Kristiansson E, Joakim Larsson DG. Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome.* 2017;5(1):160.
63. Ilina E, Malakhova M, Bodoev I, Filimonova A, Oparina N, Govorun V. Mutation in ribosomal protein S5 leads to spectinomycin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Microbiol.* 2013;4(186).
64. Chalmers G, Cormier AC, Nadeau M, Côté G, Reid-Smith RJ, Boerlin P. Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada. *Vet Microbiol.* 2017;203:149-57.
65. Chen MY, Lira F, Liang HQ, Wu RT, Duan JH, Liao XP, et al. Multilevel selection of bcrABDR-mediated bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* from chicken farms. *Sci Rep.* 2016;6:34895.
66. Charlebois A, Jalbert LA, Harel J, Masson L, Archambault M. Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One.* 2012;7(9):e44449.
67. Pollock TJ, Thorne L, Yamazaki M, Mikolajczak MJ, Armentrout RW. Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J Bacteriol.* 1994;176(20):6229.
68. Han X, Du X-D, Southey L, Bulach DM, Seemann T, Yan X-X, et al. Functional analysis of a bacitracin resistance determinant located on ICEcp1, a novel Tn916-like element from a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(11):6855-65.
69. Matos R, Pinto VV, Ruivo M, Lopes MdFS. Study on the dissemination of the bcrABDR cluster in *Enterococcus* spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(2):142-7.
70. Xu F, Zeng X, Hinenoya A, Lin J. MCR-1 Confers Cross-Resistance to Bacitracin, a Widely Used In-Feed Antibiotic. *mSphere.* 2018;3(5):e00411-18.
71. Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis.* 2003;36(4):462-7.
72. Collignon PJ, McEwen SA. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop Med Infect Dis.* 2019;4(1).
73. Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1459-63.
74. van Bunnik BAD, Woolhouse MEJ. Modelling the impact of curtailing antibiotic usage in food animals on antibiotic resistance in humans. *R Soc Open Sci.* 2017;4(4):161067.
75. Sundqvist M. Reversibility of antibiotic resistance. *Ups J Med Sci.* 2014;119(2):142-8.
76. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol.* 2008;190(14):5095-100.
77. Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrin F, Levesque RC, Brousseau R, et al. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3214-21.

78. Rothrock MJ, Jr., Locatelli A, Feye KM, Caudill AJ, Guard J, Hiatt K, et al. A Microbiomic Analysis of a Pasture-Raised Broiler Flock Elucidates Foodborne Pathogen Ecology Along the Farm-To-Fork Continuum. *Front Vet Sci.* 2019;6:260-.
79. Park SH, Hanning I, Perrota A, Bench BJ, Alm E, Ricke SC. Modifying the gastrointestinal ecology in alternatively raised poultry and the potential for molecular and metabolomic assessment1 1Presented as part of the Next Generation Sequencing: Applications for Food Safety and Poultry Production Symposium at the Poultry Science Association's annual meeting in Athens, Georgia, July 10, 2012. *Poult Sci.* 2013;92(2):546-61.
80. Park SH, Hanning I, Perrota A, Bench B, Alm E, Ricke S. Modifying the gastrointestinal ecology in alternatively raised poultry and the potential for molecular and metabolomic assessment. *Poult Sci.* 2013;92:546-61.
81. Griggs J, Bender J, Jacob J. Microbial Safety of Chickens Raised Without Antibiotics. *J Appl Poult Res.* 2006;15.
82. Heuer O, Pedersen K, Andersen JS, Madsen M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett Appl Microbiol.* 2001;33:269-74.
83. Thibodeau A, Fravallo P, Laurent-Lewandowski S, Guévremont E, Quessy S, Letellier A. Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. *Can J Vet Res.* 2011;75(4):298-307.
84. Arsenault J, Letellier A, Quessy S, Normand V, Boulianne M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Prev Vet Med.* 2007;81(4):250-64.
85. Young I, Rajic A, Wilhelm BJ, Waddell L, Parker S, McEwen SA. Comparison of the prevalence of bacterial enteropathogens, potentially zoonotic bacteria and bacterial resistance to antimicrobials in organic and conventional poultry, swine and beef production: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect.* 2009;137(9):1217-32.
86. Gaucher ML, Thibodeau A, Fravallo P, Archambault M, Arsenault J, Fournaise S, et al. Broiler chicken carcasses and their associated abattoirs as a source of enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Prevalence and critical steps for contamination. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):439-54.
87. Mahamat Abdelrahim A, Radomski N, Delannoy S, Djellal S, Le Négrate M, Hadjab K, et al. Large-Scale Genomic Analyses and Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Implicated in Foodborne Outbreaks in France. *Front Microbiol.* 2019;10(777).
88. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe.* 2018;53:5-10.
89. Nagpal R, Ogata K, Tsuji H, Matsuda K, Takahashi T, Nomoto K, et al. Sensitive quantification of *Clostridium perfringens* in human feces by quantitative real-time PCR targeting alpha-toxin and enterotoxin genes. *BMC Microbiol.* 2015;15:219.
90. Tang KL, Caffrey NP, Nobrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Health.* 2017;1(8):e316-e27.
91. Gabriel I, Lessire M, Mallet S, Guillot JF. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *Worlds Poult Sci J.* 2006;62(3):499-511.

92. Shang Y, Kumar S, Oakley B, Kim WK. Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Front Vet Sci.* 2018;5:254-.
93. Rinttilä T, Apajalahti J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance1. *J Appl Poult Res.* 2013;22(3):647-58.
94. Borda-Molina D, Seifert J, Camarinha-Silva A. Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:131-9.
95. Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(10):4301-10.
96. Yan W, Sun C, Yuan J, Yang N. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. *Sci Rep.* 2017;7:45308.
97. Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci.* 2003;82(4):632-9.
98. Crisol-Martínez E, Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Moore RJ. Understanding the mechanisms of zinc bacitracin and avilamycin on animal production: linking gut microbiota and growth performance in chickens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(11):4547-59.
99. Hugerth LW, Andersson AF. Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Front Microbiol.* 2017;8:1561.
100. Laupland KB, Valiquette L. The changing culture of the microbiology laboratory. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2013;24(3):125-8.
101. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology.* 2018;16(7):410-22.
102. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2761.
103. de Muinck EJ, Trosvik P, Gilfillan GD, Hov JR, Sundaram AYM. A novel ultra high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing library preparation method for the Illumina HiSeq platform. *Microbiome.* 2017;5(1):68-.
104. Hirai J, Nagai S, Hidaka K. Evaluation of metagenetic community analysis of planktonic copepods using Illumina MiSeq: Comparisons with morphological classification and metagenetic analysis using Roche 454. *PLoS One.* 2017;12(7):e0181452-e.
105. Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science.* 2014;5:209-.
106. Lariviere-Gauthier G, Thibodeau A, Letellier A, Yergeau E, Fravallo P. Reduction of *Salmonella* Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Front Microbiol.* 2017;8.
107. Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 2011;21(3):494-504.
108. Balvociute M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? *BMC Genomics.* 2017;18(Suppl 2):114.
109. Wagner BD, Grunwald GK, Zerbe GO, Mikulich-Gilbertson SK, Robertson CE, Zemanick ET, et al. On the Use of Diversity Measures in Longitudinal Sequencing Studies of Microbial Communities. *Front Microbiol.* 2018;9(1037).

110. Morris EK, Caruso T, Buscot F, Fischer M, Hancock C, Maier TS, et al. Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol Evol*. 2014;4(18):3514-24.
111. Thibodeau A, Fravallo P, Yergeau É, Arsenault J, Lahaye L, Letellier A. Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131978.
112. Johnson TJ, Youmans BP, Noll S, Cardona C, Evans NP, Karnezos TP, et al. A Consistent and Predictable Commercial Broiler Chicken Bacterial Microbiota in Antibiotic-Free Production Displays Strong Correlations with Performance. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(12).
113. Kumar S, Chen C, Indugu N, Werlang GO, Singh M, Kim WK, et al. Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192450.
114. Apajalahti J, Vienola K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim Feed Sci Technol*. 2016;221:323-30.
115. Robinson K, Becker S, Xiao Y, Lyu W, Yang Q, Zhu H, et al. Differential Impact of Subtherapeutic Antibiotics and Ionophores on Intestinal Microbiota of Broilers. *Microorganisms*. 2019;7(9).
116. Proctor A, Phillips GJ. Differential Effects of Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD) on the Distal Colon and Cecal Microbiota of Young Broiler Chickens. *Front Vet Sc*. 2019;6:114.
117. Costa MC, Bessegatto JA, Alfieri AA, Weese JS, Filho JAB, Oba A. Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171642.
118. Mehrotra M, Li X-Z, Ireland MJ. Enhancing antimicrobial stewardship by strengthening the veterinary drug regulatory framework. *Can Comm Dis Rep*. 2017;43:220-3.
119. World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision (2019). [Accessed March 10, 2020]. Available from: <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/>.
120. Health Canada. Categorization of Antimicrobial Drugs Based on Importance in Human Medicine (2009). [Accessed December 18, 2019]. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/antimicrobial-resistance/categorization-antimicrobial-drugs-based-importance-human-medicine.html>.
121. Public Health Agency of Canada. Tackling Antimicrobial Resistance and Antimicrobial Use: A Pan-Canadian Framework for Action (2017). [Accessed March 11, 2020]. Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/publications/drugs-health-products/tackling-antimicrobial-resistance-use-pan-canadian-framework-action.html>.
122. Chicken Farmers of Canada. The Antimicrobial Use Reduction Strategy (2020). [Accessed December 19, 2019]. Available from: <https://www.chickenfarmers.ca/the-antimicrobial-use-reduction-strategy/>.
123. Public Health Agency of Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2016 Annual Report (2018). [Accessed March 11, 2020]. Available from: http://publications.gc.ca/collections/collection_2018/aspc-phac/HP2-4-2016-eng.pdf.

124. Cogliani C, Goossens H, Greko C. Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe. *Microbe*. 2011;6:274-9.
125. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, et al. Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill*. 2016;21(6):30135.
126. Rahube TO, Marti R, Scott A, Tien Y-C, Murray R, Sabourin L, et al. Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(22):6898-907.
127. Marti R, Tien YC, Murray R, Scott A, Sabourin L, Topp E. Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(10):3258-65.
128. Lau CH-F, Li B, Zhang T, Tien Y-C, Scott A, Murray R, et al. Impact of pre-application treatment on municipal sludge composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Sci Total Environ*. 2017;587-588:214-22.
129. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*. 2012;6(8):1621.
130. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;4:e2584.
131. Bier A, Khasbab R, Haberman Y, Braun T, Hadar R, Sosnovski K, et al. Antibiotic Treatment Does Not Ameliorate the Metabolic Changes in Rats Presenting Dysbiosis After Consuming a High Fructose Diet. *Nutrients*. 2020;12(1):203.
132. Sundqvist M, Geli P, Andersson DI, Sjölund-Karlsson M, Runehagen A, Cars H, et al. Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. *J Antimicrob Chemother*. 2009;65(2):350-60.
133. Levin BR. Minimizing Potential Resistance: A Population Dynamics View. *Clin Infect Dis*. 2001;33(Supplement_3):S161-S9.
134. Chicken Farmers of Canada. On Farm Food Safety (2020). [Accessed March 11, 2020]. Available from: <https://www.chickenfarmers.ca/on-farm-food-safety/>.
135. Eeckhaut V, Van Immerseel F, Croubels S, De Baere S, Haesebrouck F, Ducatelle R, et al. Butyrate production in phylogenetically diverse Firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microb Biotechnol*. 2011;4(4):503-12.
136. Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, et al. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol*. 2010;39(2):117-21.
137. Hu Z, Guo Y. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;132(3):240-9.
138. Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog*. 2013;5(1):23-.

139. Borda-Molina D, Vital M, Sommerfeld V, Rodehutsord M, Camarinha-Silva A. Insights into Broilers' Gut Microbiota Fed with Phosphorus, Calcium, and Phytase Supplemented Diets. *Front Microbiol.* 2016;7(2033).
140. Hammerum A, Flannagan S, Clewell D, Jensen L. Indication of Transposition of a Mobile DNA Element Containing the *vat(D)* and *erm(B)* Genes in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:3223-5.
141. Jensen LB, Hammerum AM, Aarestrup FM. Linkage of *vat(E)* and *erm(B)* in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(8):2231-2.
142. Lerminiaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol.* 2019;65(1):34-44.
143. Stanley D, Keyburn AL, Denman SE, Moore RJ. Changes in the caecal microflora of chickens following *Clostridium perfringens* challenge to induce necrotic enteritis. *Vet Microbiol.* 2012;159(1):155-62.
144. Abbona CC, Stagnitta PV. *Clostridium perfringens*: Comparative effects of heat and osmotic stress on non-enterotoxigenic and enterotoxigenic strains. *Anaerobe.* 2016;39:105-13.
145. Knapp CW, Zhang W, Sturm BS, Graham DW. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. *Environ Pollut.* 2010;158(5):1506-12.
146. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5407.
147. Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(11):4605-14.
148. Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, et al. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 2011;5(8):1253-61.
149. Langlais M, Thibodeau A, Fravallo P. A metagenomic analysis of the pre-enrichment step for the isolation of *Salmonella* spp. from pig feces. *J Microbiol Methods.* 2019;157:43-6.
150. Tschirdewahn B, Notermans S, Wernars K, Untermann F. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int J Food Microbiol.* 1991;14(2):175-8.
151. Stanley D, Geier MS, Hughes RJ, Denman SE, Moore RJ. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS One.* 2013;8(12):e84290-e.
152. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33(9):496-503.
153. Ducatelle R, Goossens E, De Meyer F, Eeckhaut V, Antonissen G, Haesebrouck F, et al. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Vet Res.* 2018;49(1):43.
154. Ducatelle R, Eeckhaut V, Haesebrouck F, Van Immerseel F. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal.* 2015;9(1):43-8.

155. Zeng H, Ishaq SL, Liu Z, Bukowski MR. Colonic aberrant crypt formation accompanies an increase of opportunistic pathogenic bacteria in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem.* 2018;54:18-27.
156. Shi D, Bai L, Qu Q, Zhou S, Yang M, Guo S, et al. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. *Poult Sci.* 2019;98(6):2405-13.
157. Miyamoto K, Li J, McClane BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. *Microbes Environ.* 2012;27(4):343-9.
158. Heikinheimo A, Lindström M, Granum PE, Korkeala H. Humans as reservoir for enterotoxin gene--carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1724-9.
159. Heikinheimo A, Lindström M, Korkeala H. Enumeration and isolation of cpe-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):3992-7.