

Université de Montréal

Mise au point d'un système de fermentation pour la production d'un microbiote intestinal porcin

Par

Mathieu Bellerose

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2021

© Mathieu Bellerose, 2021

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Mise au point d'un système de fermentation pour la production d'un microbiote intestinal
porcin**

Présenté par

Mathieu Bellerose

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marcio Carvalho Costa

Président-rapporteur

Philippe Fravalo

Directeur de recherche

Alexandre Thibodeau

Codirecteur

Mohamed Rhouma

Membre du jury

Résumé

La prise en compte du microbiote intestinal porcin est une approche de plus en plus considérée dans la qualification des mesures de contrôle des pathogènes alimentaires issus de cette filière de production. Toutefois, ces études, en conditions protégées, sont généralement réalisées *in vivo*, nécessitent des installations spécialisées, coûteuses en fonctionnement. Une alternative possible à l'utilisation des animaux serait la disponibilité d'un système *in vitro* mimant le microbiote intestinal cultivé en bioréacteur. Ce projet de recherche vise la mise au point d'un système de culture en bioréacteur pour la production d'un microbiote dérivé du microbiote intestinal porcin, puis la mesure de l'effet de deux huiles essentielles sur le microbiote. Un système, original par son alimentation continue par un digestat d'aliment conventionnel porcin, a été utilisé dans le cadre de ce projet. En effet, ce système est composé de huit réacteurs, dont un réacteur mère permettant la croissance du microbiote qui a été distribué dans les sept réacteurs fils afin de disposer de conditions reproductibles. Les résultats obtenus par séquençage métagénomique 16S par Illumina MiSeq des échantillons démontrent une grande évolution de la composition des échantillons à 48 h par rapport au contenu intestinal utilisé pour l'inoculation. Toutefois, cette variation a diminué considérablement entre 48h et 72h, pour offrir une fenêtre d'analyse de microbiotes complexes d'origine intestinale porcine pour l'évaluation d'additifs alimentaires. Dans le cadre de cette étude, l'introduction de deux huiles essentielles, le Thymol et le Carvacrol, a été testée dans le système à 48h, pour deux concentrations (200 ou 1000 ppm). Les résultats de PCR quantitative ont démontré une augmentation significative des populations de Lactobacilles dans les réacteurs contenant du Thymol à 1000 ppm en 24h (entre l'ajout à 48h et la fin de l'expérience, à 72 h) ou par comparaison avec le réacteur contrôle sans huile à la fin de l'essai, mais aucune différence significative n'a été observée pour le Carvacrol. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée au niveau de la composition du microbiote entre les réacteurs comportant des additifs différents. Cette étude a permis le développement d'un système de bioréacteur permettant de maintenir un microbiote dérivé du microbiote intestinal porcin sur 72h, ainsi que sa mise en œuvre pour mesurer l'effet de l'addition d'une huile essentielle dans un réacteur.

Mots-clés : Microbiote, Bioréacteur, Huiles essentielles, Métagénomique 16S, Porcelet

Abstract

Pig intestinal microbiota is an approach more considered in the foodborne pathogen control qualification in the pig production. However, these studies are commonly conducted *in vivo* needing specific installation and significant costs. A possible alternative to the use of animals would be the used of an *in vitro* system to mimic the intestinal microbiota, in a bioreactor. This research project aims to setup a bioreactor system to produce a microbiota derived from the pig intestinal microbiota, and to assess the effect of two essentials oils on this microbiota. The system used in this project is unique by its design, continuously supplied using digested piglet feed as a culture media. This system is composed of eight reactors, including a mother reactor for the growth of the microbiota that was divided between seven daughter reactors to obtain reproducible conditions. Results obtained by 16S metagenomic sequencing using Illumina MiSeq of the samples showed an evolution of the sample composition at 48h compared to intestinal content used for inoculation. However, this variation decreases between 48h and 72h, offering a window for the analysis of food additives effect on the microbiota from piglet origin. In this study, two essentials' oils, Thymol and Carvacrol, were added to the system at 48h, at a concentration of 200 and 1000 ppm, respectively. Quantitative PCR showed a significant increase of *Lactobacilli* in reactors containing Thymol at 1000 ppm in 24h (between the addition at 48h and the end of the experiment at 72h) or when comparing with the control reactor without oils at the end of the experiment, but no significative difference was observed for the Carvacrol. However, no significative difference was observed in microbiota composition between the reactors containing the different additives. This study enabled the development of a bioreactor system to maintain a microbiota derived from the pig intestinal microbiota over 72h, and the possibility to assess the effect of essential oils addition in a reactor.

Keywords: Microbiota, Bioreactor, Essential oils, 16S Metagenomic, Piglet

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations	11
Remerciements	13
Revue de la littérature	14
1. Industrie du porc au Québec.....	15
2. Conditions physicochimiques de l'intestin porcin	18
2.1 pH de l'intestin	18
2.2 Conditions atmosphériques	18
2.3 Potentiel d'oxydoréduction	18
2.4 Température	19
3. Composition du microbiote intestinal porcin	19
3.1 Composition en fonction de l'âge	21
3.2 Composition en fonction du segment du tube digestif.....	21
3.3 Fonction du microbiote intestinal.....	22
4. Méthode de collecte de l'inoculum	24
5. Méthode d'analyse du microbiote	25
5.1 Analyses par qPCR.....	26
5.2 Analyses par séquençage.....	27

5.3 Analyses par bio-informatique	29
6. Systèmes de fermentation pour l'étude du microbiote	32
6.1 Système en batch	32
6.2 Système en continu	33
6.3 Roulement d'une expérience impliquant l'utilisation d'un réacteur	34
6.4 Milieu de culture utilisé	35
6.5 Utilisation des bioréacteurs	36
7. Additifs alimentaires pouvant influencer la composition du microbiote	37
7.1 Antibiotiques	37
7.2 Prébiotiques	39
7.3 Probiotiques	39
7.4 Huiles essentielles	40
8. <i>Salmonella</i> , un pathogène alimentaire du porc	41
8.1 Caractéristiques	42
8.2 Importance en santé publique	42
8.3 <i>Salmonella</i> dans l'industrie porcine	43
8.4 <i>Salmonella</i> et le microbiote	44
Hypothèse et objectifs	46
Article Scientifique	48
Discussion	88
1. Amélioration du système	89
2. Discussion des résultats	90
3. Nouveautés de l'étude	92
4. Limites de l'étude	93

5. Perspectives.....	94
Conclusion.....	96
Références bibliographiques	99

Liste des tableaux

Table 1 : Primer list for qPCR analysis	58
Supplementary Table 1 : List of unique phyla present either at T0 or T72, based on Venn diagram.	73
Supplementary Table 2 : List of unique families present at T0, with their associated phylum, number of sequences and the percentage of total sequences at T0.	74
Supplementary Table 3 : List of unique families present at T72, with their associated phylum, number of sequences and the percentage of total sequences at T72.	75
Supplementary Table 4 : MaAsLin association at the phylum level for T0, T48 and T72, using time as the factor.	78
Supplementary Table 5 : MaAsLin association at the family level for T0, T48 and T72, using time as the factor.	80
Supplementary Table 6 : Unique families associated with either T72, T0 or piglet factor.	81
Supplementary Table 7 : Unique genus associated with either T72, T0 or piglet factor.	83

Liste des figures

Revue de la littérature

Figure 1 : Cycle d'élevage du porc.	17
Figure 2 : Composition du microbiote intestinal du porc en fonction du segment du tube digestif.	20

Article scientifique

Fig 1: Alpha Diversity of the microbiota according to the time of sampling and the replicate.	60
Fig 2: NMDS representation of the beta diversity, using the Bray-Curtis index, of the bioreactor samples according to the time of sampling.....	61
Fig 3: NMDS representation of the beta diversity, using the Bray-Curtis index, based on the experimental replicate.....	63
Fig 4: NMDS representation of the bioreactor samples compared to the inoculum and piglet samples, using the Bray-Curtis index, based on the time as a factor.	64
Fig 5: Venn diagram indicating shared and unique phyla (A), families (B) or genera (C), between sample form the bioreactor at T0, sample form the bioreactor at T72, MF sample and piglet sample.....	65
Fig 6: Graphical representation of the evolution of the log DNA copies of lactobacilli per ng of genomic DNA.....	66
Fig 7: Alpha diversity of the bioreactor samples, between T48 and T72, with the condition as a factor.....	67
Fig 8: NMDS representation of the bioreactor samples, using the Bray-Curtis index, of T48 and T72, based on the condition factor.	68
Supplementary fig 1: Relative abundance of the microbiota composition, at the phylum level, for T0, T48 and T72.	75

Supplementary fig 2: Relative abundance of the microbiota composition, at the family level, for T0, T48 and T72.76
Supplementary fig 3: Photo of the bioreactor setup.77

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ddNTP: didésoxyribonucléotide triphosphate

dNTP: désoxyribonucléoside triphosphate

IgA: Immunoglobuline A

IViDiS: *In-Vitro* Digestion System

MaAsLin: Multivariate Analysis by Linear Model

NMDS: Non-metric Multidimensional scaling

OTU : Unité taxonomique opérationnelle

PBS : Phosphate buffer saline

PCoA: Principal Coordinate Analysis

PCR : Quantitative polymerase chain reaction

pH : Potentiel Hydrogène

QPCR : Quantitative polymerase chain reaction

SCFA : Acide gras à courte chaîne

*“Sometimes I’ll start a sentence and I don’t even know where it’s going. I just hope I find it along
the way.”*

-Michael Scott

Remerciements

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche Dr Philippe Fravallo pour l'opportunité offerte à la suite d'un stage réalisé à la Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV). J'aimerais aussi remercier mon codirecteur de recherche, Dr Alexandre Thibodeau, pour son support, ses conseils et son aide tout au long des différentes péripéties du projet. J'aimerais également remercier Isabelle Mainville et Dr Yves Arcand, collaborateurs essentiels sans qui le système, et donc le projet, n'aurait pu exister. Je souhaite remercier tous les membres de la CRSV pour leur aide et leur soutien sur les différents aspects de mon projet.

J'aimerais offrir mes remerciements au Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et au Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) pour leur soutien financier pour mon projet. Merci également aux membres de mon comité-conseil Dr Philippe Fravallo, Dr Alexandre Thibodeau, Dre Marie-Lou Gaucher et Dre Patricia Turgeon. Merci au jury d'évaluation du mémoire, Dr Marcio Carvalho Costa, Dr Philippe Fravallo, Dr Alexandre Thibodeau et Dr Mohamed Rhouma.

Finalement, j'aimerais remercier ma conjointe, mes parents et ma famille pour leur support tout au long de ce parcours.

Revue de la littérature

1. Industrie du porc au Québec

Le secteur porcin est une industrie de grande importance au Canada, représentant 30 % des revenus des productions animales et 10 % des revenus des productions agricoles avec plus de 3 milliards de dollars générés annuellement (1). En effet, plus de 21 millions de porcs ont été abattus dans les abattoirs canadiens en 2019 et, en 2018, l'industrie comptait plus de 26 millions de têtes. Le Québec, quant à lui, produit de 25 à 30 % de la consommation canadienne (2). En chiffre, le secteur porcin au Québec en 2018 était composé de plus de 2 000 entreprises de productions, avec un volume de production de plus de 7,1 millions d'animaux par année (3). Au niveau de la consommation, la viande porcine, en 2014, était la viande la plus consommée mondialement, avec environ 110 millions de tonnes équivalent carcasse (2). Au Canada, la consommation moyenne de porc pour l'année 2018 était de 21,7 kg par personne. De plus, le Québec contribue à hauteur de 43 % de l'exportation canadienne de viande de porc (3).

Du point de vue économique, le marché porcin québécois produit des recettes de 1,22 milliard de dollars annuellement, ainsi que des recettes de plus de 4 milliards de dollars au niveau de la transformation (3).

Considérant l'élevage, au Canada, certaines races de porc sont préférées pour la facilité de l'élevage et la qualité de la production. Quatre races de porc sont principalement élevées dans les fermes, soit le Yorkshire (42 %), le Large White (32 %), le Landrace et le Duroc (25 %)(4). La femelle Yorkshire est une race choisie pour sa croissance rapide et sa capacité à produire des portées contenant de nombreux porcelets (5). La femelle Landrace est aussi choisie pour ses grandes portées, mais aussi pour son taux élevé de muscle et son comportement maternel. Le mâle Duroc est lui sélectionné pour la qualité de sa viande et sa croissance rapide.

L'alimentation des porcs d'élevage est composée principalement de céréales, produites localement au Canada. En effet, environ 35 à 45 % de la production de céréale canadienne est destinée à la production porcine. L'alimentation des porcs est principalement composée de maïs (54 %), d'orge (29 %) et de blé fourrager (12 %) (4). La composition de l'alimentation du porc varie en fonction de l'âge et du stade physiologique de l'animal : d'une alimentation basée sur le lait maternel à la naissance vers une diète solide en stade post-sevrage, suivi d'une alimentation riche en nutriments et protéines lors du stade d'engraissement, pour finir avec une alimentation plus faible en nutriments dite de finition (6).

Différents types d'éleveurs sont présents au Québec (7). Le premier type est l'éleveur reproducteur. Comme son nom l'indique, cet éleveur se spécialise dans la production d'animaux destinés à la reproduction. Le deuxième type est le naisseur qui se spécialise dans la production de porcelets destinés à l'engraissement et élève un troupeau de truies. En 2015, le Québec comportait environ 204 entreprises de ce type, avec en moyenne 665 truies par entreprise (8) distribuées parfois dans plusieurs fermes. Le troisième type d'éleveur est le finisseur, qui va engraisser les porcelets jusqu'à leur poids final soit entre 120 et 135 kg (8). En 2015, environ 325 entreprises de type finisseur se trouvaient au Québec. Ces entreprises comportaient en moyenne 7243 porcs, pesant en moyenne 100,22 kg (8). Il est important de noter que ces types d'éleveurs ne sont pas toujours exclusifs les uns des autres. En effet, plusieurs éleveurs possèdent des établissements naisseurs et finisseurs, donc engraisent les porcelets de la naissance à l'abattage. Environ 400 entreprises de ce type se trouvent au Québec. Ces entreprises comportaient des troupeaux d'en moyenne 394 truies, et produisaient 9585 porcs charcutiers par an. Une autre entreprise intermédiaire est présente au Québec, soit la pouponnière. Ces éleveurs vont prendre en charge des porcelets après le sevrage, et les élever pendant 50 jours, jusqu'à un poids qui varie entre 20 et 35 kg (8).

L'élevage des porcs commence par la gestation de la truie (7). Cette gestation est généralement d'une durée de 3 mois, 3 semaines et 3 jours. Cette gestation se termine par une portée de 8 à 12 porcelets, pesant à la naissance entre 1 et 2 kg. Les porcelets sont ensuite laissés avec leur mère jusqu'à environ 21 jours d'âge et auront un poids final d'environ 6 kg. Les porcelets sont sevrés et envoyés à la pouponnière pendant 7 semaines, pour un gain quotidien de 0,45 à 0,68 kg. Finalement, les porcs se retrouvent en engraissement pendant 18 semaines, afin d'atteindre un poids d'abattage d'environ 135 kg.

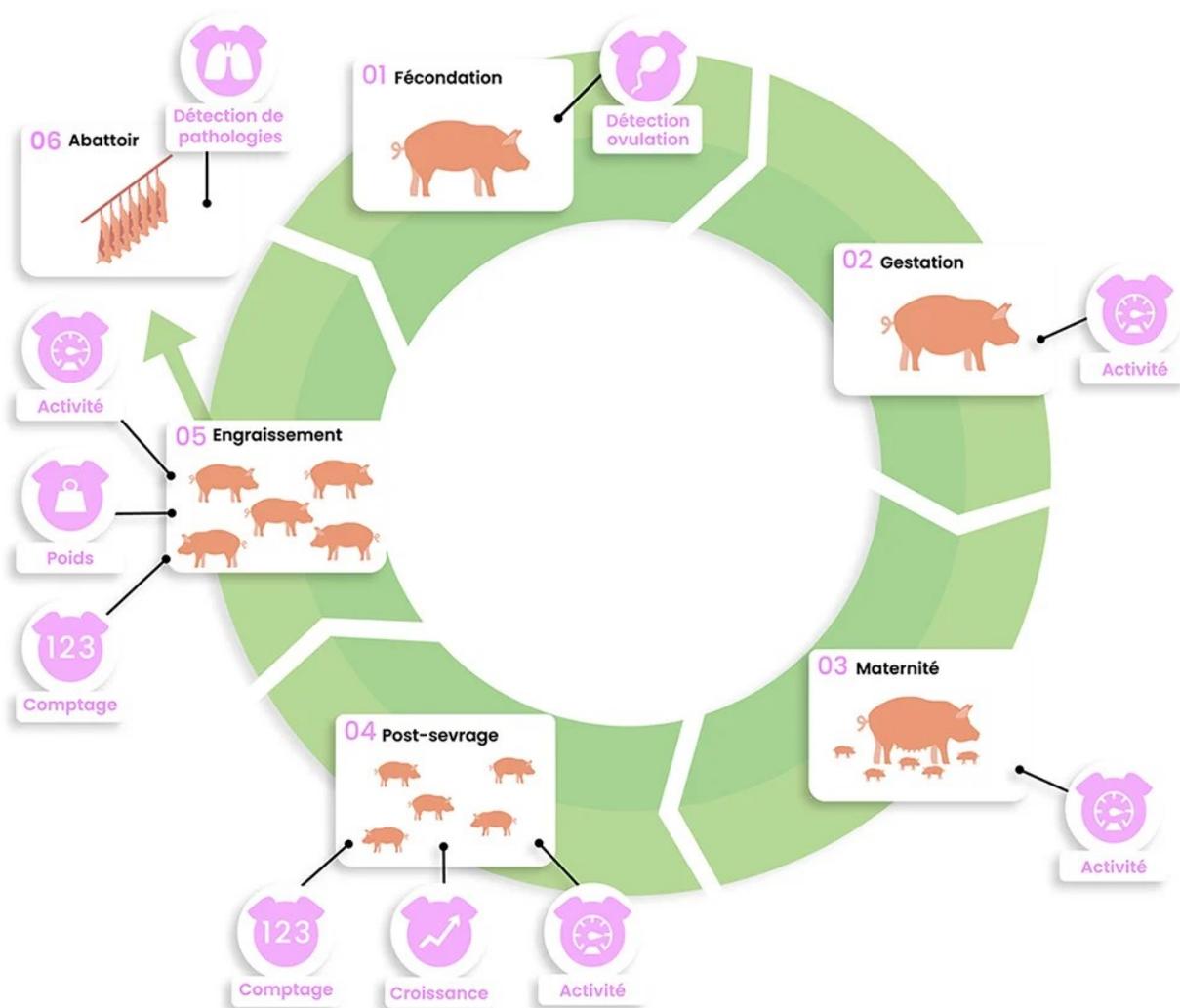


Figure 1 : Cycle d'élevage du porc.

Représentation des différents stades de l'élevage du porc (9).

Au sein de la production porcine, la santé de l'animal et son bien-être sont des facteurs importants, afin de conserver non seulement une productivité élevée, mais aussi pour maintenir l'image de l'entreprise. Au même titre, la santé intestinale des porcs est un aspect important dans la production porcine (10). Une bonne santé intestinale de l'animal permet une meilleure absorption des nutriments et offre une protection contre des infections causées par des microorganismes (10). Il est donc intéressant d'étudier différents aspects de l'intestin des porcs, comme la composition et les conditions physicochimiques, dans l'optique d'optimiser la santé intestinale des animaux.

2. Conditions physicochimiques de l'intestin porcin

La première étape dans l'étude de l'intestin du porc est le recensement des conditions physicochimiques présentes dans cet environnement. En comprenant ces conditions, il sera plus facile d'identifier les paramètres à utiliser pour la mise au point du bioréacteur.

2.1 pH de l'intestin

Le pH digestif chez le porc varie selon la section de l'intestin. Chez le porc charcutier, au niveau du petit intestin (iléon), le pH se situe autour de 6,7 (11). Dans la section suivante de l'intestin, soit le colon, le pH se situe autour de 6,3. Finalement, au niveau du cæcum, le pH est légèrement inférieur, soit autour de 6,0. Cette différence de pH peut sembler faible, mais elle est importante pour chacune des sections. En effet, il a été observé qu'une diminution du pH de 6,7 à 6,3 défavorisait certaines espèces bactériennes en diminuant leur vitesse de croissance, et même en favorisant d'autres espèces en augmentant leur vitesse de croissance (12). Par exemple, il a été observé qu'*E. coli* passe d'une croissance de 0,38/h dans une solution de pH 6,71 à 0,18/h dans une solution de pH 6,25, évolution majeure en comparaison avec *Ruminococcus* qui ne passe que de 0,80/h à 0,86/h, dans les mêmes pH.

2.2 Conditions atmosphériques

Les conditions atmosphériques, particulièrement la teneur en O₂ du milieu est une caractéristique permettant de sélectionner des bactéries selon leur tolérance. Pour les trois sections de l'intestin évoquées plus haut, ce sont des conditions anaérobiques qui sont enregistrées. En effet, les niveaux d'oxygène présent dans le tube digestif seraient d'environ 5 % au niveau de l'estomac, et de moins de 1 % dans le reste du tube digestif (13). Cette faible concentration en oxygène devient un facteur de sélection majeur des populations bactériennes présentes, limitant les bactéries aérobies strictes et permettant donc la croissance de bactéries anaérobiques facultatives ou strictes. Ce faible niveau d'oxygène explique la composition majoritaire des bactéries présentes dans l'intestin, soit majoritairement des bactéries anaérobiques strictes (14).

2.3 Potentiel d'oxydoréduction

Au-delà de la concentration en oxygène, c'est le potentiel redox du milieu qui va définir l'intensité de l'anaérobiose régnant dans un environnement. Le potentiel redox est une mesure qui représente la capacité d'une substance ou d'un milieu à s'oxyder ou se réduire (15). Le potentiel redox est un

autre paramètre physicochimique à prendre en compte. Il est variable dans les différentes régions de l'intestin, mais reste de l'ordre de grandeur de -100 mV. Peu de données sont disponibles sur le potentiel redox au niveau des différents segments de l'intestin porcine et ces données ne sont pas toujours récentes. Au niveau de l'iléon, il a été observé que le potentiel redox était faiblement négatif, et se situe autour de -43 mV (16). Au niveau du cæcum, le potentiel redox est très faible, se situant entre -185 mV et -209 mV (17). Dans le côlon ascendant, le potentiel redox est faible, de l'ordre de -200 mV (jusqu'à -379 mV), puis tend à augmenter dans le colon transversal et descendant, avec -197 mV (jusqu'à -375 mV) et -35 mV respectivement (16). Un extrême à -363 mV pour le côlon a été évoqué (18). Cette valeur, beaucoup plus basse, pourrait provenir du fait que l'ajustement de la sonde n'a pas été réalisé. En effet, lors du calcul de potentiel redox, il faut tenir compte de la correction de la sonde, qui est d'environ -199 mV (17).

2.4 Température

Un autre paramètre physicochimique important au niveau de l'intestin du porc est la température. Il a été montré que la température du tractus gastro-intestinal se situe entre 38,7 et 40,6 °C chez le porc (19). Elle correspond à la température corporelle de l'animal et ne varie pas selon la région de l'intestin étudiée. Cette température conditionne la croissance des bactéries présentes dans le tube digestif de l'animal. En plus de la température du tube digestif, il a été observé que la température de l'environnement de l'animal affecte la composition du microbiote intestinal, soit par l'augmentation de la température corporelle de l'animal, soit par la modulation des réponses de l'hôte (20). Ainsi la température corporelle module spécifiquement certains phylums (l'étude cite les *Chordata*, *Arthropoda*, et *Mollusca*). Les températures physiologiques extrêmes peuvent conduire à des changements de composition (diversité alpha) entre microbiotes d'individus, ainsi que des évolutions de diversités entre ceux de populations (diversité bêta) (20).

3. Composition du microbiote intestinal porcine

Le tube digestif des animaux contient une grande quantité de microorganismes. En effet, il a été estimé que le tube intestinal comporte 10^{14} bactéries au total (21), appelé microbiote intestinal. Le microbiote intestinal représente donc l'ensemble des microorganismes présents dans l'intestin (22). La notion de microbiome, quant à lui, inclut l'environnement dans lequel ces bactéries se trouvent et interagissent (y compris par expression génique mesurable) (23, 24). En plus des interactions inter bactériennes, le microbiote interagit avec aussi avec l'hôte, soit en symbiose, soit en situation

parasitaire. Afin de maintenir l'homéostasie, le tube digestif contribue à la maîtrise de ces bactéries par la mise en place de plusieurs barrières. Ces barrières sont de type physique (épithélium, mucus), biochimique (enzymes) et immunologique (cellules dendritiques, IgA) (22).

La composition du microbiote intestinal varie énormément selon l'âge et l'environnement des porcs (notamment leur alimentation). Toutefois, il a été remarqué une tendance dans la composition du microbiote fécal porcin : les deux principaux phylums présents sont les Firmicutes (81,0 %) et les Bacteroidetes (9,2 %) (25, 26). Les familles majoritaires systématiquement retrouvées par analyse bio-informatiques y sont les *Ruminococcaceae*, les *Lachnospiraceae*, les *Prevotellaceae* ainsi que les *Clostridiaceae 1* (27). Les principaux genres bactériens retrouvés dans cette même matrice sont *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Escherichia*, *Prevotella* et *Ruminococcus*. Toutefois, ces données restent des données générales obtenues de matières fécales, donc très partiellement représentatives des différentes régions intestinales (27).

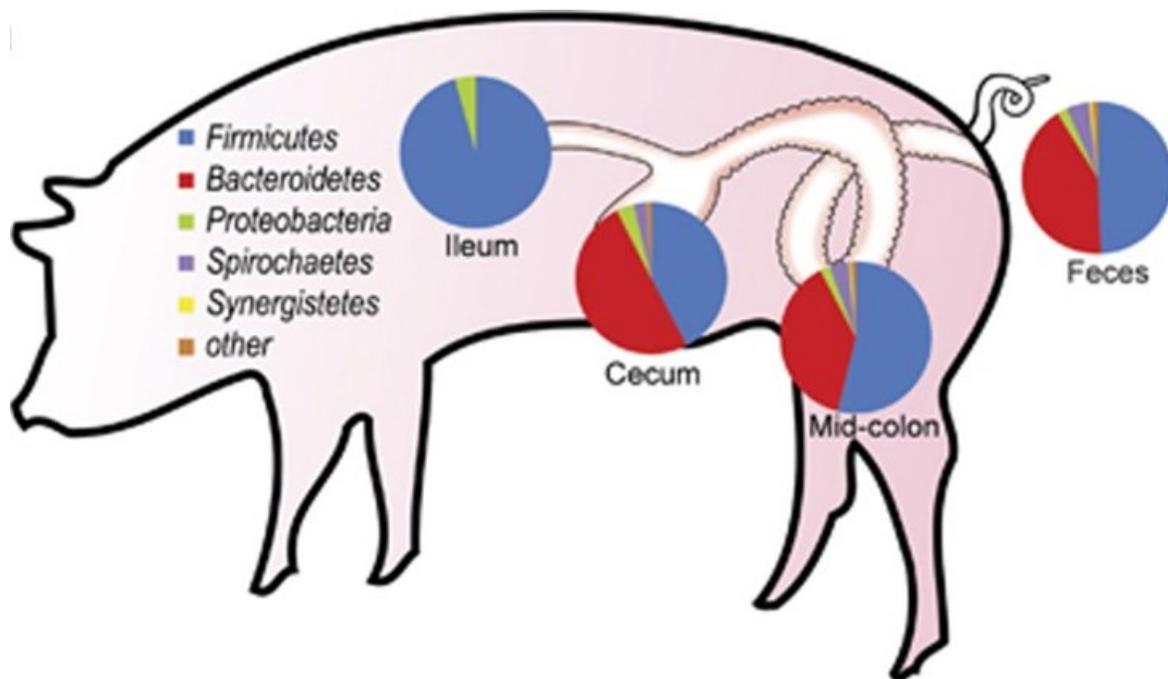


Figure 2 : Composition du microbiote intestinal du porc en fonction du segment du tube digestif.

La proportion des phylums majoritaires est représentée selon la section intestinale (28).

3.1 Composition en fonction de l'âge

La colonisation initiale de l'intestin du porcelet dépend de plusieurs facteurs (29, 30). Ces facteurs comprennent, entre autres, les conditions d'hygiène lors de la mise bas et l'administration ou non d'antibiotiques et l'alimentation, (31). Les premières espèces qui vont coloniser le tube digestif des porcelets sont principalement les *Escherichia*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Enterococcus* (32). L'abondance de certaines autres espèces comme *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus* va augmenter plus tard dans le processus de colonisation, soit autour de 14 jours d'âge (32, 33). De plus, il a été observé que le microbiote de la truie n'affecte pas la composition du microbiote intestinal du porcelet dans les premiers jours de sa vie (34). La composition du microbiote intestinal évolue tout au long du développement de l'animal, jusqu'à l'atteinte d'une stabilisation autour de 6 mois d'âge (35, 36). Autour d'un mois d'âge, le microbiote fécal du porcelet est principalement constitué de *Firmicutes*, à environ 73 %, de *Bacteroidetes* à environ 5 % et de *Proteobacteria* à environ 16 %. Elle devient, vers 6 mois d'âge, une distribution de *Firmicutes* à environ 91 %, de *Bacteroidetes* autour de 5 % et de *Proteobacteria* autour de 2 % (35).

3.2 Composition en fonction du segment du tube digestif

3.2.1 : Composition au niveau de l'iléon

Au niveau de l'iléon, les principaux phylums présents dans ce segment sont, les Firmicutes (56,0 %), les Protéobactéries (41,2 %), puis Bacteroidetes (1,34 %) (37). En comparant ces données avec les phylums obtenus lors de l'analyse sur les matières fécales, il est possible d'observer que les protéobactéries constituent une portion importante de la population bactérienne du contenu de l'iléon. De plus, la part totale des Bacteroidetes est faible au niveau de l'iléon, contrairement à sa représentation dans les deux autres régions. Au niveau de la famille, les constituants majeurs du microbiote iléal sont les *Lactobacillaceae* et les *Bifidobacteriaceae* (38). Lorsque l'analyse des principaux genres a été réalisée, *Escherichia-Shigella* était le principal genre avec 23,1 %, suivi de *Terrisporobacter* avec 17,9 %, *Romboutsia* avec 13,7 % puis finalement *Clostridium sensu stricto*1 avec 12,9 % (37).

3.2.2 Composition au niveau du cæcum

En ce qui concerne la composition du microbiote cæcal, les deux principaux phylums sont respectivement Bacteroidetes (46,4 %) et Firmicutes (37,7 %). En comparant ces pourcentages avec ceux trouvés dans les matières fécales, il apparaît immédiatement que le taux de Bacteroidetes est plus élevé dans le microbiote cæcal, surpassant la part des Firmicutes. Le cæcum est le segment de l'intestin contenant le plus haut taux de Bacteroidetes. Au niveau de la famille, les principales familles retrouvées sont *Methanobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae* et *Ruminococcaceae* (39). Au niveau du genre, les trois principaux genres retrouvés sont *Alloprevotella* avec 7,2 %, *Lactobacillus* avec 5,0 % puis *Prevotellaceae NK3B31group* avec 4,4 % (37). Les familles et les genres majoritaires sont différents de ceux retrouvés dans l'iléon.

3.2.3 Composition au niveau du colon

Les principaux phylums présents au niveau du colon, sont cette fois encore Firmicutes (62,5 %) et Bacteroidetes (29,2 %). Ces proportions de ces phylums retrouvés dans le colon correspondent à celles retrouvées dans les matières fécales. Au niveau de la famille, les principaux membres retrouvés sont les *Lactobacillaceae*, *Ruminococacceae*, *Lachnospiraceae* et les *Clostridiaceae* de groupe 1(40). Au niveau du genre, les trois principaux genres retrouvés sont *Streptococcus* avec 10,4 %, *Lactobacillus* avec 8,8 % et *Clostridium* avec 8,0 % (37). Tout comme les phylums, les familles et les genres majoritaires au niveau du colon sont similaires à ceux retrouvés dans les matières fécales.

3.3 Fonction du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal, autant chez l'humain que chez le porc, joue plusieurs rôles importants. Un de ces rôles est d'aider au développement du système immunitaire (41). En effet, à la naissance, le système immunitaire de la muqueuse intestinale du porcelet n'est pas encore développé. Lorsque le porcelet ne reçoit plus la protection offerte par le colostrum et le lait de la mère, le microbiote aide au développement du système immunitaire. Il a été observé, chez un animal gnotobiotique, que certaines composantes du système immunitaire étaient manquantes, par exemple les cellules T de la muqueuse et du mucus (42). Le lait maternel permet un apport en microorganisme, en métabolite (oligosaccharides), en IgA et en cellules immunitaires, la croissance et la formation du microbiote intestinal de l'animal (43). Par exemple, les IgA maternels réduisent l'activation immunitaire et permettent le développement de certains constituant du microbiote, comme les

Bifidobacterium. Par la suite, le microbiote intestinal va conditionner les cellules épithéliales de l'intestin, afin de les rendre hyporéactives aux stimulations des Toll Like Receptor. Toutefois, le mécanisme exact de l'intégration de ces signaux reste inconnu. En plus de ce conditionnement, les bactéries commensales permettent le développement de structure lymphoïde tertiaire dans l'intestin, ainsi que la promotion de la maturation des cellules épithéliales (43).

En plus d'aider au développement du système immunitaire de l'hôte, le microbiote intestinal joue un rôle important au niveau du métabolisme de certains nutriments. Le microbiote intestinal est en mesure de fermenter les sucres complexes non digestibles par l'hôte (appelés fibres alimentaires), comme la cellulose ou la pectine, et produire à cette occasion des acides gras volatiles à chaîne courte (SCFA) (44, 45). Ces SCFA, dont particulièrement le butyrate, le propionate et l'acétate sont des sources d'énergie qui sont disponibles pour l'hôte, et jouent eux-mêmes un rôle dans la régulation de la présence de certains pathogènes dans le contenu intestinal (par ex. le butyrate inhibe spécifiquement l'expression des facteurs d'adhésion chez les *Salmonella*) (44, 46). Le microbiote intestinal, par son métabolisme, peut aussi produire certaines vitamines essentielles non trouvées dans l'alimentation pour l'hôte, comme la vitamine K et certaines vitamines appartenant au groupe des vitamines B (47). Le microbiote intestinal est aussi apte à métaboliser les polypeptides et les protéines présentes au niveau de l'intestin, libérant certains acides aminés essentiels, comme la lysine et la thréonine (48, 49). Certaines études ont aussi rapporté une différence de composition du microbiote entre des porcs obèses ou des porcs réguliers, suggérant ainsi un rôle du microbiote dans le métabolisme des lipides (50). Dans ce contexte, parmi ces différences, il a été noté une augmentation de certains OTUs correspondant aux *Lachnospiraceae*, aux *Prevotella* et aux *Bacteroides* (50), significativement associés à ce surpoids.

Au-delà de ces aspects immunitaire et métabolique, le microbiote intestinal jouerait aussi un rôle majeur dans ce qui est considéré comme l'axe microbiote-intestin-cerveau (51). Il a été observé que le microbiote intestinal est capable de moduler la maturation, le développement et les fonctions du système nerveux central (52). Inversement il a aussi été montré que le cerveau possède un impact sur la composition du microbiote intestinal : en condition de stress, la composition du microbiote intestinal change drastiquement (53). Par exemple, chez la souris, un contexte stressant (de même que l'utilisation de certains antibiotiques perturbateurs de microbiote) conduit à une augmentation

de la production de tryptophan hydroxylase isoforme 1 (TPH1), qui est responsable de la synthèse de la sérotonine (53).

En conclusion, s'il est possible d'observer une différenciation du microbiote dans les différentes portions de l'intestin, il n'en reste pas moins que les régions terminales (colon, cæcum et matière fécale) sont plus similaires entre elles qu'avec les sections intestinales proximales, à commencer par l'iléon. Dans un contexte analytique, lors de la collecte d'échantillon, il est important de tenir compte de cette différence de composition, et ainsi procéder à la collecte dans la région d'intérêt du tube digestif selon la question à laquelle on tente de répondre.

4. Méthode de collecte de l'inoculum

Dans le cas d'une étude sur le microbiote intestinal, il est important de prendre en considération la méthode de collecte de l'inoculum. En effet, l'utilisation même de différentes méthodes de collecte de matière intestinale a un impact direct sur la composition du microbiote(54). Il faut aussi prévoir une méthode de transport adaptée au type d'échantillon, puisque celui-ci peut aussi être dommageable. De plus, l'utilisation de protocoles différents tant pour l'extraction que l'analyse de l'ADN peuvent aussi avoir un impact sur le résultat final (55). Indépendamment du rôle des différents protocoles, certaines variables peuvent rapidement jouer un rôle dans l'évolution de la composition du microbiote. Par exemple, l'oxygène est toxique pour certaines populations bactériennes et affecte la viabilité de leurs représentants. Même si la viabilité des espèces bactériennes sensibles à l'oxygène a un impact moins important au niveau des analyses, celle-ci est de grande importance dans l'optique de traitement ou de thérapie basés sur le microbiote. Afin de conserver le plus fidèlement possible les différentes populations bactériennes, il est suggéré de travailler en environnement anaérobique, tant que possible dès la collecte et pendant le transport des échantillons.

En ce qui concerne la conservation des échantillons, la méthode privilégiée par la communauté scientifique est la congélation de ceux-ci à -80 °C, sans l'ajout de solution tampon (56). Cette méthode de conservation permet de conserver l'ADN pour des analyses de ARNr16S, même après 14 ans de conservation (57). Outre la congélation à -80 °C, d'autres méthodes sont utilisées, dont la congélation à -20 °C, la conservation à 4 °C ou la conservation à la température de la pièce. Ces dernières méthodes ont des impacts de plus en plus importants sur l'évolution de la composition mesurée du microbiote. Par exemple dans le cas de la conservation à la température de la pièce,

certaines espèces peuvent continuer à croître, ce qui modifie les résultats finaux obtenus. Dans le cas de la congélation, le temps requis avant la congélation complète est à prendre en considération. Il a été observé qu'une congélation lente entraînait une différence de composition au niveau du genre, lorsque comparée avec celle d'un échantillon d'ADN extrait immédiatement après la collecte (58). Une congélation rapide dans l'azote liquide est donc préférée à une congélation lente afin de stabiliser le microbiote qui sera séquencé (58).

Le choix de la méthode de conservation dépend grandement de l'étude qui doit être réalisée. Dans le cas d'une étude de métagénomique, la viabilité des cellules apparaît de moindre importance, puisque c'est l'ADN recueilli qui est analysé. Toutefois, dans le cas d'étude de transplant fécal ou d'ensemencement dans un bioréacteur, la méthode de conservation doit permettre une bonne reprise du microbiote, donc une bonne viabilité cellulaire. Il est alors préférable d'utiliser des méthodes comme la conservation à -80 °C dans un milieu de maltodextrine-tréhalose, comme il a été démontré par Burz et al. (59).

Il est de pratique courante, dans les situations d'analyse du microbiote intestinal, de récolter les matières fécales et d'analyser le microbiote à partir de cette matrice. Ce choix, s'explique par la simplicité de sa réalisation, le fait que le prélèvement soit non-invasif (ni destructif ce qui est d'importance vis-à-vis du bien-être animal et de considérations économiques des essais expérimentaux). Le prélèvement de matières fécales ne requiert aucun outil ou appareil particulier. En contrepartie ce choix entraîne une approximation de la composition microbienne du contenu intestinal considérant le microbiote fécal comme un indicateur limité du microbiote intestinal (60). En effet, en comparant le microbiote fécal et le microbiote provenant de niches mucoales au niveau du colon, une différence de composition importante a été observée chez l'humain (61). Une variabilité transversale (de la lumière vers la muqueuse) a pu être relevée également, même si elle est reconnue plus faible au niveau du colon que du duodénum (62). Il reste donc préférable, dans le cas d'étude du microbiote intestinal, de procéder à la collecte du contenu de la section intestinale à l'étude.

5. Méthode d'analyse du microbiote

Classiquement, les études en lien avec des populations bactériennes combinent les approches d'isolement, de dénombrement avec la caractérisation des bactéries, sur différents milieux de culture, autant solides, semi-solides que liquides, sélectifs ou non (63). Toutefois, il a été rapporté

que le nombre de bactéries observées par microscopie est supérieur à l'évaluation du dénombrement réalisé par culture typique, ce qui conforte la théorie selon laquelle certaines bactéries sont non cultivables (64). Il serait cependant plus juste de nommer ces bactéries « cultivables en devenir », puisque leurs conditions idéales de culture n'ont peut-être pas encore été identifiées ou que leur faible représentation ne permettra par leur culture sans disposer d'agents sélectifs très spécifiques. Ceci explique que la majorité des microbiomes sont considérés non ou partiellement cultivés (65). Il est donc important, dans le cas d'études de communautés complexes comme le microbiote intestinal, d'utiliser des outils adaptés qui permettront d'appréhender le plus grand nombre de bactéries possible, qu'elles soient cultivables ou non. Parmi ces outils, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, plus précisément la qPCR et le séquençage (66) est particulièrement adaptée.

Avant l'utilisation des techniques comme le séquençage pour l'analyse du microbiote, d'autres techniques basées sur la diversité présentée par l'ADN codant l'ARN ribosomal 16S étaient utilisées. Par exemple, Bibiloni et al ont montré la diversité des bactéries présentes dans l'intestin de souris colitique, par l'amplification du segment V3 du gène codant pour l'ARN 16S, puis ils ont séparé et ont identifié les amplicons par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) (67). Selon le même principe, mais en s'appuyant sur le polymorphisme conformationnel de l'ADN simple brin (SSCP) il a été possible de révéler la diversité microbienne présente dans des échantillons fécaux en productions animales (68, 69). Une autre technique utilisée avant le séquençage était la puce à ADN. Cette technique permettait, comme les autres techniques précédemment décrites, d'identifier les espèces bactériennes présentes dans un échantillon de microbiote, par l'utilisation d'une sonde qui se lie sur un segment d'ADN codant pour l'ARN 16S, spécifique à une espèce (70). Pour cette dernière une connaissance préalable des bactéries présentes dans la communauté était donc nécessaire.

5.1 Analyses par qPCR

Une des méthodes utilisées pour l'analyse de la composition du microbiote intestinal s'appuie sur la qPCR. Cette technique de biologie moléculaire permet de quantifier dans un échantillon une bactérie cible (donc connue et attendue dans ce type échantillon), en mesurant la quantité d'ADN présente, selon la fluorescence acquise en cours de réaction d'amplification de l'échantillon (71) : plus la fluorescence est détectable rapidement, plus le gène (la bactérie) était présent en grande

quantité dans l'ADN extrait de l'échantillon. Cette méthode comporte plusieurs avantages (72), dont la simplicité de la méthode, puisqu'elle est réalisable avec un niveau d'équipement classique pour un laboratoire, et en seulement quelques heures.

L'indicateur fluorescent ajouté au mélange réactionnel dépend de la technologie de détection souhaitée. La première technologie de détection est l'utilisation d'un agent se liant à l'ADN double brin (73). Cette technologie comprend des agents intercalent de l'ADN ou des agents se fixant aux sillons mineurs de l'ADN. Parmi ceux-ci, le plus populaire est le SYBR Green I, puisqu'il possède une bonne sensibilité et il est facile à utiliser. Lorsque le SYBR Green I se lie à l'ADN double brin, à la suite de la phase d'élongation, il libère le fluorophore lui étant attaché, permettant ainsi la lecture de fluorescence émise. La deuxième technologie de détection est l'utilisation de sonde fluorescente. Cette technologie comporte plusieurs types de sondes. Le premier type est l'hydrolyse de sonde (Taqman assay). Dans ce type de sonde, c'est une amorce qui possède un fluorophore, ainsi qu'un suppresseur. Lors que la polymérase commence l'élongation, le fluorophore et le suppresseur sont relâchés et se distancient, permettant ainsi au fluorophore d'émettre une longueur d'onde. Le deuxième type de sonde est l'hybridation de deux sondes. Dans ce type, l'amorce est divisée en deux petites amorces, contenant chacune un fluorophore. Toutefois, l'une des sondes possède un fluorophore donneur (par exemple vert) et l'autre possède un fluorophore accepteur (par exemple rouge). Lors de la phase d'hybridation, les deux amorces se lient à l'ADN, et la proximité des sondes permet au fluorophore émetteur d'absorber la fluorescence du donneur, puis d'émettre dans une autre longueur d'onde.

Grâce à la qPCR, il est possible d'obtenir un portrait général du microbiote intestinal, à condition de cibler un nombre conséquent de populations indicatrices (74). En effet, il est possible, en utilisant des amorces spécifiques pour certaines familles, genre ou espèce, de quantifier la présence de certaines populations d'intérêt dans l'échantillon (72). Parmi les indicateurs pertinents à observer se trouvent les bactéries totales, par l'analyse du gène codant pour l'ARN 16S, les *Enterobacteriaceae*, famille qui regroupe 20 genres, dont les *Escherichia coli* et *Salmonella*, ainsi que les *Lactobacillus* (75-77).

5.2 Analyses par séquençage

Plusieurs techniques de séquençage ont été utilisés pour l'analyse du microbiote, avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Une des premières techniques de séquençage a été mise au

point par Frederick Sanger, appelée chain-terminator method, ou séquençage Sanger (78). Cette méthode, en plus d'utiliser les désoxyribonucléotides (dNTP), utilise un faible pourcentage de didésoxyribonucléotide (ddNTP) (79). Ces ddNTP n'ont pas de groupe hydroxyle en position 3', ce qui empêche la prolongation du brin par la polymérase. Originellement, ce séquençage était réalisé dans 4 tubes différents de façon simultanée, avec uniquement un type de ddNTP par tube. Les différentes réactions étaient par la suite transférées dans un gel d'électrophorèse, puis selon la distance de migration, la séquence pouvait être déterminée, en commençant par le bas du gel, représentant le plus petit fragment. De nos jours, le principe de cette technique est toujours utilisé, mais sa réalisation a été optimisée. Des fluorophores ont été ajoutés sur les ddNTP, à raison d'une couleur par type de base, ce qui permet de faire le séquençage en une réaction au lieu de quatre. De plus, la lecture de la séquence se fait par lecture optique, en faisant migrer le produit de la réaction dans un capillaire, contenant un gel et un courant électrique (80). Un laser permet la lecture des fluorophores à un point précis, puisque la longueur des brins aura un impact sur la vitesse de migration.

Dans l'optique d'optimiser les méthodes de séquençage, d'autres techniques ont été développées. Parmi celles-ci, le pyroséquençage (séquençage 454) qui utilise une cascade enzymatique du pyrophosphate pour activer la luciférase, menant ainsi à la production d'un signal lumineux (81). Tout d'abord, des billes sont préparées fixant par amplification l'ADN à séquencer sur leur surface (82). Par la suite, ces billes sont ajoutées, à raison d'une bille par puits, dans une plaque contenant des billes avec de la sulfurylase et de la luciférase à sa surface. La plaque est alors soumise à un seul type de nucléotide à la fois. Si la base ajoutée se lie à l'ADN sur la bille, le pyrophosphate relâché réagira avec la seconde bille, produisant un signal lumineux. La force du signal lumineux est proportionnelle au nombre de base qui se lient, alors si la séquence comporte 4 bases identiques d'affilée, le signal lumineux produit sera 4 fois plus puissant. La plaque est alors rincée, puis une autre base est ajoutée. Ceci est alors répété jusqu'à l'obtention de la séquence complète.

Une autre technique de séquençage couramment utilisée est la méthode d'Illumina. Dans cette méthode, le guide d'ADN est tout d'abord amplifié sur une microplaque, permettant ainsi la formation d'un îlot pouvant contenir jusqu'à 1000 copies identiques de l'ADN (83). Pour se faire, l'ADN guide est lié à un adaptateur à chacune des extrémités. Par la suite, les fragments d'ADN s'hybrident à la séquence « adaptateur complémentaire » qui est liée à la microplaque (82). L'ADN

est alors amplifié, ce qui mène à la formation de l'îlot d'ADN. Une fois les îlots complétés, la plaque est lavée, puis le séquençage commence. Le séquençage par Illumina est encore une fois séquentiel. Toutefois, tous les nucléotides sont ajoutés en même temps, mais avec un fluorophore différent par nucléotide, qui empêche l'ajout de base supplémentaire. À la suite d'un lavage, le fluorophore est clivé, puis une lecture optique de l'ensemble de la plaque est réalisée et traitée par des logiciels d'analyse d'image, donnant pour chaque cycle et chaque îlot quel nucléotide a été ajouté. Le cycle est alors répété, jusqu'à la complétion du séquençage.

Dans le cas du séquençage d'une communauté complexe comme un microbiote intestinal, un facteur commun à tous les membres doit être identifié, afin d'utiliser le moins d'amorces possible. Il s'agit de la région de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S (84). Ce gène, présent uniquement chez les bactéries, est hautement conservé (peu soumis à des événements de recombinaison ou de mutation spontanée). Ce gène de 1500 paires de base contient 9 régions hautement variables et propres à chaque espèce bactérienne, nommées régions V1 à V9 et chacune des régions est donc encadrée par des séquences qui elles sont hautement conservées (85). Un ou plusieurs agencements de cette région sont sélectionnés, puis une amorce est mise au point, dans la région hautement conservée, pour amplifier la section variable du gène. Une PCR est réalisée avec cette amorce afin d'amplifier la région déterminée, puis le produit de cette PCR peut être séquencé par les dernières technologies, comme la plateforme Illumina MiSeq. Le séquençage des échantillons produit toutefois énormément de données brutes. Il est donc nécessaire de procéder à une analyse bio-informatique afin de traiter et analyser ces résultats.

5.3 Analyses par bio-informatique

Le séquençage produit un nombre de séquences très élevé, alors des outils spécifiques sont nécessaires pour leur analyse. Plusieurs outils sont disponibles afin de réaliser différentes opérations bio-informatiques, dont Velvet, MetAMOS, Prokka (86). En plus de ces outils, des logiciels peuvent être utilisés, évitant l'utilisation séquentielle et successive de solutions numériques. Peuvent être cités le logiciel R avec le package DADA2 et logiciel Mothur (87, 88). Malgré la grande diversité de logiciels et de procédures disponibles, le fonctionnement (mode opératoire) général de l'analyse reste commun.

La première étape de cette procédure est de procéder à un nettoyage des séquences, afin d'analyser uniquement les séquences désirées et contenant le moins d'erreurs possible. Pour réaliser ce

nettoyage, il faut d'abord retirer les nucléotides ambigus des séquences, qui apparaissent lorsque le séquenceur ne parvient pas à déterminer le type de nucléotide qui a été intégré à la séquence (89). Certains logiciels permettent même d'assigner un nucléotide à ces ambigus ou proposent une correction des erreurs. Si à la suite de cette étape de correction des séquences contiennent toujours des séquences ambiguës, elles sont éliminées. De plus, il faut retirer les longues séquences de nucléotides répétées, particulièrement les séquences de plus de 8 nucléotides consécutifs (90). Un autre aspect du nettoyage des séquences est le retrait des sections de séquences ayant un indice de qualité faible, c'est-à-dire des séquences dont la probabilité que la base ait été mal identifiée est considérée trop élevée. Ce retrait peut se faire de deux façons, soit par une coupure complète de la séquence dès que l'indice de qualité est sous le seuil désiré ou par le retrait de section dont l'indice de qualité moyen est sous le seuil désiré (90, 91). Le nettoyage des séquences se poursuit par le retrait des séquences dont la longueur est anormale, soit trop longue ou trop courte (89). La dernière étape du nettoyage est le retrait des séquences non désirées, donc appartenant aux mitochondries, aux chloroplastes ainsi que des séquences eucaryotes.

La seconde étape de cette analyse est le retrait des séquences dites chimères (89). Les séquences chimériques sont des artéfacts liés à la PCR (92). Ce phénomène se produit lorsque l'amplification d'un brin est arrêtée prématurément, et que ce brin incomplet se lie à un autre segment d'ADN lors d'un cycle ultérieur, agissant ainsi comme amorce. Le brin résultant provient ainsi de deux ou plusieurs brins d'ADN. Ce retrait de séquence chimérique se produit par l'utilisation de base de données créée à cet effet ou de logiciel capable de repérer les chimères, comme Chimera Slayer par exemple (93).

Une fois que le nettoyage et le retrait des chimères sont réalisés, la communauté doit être caractérisée. Pour se faire, les séquences sont regroupées en OTUs (89). Une OTU, ou unité taxonomique opérationnelle, représente un groupement de séquence similaire, groupement déterminé par un seuil de similarité établi lors de l'analyse bio-informatique, généralement autour de 97 %. Cette valeur de 97 % se base sur le fait que le gène codant pour l'ARN 16S est hautement conservé, et que les différentes espèces sont discriminées par cette valeur seuil (94). Encore une fois, plusieurs méthodes sont disponibles afin de regrouper les séquences en OTU, dépendamment de la puissance informatique disponible (puissance de l'ordinateur ou du serveur) et de la précision des résultats désirée. Une fois les OTUs obtenus, il est possible de procéder à l'assignation

taxonomique, en comparant les séquences de ces OTU à celles déposées dans des bases de données comme Silva, RDP ou Greengenes (95-97).

Les OTUs précédemment obtenues permettent d'analyser la diversité du microbiote. La première mesure est la caractérisation de la diversité alpha des échantillons (98). La diversité alpha représente la diversité au sein de chaque échantillon individuellement, et les valeurs obtenues pour les différents indices calculés sont donc associées à un échantillon donné (99). Différents indices peuvent être calculés pour caractériser la diversité alpha, qui sont généralement le fruit de deux composantes : la richesse de l'échantillon et sa distribution dans l'échantillon (98). La richesse de l'échantillon représente le nombre de séquences différentes présentes dans un seul échantillon, tandis que la distribution dans l'échantillon mesure l'abondance relative des espèces. Trois indices sont couramment utilisés, soit Obs, le nombre d'espèces observées, l'indice de Shannon et l'indice de Simpson (98). Les espèces observées représentent uniquement la richesse d'un échantillon, donc ne fournissent aucune information sur la distribution (100). L'indice de Shannon mesure de façon équitable la richesse de l'échantillon ainsi que la distribution des espèces au sein de l'échantillon. L'indice de Simpson mesure aussi en fonction de la richesse et de la distribution des espèces dans l'échantillon, mais donne plus de poids à la distribution. Une fois les indices obtenus, il est possible de réaliser des tests statistiques afin d'identifier, ou non, une différence entre les groupes. Le test à réaliser dépend de l'analyse, mais peut-être, entre autres, un test t, une ANOVA ou un test de Kruskal-Wallis.

Le second type de diversité utilisé dans les analyses bio-informatiques est la diversité bêta. La diversité bêta représente la diversité au sein de l'écosystème, donc la diversité entre les échantillons. La diversité bêta ne peut être calculée pour un seul échantillon, comparativement à la diversité alpha. Il s'agit de la comparaison de tous les échantillons d'une étude (101). Cette diversité peut être de type qualitatif ou de type quantitatif. La diversité bêta de type qualitatif se base sur des comparaisons de séquences de type présence/absence (101). Pour ce faire, des indices comme celui de Jaccard ou Unifrac non pondéré sont utilisés et les calculs répétés sont portés par des algorithmes. Dans le cas de la diversité bêta de type quantitatif, les comparaisons se basent sur l'abondance relative des différents échantillons (101). Les algorithmes et les indices utilisés dans ce cas sont ceux de Bray-Curtis ou Unifrac pondéré. De plus, peu importe le type choisi, les analyses peuvent se faire à l'aide de la phylogénie ou non (directement sur les OTU) (101).

Les diversités alpha et bêta précédemment décrites permettent donc d'obtenir une évaluation de la structure du microbiote. Les différences peuvent donc être comparées, toujours à l'aide de tests statistiques, comme un Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (102). Il est aussi possible de visualiser les différences entre les structures de microbiotes par une représentation sur un graphique de type Principal Coordinates Analysis (PCoA) ou (Non-metric multidimensional scaling) NMDS. Afin d'identifier les déterminants d'une différence de composition entre les différents échantillons, il est possible de trouver des biomarqueurs spécifiques, ceux qui ont le plus de poids dans la signification statistique des différences mesurées. Un outil en particulier peut être utilisé, soit le Multivariate Analysis by Linear Models (MaAsLin2). Cet outil permet d'identifier une association autant positive que négative d'une OTU avec une certaine condition (103).

6. Systèmes de fermentation pour l'étude du microbiote

Plusieurs modèles de système de fermentation existent dans la littérature pour la représentation d'un microbiote intestinal, autant pour la reproduction d'un modèle animal que pour la reproduction d'un modèle humain. Ces différents modèles varient énormément en complexité, passant d'un modèle simple à volume fixe, avec anaérobie et pH contrôlés (104) à un modèle complexe en alimentation continue incluant un îlot de cellules simulant la muqueuse intestinale (105). Le type de modèle à utiliser dépend en grande partie de facteurs comme les fonds disponibles pour les réactifs, la durée nécessaire de l'expérience, la croissance bactérienne et la gestion de la concentration en nutriments et en métabolites dans le milieu de culture (106).

6.1 Système en batch

Le premier type de système de fermentation couramment utilisé dans l'étude du microbiote intestinal est un système de fermentation dit en batch. Les bioréacteurs en batch sont des réacteurs dans lesquels les solutions sont ajoutées dès le départ, et aucun ajout ou retrait n'a lieu avant la fin de l'expérience (107). Les systèmes en batch sont les systèmes les plus simples, mais ils ont le moins de flexibilité (108). L'avantage de ce type de système se situe dans leur facilité d'utilisation, ainsi que leur faible risque de contamination par des bactéries puisque le système reste fermé en permanence (106). Toutefois, ces systèmes produisent une plus faible densité de cellules bactériennes comparativement aux autres modèles. Ce type de système est idéal pour des expériences de courte durée (104).

Une variation plus complexe du système en batch est le système fed-batch. Le système fed-batch se base sur le même principe que les systèmes en batch, à l'exception notable que des nutriments sont ajoutés en petite quantité dans le système, périodiquement au cours de l'expérience (109). Un exemple d'utilisation de ce système dans le cas d'une étude sur le microbiote est le système mis au point par Takagi et al (104). Dans cette étude, les auteurs ont mis au point un système de fermentation, sans alimentation, sur une durée de 24 h. Les auteurs ont ajouté dans leur milieu de culture un inoculum de matière fécale humaine, et ont observé que le microbiote final à 24 h était similaire au microbiote de l'inoculum initial. Les auteurs ont par la suite testé l'ajout de divers oligosaccharides, ce qui a augmenté la présence de *Bifidobacterium* (104).

6.2 Système en continu

Le second type de système de fermentation couramment utilisé dans l'étude du microbiote intestinal est un système de fermentation avec alimentation en continu. Les systèmes en alimentation continue sont des systèmes de fermentation dans lesquels du milieu de culture frais est ajouté en permanence dans le réacteur et du volume est retiré au même moment (106). Ce principe permet le renouvellement des nutriments disponibles dans le milieu, ainsi que le retrait des métabolites toxiques du système. Ce principe permet de balancer la croissance et la perte de bactérie dans le milieu réactionnel, et de garder les bactéries dans une phase métaboliquement active tout au long de l'étude (110). De plus, dans la plupart des cas, d'autres conditions sont aussi régulées, soit l'atmosphère, le pH, la température et la composition du milieu de culture.

Il existe plusieurs systèmes dans cette catégorie, avec différents niveaux de complexité. Un exemple de système complexe est le système PolyFermS (111). Ce système est composé de plusieurs réacteurs, dont un réacteur contenant l'inoculum, un réacteur contrôle, et quatre réacteurs tests. Dans le cas de ce système, les réacteurs tests et contrôles sont alimentés à 90 % par du milieu nutritif frais et à 10 % par le contenu du réacteur contenant l'inoculum. Ce réacteur est maintenu pendant toute la durée de l'expérience, soit 54 jours. Dans ce type de réacteur, il est possible de tester jusqu'à 4 conditions simultanées. Toutefois, les réacteurs doivent être stabilisés pendant 3 jours entre chaque traitement (111). De plus, une différence d'abondance relative est observée entre l'inoculum fécal initial et le réacteur servant à inoculer le système, surtout par la perte des *Clostridiaceae* et des *Lactobacillaceae*. Aussi, une variation est observée au niveau du réacteur alimentant les réacteurs tests en inoculum au travers de l'expérience (111). Le système PolyFermS

a été utilisé dans une autre étude afin d'évaluer l'effet de différentes fibres diététique (Inuline, Fructo-oligosaccharide, B-glucan, a-galactooligosaccharide, xylo-oligosaccharide) sur le microbiote et sur la production de SCFA chez l'humain (112). Indépendamment de la fibre utilisée, un microbiote dominé par des *Bacteroidaceae-Ruminococcaceae* produit plus de butyrate, que dans celui dominé par des *Prevotellaceae-Ruminococcaceae* qui produit plus de propionate.

Un autre exemple de système, encore plus complexe, est le système TWINSHIME (105). Contrairement au PolyFermS, ce système vise l'étude du système digestion en connectant les différents réacteurs en série. Ceci permet alors de reproduire les conditions de l'estomac, de l'intestin grêle, du côlon ascendant, du colon transversal et du côlon descendant. De plus, des billes composées d'Agar et de mucine sont ajoutées au milieu de culture, afin de simuler la muqueuse intestinale. Ce système est utilisé pendant 43 jours, et l'alimentation du système se fait à raison de 3 fois par jours (105). Toutefois, tout comme le PolyFermS, une importante différence de composition est observée dans les premiers jours. Jusqu'à 10 jours sont nécessaires afin d'obtenir une stabilisation de la communauté microbienne. Une fois stabilisée, la composition du microbiote est très similaire à la composition initiale (105). Bien que ce système se rapproche des conditions digestives de l'humain, il n'est pas possible de tester plusieurs additifs de façon simultanée. Dans la littérature, le TWINSHIME a été utilisé afin de caractériser le microbiote du système, dans l'optique d'étudier le microbiote en profondeur dans un système en dynamique (105).

6.3 Roulement d'une expérience impliquant l'utilisation d'un réacteur

Peu importe le type de réacteur utilisé, la procédure reste similaire. La procédure typique commence par la préparation du système (113). Cette première étape vise la stérilisation de l'équipement, la connexion du réacteur au système de contrôle et l'addition du milieu de culture. La seconde étape d'une expérience en bioréacteur est l'inoculation du système, soit par une culture bactérienne ou un échantillon de matière fécale. Une fois l'inoculation réalisée, la période de culture commence. Cette période de culture varie en fonction du système sélectionné ainsi que les objectifs de l'étude. En effet, comme mentionné, le choix du système influence la durée de l'expérience puisque les réacteurs en batch sont limités par les nutriments et sont généralement utilisés pendant 24 h (104). Dans le cas des systèmes en continu, les temps d'expériences varient énormément d'un système à l'autre. La durée de ces expériences peut varier de quelques jours à plusieurs mois (111, 114, 115). La période de culture est aussi la période où plusieurs paramètres

sont surveillés, dont le pH, la température, et l'agitation (113). C'est aussi dans cette période où les échantillons sont collectés. Dans le cas des expériences en alimentation continue, l'ajout de milieu de culture frais commence dans cette phase, ainsi qu'un retrait équivalent de contenu du réacteur. La phase de culture de l'expérience se termine par une phase de collecte, où les cellules, la biomasse ou les métabolites, en fonction de l'expérience, sont collectés, puis l'expérience est arrêtée. Une fois l'expérience arrêtée, le système est vidé et nettoyé, puis son contenu stérilisé afin d'éliminer les microorganismes. Les échantillons récoltés peuvent alors faire l'objet d'analyses subséquentes, par qPCR ou par séquençage à haut débit.

6.4 Milieu de culture utilisé

Tout comme la durée de roulement des expériences, le milieu de culture utilisé dans les réacteurs est très variable. Certains systèmes utilisent des milieux de culture simple composés de quelques éléments, tandis que d'autres utilisent des milieux beaucoup plus complexes, pouvant être composés d'une vingtaine d'ingrédients différents (116, 117). En effet, chaque système utilise un milieu de culture différent, mais certains éléments sont communs à tous les systèmes. Par exemple, dans la majorité des systèmes, une certaine quantité de mucine est ajoutée au milieu de culture, afin de simuler en partie la muqueuse intestinale (111, 116, 117). De plus, beaucoup de milieux de culture en bioréacteur ajoutent comme ingrédients de la L-Cystéine. En effet, la L-Cystéine est ajoutée puisqu'elle est reconnue comme étant un agent réducteur, permettant ainsi la diminution du potentiel redox du milieu de culture (118). Il existe d'autres agents réducteurs en alternative à la L-Cystéine. Le choix de l'agent réducteur dépend du potentiel d'oxydoréduction désiré. Parmi ces alternatives, il est possible de retrouver l'acide ascorbique, le thioglycolate, le mercaptoéthanol ainsi que le formaldéhyde sulfoxylate (119). Comme tout milieu de culture bactérien, certains éléments essentiels doivent être présents. En effet, afin de favoriser la croissance bactérienne dans un environnement donné, une bactérie doit avoir accès à une source d'énergie soit une source de carbone ainsi que certains éléments essentiels, comme du fer, du potassium et de l'azote (120). Le milieu de culture sélectionné dépend donc des bactéries qui devront être cultivées dans le système (121). Toutefois, les milieux de culture artificiels ont tous des composantes en commun, soit des glucides, généralement sous la forme de fécule, pectine ou arabinogalactan, des produits azotés, sous la forme d'extrait de levure, de mucine ou de peptone, ainsi que des sels et minéraux, dont entre autres du KCl, NaCl, MgSO₄ et de la bile (111, 117). Une alternative au milieu de culture synthétique est la digestion d'aliment dans un système, comme l'IViDiS, afin de produire un milieu

de culture dérivé d'un aliment (122). De cette façon, la composition du milieu de culture est représentative de la composition intestinale.

6.5 Utilisation des bioréacteurs

Les systèmes de bioréacteurs ont une grande variété d'objectifs quant aux expériences réalisées. Une des multiples utilisations recensées dans la littérature est l'utilisation d'un système de bioréacteur pour évaluer l'effet d'un prétraitement avec un antibiotique avant un transplant fécal (114). Dans ce système, un microbiote composé de bactéries impliquées dans la colite ulcéreuse a été cultivé, puis la moitié des réacteurs ont reçu un prétraitement à la rifaximine avant le transplant fécal. Dans cette étude, il a été observé qu'un traitement à la rifaximine réalisé avant le transplant fécal n'avait pas d'impact sur l'efficacité de la transplantation.

Une autre utilisation d'un système de bioréacteur visant à évaluer les modifications de la lignine par le microbiote intestinal des termites (123). Le microbiote intestinal des termites est cultivé dans le bioréacteur, puis de la paille de blé est ajoutée. La dégradation de la lignine présente dans la paille est ensuite évaluée par résonance magnétique nucléaire.

Les systèmes de bioréacteurs peuvent aussi être utilisés pour des études sur le microbiote animal, et le microbiote intestinal porcin peut être utilisé comme modèle d'étude. Par exemple, le modèle mis en place par Tanner *et al.*, est utilisé pour stabiliser un microbiote intestinal porcin, puis le diviser dans cinq réacteurs en parallèle (111). Ce système permet donc la production d'un microbiote similaire dans les cinq réacteurs, situation idéale pour tester plusieurs conditions de façon simultanée. Cependant, il est intéressant de noter que le milieu de culture utilisé dans ce système est un milieu de culture synthétique, contrairement à un milieu de culture provenant d'une digestion d'aliment.

Le microbiote présent dans un environnement, soit en bioréacteur ou au niveau de l'animal, dépend donc des conditions de culture et des nutriments présents dans l'environnement ou dans le milieu de culture. Toutefois, il est possible d'influencer et même de modifier le microbiote d'un environnement. Cette modification ou modulation est réalisable par l'ajout d'additifs. Ces additifs peuvent être ajoutés autant dans un système de bioréacteur, ou directement dans l'alimentation de l'animal.

7. Additifs alimentaires pouvant influencer la composition du microbiote

Il est reconnu que le microbiote intestinal, autant chez l'humain que chez les animaux, est sensible à plusieurs facteurs. Comme mentionné, la composition du microbiote peut varier lorsque l'hôte est dans une situation de stress (53). Toutefois, certains facteurs autres que psychologiques ont un impact sur la composition du microbiote. Il a naturellement été observé que l'alimentation joue un rôle majeur dans la composition du microbiote intestinal (124). En plus de l'impact de l'alimentation sur la composition du microbiote, certains additifs alimentaires ont eux aussi un impact majeur sur la composition. Par exemple, l'utilisation de SCFA et d'huiles essentielles (thymol, cinnamaldehyde et eucalyptus) dans l'alimentation du porc augmente la diversité des familles bactériennes et l'abondance des bactéries lactiques (125). Les additifs alimentaires sont des composés ajoutés dans l'alimentation des porcs, qui ont comme fonction d'améliorer les performances zootechniques et la santé générale des animaux (126). Ces composés sont divisés en différentes catégories, notamment les plus employées : antibiotiques, prébiotiques, probiotiques et huiles essentielles.

7.1 Antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés possédant des propriétés antimicrobiennes (bactériostatiques et bactéricides). Ces composés étaient utilisés depuis les années 1950 en élevage pour le contrôle et la prévention des maladies, mais aussi comme facteur de croissance pour améliorer les performances zootechniques des animaux (127). Le mécanisme d'action des antibiotiques comme facteur de croissance reste peu connu. Toutefois, certaines hypothèses concernant ce mécanisme d'action ont été émises. La première hypothèse est que l'antibiotique cause une réduction de microorganismes pathogènes dans l'intestin (128, 129). Chez la volaille, il a été rapporté qu'une alimentation faible en acide folique supplémenté d'un antibiotique permettait la croissance de coliformes iléaux produisant de l'acide folique (130). La seconde hypothèse est que l'antibiotique réduit la concentration des métabolites du microbiote, conduisant ainsi à la réduction de l'inflammation intestinale (128). La troisième hypothèse est que les antibiotiques diminuent la production de toxines par les bactéries intestinales (128). La quatrième et dernière hypothèse est que les antibiotiques diminuent le nombre d'infections intestinales sub-cliniques (128).

Les antibiotiques sont généralement sélectionnés et utilisés dans le but d'inhiber certaines populations pathogènes précises. Toutefois, plusieurs de ces antibiotiques sont à spectre plus large affectant ainsi plusieurs familles microbiennes du microbiote (131). De plus, les antibiotiques peuvent affecter indirectement d'autres espèces qui dépendent de métabolites secondaires produits par des familles directement affectées (132). Ce phénomène a été observé avec l'utilisation de la vancomycine. Cet antibiotique est utilisé pour son spectre d'action dirigé contre les bactéries à Gram positif uniquement, mais une diminution de certaines bactéries à Gram négatif a été observée dans un environnement complexe comme le microbiote intestinal.

Certains antibiotiques sont utilisés comme facteur de croissance dans l'alimentation animale. Parmi ceux-ci, il est possible de retrouver les flavophospholipides (exemple; bambermycine) et les ionophores (133, 134). La consommation d'antibiotique par la filière porcine mondiale est autour de 172 mg/kg de masse de l'animal, représentant le double de la consommation d'antibiotique chez l'humain (135). Cette consommation d'antibiotique est variable entre les pays, avec une consommation de 14 600 tonnes aux États-Unis et de 97 000 tonnes en Chine (135). Toutefois, cette énorme utilisation d'antibiotique, généralement à dose sous-thérapeutique, favorise la sélection de bactéries résistantes. Par la suite, la viande, contaminée par ces bactéries, peut mener à la propagation de de la résistance aux antimicrobiens et du transfert des gènes d'antibiorésistance jusqu'à l'humain (136). Ce phénomène devient alors problématique, puisque l'humain peut développer une infection résistante aux antibiotiques ce qui réduit l'efficacité de ces molécules dans le traitement des infections bactérienne en médecine humaine (137).

Vu la problématique grandissante de la résistance aux antibiotiques, une réduction de l'utilisation de ces molécules en production animale doit avoir lieu. Dans l'optique d'une lutte contre la résistance aux antibiotiques, le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) a lancé une campagne de sensibilisation dans le but d'informer les éleveurs sur les retombées d'une utilisation judicieuse d'antibiotique au sein de leur élevage (138). En plus de la campagne de sensibilisation, une nouvelle réglementation a été mise en place, ayant pour but de réduire l'utilisation d'antibiotique de plus haute importance en santé humaine (139). Cette réglementation prévoit, au niveau de la filière porcine, de réserver l'administration de médicament de très haute importance en santé humaine uniquement à des fins curatives chez le porc malade.

De plus, cette réglementation vise à interdire l'administration à des fins préventives des médicaments de très haute importance en santé humaine chez les animaux de la ferme.

À la vue de l'impact des antibiotiques, lorsqu'utilisés comme facteur de croissance, il est important de trouver et d'utiliser des approches alternatives à ces molécules.

7.2 Prébiotiques

Les prébiotiques sont des composés non digestibles par l'animal et qui sont fermentés par le microbiote intestinal (140). Ces composés, une fois fermentés, augmentent la production de métabolite bactérien produit au niveau de l'intestin, comme les acides gras à courte chaîne. De plus, ces composés peuvent moduler le microbiote, ce qui aide à réduire l'inflammation au niveau de l'intestin. Les prébiotiques les plus importants sont des oligosaccharides, plus précisément les Mannan-oligosaccharides (MOS), les Fruto-oligosaccharides (FOS), les Galacto-oligosaccharides (GOS), les Chito-oligosaccharides (COS), les Isomalto-oligosaccharides (IMO), les Pectic-oligosaccharides (POS) et les Xylo-oligosaccharides (XOS) (141). Plusieurs prébiotiques sont disponibles avec chacun leur particularité, comme le type de bénéfice qu'il apporte à l'animal. Certains prébiotiques sont utilisés pour la stimulation de certaines bactéries spécifiques, comme les GOS qui stimulent les *Lactobacilles* et les *Bifidobactéries*, tandis que d'autres ont des bénéfices sur les performances zootechniques des animaux, comme les COS, qui favorisent la croissance des animaux et améliorent la fonction de la barrière intestinale des porcs (142, 143).

7.3 Probiotiques

Les probiotiques sont un autre type d'additif alimentaire utilisé chez le porc. Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui lorsqu'administrés aux animaux en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique pour l'hôte (144). Tout comme les prébiotiques, les probiotiques augmentent les performances zootechniques de l'animal, par l'utilisation de nutriments présents au niveau de l'intestin, et la production de métabolites secondaires actifs (144). Par exemple, des bactéries qui produisent de l'acide lactique comme métabolite sont utilisées afin d'acidifier l'intestin pour réduire sa colonisation par des pathogènes. Une souche doit posséder certaines caractéristiques afin de pouvoir être considérée comme probiotique (145). Tout d'abord, la souche bactérienne doit résister à l'acidité gastrique, doit coloniser l'intestin et être métaboliquement active dans l'intestin, donc produire des métabolites. La seconde caractéristique est la promotion de la santé de l'animal.

Chez le porc par exemple, *L. rhamnosus* permet une meilleure santé intestinale de l'animal par l'inhibition de l'adhésion de pathogène entérique à la muqueuse, comme *Salmonella*, *Clostridium* ou *E. coli* (146). Aussi, cette souche doit posséder un potentiel industriel, c'est-à-dire pouvoir être produite en grande quantité et présenter une bonne stabilité à long terme pour que la production industrielle au fil des années n'altère pas les propriétés initiales des souches. Finalement, la souche doit être sécuritaire, donc non toxique et non pathogène, pour l'animal, mais aussi pour la santé humaine, et ne pas porter de gène de résistance aux antibiotiques. Les bactéries le plus souvent utilisées comme probiotique sont les *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Bacillus*

7.4 Huiles essentielles

Une alternative supplémentaire à l'utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaires dans l'optique de moduler le microbiote est l'introduction des huiles essentielles. Les huiles essentielles sont des composés aromatiques présents naturellement dans certaines parties de plantes (147). Ces huiles sont couramment utilisées dans certains produits comme le maquillage, les parfums ou dans l'alimentation comme supplément de saveur et d'arôme. Toutefois, certaines recherches ont observé un effet antimicrobien de ces huiles essentielles (148, 149). En effet, certaines huiles essentielles ont démontré un potentiel antibactérien contre quelques pathogènes alimentaires, tel que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium et *Escherichia coli* O157 : H7.

Une de ces huiles essentielles d'intérêt est le carvacrol. Le carvacrol est un composé aromatique de la catégorie des monoterpènes (147). Le carvacrol est naturellement retrouvé dans certaines plantes aromatiques, plus précisément l'origan et le thym (150). Malgré sa présence naturelle dans ces plantes, il est possible de produire le carvacrol de façon synthétique, par des méthodes chimiques et de biotechnologie. Le carvacrol possède des caractéristiques antimicrobiennes, autant sous forme d'huile que sous forme de vapeur. En effet, il a été observé que le carvacrol est efficace sous forme de vapeur contre *Escherichia coli* O157 : H7 et *Salmonella*, en plus de traiter des infections respiratoires comme *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (151). En plus de l'efficacité sous forme de vapeur, le carvacrol possède un effet inhibiteur sous forme d'huile contre certains pathogènes alimentaire *in vitro*, dont *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (149).

Une autre huile essentielle d'intérêt est le thymol. Le thymol, étant l'isomère du carvacrol, est lui aussi un composé aromatique de la catégorie des monoterpènes (152). Le thymol se trouve naturellement dans certaines plantes de la famille des *Lamiaceae*, dont le thym et l'origan, mais peut aussi être synthétisé de façon chimique. Tout comme le carvacrol, le thymol possède des propriétés antibactériennes lorsqu'utilisé comme huile avec certains pathogènes. En effet, le thymol est efficace, *in vitro*, contre certains pathogènes alimentaires, autant Gram positif que Gram négatif. Ces pathogènes sont, entre autres, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cerus* (153).

L'efficacité du carvacrol et du thymol comme agents antibactériens se base sur sa capacité de perméabilisation de la membrane cellulaire des bactéries (154, 155). En effet, ces deux huiles, par leur composition, peuvent perturber la portion des lipides de la membrane cellulaire, causant ainsi une expansion de la membrane, une augmentation de la fluidité membranaire et une fuite de matériel intracellulaire. De plus, ces deux huiles ont aussi la capacité de dépolariser la membrane cellulaire, signifiant ainsi une perte de proton et de potassium intracellulaire. Il est intéressant de noter toutefois que le carvacrol et le thymol ne parviennent pas à complètement éliminer *Escherichia coli*, mais qu'ils inhibent sa croissance de façon significative (155).

En plus du carvacrol et du thymol, plusieurs autres huiles essentielles montrent une efficacité antibactérienne lors de test *in vitro* (149). Parmi ceux-ci se trouvent l' α -terpineol, le citral, l'eugénol, le géraniol et le perillaldehyde. Toutefois, l'efficacité des huiles essentielles est généralement obtenue lors de tests *in vitro*. Ces essais sont réalisés en deux étapes, soit la détermination du potentiel antimicrobien, par la méthode de diffusion par disque, puis la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces huiles, par la méthode de dilution en gélose ou en bouillon (156). Des études supplémentaires sont donc requises afin de confirmer l'efficacité de ces huiles essentielles sur les pathogènes dans un environnement plus complexe, comme *Salmonella* Typhimurium dans un microbiote intestinal.

8. *Salmonella*, un pathogène alimentaire du porc

Chaque année, plus de 4 millions de cas de toxiinfections alimentaires ont lieu au Canada (157). *Salmonella* spp. non typhique, serait responsable d'environ 5 % des cas, mais représenterait 24 % des hospitalisations et 17 % des décès liés aux toxiinfections alimentaires (158). *Salmonella* est le principal agent de zoonose bactérienne d'origine alimentaire associé à la production porcine. Au

Canada, la prévalence de *Salmonella* tout au long de la chaîne de production porcine est décrite par les chiffres suivants : 66 % dans les fermes contaminées et un taux de contamination de carcasse d'environ 4,2 % (159, 160). La lutte contre ce pathogène est donc une priorité pour la filière.

8.1 Caractéristiques

Salmonella est une bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae*, Gram négatif en forme de bâtonnet, environ 2 à 3 µm par 0,4 à 0,6 µm (161). Le genre *Salmonella* comporte deux espèces, soit *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*, et six sous-espèces. *Salmonella enterica* est composée de plus de 2600 sérovars, dont la majorité appartiennent à la sous-espèce *enterica* (162). *Salmonella* peut aussi être classée en séro groupe, selon son antigène O (somatique) qui sera complété par l'identification de ses antigènes H (flagellaires, *Salmonella* présente deux phases antigéniques flagellaires) pour aboutir au sérovar. La température de croissance de la plupart des sérovars se situe entre 5 et 47 °C, avec une croissance optimale entre 35 et 37 °C. *Salmonella* est sensible à la chaleur, et généralement tuée par des températures supérieures à 70 °C. Cette bactérie peut croître à des pH entre 4 et 9, mais a un pH optimal de 6,5 à 7,5. *Salmonella* requiert une activité de l'eau entre 0,94 et 0,99. Finalement, la croissance de *Salmonella* est complètement inhibée lorsque la température est de moins de 7 °C et un pH de moins de 3,8 ou une activité de l'eau de moins de 0,94.

8.2 Importance en santé publique

Salmonella est un microorganisme important au niveau de la santé publique. En effet, comme mentionné plus tôt, *Salmonella* est responsable d'environ 5 % des cas de toxiinfection alimentaire au Canada, et d'environ 17 % des cas de décès (158). Afin de mesurer l'impact des microorganismes sur la santé, une unité de mesure a été instaurée par l'OMS, soit l'espérance de vie corrigée de l'incapacité (EVCI) ou *Disability-Adjusted Life Years* (DALYs) (163, 164). Un DALY représente la perte de l'équivalent d'une année de pleine santé. Le calcul d'un DALY est basé sur la somme des années de vie perdue (*Years of life lost due to premature mortality*, YLL) et des années perdues causée par un handicap (*Years of healthy life lost due to Disability*, YLD). Le YLL se calcule en multipliant le nombre de morts avec le nombre d'années de vie restantes selon l'espérance de vie. Le YLD se calcule, depuis 2012, en multipliant le nombre de cas avec le poids d'un handicap. En Amérique du Nord, en 2010, *Salmonella enterica* a causé en taux de DALYs de 9 par 100 000 habitants, facteur le plus élevé avec *Campylobacter* (165). La salmonellose, maladie

causée par *Salmonella* est une maladie à déclaration obligatoire au Québec, ainsi que partout au Canada (166, 167). Il est donc intéressant, à la vue de ces chiffres, de comprendre comment la contamination à *Salmonella* se distribue au niveau de l'industrie porcine.

8.3 *Salmonella* dans l'industrie porcine

Salmonella, comme mentionné dans la section précédente, est un pathogène qui est parfois présent dans le microbiote intestinal du porc à la ferme. En effet, des études ont détecté la présence de *Salmonella* dans 40 % à 60 % des fermes de porc échantillonnées (160). Chez le porc, seulement certaines *Salmonella* peuvent causer une maladie, comme *Salmonella* Choleraesuis et *Salmonella* Typhimurium (168). La salmonellose porcine se manifeste généralement par une septicémie ou par une entéocolite. Toutefois, *Salmonella* est principalement asymptomatique chez le porc (169). Dans les cas d'infection asymptomatique, *Salmonella* est retrouvé dans les nœuds lymphatiques et dans l'intestin des animaux, avec une distribution cœcale plus importante privilégiée dans ces cas.

La contamination des porcs à la ferme par cette bactérie peut se produire dans plusieurs circonstances. Un facteur de risque important dans la contamination du troupeau est l'introduction de nouveaux animaux dans le troupeau (170). Si l'animal venant d'être introduit dans le troupeau est contaminé par *Salmonella*, un risque est présent que cet animal contamine une portion du troupeau. Une autre possibilité de contamination provient de la présence des rongeurs qui sont reconnus comme étant une source de contamination à la ferme (171). Ces rongeurs peuvent être porteurs de certains pathogènes, comme *Campylobacter* ou *Salmonella* et ont la capacité à s'infiltrer sur les lieux d'élevage, permettant ainsi la contamination des aliments et des animaux. Un autre facteur important dans la contamination des animaux par *Salmonella*, même si son poids est encore controversé, est l'alimentation. Malgré le traitement de l'alimentation des porcs par la chaleur lors de la fabrication en granulés qui permet de réduire la contamination par *Salmonella*, celle-ci peut être retrouvée dans les granulés dans les enclos des porcs (170). Un autre facteur important à prendre en compte est la qualité du nettoyage (172). Afin de réduire la propagation de *Salmonella* entre les différents troupeaux ou lots d'un même élevage, il est important d'éviter la mise en place de cycles de recontaminations successives et il est donc crucial de procéder à un nettoyage complet et une désinfection des parcs, ainsi que de procéder à la désinfection de l'équipement utilisé entre deux lots produits, idéalement en contrôlant l'efficacité de cette opération.

Malgré le fait que les porcs soient asymptomatiques au niveau de la ferme, cette contamination peut avoir un impact sur la suite de la chaîne de production (jusqu'au consommateur). En plus de la contamination acquise à la ferme, celle-ci peut se propager lors du transport (173) et tout particulièrement de l'attente des animaux à l'abattoir. Une fois à l'abattoir, une contamination des carcasses de porc par *Salmonella* peut aussi avoir lieu. En effet, lors de l'éviscération, une contamination de la carcasse pourrait avoir lieu, causée par un contact avec le contenu intestinal ou des nœuds lymphatiques, contenant *Salmonella* (174). Certains environnements d'abattoir peuvent être hautement contaminés, comme les couteaux et l'appareillage, augmentant le risque de contamination des carcasses appartenant à des animaux négatifs à *Salmonella* au départ.

Le pourcentage d'échantillon positif à *Salmonella* est hautement variable d'un abattoir à l'autre. Une étude réalisée dans deux abattoirs différents en Belgique a rapporté 33 % et 75 % d'échantillon d'environnement positifs dans ces deux sites (174). Une autre étude réalisée dans deux autres abattoirs aux Pays-Bas a rapporté des environnements positifs semblables entre eux, soit de 19 % et de 26 % (173). Au niveau de la contamination des carcasses à la fin de la ligne de production, une grande variation est aussi rapportée. Cette dernière étude, lors de la vérification des carcasses positives, a rapporté une prévalence de 1,4 %. Dans une autre étude, la prévalence moyenne de *Salmonella* sur les carcasses était de 27 % (175). La prévalence peut même atteindre des niveaux plus élevés, soit autour de 37 % (174).

8.4 *Salmonella* et le microbiote

Il a été rapporté que *Salmonella* est un pathogène alimentaire présent dans le tube digestif des porcs, présentant ou non des symptômes cliniques. Cependant, quelles sont les différences de composition de microbiote entre un animal porteur du pathogène et un animal sain? Il a été observé, lors d'infection expérimentale chez le porc, que le statut d'excrétion de *Salmonella* possède un impact sur la composition du microbiote (176). Lorsque les animaux excrètent de façon active *Salmonella*, la composition du microbiote diffère significativement de celle des animaux n'excrétant pas ou peu *Salmonella*. Toutefois, lorsque l'excrétion est terminée, leur microbiote se rapproche de ceux qui n'ont pas ou peu excrété *Salmonella*. Une réduction de plusieurs genres bactériens a été retrouvée, autant chez les animaux infectés expérimentalement que chez les animaux infectés naturellement. Parmi ces genres, il est possible de retrouver *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Anaerobacter*, *Roseburia*, *Fastidiosipila*, *Campylobacter* et *Succinivibrio*.

Dans une autre étude, il a été démontré qu'une souche virulente de *Salmonella* Typhimurium 1 jour post-infection causait une augmentation significative des *Lactobacillus*, mais cette augmentation n'était plus significative après 12 jours d'infections (177). De plus, l'impact d'une souche virulente porte sur une réduction des bactéries productrices de SCFA, favorisant ainsi l'intégration de cette souche virulente de *Salmonella* dans le microbiote contrairement à ce qui est observé pour une souche non virulente.

En plus de moduler la composition du microbiote intestinal, il est suggéré que *Salmonella* Typhimurium utilise d'autres méthodes pour augmenter sa compétitivité au niveau de l'intestin. Parmi ces méthodes, il a été observé que *Salmonella* tire profit du quorum-sensing (178). Une étude a rapporté une meilleure compétitivité d'une souche de *Salmonella* wild-type par rapport à une souche mutante ne pouvant pas faire du quorum-sensing. De plus, la souche mutante semble moins motile que la souche wild-type, suggérant une fois de plus l'importance du quorum-sensing dans l'intégration de *Salmonella* au sein du microbiote intestinal.

Dans une étude réalisée au Québec, des biomarqueurs ont été identifiés, selon la présence ou non de *Salmonella* dans le microbiote (27). Trois biomarqueurs (*Alloprevotella*, *Prevotella* et *Clostridium* cluster IV) ont été identifiés lorsque *Salmonella* était absente dans le microbiote des porcs. Ces trois biomarqueurs sont connus pour la production de SCFA, particulièrement le butyrate. Le butyrate est reconnu dans la littérature pour réduire l'invasivité de *Salmonella* (179). Dans le cas d'une présence de *Salmonella*, une dizaine de biomarqueurs ont été identifiés, dont *Bacteroides* et *Blautia*. Ces deux marqueurs sont connus, pour leur part, comme étant producteurs d'acétate, activateur de gènes de virulence chez *Salmonella* (180).

Hypothèse et objectifs

L'importance du microbiote intestinal dans le contrôle des pathogènes alimentaires comme *Salmonella* a été expliquée dans cette revue de la littérature. Il a aussi été rapporté qu'il est possible de moduler le microbiote, soit pour favoriser certaines populations bactériennes ou pour en inhiber d'autres, par l'utilisation d'additifs alimentaires comme les prébiotiques, les probiotiques ou par l'utilisation d'huiles essentielles. Cette modulation doit être réalisée *in vivo*. Mais les développements peuvent avantageusement être obtenus *in vitro* à l'aide de système de fermentation représentant une section de l'intestin du porc. L'utilisation de systèmes *in vitro* présente beaucoup d'avantages sur le plan éthique et économique. Toutefois, les systèmes présentement décrits dans la littérature sont généralement utilisés sur de longues durées et utilisent un milieu de culture synthétique composé de nombreux ingrédients ajoutés individuellement. Le travail présenté dans ce mémoire tend donc à répondre à cette problématique.

À la vue de cette revue de la littérature, deux hypothèses ont été émises pour ce mémoire de maîtrise. Tout d'abord, il est possible de stabiliser une communauté microbienne similaire au microbiote intestinal porcin dans un système de fermentation en alimentation continue sur une courte durée en utilisant comme milieu de culture le résultat d'une digestion *in vitro* d'un aliment pour animal conventionnel. Ensuite, il est aussi possible d'obtenir une modulation de ce microbiote à l'aide d'huiles essentielles.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est de mettre en place un système de fermentation en alimentation continue permettant la production d'un microbiote issu d'un intestin porcin. Pour y parvenir, plusieurs objectifs secondaires ont été proposés. Le premier objectif de mon projet de recherche est de produire un milieu de culture simulant le contenu intestinal porcin par la digestion *in vitro* de moulée destinée aux porcelets. Le second objectif est de produire et de maintenir, sur trois jours, une communauté microbienne similaire au microbiote intestinal porcin. Le troisième objectif est d'observer et valider l'effet de l'ajout de deux huiles essentielles, à deux concentrations différentes, sur ce microbiote. Finalement, le dernier objectif de mon projet est d'évaluer l'implantation d'un pathogène alimentaire, *Salmonella*, dans le système de fermentation.

Article Scientifique

A short-term bioreactor model to assess the effect of Thymol and Carvacrol on a piglet intestinal derived microbiota

Mathieu Bellerose^{1,2}, Philippe Fravalo^{1,2,4}, Isabelle Mainville³, Yves Arcand³, and Alexandre Thibodeau*^{1,2}

1 Research Chair in Meat Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

2 Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

3 Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe Research and Development Center, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

4 Pôle Agro-alimentaire, Conservatoire national des arts et métiers, Le Cnam, Ploufragan, France

*Corresponding author

E-mail : alexandre.thibodeau@umontreal.ca

Abstract

Modulation of the microbiota of pig appears as an avenue to mitigate *Salmonella* asymptomatic carriage, and essential oils are candidate to drive such a favorable modulation. *In-vitro* bioreactor systems are used to reproduce intestinal microbiota. Some of these systems are used over long periods, from weeks to months. In this study, we developed a continuous feeding system able to produce a microbiota derived from the pig intestinal microbiota over 48h and characterize the effect of essential oils on this microbiota, over 24 h trials. This system enables the growth of a microbiota from piglet colonic content, then the division of this microbiota over 8 reactors, reducing variability between reactors. After an initial growth of the microbiota, two essential oils, Thymol and Carvacrol, were added or not to the reactors, at 200 ppm or 1000 ppm. Sample from the bioreactor were collected, and microbiota composition and essential oils effect were assessed by 16S rRNA metagenomics using Illumina MiSeq platform. Moreover, essential oil effect was also assessed using quantitative PCR, for the total bacteria, the *Lactobacilli* and the *Enterobacteria*. Alpha and beta diversity shown a variation in microbiota composition between the start of the experiment and 48h. Variation was however non-significant between 48h and 72h, providing a window for additives testing. No effect on alpha and beta diversity was observed after the addition of the essential oils. Conversely, quantitative PCR results shown a significant growth of *Lactobacilli* at the end of the trial (24h post inoculation) as compared to the moment that thymol was added, but only at 1000 ppm. Moreover, *Lactobacilli* levels were higher while using thymol at 1000 ppm compared to the negative control. This study validated the bioreactor model as a tool for the screening of feed additive over a short period of time and suggest that essential oil effects are subtle on the microbiota, showing a specificity of action against few bacterial populations.

Introduction

The intestinal microbiota of the pig is a complex community living in homeostasis with its host (22). This microbiota is essential to the host, as it performs important functions, such as the modulation of intestinal tissue proliferation and differentiation, education and stimulation of the host immune system, energy metabolism, vitamins catabolism as well as protection against pathogen colonization (181-183). The community composition and structure of pig gut bacteria is largely determined by factors such as diet, age, genetics, environmental conditions, microbial infection and antimicrobial exposure (184). In monogastric mammals (like Human or pigs) when the equilibrium, in composition and structure, of the intestinal microbiota is disrupted, a phenomenon called dysbiosis occurs (185). To restore the balance, the microbiota can be modulated, for example by introducing antibiotic treatments (when pathogens are present), in-feed probiotic and prebiotic or by drastic clinical interventions such as fecal microbiota transplantation (186, 187).

In many mammals, and specifically in pigs, strong diet transitions (e.g. weaning, or feed program transitions) are critical parts of the animal development that are deleterious on the microbiota composition, causing a dysbiosis (188). During this phase, a reduction of *Lactobacillus* and an increase of *Proteobacteriaceae*, such as *Escherichia coli*, was reported (189). Some experimental studies conducted in pigs described the benefits of different feed additives on the microbiota composition and diversity of piglet during the post-weaning period. Indeed, the addition of an essential oil mixture of thymol and cinnamaldehyde was shown to reduce the intestinal *E. coli* number by one log of magnitude, leading to an increase of the lactobacilli to *E. coli* ratio, considered as a favorable marker for the pig's intestinal health (190). Other *in vivo* studies have found that the addition of cello-oligosaccharide in the feed as prebiotic led to an increase in *Lactobacillus* but had no effect on the *E. coli* population. However, the addition of Mannan-oligosaccharides in the feed as prebiotic had no impact on the *Lactobacillus* but decreased the *Enterobacteriaceae* (191, 192). In another study, *Enterococcus faecalis* was used as a probiotic to restore the dysbiosis associated with the weaning period (193).

In the swine industry, foodborne pathogens are frequent inhabitants of the intestinal microbiota with some of them, such as *Salmonella*, also sometimes acting as an intestinal pathogen for the pig causing diarrhea (194). *Salmonella* is considered as one of the major food-borne pathogens

worldwide, commonly found in healthy pigs intestinal tracts, and can contaminate pork product later in the production chain (169). It was previously shown that *Salmonella* carriage was associated with a shift in intestinal microbiota, opening the door to a prevention based on modulation of the intestinal microbiota, using in-feed essential oils (195). So, the pig intestinal microbiota plays a crucial role for both the pig's and indirectly for public health, it therefore appears as a prime target for intervention, leading to an increasing need for more research on the intestinal microbiota and its manipulation. Such experimentations can be realized both *in vivo* and *in-vitro*, each with their advantages and disadvantages.

The *in vivo* models, for instance, must be conducted in controlled conditions in an animal facility, or designed for field studies. They allow for the measurement not only of the microbiota itself, but also consider the crucial and numerous host responses (196). However, using animal models come with a high cost and is time consuming. Moreover, since the microbiota seems to be modulated by multiple factors in animal models, perfectly controlling only one of few environmental variables at the time can become a tedious task especially in field conditions, giving rise to multiple co-founding factors also affecting the intestinal microbiota. Conversely, in the *in-vitro* approaches, culture condition can be meticulously controlled, therefore a single variable can be easily investigated on individual bacterial genus over a precise period, provided the targeted bacteria can be cultured. However, reproducing complex interactions between the numerous microbiota members for longer time requires a methodological approach more complex than standard culture. Co-culture conditions needs to be adequate for growth of all bacterial candidate, culture media needs to be replenished periodically for longer time periods and sometime the study context calls for specific yet stable environmental conditions to relate to a given environment like the gut, such as atmospheric or pH conditions (108). To minimize these limitations, bioreactor systems can be employed for *in vitro* studies.

Bioreactor systems used for microbiota studies vary in complexity. The simplest model of bioreactor is the batch system. In this system, a specific working volume is set, and no additional nutrient are added throughout the experiment (104, 197). So, these systems are designed for short-term experiments. A more complex system is called chemostats. This system involves the addition and removal of culture media, keeping nutrients availability and bacterial waste stable for weeks (110, 198). Based on this system, other components can be added to reproduce or simulate specific

aspect of the host microbiota. For example, multiples reactors can be linked to make a multi-stage system, where the culture media overflow from a first reactor can be added to a second reactor and so on (111, 199).

Bioreactors were also used for studies on the animal microbiota using the pig as a model. For example, a continuous bioreactor system setup by Tanner *et al.*, was used to stabilize a pig microbiota and that could be distributed in five parallel reactors (111). This system was used to reproduce a microbiota similar in each of the five reactors, enabling the possible testing of multiples additive simultaneously.

Most systems described above have limitations that prevent them to be use for the rapid screening of microbiota modulation methods. Indeed, most systems require a long stabilization period, consisting of over a week to months, reducing the number of effective experiments that can be done with the system as well as increasing the changes of possible system crash due to a malfunction of the bioreactor (111, 200). Also, some of these systems rely only on one reactor, thus limiting the number of conditions tested simultaneously (116, 200). Finally, most systems are using multi-ingredient lab-made culture media for the bioreactors that could induce some unwanted change in the microbiota composition compared to *in vivo* conditions (111, 200).

Therefore, the aim of the present study was to setup a bioreactor system that can maintain a microbiota derived from the piglet intestine for a sufficient yet short time and to assess if the resulting microbiota can be modified using essential oils, as a proof of concept in the perspective of use against *Salmonella* carriage in pigs. This system was designed for short experiment, over the period of 72h, enabling the eventual high-speed screening of some microbiota modulation options. To reach this, qPCRs for some key indicator microorganisms and high throughput sequencing of the genes coding for the 16S rRNA of the bioreactor's microbiota at key time points were used.

Materials and Methods

Bioreactor system

The bioreactor system was composed of eight custom-made jacketed glass reactors (Soham Scientific, Fordham, UK). The mother reactor had a maximum volume of 600 ml and was connected to seven 300 ml daughter reactors (Supplementary fig 3). These reactors were each placed on an individual magnetic stirrer (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and set at low speed to keep the microbiota from sedimenting. A water circulator (Polyscience, Niles, USA) was connected to the outer layer of the reactor, enabling the temperature to be maintained at 39°C.

Each bioreactor had a pH regulating system composed of a pH probe (Hach, London, Canada) connected to a custom-made control panel (Les Contrôles Luc Hébert inc, Saint-Hyacinthe Canada) that activated, when needed, a set of two pumps (Kamoer, Shanghai, China): one for the acid (HCl, 1M) and one for the base (NaOH, 2.5M). A software was used to set a pH profile for each reactor, which can vary in time if needed. Before every experiment, pH probes were carefully calibrated. Once each experiment was over, the software generated an hourly report of the pH and use of all solutions throughout the experiment.

Gaseous nitrogen was constantly injected in each reactor at 150 kPa to remove gaseous oxygen. A set of calibrated pumps (Cole-Parmer, Montreal, Canada) was used to constantly add fresh culture media to the reactors, at a rate of 16 ml/h. One pump was used for feeding the mother reactor and another pump with a multichannel head was used for the feeding of the daughter reactors.

Fresh culture media was prepared every 24h and kept refrigerated at 4°C on a plate stirrer (Fisher Scientific, Ottawa, Canada), to prevent the media from sedimenting. Another set of pumps (Cole-Parmer, Montreal, Canada) with multichannel head was used to remove the volume excess from the daughter reactors. This excess of media was collected in closed 5L glass bottles with four holes cap (Diba Industries, Danbury, USA) for the tubing, therefore allowing the safe recovery and decontamination of all effluents.

The cap of each reactor was composed of three GL-25 connectors and three 7mm connectors. The GL-25 connectors were for the following use: one for the pH sensor, one divided in four connections: introduction of the acid, the base, the direct introduction of the nitrogen in the culture

media and the release of the excess gas in the reactor into an Erlenmeyer containing water (gas trap to preserve anaerobic conditions) and a last unused one that was sealed off. For the three 7mm connectors, one was for feeding the reactor, one to remove the excess volume and the last one was used for sampling the microbiota.

Culture media preparation

Culture media used in this system came from an *in-vitro* digestion of swine feed. Standard swine feed was used in a modified version of the IViDiS system (201). It reproduces the digestive system of the pig, from the mouth to the ileum. Swine feed was first grinded and passed through in a 1 mm sieve. For the digestion, 1.5 kg of sieved feed was added gradually into the stomach reactor with 4.5 L of water (Eska, St-Mathieu-d'Harricana, Canada). A digestion program adapted from Tompkins and al (201) was used to represent the pig digestive system. The output of this *in-vitro* digestion was the equivalent of ileal content. It was collected in batch of 1 L in a Whirl-pak bag (Whirl-pak, Madison, USA) for a total of 11 samples. Digestate composition varied in the bags based on the digestion time, with more undigested feed at the beginning and less feed at the end. Therefore, the first and last three bags of each digestion were discarded. This media, called here digestate, was then kept at -20°C until needed for the bioreactor system.

Before being used in the bioreactor, different fractions representing the whole digestion process were thawed overnight at 4°C, were pooled and further diluted 1:1 with phosphate buffer saline (Oxoid, Nepean, ON, Canada) supplemented or not with 1% thioglycolate (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). , The culture media was mixed using a stomacher for 60 seconds, using a filter bag (Labplas, Sainte-Julie, Canada) to remove undigested feed and therefore preventing tubing from clogging.

Inoculum preparation

All animal manipulations were approved by the ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of Université de Montréal, certificate number 19-Rech-2047. Twelve piglets (3 weeks-old, post-weaning period) were kept for one week for acclimatation purposes at the Faculty of Veterinary Medicine of Université de Montréal, in Saint-Hyacinthe, Québec, under strict biosecurity conditions. Animals were offered water *ad-libitum* and a standard commercial antibiotic-free feed, the same used for the preparation of the bioreactor culture media. At the end

of the one-week period, no clinical signs of any disease were observed. Therefore, animals were euthanized, and necropsy was performed to collect colonic contents. Indeed, colonic sections were identified, and extremities were tied before cutting. They were sent to the lab on ice for further manipulations. At the lab, colonic contents were pooled. An equivalent volume of freezing media (Brucella broth (2.8%), Agar (0.12%), Glycerol (20%), Sucrose (5%), Ascorbic acid (0.4%), powdered milk (5%)) supplemented with 1% thioglycolate (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) was then added. Each pool was aliquoted in tubes of 10g and kept at -80°C for the subsequent inoculation of the bioreactor. An aliquot of 500 mg was collected, flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for sequencing purposes. Overall, the necropsy and the lab work took approximately 6h.

Bioreactor experiments

To start the system, 10 ml of digestate was inoculated with 10g of pooled piglet colonic matter, in the mother reactor while N₂ was injected in the system. The mother reactor was then filled with digestate containing 0.1% of thioglycolate, for 6h, at a rate of 80 ml/h for a total volume of 490 ml, at 39°C. During that time, pH was monitored and maintained at 6.5, representing pig colonic pH (11). When completed, 70 ml of the mother reactor content was added to each of the daughter reactors. Volume transfers were done by pulling 2 times 35 ml with a 60ml syringe (Terumo, Vaughan, Canada). Daughter reactors were then activated for 18h with constant feeding and removing of culture media at a rate of 16 ml/h. After this period, the culture media was changed to digestate without thioglycolate for an additional 48 hours and added/removed with a continuous flow of 16 ml/h. To monitor the reactors, samples (5 ml) were taken with a syringe in 15 ml conical tubes (Sarstedt, Newton, USA) just before the filling procedure was started (T0), before dividing the mother reactor, 6h since the start (T6), then 24h (T24), 48h (T48), 51h (T51), 54h (T54), 60h (T60) and finally 72h after the beginning of the experiments (T72). For the essential oil experiments, the same sampling times points were used. The essential oils were added or not right after the T48 sampling. For the essential oil assay, the oils were added directly in the culture media when needed. Thymol (Jefo, Saint-Hyacinthe, Canada) or Carvacrol (Beauchamp international, Brossard, Canada) were tested at a final concentration of 200ppm and 1 000ppm. Each bioreactor sample was centrifuged immediately at 5 000 rpm (Sorvall Legend XTR, Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) for 15 minutes, the supernatant discarded, and the pellet was frozen at -20°C until

DNA extraction. Experiment was made three times using these conditions, to obtain independent replicates.

DNA extraction and qPCR

From each sample, DNA was extracted, for sequencing and qPCR, using the DNeasy PowerLyzer PowerSoil kit (QIAGEN Inc., Toronto, Canada) following the manufacturer recommendation. DNA was quantified using a QFX Fluorometer (DeNovix Inc., Wilmington, USA) with the QUBIT BR Assay kit (Invitrogen™, Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) and normalized at 5 ng/μl with PCR-grade water. DNA was used for qPCR, in a Roche LC96 Real Time PCR (Roche diagnostics, Mannheim, Germany), for estimating the 16S copies numbers with the primers used for high-throughput sequencing, as well as enterobacteria and Lactobacilli levels, using primers detailed in Table 1. The 16S rRNA gene V4 hypervariable region encoding sequences in the genomic DNA for each sample was amplified by PCR using universal primers detailed in Table 1. The PCR reaction, with a volume of 20 μl, was composed of Evagreen (MBI Evolution, Montreal, Canada) 1X, 0.3 μM of each primer and 50 ng of DNA. Reaction was conducted for 5 minutes at 95°C followed by 35 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 55°C, 180 seconds at 72°C and finished with a high-resolution melting curve. The Lactobacilli qPCR was performed in a volume of 25 μl composed of Evagreen (MBI Evolution, Montreal, Canada) 1X, 0.5 μM of each primer and 10 ng of DNA. Reaction was conducted for 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by 35 cycles of 15 seconds at 95°C, 60 seconds at 60°C and finished with a high-resolution melting curve. For the Enterobacteria reaction, the qPCR reaction volume was set at 20 μl and was composed of Evagreen (MBI Evolution, Montreal, Canada) 1X, 0.4 μM of each primer and 50 ng of DNA. Reaction was conducted for 15 minutes at 95°C, followed by 35 cycles of 20 seconds at 95°C, 60 seconds at 60°C and finished with a high-resolution melting curve. Standard curve used for the lactobacilli was made from amplicon using the *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 and the standard curve for the enterobacteria was made from amplicon produced using *Escherichia coli* ATCC 25922. These amplicons were then quantified, number of DNA copies was calculated using the calculator from URI Genomics & Sequencing Center (202), and diluted to obtain standards containing 10⁸ to 10² copies per μl. Negative control (PCR grade water instead of DNA) was performed for quality assessment purposes. Total gene copy numbers were thereafter reported as copy number per ng of extracted DNA.

Target	Sequence 5'-3'	Reference
16S copies	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	(184)
	GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT	
Lactobacilli	GCA GCA GTA GGG AAT CTT CCA	(203)
	GCA TTY CAC CGC TAC ACA TG	
Enterobacteria	ATG GCT GTC GTC ACG TCG T	(203)
	CCT ACT TCT TTT GCA ACC CAC TC	

Table 1 : Primer list for qPCR analysis

16S rRNA Gene Sequencing

The V4 region of the genes coding for the 16S rRNA were first amplified in a Mastercycler ®Nexus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with a total of 12.5 ng of genomic DNA from each sample and Platinum Superfi DNA Polymerase (Invitrogen, Burlington, On, Ca). PCR conditions were as follow: 5 minutes denaturation at 98°C, followed by 23 cycles of 98°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 3 minutes with a final elongation at 72°C for 10 minutes. Amplicon quality was verified on an agarose gel containing SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Burlington, On, Ca) and was sent for Illumina MiSeq (250PE) sequencing at Genome Québec. A positive control, ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and a negative PCR control (use of PCR grade water instead of DNA) were used for quality assessment purpose.

Sequence Analysis and Diversity Determination

Raw sequencing reads were demultiplexed, quality-filtered and analyzed using Mothur software (87) 1.43.0, according to Mothur MiSeq SOP, with the following modifications: the method for pre-cluster was Deblur, and the method for cluster was Unique (102), therefore ASV (Amplicon sequence variants) and not OTU were used. Mothur SOP was last accessed on April 27, 2021. Taxonomic assignation of the ASV was done using the Silva 132 Mothur-formatted database. Resulting files were further analysed in RStudio 1.3.1073 using R version 4.0.3. The shared and taxonomy file produced by Mothur were first imported into R. After inspection of raw data, controls were removed, and remaining samples were rarefied to the lowest number of sequences within a sample prior to alpha and beta diversity analysis. Observed, Shannon and Inverted

Simpson indexes were used for the alpha diversity analysis. A Kruskal-Wallis statistical test was used to assess significant differences between relevant conditions for the three indexes. The microbiota structure was assessed using both Jaccard and Bray-Curtis dissimilarity indexes and results were visualized with a non-metric multidimensional scaling (NMDS) graph, followed by statistical confirmation using ADONIS (Vegan package) (204) and Pair-Wise ADONIS (pairwiseAdonis) (205) to test differences between groups. Venn diagrams were generated to report either phylum, family, genus or ASV present only in specific conditions. Prior to the Venn diagrams, sequences present only once across all sample were removed. A Multivariate Analysis by Linear Models (MaAsLin2) (103) was performed to identify specific biomarkers associated with tested conditions.

Results

Sequencing quality control

The microbiota total richness, maintained *in-vitro* in the system, was first analysed using the 16S qPCR. No differences were observed as the 16S copy numbers remained the same for all samples. For all 109 samples and controls, the total number of sequences, including controls, was 14 447 474 at the beginning of the bioinformatic process. After the cleanup steps of Mothur, the total number of sequences was 6 954 810. Highest sequence number in a sample was 77 600 sequences, mean number of sequences per sample was 54 812 and the lowest number of sequences in a sample was 35 434 sequences. Two negative PCR control were made, containing 149 and 1 249 sequences. Two mock community positive controls were sequenced, and they contained respectively 47 094 and 38 455 sequences. When looking at the sequencing error based on the ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Zymo Research, Irvine, CA, USA), sequencing error was 0.017%. The mock community relative composition obtained were similar to the manufacturer's description.

Microbiota evolution in time

The first step was to assess the microbiota diversity throughout the experiments, from T0 to T72, by looking at the evolution of the alpha and beta diversities. Graphical representations of alpha-diversity indexes for all samples are shown in fig 1. A Kruskal-Wallis test was conducted on the

three indexes and statistical difference were observed, according to the sampling time, for Observed ($p=0.004$), Shannon ($p=1.09e-8$) and Inverted Simpson ($p=2.92e-7$), where T0 samples presented higher diversity values than all other samples.

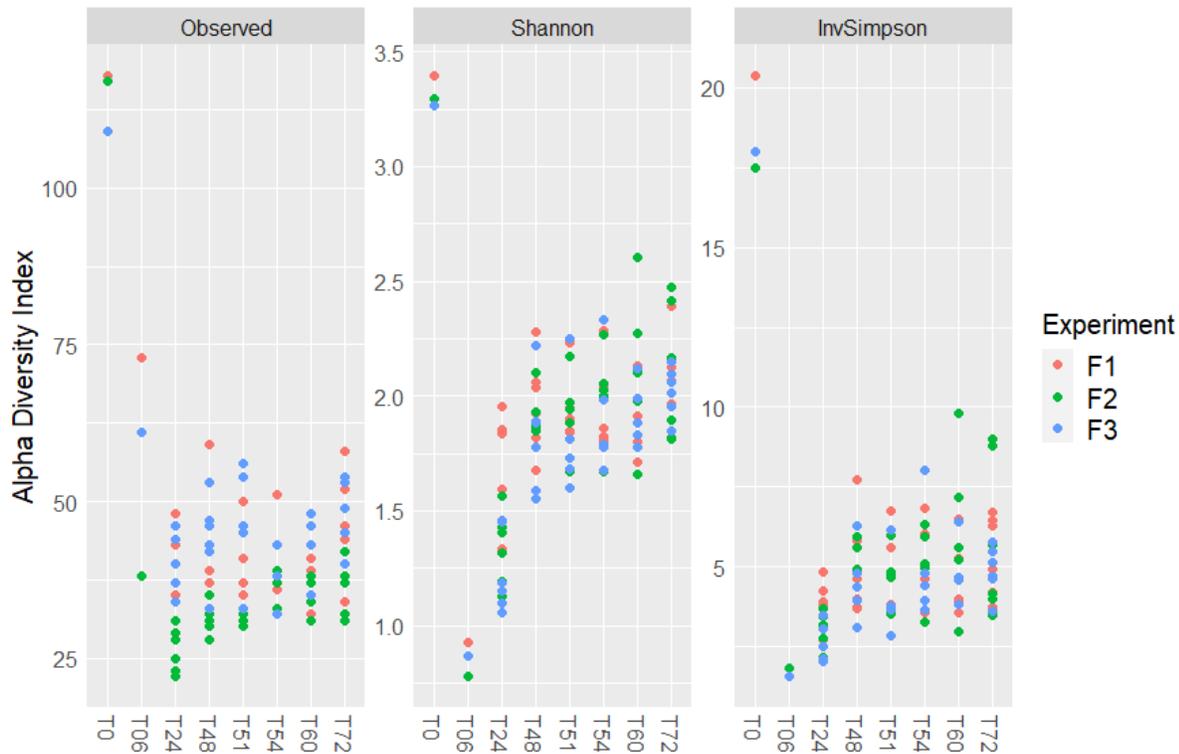


Fig 1: Alpha Diversity of the microbiota according to the time of sampling and the replicate.

Graphs represents, respectively, the Observed index, the Shannon index, and the Inverse Simpson index. A significant difference based on time was found for all indexes using the Kruskal-Wallis test ($p=0.004$, $p=1.09e-8$, $p=2.92e-7$). The 3 independent replicates (F1, F2 and F3) are also shown on the graph.

A focus was made to identify phylum, families, and genus present only at the beginning (T0) or at the end of the experiment (T72). Supplementary tables 1, 2 and 3 show unique families, their phyla assignation, their total sequences number at either T0 or T72 and their relative abundances. At the family level, 31 families were unique at T0, and 18 were unique at T72. Sequences from the unique families found at T0 represent 6.1% of all the sequences in the T0 group. The unique families found at T72 represented about 0.013% of all sequences recovered at T72.

For the beta diversity, the microbiota structure was observed using a non-metric multidimensional scaling (NMDS) (fig 2) graphic with the time of sampling as variable. Using the Bray-Curtis and Jaccard index, differences were observed between sampling times ($p=0.0009$). Graphically, samples on the plot clustered according to the sampling time, with samples from T48 to T72 occupying the same region on the graph compared to T0, T06 and T24. Pairwise Adonis was conducted to identify significant differences between times. T0 was significantly different from T24, T48 and T72 ($p<0.01$), but not significantly different from the T06. T06 samples were significantly different from that of T24, T48 and T72 samples ($p<0.01$). No significant difference was observed between samples T48 and T72.

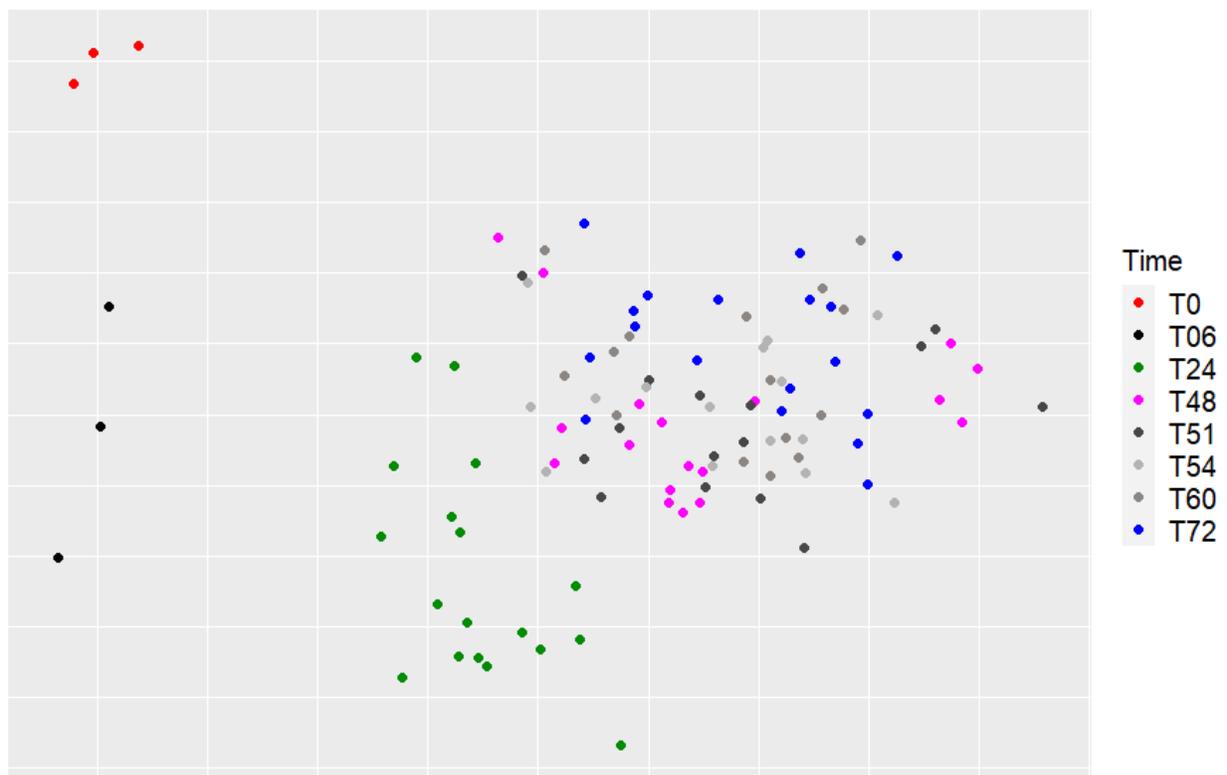


Fig 2: NMDS representation of the beta diversity, using the Bray-Curtis index, of the bioreactor samples according to the sampling time. A significant difference was found between different times, using the Adonis statistical test ($p=0.0009$). Pairwise Adonis shown a significant difference between T0 and each of the T24, T48 and T72 ($p<0.01$). No statistical difference was shown between T48 and T72.

Relative abundance of the microbiota populations at phylum and family levels, at T0, T48 and T72 are shown in a stack bar graph in Supplementary Fig 1 and 2. At the phylum level, a clear shift in composition was observed between T0 and T48, and another shift was observed between T48 and T72. At the family level, similar differences could be observed.

Multivariate Analysis by Linear Models (MaAsLin2) was then used to identify bacterial phyla, families and genera associated with a specific time (using T0 as a reference, N=3). All MaAsLin2 results are shown in supplementary tables 4 and 5. At the phyla level, eight phyla were less represented at all times compared to T0: Lentisphaerae, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Synergistetes, Spirochaetes, Euryarchaeota, Firmicutes and Bacteria_unclassified, which represent all unclassified sequences. At the family level, 38 families were less represented at all times compared to T0, including Ruminococcaceae, Porphyromonadaceae and Peptostreptococcaceae. Only 12 associations were found at T72, including *Coriobacteriaceae*, *Leuconostocaceae*, *Veillonellaceae*, *Bifidobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*.

Microbiota reproducibility between experiments

The second step was to assess the reproducibility of the experiments, by looking at the alpha (fig 1) and beta diversity of the samples using the replicate (F1, F2 or F3) as a variable. For the alpha diversity, only the observed index was statistically significant ($p=8.9e-9$) when comparing all samples based on the replicate. For the beta diversity, samples were plotted on a NMDS (fig 3), using the replicate as a variable. At first glance, samples from different experiments seem to regroup according to the experiment. This was confirmed with ADONIS statistical test using the Bray-Curtis index and the Jaccard index ($p=0.0009$). Pairwise ADONIS was conducted to find statistical differences between different pairs of experiments. All pairs were significantly different ($p<0.001$). When time was added as a variable in the ADONIS test, time, replicate, and the interaction between the 2 variables were found to affect the microbiota structure.

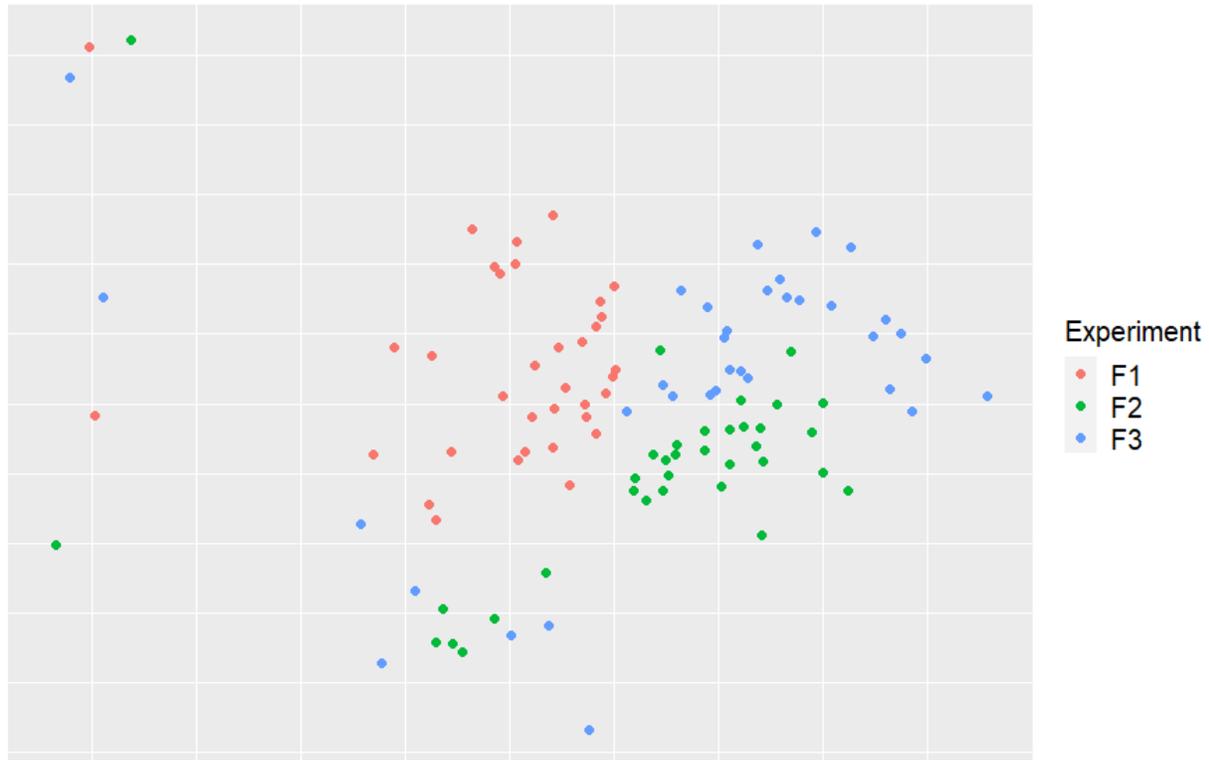


Fig 3: NMDS representation of the beta diversity, using the Bray-Curtis index, based on the experimental replicate. A significant difference was found between different replicate, using the ADONIS statistical test ($p=0.0009$). Pairwise ADONIS showed a significant difference between all pairing of experiment ($p<0.001$). The 3 independent replicates (F1, F2 and F3) are shown on the graph.

Similarities between the bioreactor samples, piglet feces and the inoculum.

The third step was to compare the microbiota obtained within the system with the colonic content used for the bioreactor inoculation (MF) as well as rectal swabs samples originating from piglets of another study (healthy negative control animals, 28 days-old, raised in a level 2 animal facility) (184). When comparing the microbiota structure, using the origin of the sample as a variable (MF, piglet, and bioreactor samples), a statistical difference was observed ($p=0.0009$). Piglet samples were significantly different from the bioreactor samples at T24 and T72 ($p=0.01$) but not from the

T0 samples. The same was observed for the inoculum (MF). On the NMDS graph (Fig 4), samples from piglets, MF and T0 (start of the bioreactor experiments) were grouped, while the other groups corresponded to what was already observed. For the alpha diversity, a significant difference was found between bioreactor samples, piglet, and MF samples, for all sampling time, for all three indexes ($p=3.52e-5$, $p=2.11e-10$, $p=3.89e-9$), except for T0 samples that were similar to MF and the piglets' rectal swabs.

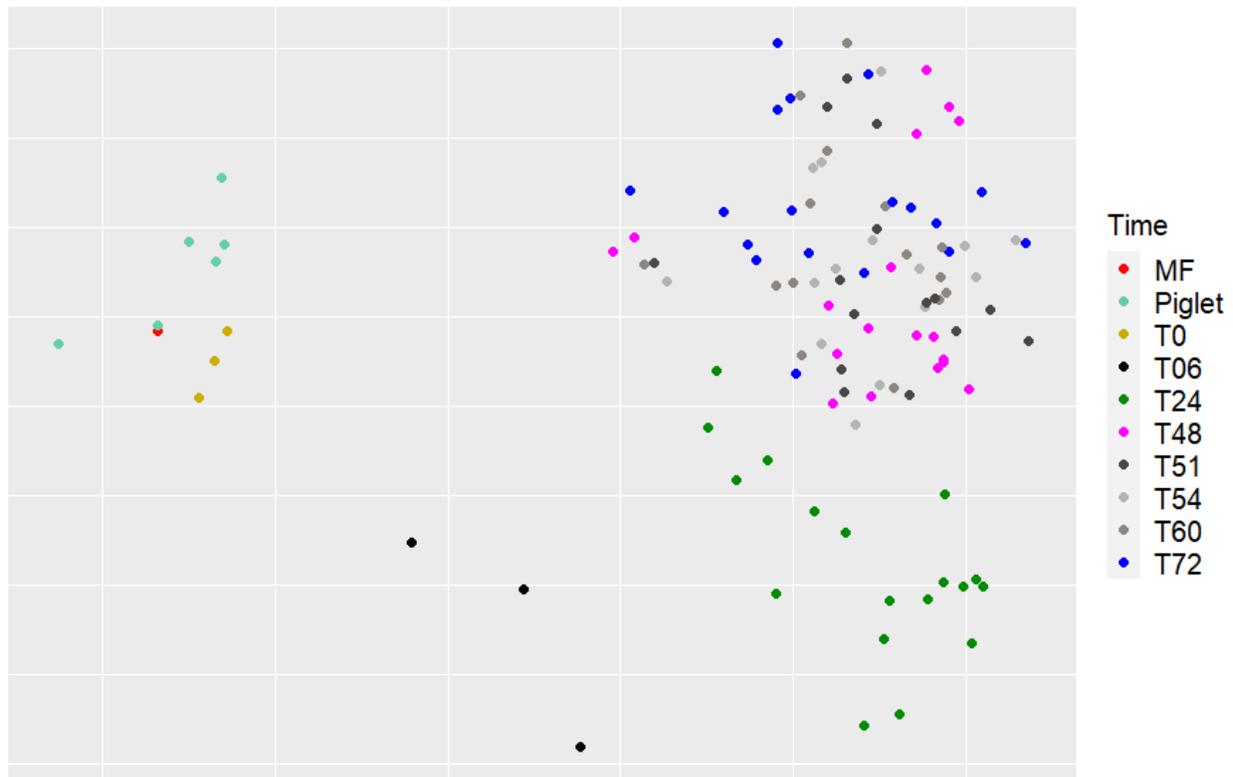


Fig 4: NMDS representation of the bioreactor samples compared to the inoculum and piglet samples, using the Bray-Curtis index, based on the time as a factor. A significant difference was found between different times, using the ADONIS statistical test ($p=0.0009$). Pairwise ADONIS shown a significant difference between T0 and each of the T24, T48 and T72 ($p<0.01$). Pairwise ADONIS also shown a significant difference between piglet samples and T48, and piglet samples and T72 ($p=0.01$). No statistical difference was observed for samples between T48 and T72, and between piglet samples and MF and T0 samples.

Venn diagrams were made to represent unique phylum, family, and genus present either in the MF sample, the piglet samples, the T0 or T72 bioreactor samples. The Venn diagram are shown in fig 5. At the phylum level, 5 phyla were common between all groups and 8 phyla were found in all groups except the T72. One phylum was unique to T72, and one phylum was unique in the piglet samples. No unique phyla were found in the T0 or MF samples. At the family level, two families were found only at T72, 23 families were found only in the piglet samples and one family was only found at T0. No unique family was found for the MF sample. For the families that were shared, 18 families were common between MF, piglet and T0, and 26 families were common between all samples. At the genus level, seven genera were only found in the T72 samples, 55 genera were only found in the piglet samples, and five genera were only found at T0. Fifty genera were common between MF, piglet and T0, and 45 genera were common between all samples.

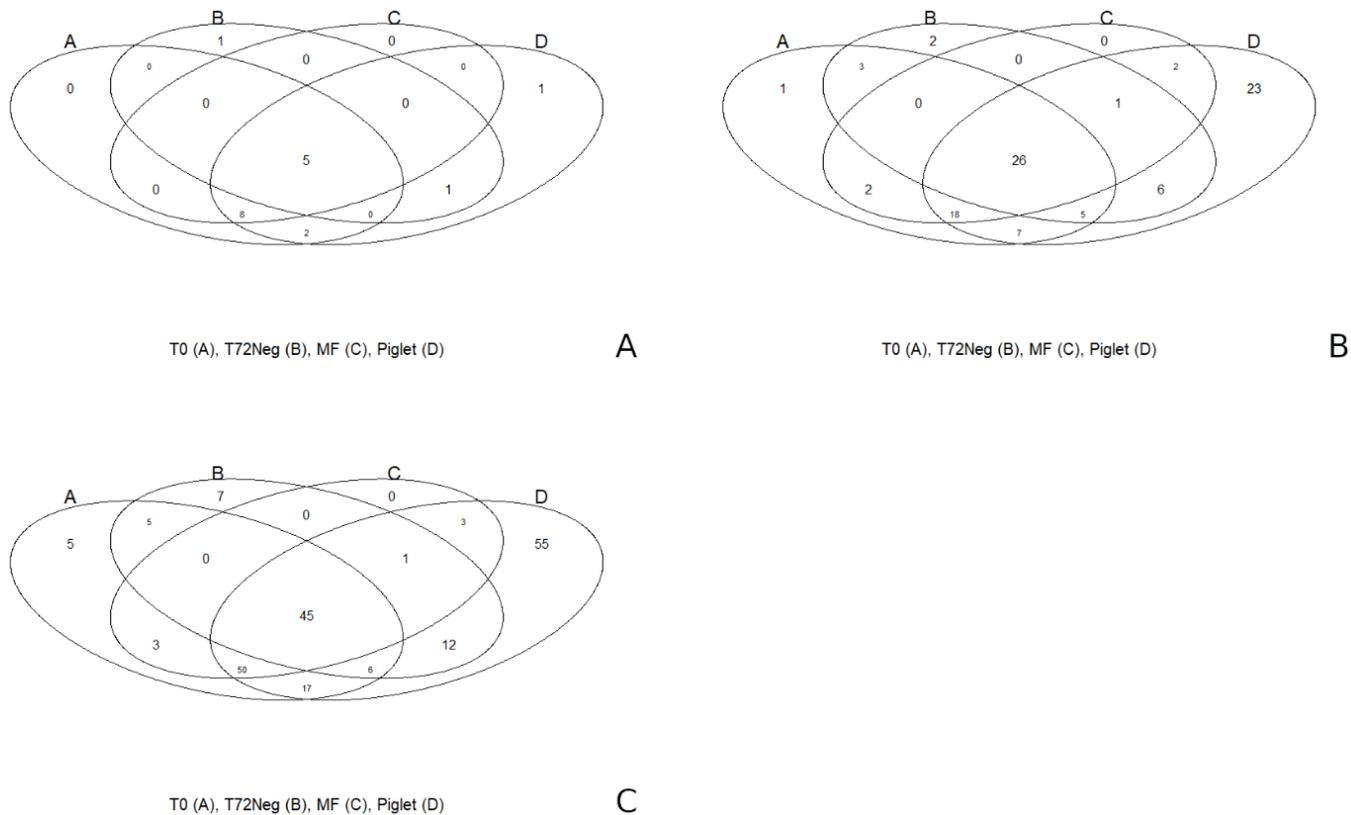


Fig 5: Venn diagram indicating shared and unique phyla (A), families (B) or genera (C), between sample form the bioreactor at T0, sample form the bioreactor at T72, MF sample and piglet sample.

Effect of essential oils

The next objective was to assess if the bioreactor microbiota could be modified using two essential oils, Thymol and Carvacrol, at 200 ppm or 1000 ppm, respectively. Both oils, regardless of the concentration used, had no effect on the 16S copy numbers and the Enterobacteria levels as assessed by using qPCR. However, using qPCR, lactobacilli levels increased in presence of Thymol but only at 1000 ppm, between the moment the oil was added (T48) and the end of the experiment (T72) ($p=0.001$), and at T72 when comparing the experiment with oil to the control condition (without oil) as shown in fig 6.

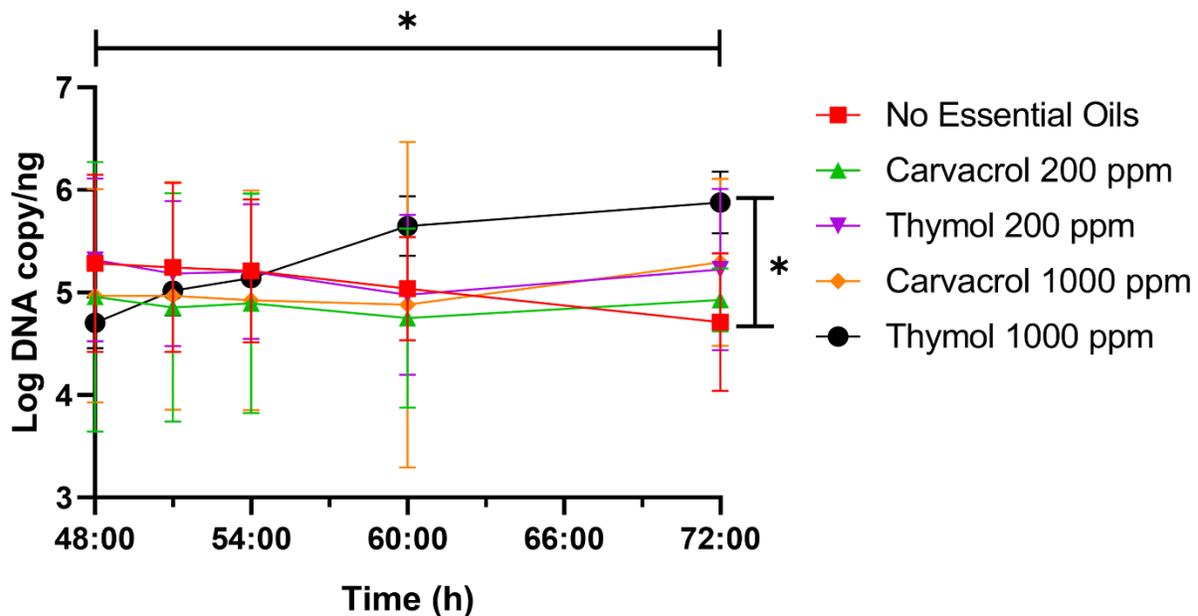


Fig 6: Graphical representation of the evolution of the log DNA copies of lactobacilli per ng of genomic DNA. N=3, bar represent standard deviation. Lactobacilli levels were measured by qPCR. Graphical representation was generated using GraphPad. Student T-test showed a significant increase, in the Thymol 1000 sample, between 48h and 72h of running time ($p=0.001$). Another significant increase was found for the Thymol 1000 sample, compared to the reactor without oil at T72 ($p=0.001$).

This specific change was not observed at the alpha diversity level (Fig 7). Using the Kruskal-Wallis test, no significant differences were measured at any time for any conditions. Graphical NMDS representation of the beta diversity is shown in fig 8. ADONIS statistical analysis did not reveal any significant difference using the treatments as variable, using both Bray-Curtis and Jaccard indexes.

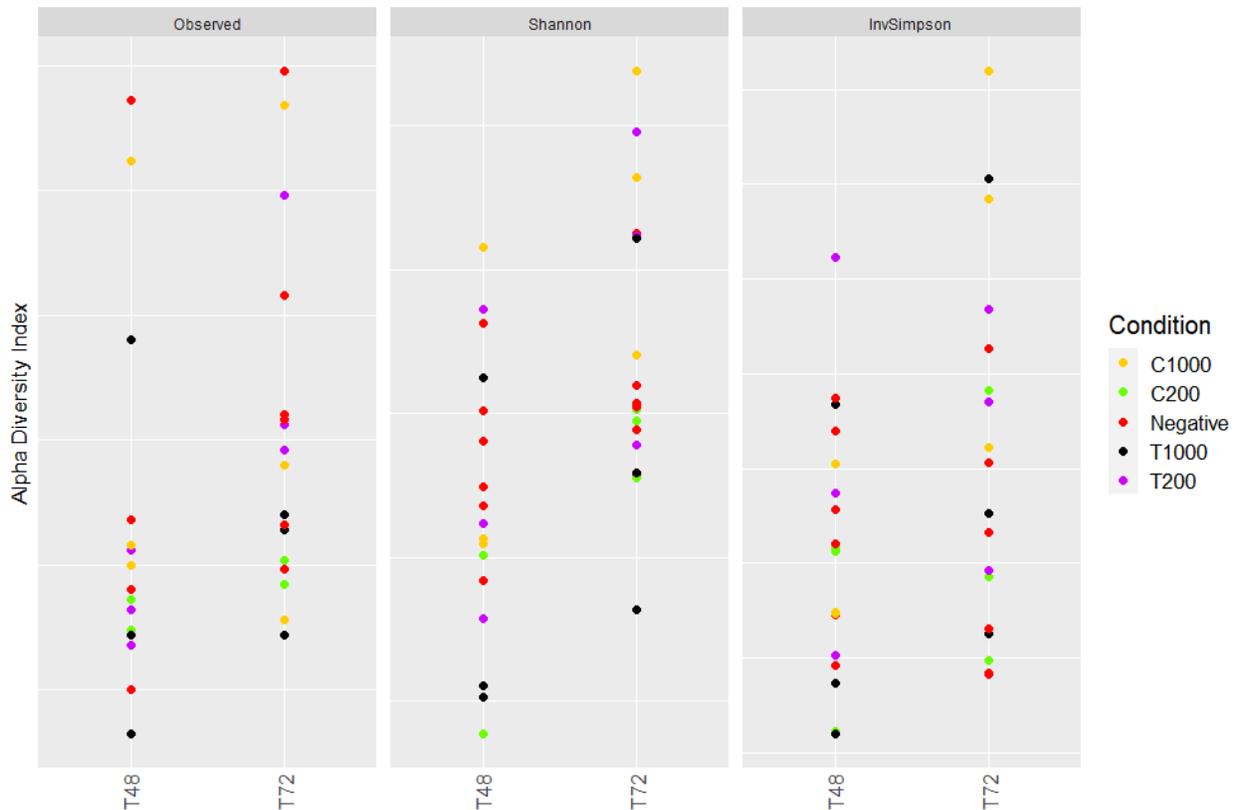


Fig 7: Alpha diversity of the bioreactor samples, between T48 and T72, with the condition as a factor. Graphs represents, respectively, the Observed index, the Shannon index, and the Inverse Simpson index. C=carvacrol; T=thymol; negative=control condition without oil addition; 1000 or 200 expressed the final oil concentration in ppm. No significant difference was found between conditions using the Kruskal-Wallis test.

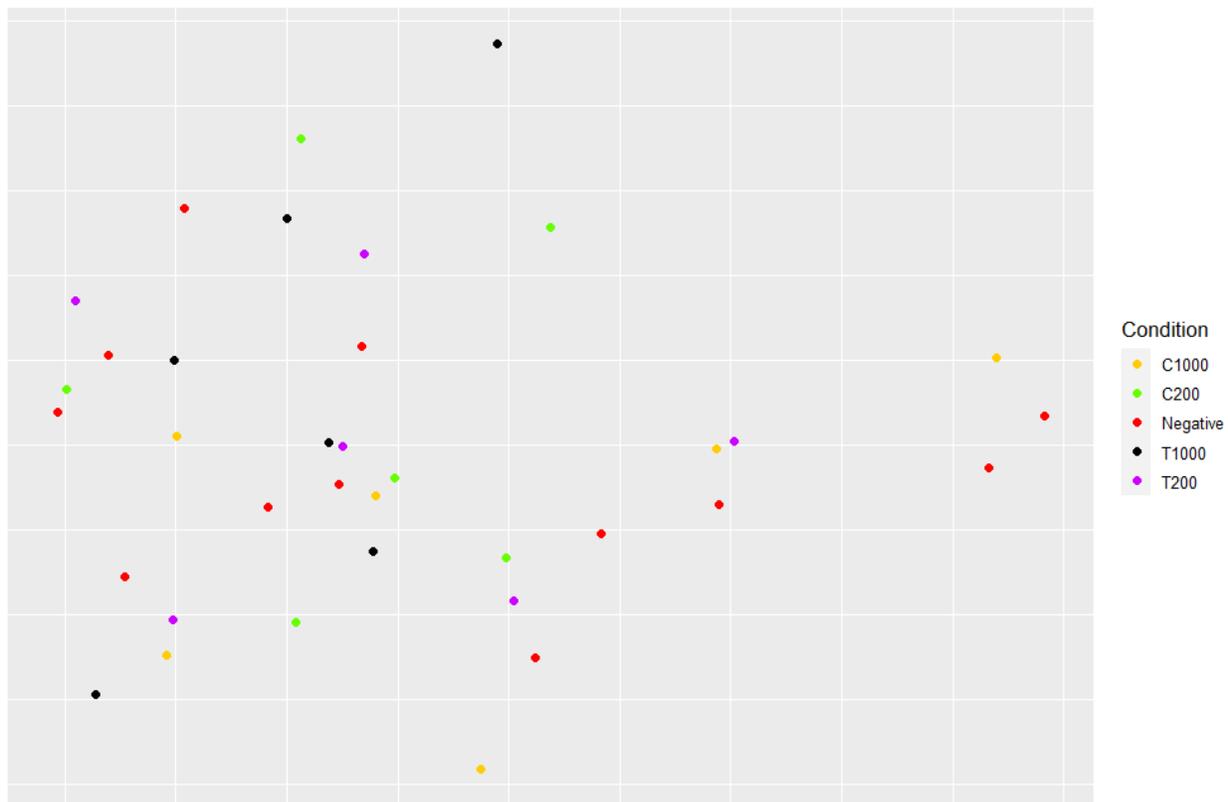


Fig 8: NMDS representation of the bioreactor samples, using the Bray-Curtis index, of T48 and T72, based on the condition factor. C=carvacrol; T=thymol; negative=control condition without oil addition; 1000 or 200 expressed the final oil concentration in ppm. No significant difference was observed between the different conditions using the ADONIS statistical test.

Considering specific change revealed by qPCR, MaAsLin analysis was performed, comparing T48 and T72, to identify either families, genus or ASV associated with specific conditions. No associations were found for any condition at T48, which was expected since the oils were added after the sampling. At T72 (24h post oil addition), the C1000 and T1000 conditions revealed two associations, only at the family level. A positive association was found for the *Erysipelotrichaceae*, for the C1000 condition. The other found association was a negative association for *Prevotellaceae*, in the T1000 sample. Of notice, a positive trend was observed, for the *Lactobacillaceae*, in the T1000 sample compared to the negative control ($p=0.08$).

Discussion

The goal of this study was to develop a bioreactor system, that can maintain a microbiota derived from the piglet intestinal microbiota, in a continuous feeding system, and to assess if the microbiota could be modified using essential oils. The system was designed for a rapid screening of microbiota modulation options, thus designed for shorter experiment compared to other systems presented in the literature. The system used piglet's feed digested *in-vitro* as the culture media, to simulate the pig end of ileal content.

The microbiota of the bioreactor was firstly characterized according to the incubation time. When looking at the alpha diversity, the three diversity indexes at T48 were lower compared to T0 but stayed stable between T48 and T72. This is in accordance with other studies where a loss of alpha diversity was recorded, between 6h and 24h (104, 206). This drop in diversity was in concordance with the Venn diagram representation which showed the loss of 31 families between the two time points. One explanation for this loss of alpha diversity could be found in the nature of microbiota analysis by molecular microbiology where it is hard to dissociate the viable from the nonviable bacteria of the microbiota (207), therefore making it hazardous to truly know what bacterial species in the bioreactor's inoculum were actually viable before the start of each experiments and therefore possibly cultivable in the bioreactor. Since T0 was closely related to the inoculum sample, improving the preparation of the inoculum (for example by reducing oxygen contact with the sample or reducing the time between sample collection and freezing) could increase the diversity by augmenting the viability of some bacteria population in the inoculum, therefore increasing the number of families that could grow *in-vitro*. However, this loss of diversity seems unavoidable, as even in an experiment where the inoculum was prepared in an anaerobic cabinet, such a loss was observed (208). This loss of diversity could also be due to the culture conditions themselves. When looking more precisely at the unique families at T0, the two major losses were the *Methanobacteriaceae* and *Spirochaetaceae*, representing 3.6% and 1.2% of the total sequences at T0. A plausible cause for the loss of *Methanobacteriaceae* was the atmosphere composition. In the system, gaseous nitrogen was added to create an anaerobic environment. However, *Methanobacteriaceae* requires the reduction of CO₂ with H₂ to produce energy (209). Replacing the gas mixture with a mix of those gas could help mitigate this problem. Another possibility for the difference of composition between T0 and T72 was the absence of the host physiology. For

example, *Spirochaetaceae* were not observed at T72 when they were clearly present at T0. Members in this family are host-associated so hardly able to grow inside a bioreactor (210). The difference in alpha diversity between the inoculum and the samples may also have come from the growth speed of certain bacterial populations. For example, genera in *Methanobacteriaceae* have highly variable growth time, varying between 3 and 40 hours of minimal doubling time (209). However imperfect this system might seem, the bioreactor was more than able to maintain a complex and rich community of bacteria.

For the beta diversity, a significant variation of the microbiota composition was observed over time and when compared with the inoculum or piglet's rectal swabs. This variation was expected, since most studies performed in various type of bioreactor have reported a clear shift in microbiota composition (211, 212). Since our experiment ended at 72h, microbiota variations beyond 72h are not known, but likely to slowly continue to shift. For example, Tanner et al system was kept working for three days in batch mode and five days in continuous operation (111), for a total of eight stabilization days, before hypothesis testing. Other system, such as the system by McDonald et al, reports that 36 days of system run time is needed before reaching a state that they considered stable (213). The design behind our system was able to evaluate short term modification enabling a fast screening while reducing the risk of system failures that threaten to throw away several weeks of experiments when a long stabilizing period is required before hypothesis testing. Another possibility for this difference in beta diversity comes from the culture media preparation. At the end of the culture media preparation, a filtration step was necessary to remove undigested feed clump that could block the feeding tube. However, this filtration could have reduced the culture media concentration of undigested complex sugars, such as starch or cellulose, reducing the growth ability of bacteria that relies on this carbon source, such as *Ruminococcaceae* (214).

When comparing the microbiota, using replication of the experiment as a factor, a significant difference was found but was also expected. In animal studies, difference in microbiota composition between farms or batches of animals are steadily observed (215-217), even when an animal facility with controlled conditions was used (218). Moreover, another study also found an higher reproducibility in experiment (between reactors) than between experiments, even if the fecal inoculum came from the same donor (213). In our study, this variation in microbiota composition could come from the different batch of culture media used, which differed between experiment.

As a proof of concept, the effect of essential oils on the bioreactor microbiota was investigated to test for the possibility of microbiota manipulation in the bioreactor. Indeed, essential oils are used in pig feed to improve intestinal health (190, 219). Essential oils used in the system were added into the culture media feeding bottles, so to gradually add the oils into the reactor as opposed to other study when the oil was immediately added to the test bacteria at the desired concentration (220). Concentration of 200 ppm and 1000 ppm were used for these two oils, based on the minimal inhibitory concentration (MIC) against *Salmonella* observed in the literature (149) and in previous work conducted in our lab (221). These concentrations therefore respectively represent a sub-minimal and over-optimal concentration of oils. In the bioreactor, carvacrol and thymol, at either concentration, had no effect on the 16S copy number and Enterobacteria levels evaluated with qPCR. Moreover, almost no effect could be observed globally on the microbiota by 16S sequencing. However, Thymol at the concentration of 1000 ppm influenced the lactobacilli, increasing their levels, compared to the reactor with no oil added. In the bio-informatics analysis of the sequencing results, a MaAsLin was used to identify biomarker associated with the oils at T72. No significant association were found for either the *Lactobacillus* genus or the *Lactobacillaceae* family. Thymol used as feed additive in broiler chicken have shown a positive effect on *Lactobacillus* strains (222). These results potentially suggest a modest effect of the oil on the intestinal microbiota, using *in vivo* models. In other studies, Thymol has shown beneficial effect on pig intestinal health, such as a reduction of diarrhea and improved jejunal barrier function, but no effect on the microbiota (223, 224).

Even though an increase of lactobacilli was found with qPCR, no effect of the oil was measured on the alpha and beta diversities. This result was unexpected, since MIC for thymol and carvacrol varies from 200 to 700 ppm for some bacterial species (220). However, classic MIC testing completely differs from the protocol followed in our study. In MIC studies, the molecules to be tested was added directly at the tested concentration in the culture media compared to a gradual oil concentration increase in the bioreactor, as the culture media containing the desired oil concentrations was added in the system, giving more time to the microbiota to adapt. It could also be simply that the oils failed to mix correctly in the culture media. On farms, the absence or little effect of thymol on the alpha and beta diversity of a microbiota has also been observed in weaned piglets, where the addition of 500 ppm of thymol in the feed had no impact on the microbiota

composition (224). Therefore, the results obtained in the bioreactor were in line with what was observed *in vivo*.

Only two bacterial populations were associated to the use of the oils. A negative association was found for the *Prevotellaceae* for the T1000 condition and a positive association for the *Erysipelotrichaceae* was found for the C1000 condition, compared to the negative control. When looking at the relative abundance of *Prevotellaceae* between T0, T48 and T72, an increase was observed. The negative association found at T72 with the Thymol condition represent the return of *Prevotellaceae* at the level present in the T0 samples. Growth over time of *Prevotellaceae* was also observed in another bioreactor system over a period of seven days (111). Members of the *Prevotellaceae* family are found to be both beneficial and not for the animals in the literature. Some studies as shown *Prevotellaceae* to improve health by improving glucose metabolism or by antibiotic synthesis, while other have reported it to be involved in opportunistic infections or even in inflammatory bowel disease (225-227).

In conclusion, an *in-vitro* bioreactor was developed to maintain a microbiota derived from the piglet colonic microbiota population with the use of an *in-vitro* digestion of piglet feed as the culture media. The current study, using essential oils, confirmed that the bioreactor's microbiota can be manipulated, by increasing Lactobacilli levels using high concentration of Thymol. The microbiota was characterized and options for improving the system were clearly identified. This system could therefore be a first step to be used before going *in vivo*, rapidly and safely identifying options that are the most susceptible to impact the animal's microbiota, therefore reducing the number of experimental groups needed for hypothesis testing in animals.

Acknowledgements

The authors want to thank all the staff of the housing facility at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal for their technical assistance with the piglets.

Funding

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole.

Supplementary Table/Fig

Kingdom	Phylum	Time
Bacteria	Candidatus_Saccharibacteria	T0
Bacteria	Deferribacteres	T0
Archaea	Euryarchaeota	T0
Bacteria	Fibrobacteres	T0
Bacteria	Lentisphaerae	T0
Bacteria	Planctomycetes	T0
Bacteria	Spirochaetes	T0
Bacteria	Synergistetes	T0
Bacteria	Tenericutes	T0
Bacteria	Chloroflexi	T72
Bacteria	Fusobacteria	T72

Supplementary Table 1: List of unique phyla present either at T0 or T72, based on Venn diagram.

Phylum	Family	Number of Sequences	Percentage of all T0 sequences
Euryarchaeota	Methanobacteriaceae	4152	3.600
Spirochaetes	Spirochaetaceae	1435	1.200
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	694	0.600
Bacteroidetes	Bacteroidetes_unclassified	288	0.200
Verrucomicrobia	Subdivision5_unclassified	138	0.100
Planctomycetes	Planctomycetaceae	67	0.060
Spirochaetes	Spirochaetales_unclassified	66	0.060
Planctomycetes	Planctomycetes_unclassified	58	0.050
Lentisphaerae	Oligosphaeraceae	51	0.040
Proteobacteria	Oxalobacteraceae	36	0.030
Euryarchaeota	Methanomassiliicoccaceae	24	0.020
Proteobacteria	Campylobacteraceae	17	0.010
Synergistetes	Synergistaceae	16	0.010
Lentisphaerae	Victivallaceae	15	0.010

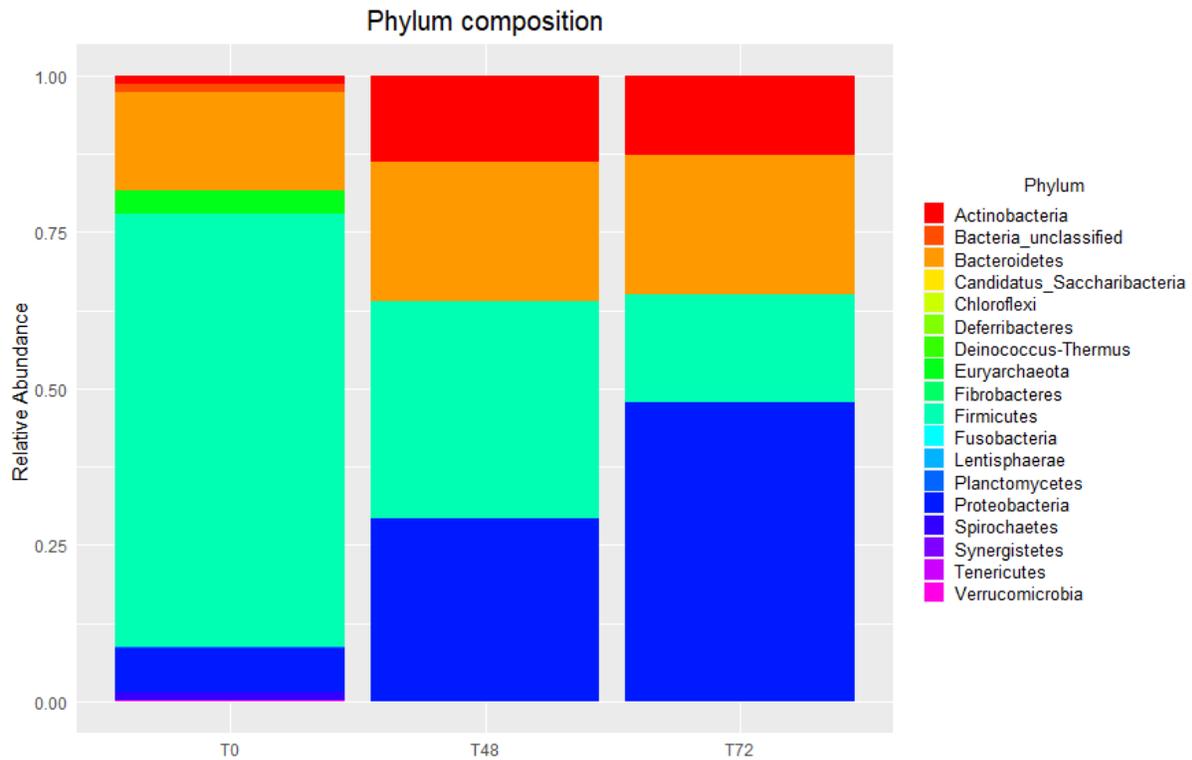
Bacteroidetes	Marinilabiliaceae	13	0.010
Firmicutes	Syntrophomonadaceae	11	0.009
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	11	0.009
Tenericutes	Anaeroplasmataceae	10	0.009
Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	9	0.007
Proteobacteria	Betaproteobacteria_unclassified	9	0.008
Firmicutes	Planococcaceae	6	0.005
Bacteroidetes	Rikenellaceae	4	0.003
Candidatus_Saccharibacteria	Candidatus_Saccharibacteria_unclassified	4	0.003
Proteobacteria	Pasteurellaceae	4	0.003
Actinobacteria	Corynebacteriaceae	3	0.003
Deferribacteres	Deferribacteraceae	2	0.001
Firmicutes	Bacillaceae_1	1	0.001
Firmicutes	Bacillaceae_2	1	0.001
Firmicutes	Catabacteriaceae	1	0.001
Proteobacteria	Desulfovibrionales_unclassified	1	0.001
Verrucomicrobia	Puniceicoccaceae	1	0.001

Supplementary Table 2: List of unique families present at T0, with their associated phylum, number of sequences and the percentage of total sequences at T0.

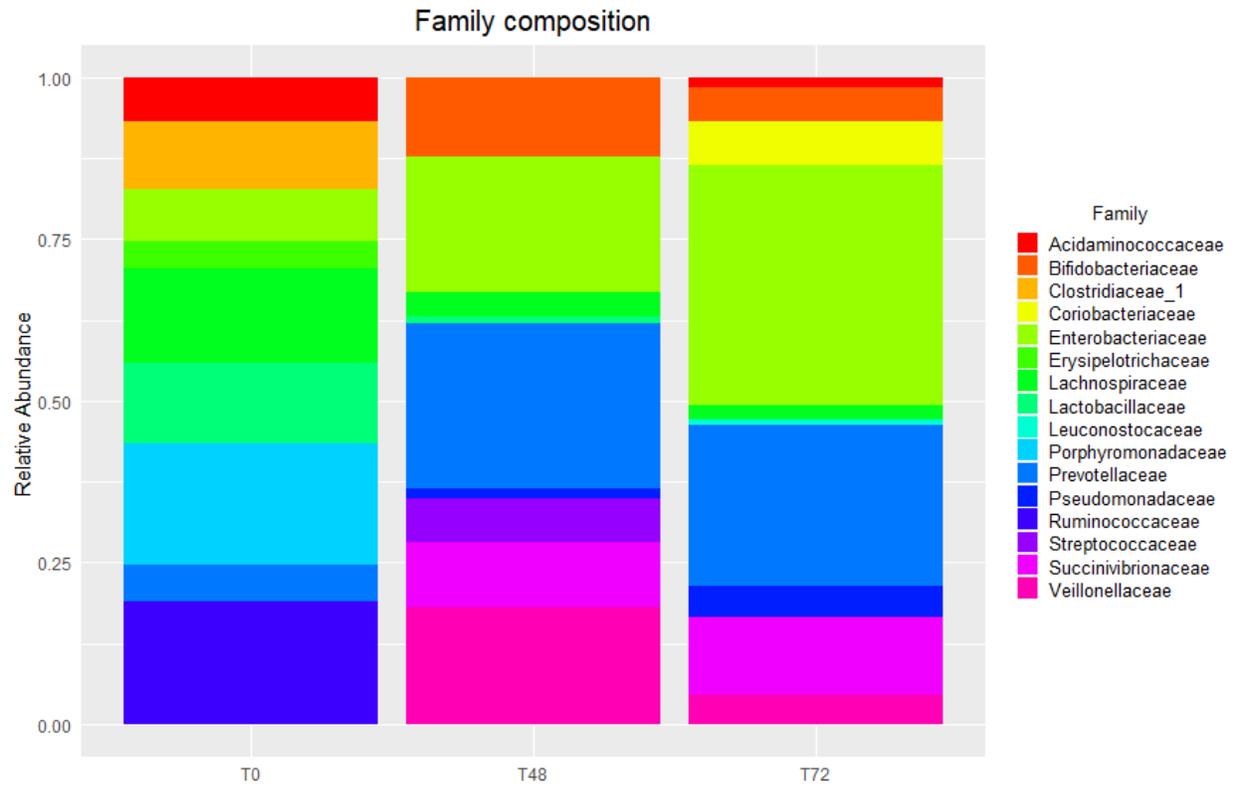
Phylum	Family	Number of Sequences	Percentage of all T72 sequences
Actinobacteria	Actinobacteria_unclassified	1	0.0003
Actinobacteria	Dietziaceae	3	0.0009
Actinobacteria	Streptomyetaceae	1	0.0003
Bacteroidetes	Cytophagaceae	2	0.0006
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	1	0.0003
Chloroflexi	Sphaerobacteraceae	2	0.0006
Firmicutes	Bacillales_Incertae_Sedis_XI	1	0.0003
Firmicutes	Carnobacteriaceae	4	0.0010
Firmicutes	Selenomonadales_unclassified	2	0.0006
Fusobacteria	Fusobacteriaceae	15	0.0040
Proteobacteria	Aeromonadales_unclassified	1	0.0003
Proteobacteria	Alphaproteobacteria_unclassified	1	0.0003
Proteobacteria	Bradyrhizobiaceae	3	0.0009
Proteobacteria	Burkholderiaceae	1	0.0003
Proteobacteria	Burkholderiales_unclassified	1	0.0003

Proteobacteria	Rhizobiales_unclassified	1	0.0003
Proteobacteria	Sphingomonadaceae	3	0.0009
Verrucomicrobia	Subdivision3_unclassified	1	0.0003

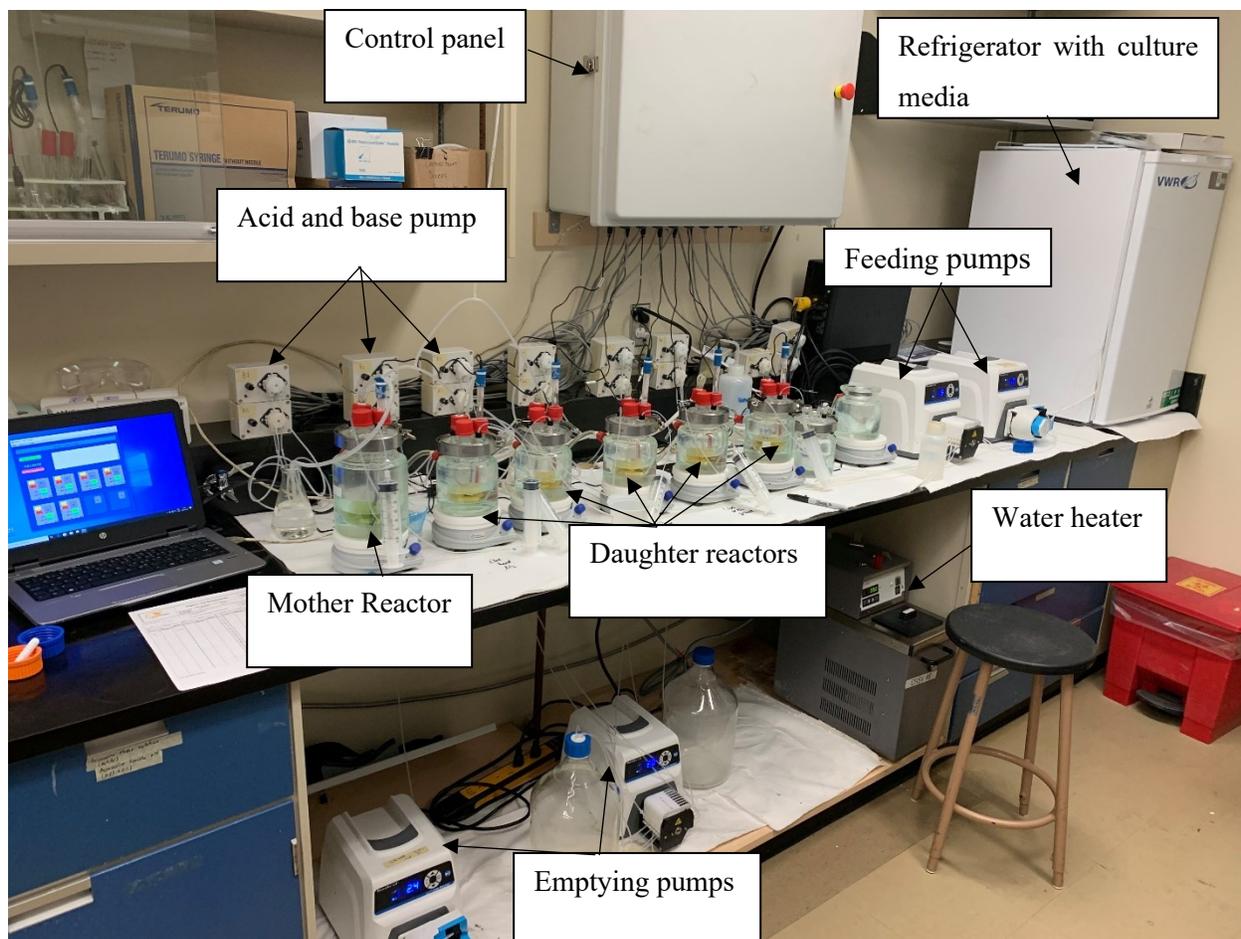
Supplementary Table 3: List of unique families present at T72, with their associated phylum, number of sequences and the percentage of total sequences at T72.



Supplementary fig 1: Relative abundance of the microbiota composition, at the phylum level, for T0, T48 and T72.



Supplementary fig 2: Relative abundance of the microbiota composition, at the family level, for T0, T48 and T72.



Supplementary fig 3: Photo of the bioreactor setup.

Major components of the system are highlighted and identified.

Phylum	Time	Association
Bacteria_unclassified	T48	-2.88
Lentisphaerae	T48	-0.85
Planctomycetes	T48	-0.82
Verrucomicrobia	T48	-0.56
Synergistetes	T48	-0.56
Spirochaetes	T48	-0.40
Archaea.Euryarchaeota	T48	-0.39
Firmicutes	T48	-0.33
Proteobacteria	T48	0.55

Actinobacteria	T48	0.90
Bacteria_unclassified	T72	-2.86
Lentisphaerae	T72	-0.85
Planctomycetes	T72	-0.82
Firmicutes	T72	-0.60
Verrucomicrobia	T72	-0.56
Synergistetes	T72	-0.56
Spirochaetes	T72	-0.40
Archaea.Euryarchaeota	T72	-0.39
Proteobacteria	T72	0.81
Actinobacteria	T72	0.96

Supplementary Table 4: MaAsLin association at the phylum level for T48 and T72 compared to T0, using time as the factor.

Phylum	Family	Time	Association
Firmicutes	Ruminococcaceae	T48	-3.03
Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	T48	-2.98
Firmicutes	Firmicutes_unclassified	T48	-2.91
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	T48	-2.87
Firmicutes	Clostridiales_unclassified	T48	-2.82
Firmicutes	Clostridia_unclassified	T48	-2.65
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	T48	-2.47
Bacteroidetes	Bacteroidales_unclassified	T48	-2.46
Firmicutes	Erysipelotrichaceae	T48	-2.44
Firmicutes	Peptococcaceae_1	T48	-2.19
Firmicutes	Eubacteriaceae	T48	-2.15
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	T48	-2.10
Firmicutes	Clostridiaceae_1	T48	-1.91
Proteobacteria	Proteobacteria_unclassified	T48	-1.64
Planctomycetes	Planctomycetes_unclassified	T48	-1.18
Firmicutes	Lachnospiraceae	T48	-1.07
Lentisphaerae	Oligosphaeraceae	T48	-0.99
Firmicutes	Enterococcaceae	T48	-0.84
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	T48	-0.81
Firmicutes	Lactobacillaceae	T48	-0.71
Euryarchaeota	Methanomassiliicoccaceae	T48	-0.65
Proteobacteria	Betaproteobacteria_unclassified	T48	-0.63
Proteobacteria	Oxalobacteraceae	T48	-0.61
Synergistetes	Synergistaceae	T48	-0.60
Verrucomicrobia	Subdivision5_unclassified	T48	-0.59
Proteobacteria	Campylobacteraceae	T48	-0.50

Bacteroidetes	Bacteroidetes_unclassified	T48	-0.50
Spirochaetes	Spirochaetales_unclassified	T48	-0.49
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	T48	-0.46
Planctomycetes	Planctomycetaceae	T48	-0.45
Firmicutes	Syntrophomonadaceae	T48	-0.44
Spirochaetes	Spirochaetaceae	T48	-0.42
Euryarchaeota	Methanobacteriaceae	T48	-0.38
Bacteroidetes	Rikenellaceae	T48	-0.35
Tenericutes	Anaeroplasmataceae	T48	-0.34
Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	T48	-0.33
Bacteroidetes	Marinilabiliaceae	T48	-0.32
Lentisphaerae	Victivallaceae	T48	-0.27
Candidatus_Saccharibacteria	Candidatus_Saccharibacteria_unclassified	T48	-0.26
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	T48	0.41
Bacteroidetes	Prevotellaceae	T48	0.65
Firmicutes	Streptococcaceae	T48	1.46
Firmicutes	Veillonellaceae	T48	1.54
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	T48	1.79
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	T48	2.89
Firmicutes	Firmicutes_unclassified	T72	-2.95
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	T72	-2.77
Firmicutes	Clostridia_unclassified	T72	-2.60
Bacteroidetes	Porphyromonadaceae	T72	-2.55
Firmicutes	Ruminococcaceae	T72	-2.52
Firmicutes	Peptostreptococcaceae	T72	-2.52
Firmicutes	Clostridiales_unclassified	T72	-2.43
Bacteroidetes	Bacteroidales_unclassified	T72	-2.21
Proteobacteria	Desulfovibrionaceae	T72	-2.15
Firmicutes	Clostridiaceae_1	T72	-1.93
Firmicutes	Peptococcaceae_1	T72	-1.92
Firmicutes	Lactobacillaceae	T72	-1.84
Firmicutes	Eubacteriaceae	T72	-1.67
Proteobacteria	Proteobacteria_unclassified	T72	-1.49
Firmicutes	Enterococcaceae	T72	-1.23
Planctomycetes	Planctomycetes_unclassified	T72	-1.18
Firmicutes	Erysipelotrichaceae	T72	-1.13
Lentisphaerae	Oligosphaeraceae	T72	-0.99
Firmicutes	Lachnospiraceae	T72	-0.96
Euryarchaeota	Methanomassiliococcaceae	T72	-0.65
Proteobacteria	Betaproteobacteria_unclassified	T72	-0.63
Proteobacteria	Oxalobacteraceae	T72	-0.61
Synergistetes	Synergistaceae	T72	-0.60
Verrucomicrobia	Subdivision5_unclassified	T72	-0.59
Proteobacteria	Campylobacteraceae	T72	-0.50
Bacteroidetes	Bacteroidetes_unclassified	T72	-0.50
Spirochaetes	Spirochaetales_unclassified	T72	-0.49

Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	T72	-0.46
Planctomycetes	Planctomycetaceae	T72	-0.45
Firmicutes	Syntrophomonadaceae	T72	-0.44
Spirochaetes	Spirochaetaceae	T72	-0.42
Bacteroidetes	Rikenellaceae	T72	-0.40
Euryarchaeota	Methanobacteriaceae	T72	-0.38
Tenericutes	Anaeroplasmataceae	T72	-0.34
Fibrobacteres	Fibrobacteraceae	T72	-0.33
Firmicutes	Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII	T72	-0.33
Bacteroidetes	Marinilabiliaceae	T72	-0.32
Lentisphaerae	Victivallaceae	T72	-0.27
Candidatus_Saccharibacteria	Candidatus_Saccharibacteria_unclassified	T72	-0.25
Proteobacteria	Gammaproteobacteria_unclassified	T72	0.33
Actinobacteria	Coriobacteriaceae	T72	0.55
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	T72	0.68
Bacteroidetes	Prevotellaceae	T72	0.71
Firmicutes	Veillonellaceae	T72	1.11
Proteobacteria	Moraxellaceae	T72	1.15
Firmicutes	Leuconostocaceae	T72	1.16
Proteobacteria	Pseudomonadaceae	T72	2.63
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	T72	2.74

Supplementary Table 5: MaAsLin association at the family level for T48 and T72 compared to T0, using time as the factor.

Factor	Phylum	Family	Number of sequences	Percentage of all factor-associated sequences
T72	Chloroflexi	Sphaerobacteraceae	2	0.0006
T72	Bacteroidetes	Cytophagaceae	2	0.0006
T0	Firmicutes	Planococcaceae	6	0.0052
Piglet	Firmicutes	Clostridiales_Incertae_Sedis_XI	166	0.0522
Piglet	Actinobacteria	Actinomycetaceae	142	0.0447
Piglet	Proteobacteria	Alphaproteobacteria_unclassified	89	0.0280
Piglet	Proteobacteria	Helicobacteraceae	65	0.0205
Piglet	Actinobacteria	Dermabacteraceae	44	0.0138
Piglet	Proteobacteria	Caulobacteraceae	28	0.0088
Piglet	Proteobacteria	Desulfovibrionales_unclassified	24	0.0076
Piglet	Firmicutes	Peptoniphilaceae	24	0.0076

Piglet	Proteobacteria	Comamonadaceae	21	0.0066
Piglet	Chlamydiae	Chlamydiaceae	19	0.0060
Piglet	Proteobacteria	Burkholderiaceae	8	0.0025
Piglet	Actinobacteria	Brevibacteriaceae	8	0.0025
Piglet	Proteobacteria	Halomonadaceae	8	0.0025
Piglet	Firmicutes	Bacillaceae_1	3	0.0009
Piglet	Proteobacteria	Xanthomonadaceae	3	0.0009
Piglet	Proteobacteria	Neisseriaceae	3	0.0009
Piglet	Fusobacteria	Leptotrichiaceae	3	0.0009
Piglet	Firmicutes	Christensenellaceae	3	0.0009
Piglet	Bacteroidetes	Sphingobacteriaceae	2	0.0006
Piglet	Proteobacteria	Rhizobiales_unclassified	2	0.0006
Piglet	Proteobacteria	Shewanellaceae	2	0.0006
Piglet	Proteobacteria	Rhizobiaceae	2	0.0006
Piglet	Actinobacteria	Actinobacteria_unclassified	2	0.0006

Supplementary Table 6: Unique families associated with either T72, T0 or piglet factor.

Factor	Genus	Numbers of sequences	Percentage of all factor-associated sequences
T72	Proteus	173	0.0503
T72	Brochothrix	6	0.0017
T72	Pseudomonadaceae_unclassified	6	0.0017
T72	Listeria	3	0.0009
T72	Bradyrhizobium	3	0.0009
T72	Sphaerobacteraceae_unclassified	2	0.0006
T72	Hymenobacter	2	0.0006
T0	Lysinibacillus	6	0.0052
T0	Synergistes	4	0.0034
T0	Cellulosilyticum	2	0.0017
T0	Lactobacillaceae_unclassified	2	0.0017

T0	Robinsoniella	2	0.0017
Piglet	Dialister	4057	1.2768
Piglet	Catenibacterium	1829	0.5756
Piglet	Methanosphaera	900	0.2833
Piglet	Oribacterium	552	0.1737
Piglet	Mobiluncus	115	0.0362
Piglet	Ezakiella	91	0.0286
Piglet	Alphaproteobacteria_unclassified	89	0.0280
Piglet	Anaerococcus	71	0.0223
Piglet	Helicobacter	65	0.0205
Piglet	Veillonella	50	0.0157
Piglet	Brachybacterium	44	0.0138
Piglet	Pasteurella	36	0.0113
Piglet	Odoribacter	29	0.0091
Piglet	Caulobacter	28	0.0088
Piglet	Desulfovibrionales_unclassified	24	0.0076
Piglet	Peptoniphilus	24	0.0076
Piglet	Porphyromonas	22	0.0069
Piglet	Actinomyces	20	0.0063
Piglet	Acidovorax	19	0.0060
Piglet	Chlamydia	19	0.0060
Piglet	Yaniella	17	0.0054
Piglet	Salinicoccus	16	0.0050
Piglet	Megamonas	16	0.0050
Piglet	Jeotgalicoccus	15	0.0047
Piglet	Lactococcus	9	0.0028
Piglet	Brevibacterium	8	0.0025
Piglet	Halomonas	8	0.0025
Piglet	Ralstonia	7	0.0022
Piglet	Desulfovibrionaceae_unclassified	7	0.0022
Piglet	Actinobacillus	7	0.0022

Piglet	Rothia	6	0.0019
Piglet	Bradyrhizobiaceae_unclassified	6	0.0019
Piglet	Butyrivibrio	4	0.0013
Piglet	Actinomycetaceae_unclassified	4	0.0013
Piglet	Ruminobacter	4	0.0013
Piglet	Enhydrobacter	3	0.0009
Piglet	Trueperella	3	0.0009
Piglet	Kocuria	3	0.0009
Piglet	Neisseria	3	0.0009
Piglet	Leptotrichia	3	0.0009
Piglet	Christensenella	3	0.0009
Piglet	Peptostreptococcus	3	0.0009
Piglet	Acetivibrio	3	0.0009
Piglet	Sphingobacteriaceae_unclassified	2	0.0006
Piglet	Rhizobiales_unclassified	2	0.0006
Piglet	Stenotrophomonas	2	0.0006
Piglet	Moraxella	2	0.0006
Piglet	Bacillaceae_1_unclassified	2	0.0006
Piglet	Comamonas	2	0.0006
Piglet	Shewanella	2	0.0006
Piglet	Citrobacter	2	0.0006
Piglet	Kaistia	2	0.0006
Piglet	Actinobacteria_unclassified	2	0.0006
Piglet	Oxalobacter	2	0.0006
Piglet	Herminiimonas	2	0.0006

Supplementary Table 7: Unique genus associated with either T72, T0 or piglet factor.

References

1. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
2. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
3. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-36.
4. Grigg JB, Sonnenberg GF. Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases. *J Immunol*. 2017;198(2):564-71.
5. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
6. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological reviews*. 2017;279(1):70-89.
7. Humphreys C. 19 - Intestinal Permeability. In : Pizzorno JE, Murray MT, editors. *Textbook of Natural Medicine (Fifth Edition)*. St. Louis (MO) : Churchill Livingstone; 2020. p. 166-77.e4.
8. Quigley EMM, Gajula P. Recent advances in modulating the microbiome. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-46.
9. Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*. 2020;39(26):4925-43.
10. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology*. 2017;25(10):851-73.
11. Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. 2006;8(7):1191-9.
12. Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L, Zhang H. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2012;25(11):1617-26.
13. Jiao LF, Song ZH, Ke YL, Xiao K, Hu CH, Shi B. Cello-oligosaccharide influences intestinal microflora, mucosal architecture and nutrient transport in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2014;195:85-91.
14. Castillo M, Martín-Orúe SM, Taylor-Pickard JA, Pérez JF, Gasa J. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function1. *Journal of Animal Science*. 2008;86(1):94-101.
15. Bonardi S. *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect*. 2017;145(8):1513-26.
16. Thanissery R, Kathariou S, Smith DP. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. *Journal of Applied Poultry Research*. 2014;23(2):221-7.
17. Hu Y, Dun Y, Li S, Zhang D, Peng N, Zhao S, et al. Dietary *Enterococcus faecalis* LAB31 Improves Growth Performance, Reduces Diarrhea, and Increases Fecal *Lactobacillus* Number of Weaned Piglets. *PLOS ONE*. 2015;10(1):e0116635.

18. Macfarlane GT, Macfarlane S. Models for intestinal fermentation : association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18(2):156-62.
19. Guzman-Rodriguez M, McDonald JAK, Hyde R, Allen-Vercoe E, Claud EC, Sheth PM, et al. Using bioreactors to study the effects of drugs on the human microbiota. *Methods*. 2018;149:31-41.
20. Takagi R, Sasaki K, Sasaki D, Fukuda I, Tanaka K, Yoshida K, et al. A Single-Batch Fermentation System to Simulate Human Colonic Microbiota for High-Throughput Evaluation of Prebiotics. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160533.
21. Hegner R, Koch C, Riechert V, Harnisch F. Microbiome-based carboxylic acids production: from serum bottles to bioreactors. *RSC Advances*. 2017;7(25):15362-71.
22. Au - Ziv N, Au - Brandt NJ, Au - Gresham D. The Use of Chemostats in Microbial Systems Biology. *JoVE*. 2013(80):e50168.
23. Drake DR, Brodgdgen KA. Continuous-Culture Chemostat Systems and Flowcells as Methods to Investigate Microbial Interactions. In : Press A, editor. *Polymicrobial Diseases* 2002.
24. Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microbial Ecology*. 1998;35(2):180-7.
25. Tanner SA, Zihler Berner A, Rigozzi E, Grattepanche F, Chassard C, Lacroix C. In Vitro Continuous Fermentation Model (PolyFermS) of the Swine Proximal Colon for Simultaneous Testing on the Same Gut Microbiota. *PLOS ONE*. 2014;9(4):e94123.
26. Oliphant K, Cochrane K, Schroeter K, Daigneault MC, Yen S, Verdu EF, et al. Effects of Antibiotic Pretreatment of an Ulcerative Colitis-Derived Fecal Microbial Community on the Integration of Therapeutic Bacteria *In Vitro*. 2020;5(1):e00404-19.
27. Dumond L, Lam PY, van Erven G, Kabel M, Mounet F, Grima-Pettenati J, et al. Termite Gut Microbiota Contribution to Wheat Straw Delignification in Anaerobic Bioreactors. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021;9(5):2191-202.
28. Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, Possemiers S, Marzorati M. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In : Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH) : Springer

Copyright 2015, The Author(s). 2015. p. 305-17.

29. Dufourny S, Everaert N, Lebrun S, Douny C, Scippo M-L, Li B, et al. Baby-SPIME: A dynamic in vitro piglet model mimicking gut microbiota during the weaning process. *Journal of Microbiological Methods*. 2019;167:105735.
30. Tompkins TA, Mainville I, Arcand Y. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Benef Microbes*. 2011;2(4):295-303.
31. Merchant HA, McConnell EL, Liu F, Ramaswamy C, Kulkarni RP, Basit AW, et al. Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. *Eur J Pharm Sci*. 2011;42(1-2):3-10.
32. Staroscik A. Calculator for determining the number of copies of a template: URI Genomics & Sequencing Center; 2004 [Available from : <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>].
33. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(23):7537-41.

34. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. 2013;79(17):5112-20.
35. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, et al. Community Ecology Package. 2.6-0 ed.
36. Martinez Arbizu P. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4 ed2020.
37. Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, et al. Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. 2021:2021. 01.20.427420.
38. Liu L, Firman J, Tanes C, Bittinger K, Thomas-Gahring A, Wu GD, et al. Establishing a mucosal gut microbial community *in vitro* using an artificial simulator. PloS one. 2018;13(7):e0197692-e.
39. O'Donnell MM, Rea MC, Shanahan F, Ross RP. The Use of a Mini-Bioreactor Fermentation System as a Reproducible, High-Throughput *ex vivo* Batch Model of the Distal Colon. Frontiers in microbiology. 2018;9:1844 -.
40. Emerson JB, Adams RI, Román CMB, Brooks B, Coil DA, Dahlhausen K, et al. Schrödinger's microbes : Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. Microbiome. 2017;5(1):86.
41. Papanicolas LE, Choo JM, Wang Y, Leong LEX, Costello SP, Gordon DL, et al. Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? EBioMedicine. 2019;41:509-16.
42. Oren A. The Family Methanobacteriaceae. In : Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 165-93.
43. Karami A, Sarshar M, Ranjbar R, Zanjani RS. The Phylum Spirochaetaceae. In : Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 915-29.
44. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes. 2012;3(4):289-306.
45. Auchtung JM, Robinson CD, Britton RA. Cultivation of stable, reproducible microbial communities from different fecal donors using minibioreactor arrays (MBRAs). Microbiome. 2015;3(1):42.
46. Sato Y, Zhao Y-J, Hori T, Aoyagi T, Inaba T, Aizawa H, et al. Transition of microbial community structures after development of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs). AMB Express. 2020;10(1):18.
47. McDonald JAK, Schroeter K, Fuentes S, Heikamp-deJong I, Khursigara CM, de Vos WM, et al. Evaluation of microbial community reproducibility, stability and composition in a human distal gut chemostat model. Journal of Microbiological Methods. 2013;95(2):167-74.
48. Holman DB, Brunelle BW, Trachsel J, Allen HK. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. 2017;2(3):e00004-17.
49. Mushegian AA. Sources of variation: Animal microbiota. 2017;10(467):eaam9011.
50. Li F, Li C, Chen Y, Liu J, Zhang C, Irving B, et al. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. Microbiome. 2019;7(1):92.
51. Thibodeau A, Letellier A, Yergeau É, Larrivière-Gauthier G, Fravallo P. Lack of evidence that selenium-yeast improves chicken health and modulates the caecal microbiota in the context of colonization by *Campylobacter jejuni*. Frontiers in microbiology. 2017;8:451 -.

52. 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.
53. El Atki Y, Aouam I, Taroq A, Gouch A, Badiaa L, el Kamari F. Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019;11:306-9.
54. Langlais M. Modulation de l'action antimicrobienne in vitro d'extraits de plantes en condition de compétition par un dérivé de microbiote d'origine fécale porcine. Montreal : Université de Montréal; 2019.
55. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol*. 2015;6 h 58 -.
56. Wei HK, Xue HX, Zhou ZX, Peng J. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal*. 2017;11(2):193-201.
57. Van Noten N, Degroote J, Van Liefferinge E, Taminau B, De Smet S, Desmet T, et al. Effects of Thymol and Thymol α -D-Glucopyranoside on Intestinal Function and Microbiota of Weaned Pigs. *Animals (Basel)*. 2020; 10(2):329.

Discussion

La validation *in vivo* de l'effet d'additifs alimentaires sur le microbiote intestinal des porcs est un processus coûteux, fastidieux et qui requiert l'utilisation de beaucoup d'animaux. Une alternative aux méthodes *in vivo* traditionnelles est l'utilisation d'un système de bioréacteur qui permet de confronter l'additif à une communauté microbienne complexe, la moins éloignée possible du microbiote intestinal. Une telle approche *in vitro*, permet, dans un processus de criblage, de sélectionner les concentrations d'additif alimentaire les plus susceptibles de fonctionner chez l'animal. Ce projet a permis la mise en place d'un système de bioréacteur, en alimentation continue, permettant de maintenir un microbiote dérivé du microbiote intestinal porcin. Ce système est composé de plusieurs réacteurs disposés en parallèle, ce qui permet l'étude de plusieurs conditions de façon simultanée, à partir d'un microbiote commun.

1. Amélioration du système

Avant de réaliser les manipulations permettant de répondre aux objectifs du projet, différentes mises au point du système ont été effectuées. Le premier problème rencontré avec le système était au niveau des sondes de pH. Pendant la nuit, le courant électrique devenait instable, et causait de fausses lectures au niveau des sondes, avec des conséquences délétères majeures puisque le système corrigeait ces pseudo-erreurs en ajoutant acide ou base. Afin d'éviter ce problème, le panneau de contrôle qui gère les sondes de pH a été connecté sur un régulateur de courant. De ce fait, le courant électrique reste stable en tout temps, évitant ainsi les fluctuations des sondes de pH. Le second problème rencontré avec le système est la stabilisation dans le réacteur mère. Dans les premiers essais, le microbiote devait être stabilisé pendant 24 h dans le réacteur mère. Toutefois, dû au grand volume dans le réacteur, il était trop difficile de maintenir le pH sur 24 h. Pour cette raison, le microbiote est cultivé pendant 6 h dans le réacteur mère, puis divisé dans les différents réacteurs filles pour la stabilisation. De plus, la concentration de la solution de NaOH utilisée pour ajuster le pH a été augmentée de 1 M à 2,5 M. Le troisième problème rencontré est un bouchon dans la tubulure causée par le milieu de culture. Pour contourner le problème, le milieu de culture a été filtré grossièrement avant l'utilisation, afin de retirer les particules qui bouchent la tubulure. Finalement, le dernier problème rencontré dans la mise au point du système est une croissance initiale très élevée des Entérobactéries, suggérant que l'environnement du bioréacteur n'est pas suffisamment anaérobie. Pour résoudre ce problème, deux solutions ont été mises en place. Tout d'abord, du thioglycolate a été ajouté à raison de 1 % dans le milieu de culture utilisé au départ, afin de réduire rapidement le potentiel redox. De plus, de la tubulure a été ajoutée afin d'injecter

l'azote du système directement dans le milieu de culture, contrairement à simplement l'injecter dans le réacteur.

2. Discussion des résultats

La première étape de ce projet était de caractériser l'évolution du microbiote dans le temps. Pour y parvenir, la diversité alpha des échantillons a été déterminée, en fonction du temps. Pour les trois indices (Observed, Shannon, Inverse Simpson), une diminution a été observée à T72, comparée à T0, mais une stabilité a été observée entre T48 et T72. Cette réduction de la diversité alpha a été rapportée dans d'autres études (104, 206). Cette réduction est aussi supportée par la perte de 31 familles entre les échantillons à T0 et les échantillons à T72. Cette perte de familles entre T0 et T72 peut provenir, tout d'abord, du fait que certaines espèces ne peuvent pas croître si les conditions ne sont pas idéales. Par exemple, certaines espèces bactériennes ont besoin d'un environnement atmosphérique différent de celui présent dans le bioréacteur. En effet, les *Methanobacteriaceae* ont besoin d'un environnement riche en CO₂ et en H₂ (209). Aussi, le système de bioréacteur ne parvient pas à reproduire les conditions physiologiques de l'hôte, empêchant ainsi la croissance des *Spirochaetaceae* (210). De plus, les méthodes de biologie moléculaire utilisées, par exemple le séquençage et la qPCR, peuvent être en cause dans cette diminution de diversité alpha, puisqu'il est difficile de dissocier à T0 ce qui est viable et non viable en séquençage (207). En effet, il est possible que certaines espèces soient non viables à la suite de la collecte de l'inoculum chez le porcelet, une exposition même minime à l'oxygène leur étant létale.

Par la suite, la diversité bêta des échantillons, en plus d'échantillon provenant de porcelet, a été calculée afin d'évaluer l'évolution de la structure et de la composition du microbiote. Les échantillons à T0 sont similaires aux échantillons provenant d'autres porcelets. Cette similitude entre les échantillons de porcelets et les échantillons à T0 était attendue, puisque l'échantillon à T0 représente du contenu de colon dilué dans du milieu de culture. Toutefois, une différence significative a été observée entre les échantillons à T0 et les échantillons à T48 et T72. Cette évolution du microbiote, en plus de concorder avec ce qu'il a été observé en diversité alpha, était attendu puisqu'une évolution similaire a été rapportée dans différents systèmes de bioréacteur dans la littérature (211, 212). Une fois que la diversité bêta des échantillons au travers du temps a été évaluée, la diversité bêta entre les expériences a été déterminée. En comparant le microbiote entre

les différentes expériences, une différence significative a été observée. Toutefois, cette différence de composition peut s'approcher de la différence de diversité du microbiote entre les animaux. En effet, lors des études *in vivo*, une différence de composition a été observée à la fois entre les animaux et les élevages (215-217), et ce, même lorsque les conditions d'élevages étaient très contrôlées (218).

Comme mentionné précédemment, la composition du microbiote est similaire entre le contenu intestinal utilisé comme inoculum et l'échantillon à T0, ce qui suggère que le milieu de culture n'affecte pas la composition du microbiote. Toutefois, une évolution du microbiote est observée entre T0, T24 et T48, ce qui suggère que notre système ne permet pas la croissance équitable de tous les membres du microbiote. Aussi, il est important de prendre en considération le temps de croissance des divers microorganismes. Par exemple, les *Methanobacteriaceae* ont un temps de croissance assez variable, allant de 3 h à 40 h avant de doubler de population (209). Ces deux facteurs complémentaires peuvent alors expliquer la variation de microbiote entre T0 et T48.

Le dernier aspect de mon projet a porté sur l'effet d'addition d'huiles essentielles. Deux huiles essentielles, le thymol et le carvacrol ont été ajoutées ou non aux réacteurs du système, à une concentration de 200 ppm ou de 1000 ppm. Les concentrations d'huiles ajoutées se basent sur les CMI observées dans la littérature (220), et dans des travaux précédemment réalisés dans le laboratoire (221). Ces concentrations représentent respectivement une concentration sous-inhibitrice et une concentration trois fois supérieure à la CMI contre *Salmonella* en présence de matière fécale durant une incubation de type batch, en conditions aérobiques à 37 °C (221). Dans cette étude, aucun effet des huiles essentielles, peu importe la concentration utilisée, n'a été observé en qPCR pour le nombre de copies de 16S et pour les Entérobactéries. Toutefois, un effet a été mesuré sur les Lactobacilles lors de l'addition du thymol à 1000 ppm, puisqu'un niveau plus élevé a été détecté, en comparaison avec le réacteur ne contenant aucune huile. De plus, une croissance des Lactobacilles a été observée, encore une fois pour le réacteur contenant le thymol à 1000 ppm, entre l'ajout de l'huile à T48 et la fin de l'expérience à T72. Dans la littérature, il a été reporté que l'ajout de thymol comme additif alimentaire chez les poulets à griller favorise la croissance des souches de *Lactobacillus* (222). En comparant les résultats obtenus dans ce projet avec les résultats de la dernière étude, l'effet du thymol est comparable entre le réacteur *in vitro* et l'étude chez l'animal.

Les séquences obtenues à partir des échantillons ont par la suite été analysées par l'utilisation d'un MaAsLin afin d'identifier un biomarqueur associé à une condition expérimentale spécifique, à T72. Malgré l'augmentation significative des Lactobacilles observée en qPCR, aucune association significative de *Lactobacillaceae* ou de *Lactobacillus* n'a été observée lors de la comparaison des échantillons sans huiles, des échantillons avec thymol 1000 ppm et des échantillons carvacrol 1000 ppm. Cette différence de résultat provient du fait que la qPCR mesure directement la quantité de Lactobacilles, contrairement au MaAsLin qui identifie des biomarqueurs associés en fonctions des métadonnées. Toutefois, une tendance positive des *Lactobacillaceae* a été observée dans les échantillons supplémentés avec le thymol à la concentration de 1000 ppm en comparaison avec les échantillons sans huiles, mais cette tendance n'est pas significative ($p=0.08$). Cette tendance non significative suggère qu'un nombre plus élevé de répliqua serait favorable, afin d'augmenter la puissance des tests statistiques.

La dernière étape du projet était l'ajout d'un pathogène alimentaire dans le système, comme *Salmonella*, et de valider son effet sur le microbiote. Toutefois, cette étape n'a pas pu être réalisée dans ce projet d'étude. Lors des différents essais conduits jusqu'alors, une concentration finale de $1 \cdot 10^4$ UFC par ml de *Salmonella* a été ajoutée dans les différents réacteurs après 24 h, mais la bactérie n'a pas été retrouvée dans le système 24 h à la suite de l'ajout, (donc à 48 h d'expérience). L'absence de *Salmonella* a été validée à l'aide d'un dénombrement sur géloses Brilliant Green Sulfa, puis par amplification par PCR du gène *InvA*. Dans le cas du dénombrement, aucune *Salmonella* n'a été cultivée, peu importe la dilution sur la gélose. Ces résultats suggèrent donc une perte de *Salmonella* dans le bioréacteur. Des essais supplémentaires seront nécessaires avec différentes concentrations de *Salmonella* afin d'identifier une concentration minimale permettant de conserver le pathogène dans le système tout au long de l'expérience.

3. Nouveautés de l'étude

Une des nouveautés de cette étude est tout d'abord l'implantation d'un nouvel outil dans le laboratoire et à la Faculté de médecine vétérinaire permettant la culture de communauté bactérienne complexe. Ce système de bioréacteur se démarque aussi des systèmes qui ont été décrits dans la littérature par certains aspects de conception. Plusieurs systèmes observés dans la littérature utilisent un milieu de culture de synthèse comportant plusieurs composés, afin de reproduire la composition en nutriment du contenu intestinal (105, 108, 111). Dans le cas de ce projet, le système

utilise comme milieu de culture le produit d'une digestion *in vitro* de moulée destinée à des porcelets. Cette digestion permet donc de conserver les vitamines et sucres complexes dans le milieu de culture, permettant ainsi la culture d'espèces bactériennes variées.

Une autre nouveauté du système provient de la durée des expériences. Les systèmes de bioréacteurs utilisés dans la littérature ont une phase de stabilisation du microbiote qui varie entre huit jours et 36 jours (111, 213). La phase de stabilisation du système utilisé dans le projet est de 48h, ce qui permet de réaliser de plus courtes expériences. Ces courtes expériences ont plusieurs avantages, en permettent un plus grand criblage d'additifs et en réduisant le risque de rencontrer des problèmes, ce qui évite de devoir arrêter l'expérience en cours de route, donc de perdre l'expérience.

4. Limites de l'étude

Cette étude, bien qu'elle ait permis la mise en place d'un système de bioréacteur fonctionnel, possède certaines limites. La première limite, malgré qu'elle soit aussi une nouveauté de l'étude, est le temps d'expérience. Dans le cadre de cette étude, les fermentations étaient réalisées sur une période de 72 h, avec une réduction de la modification du microbiote entre 48 h et 72 h. Toutefois, aucune information sur le comportement du microbiote après 72 h de culture n'a été étudiée.

Une seconde limite du système actuel est la préparation du milieu de culture. Lors de cette étude, le produit de la digestion *in vitro* a été congelé dans une douzaine de sacs, selon le débit de sortie de l'IViDiS. Ce faisant, le contenu de chaque sac était différent des autres sacs de la même digestion. Afin d'uniformiser les différentes expériences, le contenu de tous les sacs devrait être homogénéisé, puis redivisé dans différents sacs avant la congélation. Dans le cadre de cette étude, les trois premiers sacs et les trois derniers sacs de chaque digestion ont été mis de côté, afin d'éviter les extrêmes, mitigeant ainsi le problème de différence de composition. Aussi, le milieu de culture a été dilué à raison de 1 : 1 avec du PBS, à la suite d'une caractérisation des sucres simples par spectroscopie infrarouge du milieu de culture, ainsi qu'un échantillon de contenu intestinal de porcelet. De plus, afin d'éviter de bloquer la tubulure d'alimentation, le milieu de culture dilué avec le PBS doit être filtré pendant la phase de préparation, afin de retirer la moulée qui n'a pas été complètement digérée. Toutefois, cette manipulation retire potentiellement certains sucres complexes restant dans la moulée non digérée, défavorisant la croissance de certaines souches bactériennes. Un autre aspect du système pouvant être amélioré est la composition de l'atmosphère dès le début de l'expérience. Dans la conception actuelle du système, l'atmosphère du réacteur est

composée d'azote ajouté tout au long de l'expérience. Toutefois, certaines espèces ont besoin d'une atmosphère différente pour leurs croissances, comme les *Methanobacteriaceae* qui requièrent la réduction de CO₂ avec du H₂ comme source d'énergie (209). De plus, il serait idéal d'utiliser des sondes afin de suivre le potentiel redox tout au long de l'expérience, au lieu de simplement ajouter du thioglycolate en début d'expérience.

Toujours sous le thème de la composition du milieu de culture, une caractérisation plus approfondie doit être réalisée. Dans le cadre de ce projet, la composition en sucre simple a été réalisée sur le produit de l'IViDiS et sur le contenu intestinal du porcelet, afin de déterminer si une dilution du produit de l'IViDiS serait requise. Toutefois, aucune caractérisation des sucres complexes, des protéines et des lipides n'a été effectuée. Une caractérisation plus approfondie de ces différentes macromolécules permettra de prendre une meilleure décision au niveau de la dilution du contenu de l'IViDiS, si nécessaire, afin d'obtenir des niveaux de macromolécules similaires aux niveaux présents dans le contenu intestinal.

Une autre limite de l'étude actuelle provient du nombre de répliqua. Dans cette étude, trois répliquas ont été réalisés avec les huiles essentielles. Toutefois, lors des analyses bio-informatiques, ce nombre de répliqua ne permettait pas l'identification précise de certaines associations qui ont été observées par qPCR. Par exemple, une augmentation significative a été observée pour les Lactobacilles en qPCR pour l'échantillon contenant le Thymol à 1000 ppm, mais cette augmentation n'est pas significative en MaAsLin, seulement de niveau de la tendance. Ainsi, en augmentant le nombre de répliqua, la puissance du test statistique augmente, permettant d'identifier plus d'associations.

5. Perspectives

Malgré les quelques mises au point prévues pour le système de bioréacteur, celui-ci peut être utilisé pour d'autres projets. Tout d'abord, le système peut être utilisé dans un projet de recherche, afin de réaliser un criblage d'additifs alimentaires. Puisque le système a été mis au point pour la réalisation de plus courte expérience, le criblage d'une grande variété et concentration d'additifs alimentaire peut être effectué. Une étude pourrait donc être réalisée dans l'optique d'identifier un additif alimentaire ayant un impact positif sur certaines populations bactériennes étant réputée bénéfique pour le microbiote et pour la santé de l'animal, comme les Lactobacilles et les Bifidobactéries ou toute autre population identifiée lors d'expériences *in vivo* (228).

Une autre possibilité pour l'utilisation future du système est la recherche et la mise au point d'un probiotique. Tout comme pour l'étude d'additifs alimentaires, le système pourrait être utilisé afin de tester l'efficacité d'une, ou un ensemble de souches, comme probiotique. Le système permet de vérifier, à la suite des analyses bio-informatiques, l'intégration ou non de ce potentiel probiotique dans le microbiote du bioréacteur. De plus, des doses variées de ce potentiel probiotique peuvent être testées de façon simultanée dans le système, afin d'identifier du fait même une dose minimale.

En plus des projets de recherche pour l'identification d'un additif alimentaire ou d'un probiotique bénéfique pour le microbiote, le système pourrait être utilisé, en collaboration avec les industriels, comme service afin de valider l'effet d'un additif ou d'une alimentation particulière de cet industriel. En effet, il serait possible d'offrir un service d'analyse avec le bioréacteur afin d'observer et valider l'effet sur le microbiote de nouvelles formulations d'aliments développées par un industriel, à plus faible coût qu'un essai chez les animaux (*in vivo*).

Conclusion

Mon projet de recherche a permis la mise en place d'un système de fermentation en bioréacteur visant l'étude du microbiote intestinal du porcelet. À la lumière des résultats obtenus, la première hypothèse a été confirmée, qui stipule qu'il est possible de stabiliser un microbiote similaire au microbiote intestinal porcin dans le système. Toutefois, la seconde hypothèse, concernant l'observation de la modulation du microbiote à l'aide d'huiles essentielles, n'a pas été confirmée, puisqu'aucune modulation du microbiote n'a été observée en bio-informatique.

Au cours de ce projet, certains aspects du système ont été améliorés par rapport au système initial, dans l'optique de mieux répondre à l'objectif principal du projet, visant la mise en place d'un système de fermentation permettant le maintien d'un microbiote intestinal d'origine porcine. Ces améliorations comprennent l'ajout d'un régulateur de courant pour stabiliser les lectures des sondes de pH et l'ajout d'un réfrigérateur, dans lequel des plaques agitatrices ont été ajoutées et sur lesquelles les bouteilles de milieu de culture ont été placées, permettant de limiter la croissance bactérienne dans le milieu de culture, tout en conservant une bonne agitation du contenu. Le premier objectif du projet a aussi été atteint par la production du milieu de culture à partir de moulée dans l'IViDiS.

Les premiers résultats obtenus avec le système visaient à caractériser l'évolution du microbiote dans le système, puis de comparer le microbiote du système avec l'inoculum et le microbiote intestinal porcin. Ces résultats ont montré que le microbiote présent dans le système évolue avec le temps, entre l'échantillon initial et l'échantillon à 48h d'incubation. Toutefois, une diminution de la variation entre 48 h et 72 h d'incubation permet d'utiliser cette fenêtre pour analyser l'effet d'additifs sur la composition du microbiote. Ces résultats ont aussi démontré que le microbiote utilisé comme inoculum de départ était similaire au microbiote intestinal porcin. Cependant, le microbiote du système entre 48 h et 72 h est significativement différent du microbiote intestinal porcin. Ces résultats obtenus permettent donc l'atteinte du second objectif, visant la production en 48h et le maintien pendant 24 h supplémentaires d'un microbiote (pour une durée expérimentale de trois jours).

Les seconds résultats obtenus avec le système ont permis d'observer l'effet de l'addition de deux huiles essentielles, à deux concentrations différentes, sur le microbiote, permettant l'atteinte du troisième objectif. Ces résultats ont démontré, par qPCR, qu'une des huiles avait un effet spécifique sur la croissance de Lactobacilles. Toutefois, cet effet n'a pas été observé significativement lors de

l'analyse par bio-informatique des résultats de séquençage à haut débit. Le dernier objectif n'a pu être atteint dans ce projet, puisque *Salmonella* n'a pu être cultivé ni l'inoculum détecté avec le microbiote dans le réacteur.

Cette étude décrit le fonctionnement d'un nouvel outil permettant l'étude de l'effet d'additifs alimentaires sur le microbiote intestinal. Ce modèle versatile peut facilement être adapté à l'espèce, la section intestinale ou l'âge désiré. De plus, cet outil permet le criblage à court terme d'additifs, ajoutant ainsi une étape préliminaire aux études chez l'animal, en étant toutefois plus complexe que les méthodes de cultures traditionnelles. Le modèle pourrait être, dans le futur, modifié afin d'observer les effets à plus long terme.

Références bibliographiques

1. Canada Porc International. La production porcine au Canada 2020 [Available from: <http://www.canadapork.com/fr/information-sur-l-industrie/la-production-porcine-au-canada>.
2. MAPAQ. Monographie de l'industrie porcine au Québec 2016 [Available from: [https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/monographieporc_finale\(2\).pdf](https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/monographieporc_finale(2).pdf).
3. MAPAQ. Élevage de porc 2020 [Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/Production/Pages/Porc.aspx>.
4. Canada Porc International. Production Porcine Canadienne [Available from: [https://www.agrireseau.net/porc/documents/CPI-3\(F\)Production.pdf](https://www.agrireseau.net/porc/documents/CPI-3(F)Production.pdf).
5. Les Éleveurs de porcs du Québec. Les principales races de porc au Québec [Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/20-5-production-responsable-les-principales-races-de-porc-au-quebec.html>.
6. Osborne Livestock Equipment. The Complete Pig Feeding Guide: Osborne; 2018 [Available from: <https://osbornelivestockequipment.com/news/pig-feeding-guide/>.
7. Les Éleveurs de porcs du Québec. Des méthodes d'élevage modernes [Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/18-5-production-responsable-des-methodes-d-elevage-modernes.html>.
8. Centre de développement du porc du Québec inc. Guide Bilan Alimentaire Production Porcine 2017 [Available from: https://www.craaq.qc.ca/documents/files/Documents/MDAGT015/MDAGT015_guide_VF.pdf.
9. Dilepix. Solution élevages porcs [Available from: <https://www.dilepix.com/fr/performances-elevages/porcs>.
10. Ministère de l'Agriculture de l'alimentation et des affaires rurales. Prévenir et traiter la maladie en améliorant la fonction intestinale 2020 [Available from: http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/swine/facts/info_weaning.htm.
11. Merchant HA, McConnell EL, Liu F, Ramaswamy C, Kulkarni RP, Basit AW, et al. Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. *Eur J Pharm Sci.* 2011;42(1-2):3-10.
12. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2009;11(8):2112-22.
13. JENSEN BB, JORGENSEN H. Effect of Dietary Fiber on Microbial Activity and Microbial Gas Production in Various Regions of the Gastrointestinal Tract of Pigs. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(6):1897-904.
14. Shin W, Wu A, Massidda MW, Foster C, Thomas N, Lee D-W, et al. A Robust Longitudinal Co-culture of Obligate Anaerobic Gut Microbiome With Human Intestinal Epithelium in an Anoxic-Oxic Interface-on-a-Chip. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:13-.
15. Søndergaard M. Redox Potential. In: Likens GE, editor. *Encyclopedia of Inland Waters.* Oxford: Academic Press; 2009. p. 852-9.
16. Vervaeke IJ, Van Nevel CJ, Decuypere JA, Van Assche PF. A Comparison of Two Methods for Obtaining Anaerobic Counts in Different Segments of the Gastro-intestinal Tract of Piglets. *1973;36(3):397-405.*

17. Lizardo R, Tous N, Sampsonis C, D'Inca R, Calvo MA, Brufau J. Redox potential of cecum content of growing pigs and its relation with pH and VFA concentration¹. *Journal of Animal Science*. 2012;90(suppl_4):409-11.
18. Mi J, Peng H, Wu Y, Wang Y, Liao X. Diversity and community of methanogens in the large intestine of finishing pigs. *BMC Microbiology*. 2019;19(1):83.
19. Vermeulen L, Van de Perre V, Permentier L, De Bie S, Geers R. Pre-slaughter rectal temperature as an indicator of pork meat quality. *Meat Sci*. 2015;105:53-6.
20. Sepulveda J, Moeller AH. The Effects of Temperature on Animal Gut Microbiomes. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:384-.
21. Kim HB, Isaacson RE. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet Microbiol*. 2015;177(3-4):242-51.
22. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-36.
23. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31-.
24. Mittelholz A, Johnson CL, Feinberg JM, Langlais B, Phillips RJ. Timing of the martian dynamo: New constraints for a core field 4.5 and 3.7 Ga ago. *Sci Adv*. 2020;6(18):eaba0513.
25. Wang C, Shi C, Zhang Y, Song D, Lu Z, Wang Y. Microbiota in fermented feed and swine gut. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(7):2941-8.
26. Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(2):673-90.
27. 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;8:2219.
28. Looft T, Allen HK, Cantarel BL, Levine UY, Bayles DO, Alt DP, et al. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J*. 2014;8(8):1566-76.
29. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:494-.
30. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6(237):237ra65-ra65.
31. Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010;21(2):149-56.
32. Everaert N, Van Cruchten S, Weström B, Bailey M, Van Ginneken C, Thymann T, et al. A review on early gut maturation and colonization in pigs, including biological and dietary factors affecting gut homeostasis. *Animal Feed Science and Technology*. 2017;233:89-103.
33. Bian G, Ma S, Zhu Z, Su Y, Zoetendal EG, Mackie R, et al. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. 2016;18(5):1566-77.

34. Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, Medvecky M, Polansky O, Gardan-Salmon D, et al. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0170051.
35. Zhao W, Wang Y, Liu S, Huang J, Zhai Z, He C, et al. The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. *PLOS ONE*. 2015;10(2):e0117441.
36. Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, et al. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*. 2011;153(1):124-33.
37. Quan J, Cai G, Ye J, Yang M, Ding R, Wang X, et al. A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios. *Sci Rep*. 2018;8(1):4536.
38. Arguello H, Estelle J, Zaldivar-Lopez S, Jimenez-Marin A, Carvajal A, Lopez-Bascon MA, et al. Early *Salmonella Typhimurium* infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Sci Rep*. 2018;8(1):7788.
39. Kumar H, Park W, Srikanth K, Choi B-H, Cho E-S, Lee K-T, et al. Comparison of Bacterial Populations in the Ceca of Swine at Two Different Stages and Their Functional Annotations. *Genes*. 2019;10(5):382.
40. Zhu JJ, Gao MX, Song XJ, Zhao L, Li YW, Hao ZH. Changes in bacterial diversity and composition in the faeces and colon of weaned piglets after feeding fermented soybean meal. *J Med Microbiol*. 2018;67(8):1181-90.
41. Stokes CR. The development and role of microbial-host interactions in gut mucosal immune development. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017;8:12-.
42. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999;69(5):1046s-51s.
43. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-41.
44. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.
45. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003;62(1):67-72.
46. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Velge P, Bottreau E, Fievez V, et al. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;85(3):237-48.
47. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1-24.
48. Wang H, Xu R, Zhang H, Su Y, Zhu W. Swine gut microbiota and its interaction with host nutrient metabolism. *Animal Nutrition*. 2020.
49. Neis EPJG, Dejong CHC, Rensen SS. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients*. 2015;7(4):2930-46.
50. He M, Fang S, Huang X, Zhao Y, Ke S, Yang H, et al. Evaluating the Contribution of Gut Microbiota to the Variation of Porcine Fatness with the Cecum and Fecal Samples. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:2108-.

51. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. 2019;99(4):1877-2013.
52. De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. 2018;115(25):6458-63.
53. Aguilera M, Vergara P, Martínez V. Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25(8):e515-29.
54. Wang Z, Zolnik CP, Qiu Y, Usyk M, Wang T, Strickler HD, et al. Comparison of Fecal Collection Methods for Microbiome and Metabolomics Studies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:301.
55. Martinez N, Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Margolles A, Sanchez B. Filling the gap between collection, transport and storage of the human gut microbiota. *Sci Rep.* 2019;9(1):8327.
56. Vandeputte D, Tito RY, Vanleeuwen R, Falony G, Raes J. Practical considerations for large-scale gut microbiome studies. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(Supp_1):S154-S67.
57. Kia E, Wagner Mackenzie B, Middleton D, Lau A, Waite DW, Lewis G, et al. Integrity of the Human Faecal Microbiota following Long-Term Sample Storage. *PloS one.* 2016;11(10):e0163666-e.
58. Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'Sullivan Ó, Ross RP, O'Callaghan G, et al. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PloS one.* 2015;10(3):e0119355-e.
59. Burz SD, Abraham A-L, Fonseca F, David O, Chapron A, Béguet-Crespel F, et al. A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation. *Scientific Reports.* 2019;9(1):8897.
60. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell.* 2018;174(6):1388-405 e21.
61. Carroll IM, Chang YH, Park J, Sartor RB, Ringel Y. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gut Pathog.* 2010;2(1):19.
62. Wu M, Li P, Li J, An Y, Wang M, Zhong G. The Differences between Luminal Microbiota and Mucosal Microbiota in Mice. *J Microbiol Biotechnol.* 2020;30(2):287-95.
63. Ibrahim S, Belheouane M. Methods for Microbiota Analysis: Sample Collection and Laboratory Methods. In: Ragab G, Atkinson TP, Stoll ML, editors. *The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 13-27.
64. Stewart EJ. Growing Unculturable Bacteria. 2012;194(16):4151-60.
65. Bodor A, Bounedjoum N, Vincze GE, Erdeiné Kis Á, Laczi K, Bende G, et al. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 2020;19(1):1-22.
66. Claesson MJ, Clooney AG, O'Toole PW. A clinician's guide to microbiome analysis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2017;14(10):585-95.
67. Bibiloni R, Simon MA, Albright C, Sartor B, Tannock GW. Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. 2005;41(1):45-51.

68. Waché YJ, Valat C, Postollec G, Bougeard S, Burel C, Oswald IP, et al. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *Int J Mol Sci.* 2009;10(1):1-17.
69. Pissavin C, Burel C, Gabriel I, Beven V, Mallet S, Maurice R, et al. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism for the monitoring of gastrointestinal microbiota of chicken flocks. *Poult Sci.* 2012;91(9):2294-304.
70. Paliy O, Kenche H, Abernathy F, Michail S. High-throughput quantitative analysis of the human intestinal microbiota with a phylogenetic microarray. *Applied and environmental microbiology.* 2009;75(11):3572-9.
71. BioSistemika. Real-Time PCR (qPCR) Technology Basics 2017 [Available from: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>].
72. Jian C, Luukkonen P, Yki-Järvinen H, Salonen A, Korpela K. Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLOS ONE.* 2020;15(1):e0227285.
73. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology.* 2002;2(2):2-11.
74. Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology.* 2009;68(3):351-62.
75. De Angelis M, Siragusa S, Berloco M, Caputo L, Settanni L, Alfonsi G, et al. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology.* 2006;157(8):792-801.
76. Widmann S. 5 Targets to Test for in Your Production Environment: #2 Faecal Indicator Organisms 2018 [Available from: <https://www.romerlabs.com/en/knowledge-center/knowledge-library/articles/news/5-targets-to-test-for-in-your-production-environment-2-faecal-indicator-organisms/>].
77. Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9478630-.
78. Voet D, Voet JG, Domenjoud L. *Biochimie: De Boeck*; 2016.
79. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1-8.
80. Schoales J. How Does Sanger Sequencing Work? 2015 [Available from: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-does-sanger-sequencing-work/>].
81. Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology.* 2008;26(10):1117-24.
82. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics.* 2010;11(1):31-46.
83. Illumina. Illumina Sequencing Technology 2010 [Available from: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf].
84. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. 2007;45(9):2761-4.
85. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B-Y, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications.* 2019;10(1):5029.

86. Roumpeka DD, Wallace RJ, Escalettes F, Fotheringham I, Watson M. A Review of Bioinformatics Tools for Bio-Prospecting from Metagenomic Sequence Data. 2017;8(23).
87. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(23):7537-41.
88. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13(7):581-3.
89. de la Cuesta-Zuluaga J, Escobar JS. Considerations For Optimizing Microbiome Analysis Using a Marker Gene. *Front Nutr*. 2016;3:26-.
90. Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One*. 2011;6(12):e27310.
91. 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):1621-4.
92. GenBank. Chimera Detection in 16S rRNA Sequences at NCBI [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/rrnachimera/>].
93. 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.
94. STACKEBRANDT E, GOEBEL BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. 1994;44(4):846-9.
95. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(7):5069-72.
96. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D590-6.
97. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D633-42.
98. 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. 2018;9(1037).
99. Bynum N. 7: Alpha, Beta, and Gamma Diversity: LibreTextes; 2019 [Available from: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Ecology/Book%3A_Biodiversity_\(Bynum\)/7%3A_Alpha%2C_Beta%2C_and_Gamma_Diversity#:~:text=Alpha%20diversity%20refers%20to%20the,species%20richness\)%20in%20that%20ecosystem.&text=Thus%2C%20beta%20diversity%20allows%20us%20to%20compare%20diversity%20between%20ecosystems](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Ecology/Book%3A_Biodiversity_(Bynum)/7%3A_Alpha%2C_Beta%2C_and_Gamma_Diversity#:~:text=Alpha%20diversity%20refers%20to%20the,species%20richness)%20in%20that%20ecosystem.&text=Thus%2C%20beta%20diversity%20allows%20us%20to%20compare%20diversity%20between%20ecosystems)].
100. Jost L. Entropy and diversity. 2006;113(2):363-75.
101. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, et al. Conducting a microbiome study. *Cell*. 2014;158(2):250-62.

102. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. 2013;79(17):5112-20.
103. Mallick H, Rahnavard A, Mclver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, et al. Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. 2021:2021.01.20.427420.
104. Takagi R, Sasaki K, Sasaki D, Fukuda I, Tanaka K, Yoshida K, et al. A Single-Batch Fermentation System to Simulate Human Colonic Microbiota for High-Throughput Evaluation of Prebiotics. PLoS One. 2016;11(8):e0160533.
105. Liu L, Firrman J, Tanes C, Bittinger K, Thomas-Gahring A, Wu GD, et al. Establishing a mucosal gut microbial community in vitro using an artificial simulator. PLoS One. 2018;13(7):e0197692.
106. Yang Y, Sha M. A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, FedBatch, and Continuous Fermentation: Eppendorf; 2020 [Available from: <https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/763594/Fermentors-Bioreactors-Application-Note-408-BioBLU-f-Single-Vessel-A-Beginner%E2%80%99s-Guide-Bioprocess-Modes-Batch-Fed-Batch-Continuous-Fermentation.pdf>].
107. Liu S. Chapter 4 - Batch Reactor. In: Liu S, editor. Bioprocess Engineering (Second Edition): Elsevier; 2017. p. 139-78.
108. Guzman-Rodriguez M, McDonald JAK, Hyde R, Allen-Vercoe E, Claud EC, Sheth PM, et al. Using bioreactors to study the effects of drugs on the human microbiota. Methods. 2018;149:31-41.
109. Allman T. The Difference Between Batch, Fed-batch and Continuous Processes 2020 [Available from: <https://www.infors-ht.com/en/blog/the-difference-between-batch-fed-batch-and-continuous-processes/>].
110. Drake DR, Brodgdgen KA. Continuous-Culture Chemostat Systems and Flowcells as Methods to Investigate Microbial Interactions. In: Press A, editor. Polymicrobial Diseases2002.
111. Tanner SA, Zihler Berner A, Rigozzi E, Grattepanche F, Chassard C, Lacroix C. In Vitro Continuous Fermentation Model (PolyFermS) of the Swine Proximal Colon for Simultaneous Testing on the Same Gut Microbiota. PLOS ONE. 2014;9(4):e94123.
112. Poeker SA, Geirnaert A, Berchtold L, Greppi A, Krych L, Steinert RE, et al. Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). Scientific Reports. 2018;8(1):4318.
113. Rasche U. Bioreactors and Fermentors — Powerful Tools for Resolving Cultivation Bottlenecks: Eppendorf; 2019 [Available from: <https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/806599/Fermentors-Bioreactors-White-Paper-021-Stirred-tank-bioreactors-Bioreactors-Fermentors-Powerful-Tools-Resolving-Cultivation-Bottlenecks.pdf>].
114. Oliphant K, Cochrane K, Schroeter K, Daigneault MC, Yen S, Verdu EF, et al. Effects of Antibiotic Pretreatment of an Ulcerative Colitis-Derived Fecal Microbial Community on the Integration of Therapeutic Bacteria *In Vitro*. 2020;5(1):e00404-19.
115. McDonald JAK, Fuentes S, Schroeter K, Heikamp-deJong I, Khursigara CM, de Vos WM, et al. Simulating distal gut mucosal and luminal communities using packed-column biofilm reactors and an in vitro chemostat model. Journal of Microbiological Methods. 2015;108:36-44.

116. Dufourny S, Everaert N, Lebrun S, Douny C, Scippo M-L, Li B, et al. Baby-SPIME: A dynamic in vitro piglet model mimicking gut microbiota during the weaning process. *Journal of Microbiological Methods*. 2019;167:105735.
117. Schäpe SS, Krause JL, Engelmann B, Fritz-Wallace K, Schattenberg F, Liu Z, et al. The Simplified Human Intestinal Microbiota (SIHUMIx) Shows High Structural and Functional Resistance against Changing Transit Times in In Vitro Bioreactors. *Microorganisms*. 2019;7(12):641.
118. Rymovicz AUM, Souza RD, Gursky LC, Rosa RT, Trevilatto PC, Groppo FC, et al. Screening of reducing agents for anaerobic growth of *Candida albicans* SC5314. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;84(3):461-6.
119. Smith MV, Pierson MD. Effect of reducing agents on oxidation-reduction potential and the outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores. *Applied and environmental microbiology*. 1979;37(5):978-84.
120. Todar K. Nutrition and Growth of Bacteria [Available from: <http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html#:~:text=Carbon%20and%20Energy%20Sources%20for,concentration%2C%20temperature%2C%20and%20pH>].
121. Basu S, Bose C, Ojha N, Das N, Das J, Pal M, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformatics*. 2015;11(4):182-4.
122. Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;99(3):287-96.
123. Dumond L, Lam PY, van Erven G, Kabel M, Mounet F, Grima-Pettenati J, et al. Termite Gut Microbiota Contribution to Wheat Straw Delignification in Anaerobic Bioreactors. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021;9(5):2191-202.
124. Cao Y, Liu H, Qin N, Ren X, Zhu B, Xia X. Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;99:295-310.
125. Soler C, Goossens T, Bermejo A, Migura-García L, Cusco A, Francino O, et al. Digestive microbiota is different in pigs receiving antimicrobials or a feed additive during the nursery period. *PLOS ONE*. 2018;13(5):e0197353.
126. McKean J. Feed Additives for Swine 2019 [Available from: <https://swine.extension.org/feed-additives-for-swine/>].
127. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Mills A, Rushton J, Yeung S. How antibiotics are used in pig farming: a mixed-methods study of pig farmers, feed mills and veterinarians in Thailand. 2020;5(2):e001918.
128. Feighner SD, Dashkevich MP. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53(2):331-6.
129. Eysen H. The Additive Effects of Nucleic Acids and Antibiotics as Individual Growth Promotants for Chicks. *Poultry Science*. 1962;41(6):1822-8.
130. Monson WJ, Harper AE, Winje ME, Elvehjem CA, Rhodes RA, Sarles WB. A Mechanism of the Vitamin-Sparing Effect of Antibiotics. *The Journal of Nutrition*. 1954;52(4):627-36.
131. Nathan C. Antibiotics at the crossroads. *Nature*. 2004;431(7011):899-902.
132. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host–microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(4):233-43.

133. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):175-88.
134. Rajić A, Reid-Smith R, Deckert AE, Dewey CE, McEwen SA. Reported antibiotic use in 90 swine farms in Alberta. *Can Vet J.* 2006;47(5):446-52.
135. Xiong W, Sun Y, Zeng Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental Science and Pollution Research.* 2018;25(19):18377-84.
136. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40(4):277-83.
137. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:119-46.
138. MAPAQ. Usage des antibiotiques [Available from: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/antibio/Pages/utilisation_antibiotiques.aspx].
139. MAPAQ. Fiche d'information, La lutte contre l'antibiorésistance [Available from: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Santeanimale/Antibioresistance/Fiche_lutte_Antibioresistance.pdf].
140. San Andres JV, Mastromano GA, Li Y, Tran H, Bundy JW, Miller PS, et al. The effects of prebiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs1. *Translational Animal Science.* 2019;3(4):1315-25.
141. Houghton E. Prebiotics and probiotics boost pig growth and health 2018 [Available from: <https://thepigsite.com/articles/prebiotics-and-probiotics-boost-pig-growth-and-health>].
142. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods.* 2019;8(3):92.
143. Yang CM, Ferket PR, Hong QH, Zhou J, Cao GT, Zhou L, et al. Effect of chito-oligosaccharide on growth performance, intestinal barrier function, intestinal morphology and cecal microflora in weaned pigs. *J Anim Sci.* 2012;90(8):2671-6.
144. Liao SF, Nyachoti M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr.* 2017;3(4):331-43.
145. Barba-Vidal E, Martin-Orue SM, Castillejos L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livestock Science.* 2019;223:84-96.
146. Bajagai YS, Klieve AV, Dart PJ, Bryden WL. Probiotics in Animal Nutrition - Production, impact and regulation. Food and Agriculture Organization of the United Nation, editor. Rome, Italy: FAO; 2016. 108 p.
147. Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. 2017;7(2161).
148. Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control.* 2009;20(2):157-60.
149. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology.* 2004;94(3):223-53.
150. Bayir AG, Kiziltan HS, Kocyigit A. Chapter 1 - Plant Family, Carvacrol, and Putative Protection in Gastric Cancer. In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Academic Press;* 2019. p. 3-18.

151. Antonia N, Teresa P. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 2012;7(1):28-35.
152. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*. 2016;210:402-14.
153. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. 1999;29(2):130-5.
154. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. 2005;49(6):2474-8.
155. Xu J, Zhou F, Ji B-P, Pei R-S, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. 2008;47(3):174-9.
156. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:39-.
157. Smith BA, Meadows S, Meyers R, Parmley EJ, Fazil A. Seasonality and zoonotic foodborne pathogens in Canada: relationships between climate and *Campylobacter*, *E. coli* and *Salmonella* in meat products. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e190.
158. Government of Canada. Yearly food-borne illness estimates for Canada 2016 [Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/food-borne-illness-canada/yearly-food-borne-illness-estimates-canada.html>].
159. Rajic A, Keenliside J, McFall ME, Deckert AE, Muckle AC, O'Connor BP, et al. Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. *Vet Microbiol*. 2005;105(1):47-56.
160. Wilkins W, Rajić A, Waldner C, McFall M, Chow E, Muckle A, et al. Distribution of *Salmonella* serovars in breeding, nursery, and grow-to-finish pigs, and risk factors for shedding in ten farrow-to-finish swine farms in Alberta and Saskatchewan. *Can J Vet Res*. 2010;74(2):81-90.
161. Khan CMA. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *International Scholarly Research Notices*. 2014;2014:846049.
162. Graziani C, Losasso C, Luzzi I, Ricci A, Scavia G, Pasquali P. *Salmonella*. In: Dodd C, Aldsworth T, Stein R, Cliver D, Riemann H, editors. *Foodborne Diseases 2017*. p. 133-69.
163. WHO. Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY) [Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/].
164. Department of Health Statistics and Information Systems. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2011 2013 [Available from: https://www.who.int/healthinfo/statistics/GlobalDALYmethods_2000_2011.pdf?ua=1].
165. FOODBORNE DISEASE BURDEN EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP. WHO ESTIMATES OF THE GLOBAL BURDEN OF FOODBORNE DISEASES 2015 [Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf].
166. SSSQ. Maladies à déclaration obligatoire (MADO) et signalements en santé publique 2019 [Available from: <https://msss.gouv.qc.ca/professionnels/maladies-a-declaration-obligatoire/mado/demarche-pour-les-laboratoires/>].

167. Government of Canada. Surveillance de la salmonellose (Salmonella) 2016 [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/salmonellose-salmonella/surveillance.html>].
168. Iowa State University. Salmonellosis [Available from: <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/salmonellosis>].
169. Bonardi S. Salmonella in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect.* 2017;145(8):1513-26.
170. Lo Fo Wong DMA, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altrock A, et al. Herd-level risk factors for subclinical Salmonella infection in European finishing-pig herds. *Preventive Veterinary Medicine.* 2004;62(4):253-66.
171. Backhans A, Fellström C. Rodents on pig and chicken farms – a potential threat to human and animal health. *Infection Ecology & Epidemiology.* 2012;2(1):17093.
172. Ministère de l'Agriculture de l'alimentation et des affaires rurales. On-Farm Control of Salmonella in Pork Production 2016 [Available from: http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/swine/facts/info_qs_salmonella.htm].
173. Swanenburg M, van der Wolf PJ, Urlings HAP, Snijders JMA, van Knapen F. Salmonella in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of Salmonella in pork. *International Journal of Food Microbiology.* 2001;70(3):231-42.
174. Botteldoorn N, Heyndrickx M, Rijpens N, Grijspeerdt K, Herman L. Salmonella on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. 2003;95(5):891-903.
175. KORSAK N, DAUBE G, GHAFIR Y, CHAHED A, JOLLY S, VINDEVOGEL H. An Efficient Sampling Technique Used To Detect Four Foodborne Pathogens on Pork and Beef Carcasses in Nine Belgian Abattoirs. *Journal of Food Protection.* 1998;61(5):535-41.
176. Borewicz KA, Kim HB, Singer RS, Gebhart CJ, Sreevatsan S, Johnson T, et al. Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with Salmonella enterica and Lawsonia intracellularis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139106.
177. Drumo R, Pesciaroli M, Ruggeri J, Tarantino M, Chirullo B, Pistoia C, et al. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Modify Swine Intestinal Microbiota. 2016;5(106).
178. Bearson BL, Bearson SMD. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbial Pathogenesis.* 2008;44(4):271-8.
179. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and environmental microbiology.* 2006;72(1):946-9.
180. Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. Intestinal short-chain fatty acids alter Salmonella typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol.* 2002;46(5):1451-64.
181. Grigg JB, Sonnenberg GF. Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases. *J Immunol.* 2017;198(2):564-71.
182. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.

183. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological reviews*. 2017;279(1):70-89.
184. Rhouma M, Braley C, Thériault W, Thibodeau A, Quessy S, Fravalo P. Evolution of Pig Fecal Microbiota Composition and Diversity in Response to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection and Colistin Treatment in Weaned Piglets. 2021;9(7):1459.
185. Humphreys C. 19 - Intestinal Permeability. In: Pizzorno JE, Murray MT, editors. *Textbook of Natural Medicine (Fifth Edition)*. St. Louis (MO): Churchill Livingstone; 2020. p. 166-77.e4.
186. Quigley EMM, Gajula P. Recent advances in modulating the microbiome. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-46.
187. Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*. 2020;39(26):4925-43.
188. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology*. 2017;25(10):851-73.
189. Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. 2006;8(7):1191-9.
190. Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L, Zhang H. Effects of Adding Essential Oil to the Diet of Weaned Pigs on Performance, Nutrient Utilization, Immune Response and Intestinal Health. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2012;25(11):1617-26.
191. Jiao LF, Song ZH, Ke YL, Xiao K, Hu CH, Shi B. Cello-oligosaccharide influences intestinal microflora, mucosal architecture and nutrient transport in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2014;195:85-91.
192. Castillo M, Martín-Orúe SM, Taylor-Pickard JA, Pérez JF, Gasa J. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function¹. *Journal of Animal Science*. 2008;86(1):94-101.
193. Hu Y, Dun Y, Li S, Zhang D, Peng N, Zhao S, et al. Dietary *Enterococcus faecalis* LAB31 Improves Growth Performance, Reduces Diarrhea, and Increases Fecal *Lactobacillus* Number of Weaned Piglets. *PLOS ONE*. 2015;10(1):e0116635.
194. Asai T, Otagiri Y, Osumi T, Namimatsu T, Hirai H, Sato S. Isolation of *Salmonella* from diarrheic feces of pigs. *J Vet Med Sci*. 2002;64(2):159-60.
195. Thanissery R, Kathariou S, Smith DP. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. *Journal of Applied Poultry Research*. 2014;23(2):221-7.
196. Macfarlane GT, Macfarlane S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18(2):156-62.
197. Hegner R, Koch C, Riechert V, Harnisch F. Microbiome-based carboxylic acids production: from serum bottles to bioreactors. *RSC Advances*. 2017;7(25):15362-71.
198. Au - Ziv N, Au - Brandt NJ, Au - Gresham D. The Use of Chemostats in Microbial Systems Biology. *JoVE*. 2013(80):e50168.
199. Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microbial Ecology*. 1998;35(2):180-7.

200. Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, Possemiers S, Marzorati M. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME[®]). In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer

Copyright 2015, The Author(s). 2015. p. 305-17.

201. Tompkins TA, Mainville I, Arcand Y. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Benef Microbes*. 2011;2(4):295-303.

202. Staroscik A. Calculator for determining the number of copies of a template: URI Genomics & Sequencing Center; 2004 [Available from: <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>].

203. Castillo M, Martin-Orue SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martin M, Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet Microbiol*. 2006;114(1-2):165-70.

204. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, et al. *Community Ecology Package*. 2.6-0 ed.

205. Martinez Arbizu P. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4 ed2020.

206. O'Donnell MM, Rea MC, Shanahan F, Ross RP. The Use of a Mini-Bioreactor Fermentation System as a Reproducible, High-Throughput ex vivo Batch Model of the Distal Colon. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1844-.

207. Emerson JB, Adams RI, Román CMB, Brooks B, Coil DA, Dahlhausen K, et al. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*. 2017;5(1):86.

208. Papanicolas LE, Choo JM, Wang Y, Leong LEX, Costello SP, Gordon DL, et al. Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine*. 2019;41:509-16.

209. Oren A. The Family Methanobacteriaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 165-93.

210. Karami A, Sarshar M, Ranjbar R, Zanjani RS. The Phylum Spirochaetaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 915-29.

211. Auchtung JM, Robinson CD, Britton RA. Cultivation of stable, reproducible microbial communities from different fecal donors using minibioreactor arrays (MBRAs). *Microbiome*. 2015;3(1):42.

212. Sato Y, Zhao Y-J, Hori T, Aoyagi T, Inaba T, Aizawa H, et al. Transition of microbial community structures after development of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs). *AMB Express*. 2020;10(1):18.

213. McDonald JAK, Schroeter K, Fuentes S, Heikamp-deJong I, Khursigara CM, de Vos WM, et al. Evaluation of microbial community reproducibility, stability and composition in a human distal gut chemostat model. *Journal of Microbiological Methods*. 2013;95(2):167-74.

214. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. 2012;3(4):289-306.

215. Holman DB, Brunelle BW, Trachsel J, Allen HK. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. 2017;2(3):e00004-17.

216. Mushegian AA. Sources of variation: Animal microbiota. 2017;10(467):eaam9011.
217. Li F, Li C, Chen Y, Liu J, Zhang C, Irving B, et al. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. *Microbiome*. 2019;7(1):92.
218. Thibodeau A, Letellier A, Yergeau É, Larrivière-Gauthier G, Fravalo P. Lack of Evidence That Selenium-Yeast Improves Chicken Health and Modulates the Caecal Microbiota in the Context of Colonization by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:451-.
219. Zhai H, Liu H, Wang S, Wu J, Klünter A-M. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*. 2018;4(2):179-86.
220. El Atki Y, Aouam I, Taroq A, Gouch A, Badiaa L, el Kamari F. Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019;11:306-9.
221. Langlais M. Modulation de l'action antimicrobienne in vitro d'extraits de plantes en condition de compétition par un dérivé de microbiote d'origine fécale porcine. Montreal: Université de Montréal; 2019.
222. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol*. 2015;6:58-.
223. Wei HK, Xue HX, Zhou ZX, Peng J. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal*. 2017;11(2):193-201.
224. Van Noten N, Degroote J, Van Liefferinge E, Taminau B, De Smet S, Desmet T, et al. Effects of Thymol and Thymol α -D-Glucopyranoside on Intestinal Function and Microbiota of Weaned Pigs. *Animals (Basel)*. 2020;10(2):329.
225. Yap GC, Hong PY, Lee BW. MICROFLORA OF THE INTESTINE | The Natural Microflora of Humans. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 634-8.
226. Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res*. 2016;14(2):127-38.
227. Iljazovic A, Roy U, Gálvez EJC, Lesker TR, Zhao B, Gronow A, et al. Perturbation of the gut microbiome by *Prevotella* spp. enhances host susceptibility to mucosal inflammation. *Mucosal Immunology*. 2021;14(1):113-24.
228. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(S2):S1-S63.