

Université de Montréal

**ÉVALUATION DU LIEN ENTRE LA CAUDOPHAGIE ET LE MICROBIOTE
INTESTINAL CHEZ LE PORC**

par Nassima RABHI

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

Juillet 2018

© Nassima Rabhi, 2018

Résumé

La caudophagie chez le porc est un comportement qui se définit comme étant le mordillage de la queue entre congénères. Ce désordre comportemental représente un énorme défi dans la production porcine, car il engendre des pertes économiques considérables et affecte lourdement le bien-être animal. Il y a actuellement certaines solutions qui sont mises en place pour atténuer le phénomène, comme par exemple l'enrichissement du milieu ou la caudectomie, mais ces solutions ne sont pas optimales ou présentent des enjeux importants quant au bien-être animal. L'alimentation a aussi un impact sur la caudophagie et elle pourrait être liée au microbiote intestinal. Chez l'humain, le microbiote intestinal pourrait être un modulateur du comportement à travers une action qui passe par l'axe microbiote intestinal-cerveau. Le but de cette étude était d'évaluer le lien entre la caudophagie et le microbiote intestinal chez le porc. Le microbiote intestinal de porcs mordeurs et de porcs mordus a été comparé à celui de porcs-contrôle négatifs (ni mordeurs, ni mordus). Les différents groupes de porcs (n= 36 au total) ont été sélectionnés au début de l'engraissement par l'analyse d'un comportement cible centré sur le mordillage de la queue (groupe mordeur) et une grille de notation de dommages pour la queue (groupe mordu). Des échantillons composites de matières fécales ont été prélevés au début et à la fin d'un épisode de caudophagie dans un élevage commercial adapté pour y effectuer des recherches terrains. L'hormone de stress (cortisol) a aussi été dosée en utilisant un test ELISA réalisé à partir d'échantillons sanguins.

En utilisant le séquençage du segment V4 des gènes codant pour l'ARNr 16S, l'étude de la structure et de la composition du microbiote intestinal des différents groupes a été effectuée (NMDS, LEfse). Une technique de PCR quantitative (qPCR) a été également utilisée pour quantifier les lactobacilles dans les différents groupes. Pour la diversité bêta, la structure du microbiote intestinal des porcs mordeurs et des porcs mordus était différente de celle des porcs-contrôle négatifs quant à l'abondance relative des unités taxonomiques opérationnelles. En ce qui concerne la composition, entre autres, les *Lactobacillus* ont été significativement plus associées aux porcs-contrôle négatifs. Les résultats par qPCR ont montré des quantités supérieures de lactobacilles chez ce même groupe. Cependant, pour la diversité alpha, aucune différence significative n'a été remarquée entre les différents

groupes. Le taux de cortisol était significativement plus élevé chez les porcs mordeurs et les porcs mordus versus les porcs-contrôle négatifs ($p=0,02$, $p=0,0076$ respectivement). Cette étude démontre pour la première fois que la caudophagie est associée à la structure et la composition du microbiote intestinal chez le porc.

Mots-clés : Porcs, microbiote intestinal, trouble du comportement, caudophagie.

Abstract

Tail biting is a behavior problem seen in pigs defined by the act of nibbling of the tail of a penmate. This behavioral disorder represents an important challenge in porcine production because it generates substantial economic losses and affects animal welfare. Some solutions are already in place to minimize this phenomenon, such as enriching the environment or tail docking, but they are either not optimal or present issues for animal welfare. Diet has been shown to have an effect on tail biting and this could be because of changes in the intestinal microbiota. In humans, intestinal microbiota has been shown to modulate behavior. This action would be a part of the so-called brain-intestinal microbiota axis. This study aimed to evaluate the association between tail-biting and intestinal microbiota in pigs. The intestinal microbiota of biter and bitten pigs was compared to a negative control group (non-biter and non-bitten). The different groups of pigs (n=36 in total) were selected at the beginning of the growing/finishing phase by the analysis of a targeted behavior analysis centered on tail-biting (biter group) and a notation grid of damages caused to the tail (bitten group). Composite sample of fecal matter were sampled at the beginning and at the end of a tail-biting episode. Serum cortisol was measured by an ELISA assay.

The V4 segment of the 16S rRNA gene was sequenced in order to study the structure and composition of the IM and quantitative PCR (qPCR) method was used to quantify lactobacilli in the different groups. The beta diversity analysis revealed a significant difference between the intestinal microbiota structure of biter and bitten pigs in comparison to the negative control group in terms of relative abundance of operational taxonomic unit. For the composition, *Lactobacillus*, compared to other groups, were significantly more associated with the negative control group (p=0.001). Results of qPCR showed higher levels of lactobacilli in this same group. However, no significant differences were found in alfa diversity analysis. Cortisol levels were significantly higher in biter and bitten pigs in comparison to the negative control group (p=0.02, p=0.0076 respectively). This study demonstrates that tail-biting is associated to the IM structure and composition in pigs.

Key words: Pigs, intestinal microbiota, behavioral disorder, tail-biting.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	x
CHAPITRE 1 Introduction.....	1
CHAPITRE 2 Recension de la littérature	4
1. Troubles du comportement chez le porc.....	5
1.1 Processus de développement de la caudophagie.....	6
1.2 Conséquences de la caudophagie.....	8
1.2.1 Pertes économiques.....	8
1.2.2 Sur le bien-être animal.....	9
1.2.3 Sur l'innocuité de la viande.....	9
1.3 Facteurs de risque de la caudophagie.....	9
1.3.1 Environnement.....	9
1.3.2 Problèmes de santé.....	10
1.3.3 Nutrition.....	10
1.3.4 Génétique, sexe et caractéristiques individuelles.....	11
1.4 Stress.....	12
1.5 Identification et traitement de la caudophagie.....	13
1.6 Moyens de prévention de la caudophagie.....	14
1.6.1 Caudectomie.....	14
1.6.2 Enrichissement de l'environnement.....	15
1.6.3 Alimentation	15
2 Microbiote intestinal.....	17
2.1 Présentation du microbiote intestinal.....	17
2.2 Composition et diversité du microbiote intestinal.....	18
2.3 Méthodes de caractérisation moléculaire du microbiote intestinal	19

2.4	Facteurs qui influencent la composition du microbiote intestinal.....	22
2.5	Principales fonctions du microbiote intestinal.....	23
2.5.1	Fonction trophique.....	23
2.5.2	Fonctions métaboliques.....	23
2.5.3	Fonctions immunitaires.....	24
2.5.4	Fonction cérébrale.....	24
2.6	Relation entre le microbiote intestinal et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	24
2.7	Voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau.....	26
2.7.1	Voie métabolique.....	26
2.7.2	Voie nerveuse.....	26
2.7.3	Voie endocrine.....	26
2.7.4	Voie immune.....	26
2.8	Effets du microbiote intestinal sur le comportement.....	27
2.9	Effets de manipulation du microbiote intestinal sur le comportement.....	28
3.	Problématique générale et objectifs.....	29
CHAPITRE 3 Matériel, méthodes et résultats		31
Abstract.....		33
Introduction		34
i.	Materials and Methods.....	36
a.	Animals and housing.....	36
b.	Behavioral assessment	36
c.	Blood and feces sampling.....	39
d.	ELISA targeting stress hormone.....	39
e.	Sequencing of 16s ribosomal RNA genes	39
f.	Real-time quantitative polymerase chain reaction of specific bacterial populations.....	41
g.	Statistical analysis.....	41
ii.	Results.....	42
a.	Tail-biting behaviour.....	42
b.	Behavior and tails condition through the study.....	43

c. Variation of serum cortisol concentration.....	43
d. Alpha and beta diversity.....	44
e. Real-time quantitative polymerase chain reaction.....	48
iii. Discussion.....	49
Conclusion.....	52
Supplementary material.....	53
CHAPITRE 4. Discussion générale.....	62
CHAPITRE 5. Conclusion.....	71
Bibliographie	73

Liste des tableaux

Table 1. Ethogram: behavior noted during the growing period.....	37
Table 2. Comparison of alpha-diversity indices of the intestinal microbiota of selected groups.....	45
Table 3. Comparison of beta-diversity of the intestinal microbiota of selected groups....	46
Table 4. OTU and genera associated with biter pigs versus negative control pigs, at t0.....	55
Table 5. OTU and genera associated with biter pigs versus negative control pigs, at t1.....	57
Table 6. OTU and genera associated with bitten pigs versus negative control pigs, at t0.....	58
Table 7. OTU and genera associated with bitten pigs versus negative control pigs, at t1.....	60

Liste des figures

Figure 1. Grille de notation des morsures de la queue à la ferme	8
Figure 2. Organisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	13
Figure 3. Voies de communication possibles entre le microbiote intestinal et le cerveau.....	27
Fig. 4 Diagram showing bites number for each pig over a one week observation period and threshold retained to select biter pigs within the 10 pens where tail-biting was present.....	42
Fig. 5 Variation of tail-biting in biters over time	43
Fig. 6 Diagram representing the average cortisol serum concentrations of biter and bitten pigs versus the negative control pigs during a tail-biting episode.....	44
Fig. 7 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the comparison of intestinal microbiota of biter and bitten pigs versus the negative control pigs.....	47
Fig. 8 Diagram illustrating the average log of gene copy numbers of lactobacilli in biter and bitten pig's fecal matter samples versus the negative control pigs during the tail-biting episode.....	49
Fig. 9 On farm experimental setting.....	53
Fig. 10 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the comparison of intestinal microbiota of the ATB treated positive control group with the negative control pigs.....	54

Liste des abréviations

ACTH : adrénocorticotropine.

ADN : acide desoxyribonucléique (ADNr 16S : ADN ribosomique sous unité 16S).

ARN : acide ribonucléique (ARN 16S : ARN ribosomique sous unité 16S).

ATB : antibiotique.

CP : caudophagie.

CRF : corticotropin releasing factor.

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay.

g : gramme.

GC : glucocorticoïdes.

HHS : Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien.

HPA : hypothalamic-pituitary-adrenal.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

LPS : lipopolysaccharide.

m² : mètre carré.

MetaHit : méta génome intestinal humain.

MI : microbiote intestinal.

NMDS : non-metric Multidimensional Scaling.

OTU : Unités Taxonomiques Opérationnelles.

PCR : polymerase chain reaction.

qPCR : PCR quantitative.

RDP : Ribosomal Database Project.

SPF : specific pathogen free.

SSP : espèce.

T : température.

t : temps.

UE : Union Européenne.

UFC : unité formatrice de colonies.

Ce mémoire est dédié à toutes personnes sensibles au bien-être animal.

Remerciements

Merci à mon directeur de recherche, Dr Sylvain Quessy, de m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire, et son support tout au long du projet.

Merci à mes codirecteurs, Dr Nicolas Devilliers et Dr Luigi Faucitano pour leur support et aide durant le projet.

Merci à mes collègues de la Chaire de recherche en salubrité des viandes pour leur aide et leurs précieux conseils.

Merci aux membres de mon comité-conseil et aux membres de jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci à ma famille pour leur soutien constant tout au long de mes études et plus particulièrement Slimane, Assia et Amel.

Merci à mes parents qui sont toujours là pour moi, et c'est grâce à eux si je suis arrivée jusque-là.

Merci à mon conjoint pour son soutien, sans oublier ma raison de vivre, ma fille Mélanie.

Merci à mes amis Alberto, Élodie, Mélodie, Fanie, Ilhem, Hamadouche pour leur aide et encouragement.

CHAPITRE 1. Introduction

L'élevage de porcs charcutiers, particulièrement les élevages intensifs de nature industrielle, peut être affectés par différents problèmes de santé ou comportementaux. Parmi ces derniers, se trouvent la caudophagie (CP) chez le porc qui se traduit par le mordillage de la queue entre congénères. En effet, un ou plusieurs porcs peuvent être sévèrement mordus (Valros et Heinonen, 2015). Ce phénomène, assimilé à du cannibalisme (Taylor *et al.*, 2010), est considéré comme un trouble de comportement grave (Temple *et al.*, 2014). D'ailleurs, 30 % à 70 % des fermes présenteraient des problèmes épisodiques de CP (EFSA, 2007).

Par ailleurs, la CP représente un énorme défi pour la production porcine, car elle engendre des pertes économiques considérables (Zonderland *et al.*, 2011). À titre d'exemple, la condamnation à l'abattoir des carcasses affectées entraîne des pertes d'environ 1,27\$ par porc produit en République d'Irlande (Harley *et al.*, 2014). En outre, la CP affecte lourdement le bien-être de l'animal du fait des infections et des inflammations induites (Schroder-Pedersen et Simonsen, 2001; Sihvo *et al.*, 2012; Di Giminiani *et al.*, 2017). De même, les risques de propagation des pathogènes ou de contamination croisée de la viande à l'abattoir ne sont pas négligeables affectant l'innocuité de ce produit alimentaire (Valros *et al.*, 2004).

Les facteurs de risque les plus importants associés à la CP sont liés à un environnement stressant, à l'alimentation, aux problèmes de santé de l'animal et enfin aux caractéristiques individuelles, de genre et à la génétique de ce dernier (Moinard *et al.*, 2003; EFSA, 2007; D'Eath *et al.*, 2014; Nannoni *et al.*, 2014). Toutefois, il n'y a pas assez d'informations sur les liens possibles entre ces différents facteurs de risque, ce qui rend difficile de cibler ce qui déclenche réellement ce phénomène (Brunberg *et al.*, 2016).

Des mesures de prévention provisoires ont été prises en attendant d'élucider de façon précise, l'origine de ce phénomène, comme la caudectomie et l'enrichissement de l'environnement (EFSA, 2007) qui sont les seules mesures appliquées à ce jour. Néanmoins, ces solutions temporaires présentent des lacunes. Un autre moyen de prévention, encore au stade expérimental, a été mis de l'avant. Il consiste en l'ajout de

quelques acides aminés comme le tryptophane dans l'alimentation. Cela a abouti à la diminution du comportement agressif chez le porc, ce qui suggère que la diète peut jouer un rôle important dans le phénomène de la morsure de la queue (McIntyre et Edwards, 2002). Dans leur revue littérature, Brunberg *et al.* (2016) ont émis l'hypothèse que les porcs mordeurs ont une composition du microbiote intestinal (MI) différente de celle des porcs qui ne présentent pas ce comportement. Les technologies de séquençage ont permis de montrer que le MI est un écosystème complexe de micro-organismes (Ley *et al.*, 2006). Il aiderait l'organisme par des fonctions métaboliques (Hooper *et al.*, 2001; Delzenne *et al.*, 2011), trophiques (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004) et immunitaires (Sommer et Bäckhed, 2013). Cependant, sa composition peut être influencée par plusieurs éléments, tels le stress (O'Mahony *et al.*, 2010; Luna et Foster, 2015), les maladies intestinales (Di Mauro *et al.*, 2013), les antibiotiques (Robinson et Young, 2010), la génétique (Goodrich *et al.*, 2014) et l'alimentation (David *et al.*, 2014; Zeevi, 2015). Un seul ou l'ensemble de ces facteurs sont susceptibles de provoquer un déséquilibre microbien et causer diverses maladies (Lepage *et al.*, 2013).

Par ailleurs, en physiologie humaine, il y a actuellement des recherches pour éclaircir la relation entre les réponses au stress et le MI, appelé l'axe microbiote intestinal-cerveau (axe bi-directionnel) (Cryan et Dinan, 2012; Collins *et al.*, 2012; Wang et Kasper, 2014). D'autres recherches effectuées chez la souris, dévoilent un rôle du MI dans la programmation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). En effet, il est maintenant établi que les pathogènes intestinaux, tels certains types d'*Escherichia coli*, peuvent activer l'axe HHS (Zimomra *et al.*, 2011). D'un autre côté, l'augmentation de certaines souches bactériennes comme *Bifidobacterium infantis* peuvent avoir pour effet l'augmentation du tryptophane (un précurseur du neurotransmetteur sérotonine) (Desbonnet *et al.*, 2008). Enfin, l'hormone de stress (cortisol) peut agir sur la perméabilité intestinale et la fonction barrière, et ainsi modifier la composition du MI (Gareau, 2008).

L'hypothèse de base de ce projet est que le comportement de CP chez le porc est lié à une modification de la composition du MI.

CHAPITRE 2. Recension de la littérature

1 Troubles du comportement chez le porc

Le sanglier (*Sus scrofa*), l'ancêtre du porc, était un animal qui vivait naturellement à l'état sauvage dans la forêt. L'homme a pu le domestiquer, il y a de cela près de 9000 ans (Gustafsson *et al.*, 1999). Pour se nourrir, ils avaient développé des comportements exploratoires et de fouissement. Ils étaient curieux de découvrir leurs espaces de vie et, pour le faire, utilisaient leur groin et leur odorat très développé (Stolba, 1989). Il convient aussi de noter que la communauté des porcs est très hiérarchisée. Pour établir leur rang dans cette hiérarchie, ils se battent souvent entre eux, se poussent et se mordent les uns les autres (Sonoda *et al.*, 2013).

La domestication des porcs par l'homme a changé complètement leur mode de vie. En effet, leur nouvel environnement est totalement différent des habitats naturels où leurs ancêtres avaient vécu; des sélections génétiques ont été opérées pour modifier leur morphologie et augmenter leur prolificité et leur taux de croissance (Mason et Rushen, 2006). À titre d'exemple, le poids moyen d'un porcelet à la naissance est de 1.5 kg. De nos jours, au bout de cinq à 6 mois, son poids passe à environ 113 kg, alors qu'auparavant, le sanglier n'atteignait que plus de 70 kg à environ l'âge de deux ans. Vers trois semaines après leur naissance, les porcs sont retirés à leurs génitrices (sevrage des porcs) (Vignola, 2002). Ils sont placés en général dans des enclos et évoluent sur un sol entièrement ou partiellement latté jusqu'à l'âge de l'abattage qui a lieu de 5 à 6 mois d'âge (Moinard *et al.*, 2003).

Ces changements marqués par rapport à l'environnement où évoluaient leurs ancêtres qui vivaient dans la nature ont transformé le porc en un animal très sensible à des facteurs environnementaux comme la chaleur, le froid, le bruit et la lumière, ce qui fait que plusieurs d'entre eux ont développé des troubles de comportements graves dans les conditions d'élevages modernes (Studnitz *et al.*, 2007). À ce propos, on peut citer la stéréotypie, observée chez certaines truies durant la gestation, où elles répètent régulièrement et sans but précis le même mouvement, comme le mordillage des barreaux de leurs cages (Clubb et Mason, 2007), et le cannibalisme alors qu'un ou plusieurs porcs peuvent être mordus sévèrement sur différentes parties du corps (oreilles, queues, etc).

En particulier, le mordillage de la queue, ou caudophagie, constitue un problème significatif au sein de l'élevage porcin (Clubb et Mason, 2007; CIWF, 2012). C'est à partir des années 1990 que ce phénomène a été considéré comme un problème important (Smulders *et al.*, 2008), en bonne partie à cause des conséquences économiques significatives qu'il engendre (Taylor *et al.*, 2012; Valros *et al.*, 2015). L'incidence moyenne de la CP varierait entre 1,3 et 7,2 % au niveau de l'animal. Cette évaluation est toutefois basée sur des études portant sur des lésions à l'abattoir et non sur la manipulation de la queue (Taylor *et al.*, 2010). Il faut donc considérer que l'incidence réelle de la CP pourrait être plus importante, et ce, pour deux raisons:

- Les études effectuées reflètent seulement l'état des queues à l'abattoir; alors qu'il existe d'autres cas, non répertoriés comme ceux des porcs morts ou euthanasiés à la ferme.
- Les conditions des études portant sur ce phénomène de CP peuvent grandement différer. Par ailleurs, il a été rapporté, en 2004, que la fréquence des morsures de queues constatées à la ferme serait le double de celle détectée lors de l'inspection des carcasses à l'abattoir (Busch *et al.*, 2004).

1.1 Processus de développement de la caudophagie

Le mordillage de la queue constitue une manipulation orale, par le porc, de la queue de son congénère. Ceci cause des égratignures ou des plaies ouvertes (Temple *et al.*, 2014). Le développement de ce phénomène se fait en trois étapes (Ifip, 2016):

1^{ère} étape : le porc mord (porc mordeur) la queue de son congénère (porc mordu), mais sans causer de blessures ni de lésions. Il est dans un état d'excitation et d'agitation élevée (Ursinus *et al.*, 2014); 2^{ème} étape : présence de quelques griffures sur la queue qui deviennent peu à peu saignantes chez certains porcs mordus (Studnitz *et al.*, 2007); 3^{ème} étape : la présence du sang attire d'autres porcs, ce qui provoque l'aggravation des morsures et blessures jusqu'à produire la perte d'une partie de la queue (Paoli, 2016; Statham *et al.*, 2009).

Cependant, il est intéressant de noter que différents types de morsures de la queue ont été identifiées, selon la motivation qui amène le porc à mordre (Temple *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2010) :





1. Morsure en deux étapes : Elle serait due à l'absence de matériaux adéquats à manipuler (chaînes, pailles...). Dans la **première étape**, le porc mord la queue de son semblable sans provoquer de blessures. Lors de la **deuxième étape**, le porc mord toujours la queue de son congénère, mais en causant des lésions sanglantes, et le sang ravive la curiosité des autres porcs. Ce genre de morsures n'a aucune intention agressive, mais elle est vue comme une exploration redirigée (Studnitz *et al.*, 2007).

2. Morsure soudaine et forte : elle est liée à une bataille pour des besoins vitaux comme la nourriture, l'eau, l'espace, etc. C'est pour cela qu'elle se manifeste de façon agressive (Hansen et Hagelsø, 1980; EFSA, 2007). D'ailleurs, d'après Palander *et al.* (2013) la CP augmente de 60% lorsque l'accès à la nourriture est réduit.

3. Morsure obsessionnelle : les porcs se mordent la queue entre eux plus longtemps et d'une façon compulsive durant la période de l'engraissement. Il faut souligner que ce sont les porcs plus chétifs du groupe qui sont habituellement dans cette catégorie (Temple *et al.*, 2014).

Pour vérifier l'état des queues, une grille de notation a été élaborée et est souvent utilisée comme outil d'évaluation de la gravité des morsures dans un élevage (figure 1).

Figure 1. Grille de notation des morsures de la queue à la ferme (adapté d’Ifip, 2016).

	<p>Score 0 : Absence de lésions</p>
	<p>Score 1 : Présence de griffures</p>
	<p>Score 2 : Présence d’une lésion saignante de taille réduite</p>
	<p>Score 3 : Lésion importante avec parfois perte d’une partie de la queue</p>

1.2 Conséquences de la caudophagie

1.2.1 Pertes économiques

La CP a des incidences économiques importantes puisque plusieurs animaux succombent à leurs blessures et leurs complications systémiques. Il faut ajouter à cela, les frais de traitement (médicaments et personnel) (D’Eath *et al.*, 2016) et le ralentissement de l’engraissement du porc qui est estimé à 0,59 € par porc (Harley *et al.*, 2014). Aussi, les carcasses affectées sont en général condamnées à l’abattoir, soit en partie ou en totalité (Harley *et al.*, 2012; CIWF, 2012), entraînant des pertes d’environ 1,10 € par porc (Harley *et al.*, 2014). À titre illustratif, en 1999, au Royaume-Uni, les pertes nettes pour l’industrie porcine, ont été évaluées à 3,5 millions de livres (Moinard *et al.*, 2003); alors qu’en 2011, aux Pays-Bas, les pertes ont été estimées à plus de 8 millions d’euros (Zonderland *et al.*, 2011). Nous n’avons pu trouver d’études semblables sur les coûts associés à ce phénomène au Canada.

1.2.2 Sur le bien-être animal

L'une des problématiques majeures reliée à ce phénomène de CP est le bien-être des porcs qui en sont victimes. En effet, les morsures et les dommages de la queue causent de la douleur (Di Giminiani *et al.*, 2017) et du stress (Munsterhjelm *et al.*, 2013) chez les porcs mordus. La présence de plaies ouvertes peut entraîner des infections qui se développent jusqu'à atteindre la colonne vertébrale des animaux et ensuite provoquer des abcès pulmonaires. Ces infections peuvent même causer une septicémie (Schroder-Pedersen et Simonsen, 2001; Sihvo *et al.*, 2012; Di Giminiani *et al.*, 2017).

1.2.3 Sur l'innocuité de la viande

Le mordillage de la queue chez les porcs pourrait être un réel danger pour l'innocuité de la viande. En effet, la queue mordue peut s'infecter et transporter des micro-organismes pathogènes (Valros *et al.*, 2004), comme *Staphylocoques aureus*, et accroît les risques de contamination croisée de la viande à l'abattoir. En effet, la détection et la présence de ces abcès constituent un Point de Contrôle Critique biologique dans les modèles HACCP dans les usines de transformation.

1.3 Facteurs de risque de la caudophagie

Un nombre important d'études épidémiologiques a permis d'identifier plusieurs facteurs de risques. La plupart sont susceptibles d'augmenter le stress chez un porc, tel un environnement inadéquat, des problèmes de santé, ou une alimentation carencée. D'autres sont associés au genre et la génétique (Edward, 2006; Nannoni *et al.*, 2014; Telkänranta *et al.*, 2014).

1.3.1 Environnement

Il a été démontré que l'environnement d'élevage a une influence sur le comportement; il peut générer de l'agitation, de la frustration et du stress chez le porc. De même, les variations de température, les courants d'air, les taux d'ammoniac ambiant et le type du sol influencent l'animal (Nannoni *et al.*, 2014). À titre d'exemple, l'utilisation de sols en caillebotis dans beaucoup de pays, lequel ne permet pas l'ajout de pailles ou d'autres matériaux manipulables dans les enclos, favorise l'apparition de ce trouble de

comportement chez le porc (Scollo *et al.*, 2017; D'Eath *et al.*, 2016; Sonoda *et al.*, 2013; EFSA, 2007).

De plus, la réduction des espaces prévus pour l'alimentation et l'eau peut être un facteur de risque non négligeable car cela engendre une compétition pour ces ressources vitales. Cette situation accroît la frustration chez certains porcs (Moinard *et al.*, 2003; EFSA, 2007). Pourtant, le code pratique sur le bien-être des animaux est précis. Il indique que la surface minimale doit être de 0,65 m² pour le porc pesant entre 85 et 110 kg (Courboulay, 2006). Lorsque cette mesure n'est pas respectée, cela entraîne une plus forte densité des porcs dans un enclos et peut ainsi favoriser l'apparition du phénomène de CP (Moinard *et al.*, 2003).

1.3.2 Problèmes de santé

La CP peut aussi être le résultat de stress causé par des problèmes de santé (Nannoni *et al.*, 2014). En effet, il a été démontré par Moinard *et al.* (2003) qu'il existe une forte corrélation entre la prévalence de maladies en générale chez certains porcs et le phénomène de CP à la ferme. Lorsque l'organisme est sujet au stress, ses capacités immunitaires se trouvent amoindries (Shini *et al.*, 2010). Cependant, ce lien reste encore à valider selon certains auteurs (D'Eath *et al.*, 2014).

1.3.3 Nutrition

Schroder-Pedersen et Simonsen (2001) ont reporté un taux de croissance et d'engraissement réduits chez les porcs mordeurs. La faible ingestion alimentaire probablement due à une morphologie jéjunale anormale en peut être la cause (Palander *et al.*, 2013). Le type et la composition de l'aliment peuvent affecter la CP. Les résultats des études sur la relation entre la CP et le type d'alimentation sont contradictoires. En fait, une augmentation de la fréquence de blessures de la queue a été observée soit chez les porcs alimentés avec la moulée cubée comparés à ceux recevant une alimentation liquide (Hunter *et al.*, 2001; Moinard *et al.*, 2003; Smulders *et al.*, 2008) que vice-versa (Guise et Penny, 1998). Une alimentation pauvre en protéines ou en minéraux ou encore en chlorure de sodium favorise l'apparition de la CP car elle stimule l'attraction vers le sang (Fraser,

1987b; Edwards, 2011; Meyer *et al.*, 2015). Les effets d'une déficience alimentaire en protéines seraient accrus chez les porcs élevés sur caillebotis plutôt que sur paille (BPEX, 2004).

1.3.4 Génétique, sexe et caractéristiques individuelles

La génétique des animaux peut jouer un rôle dans le phénomène de la CP. En effet, d'après ces études, les porcs Yorkshire sont plus susceptibles d'être victimes que les porcs de race Landrace (Sinisalo *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2005, Keeling *et al.*, 2004). Aussi, Viitasaari *et al.* (2011) ont démontré que des porcs ayant un bas niveau de sérotonine dans plusieurs régions cérébrales, sont génétiquement susceptibles au stress, après les avoir comparés à ceux qui le tolèrent. Ces auteurs ont pu montrer que les niveaux de régulation du système nerveux autonome sont anormaux, à la fois chez les porcs mordeurs et les porcs mordus. Ceci porte à croire qu'il faut considérer à la fois les porcs mordeurs et les porcs mordus lors de l'étude de ce phénomène.

Le sexe est aussi considéré comme un facteur de risque de la CP. En effet, les morsures de la queue sont plus fréquentes chez les mâles castrés que chez les femelles (Valros *et al.*, 2004; Zonderland *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2012). La CP chez les femelles pourrait être liée à un déséquilibre nutritionnel lorsqu'elles atteignent la maturité sexuelle, ce qui les pousserait à mordre la queue de leurs congénères (Taylor *et al.*, 2010). Par surcroît, les caractéristiques individuelles de chaque porc jouent un rôle important dans le phénomène de la CP. En effet, les porcs ne réagissent pas de la même façon aux conditions d'élevage dans des conditions de peur, de nervosité (Van Putten, 1969), d'exploration, de différentes situations ou dans la manière de reproduire ce que fait un congénère (Hessing *et al.*, 1993; Bolhuis *et al.*, 2005). Enfin, il a été remarqué que certains individus sont plus susceptibles que d'autres à subir la CP (Brunberg *et al.*, 2016). Ainsi, pendant que certains porcs se laissent mordre la queue sans réagir, d'autres fuient immédiatement (Brunberg *et al.*, 2011; Keeling *et al.*, 2004).

1.4 Stress

Tel que discuté dans la section précédente, la plupart des facteurs de risque jusqu'à présent identifiés génèrent du stress chez l'animal, en effet, les situations inconfortables cause l'agitation et l'irritabilité, ce qui amène certains porcs à des comportements déviants comme la CP (Nannoni *et al.*, 2014). La douleur des morsures accroît encore d'avantage de stress chez les mordus (Munsterhjelm *et al.*, 2013). Lorsque l'animal se retrouve dans ces situations stressantes, son équilibre physiologique interne est compromis. Afin de préserver l'homéostasie, l'organisme engendre une réponse biologique par la sécrétion d'hormones via l'axe HHS dont la principale hormone active est le cortisol (Dore *et al.*, 2017).

Le cortisol libéré par la glande surrénale. Il est sécrété comme réponse à l'ACTH (hormone adrénocorticotrope), elle-même sécrétée par l'hypophyse. La sécrétion de ces hormones varie pendant les 24 heures d'une journée. En effet, elle est forte le matin et faible la nuit (rythme circadien). En cas de sécrétion abondante de cortisol, ceci entraîne un signal (GC) glucocorticoïdes (cortisone et cortisol) pour limiter l'activité de l'hypothalamus. Celui-ci secrète alors la CRF (Corticotropin releasing factor) et l'ACTH pour en limiter la production (rétrocontrôle négatif). Dans des cas de stress intense et d'infections chroniques, cette fonction de rétrocontrôle peut être compromise. À ce moment-là, les taux de cortisol et d'ACTH demeurent élevés (Goldstein et McEwen, 2002; McEwen, 2007). Par exemple, Plusieurs recherches sur la dépression ont établi une accentuation de la production de CRF et de cytokines circulantes, et une hyperactivité de l'axe HHS avec hypercortisolémie (Raison *et al.*, 2006; Dowlati *et al.*, 2010).

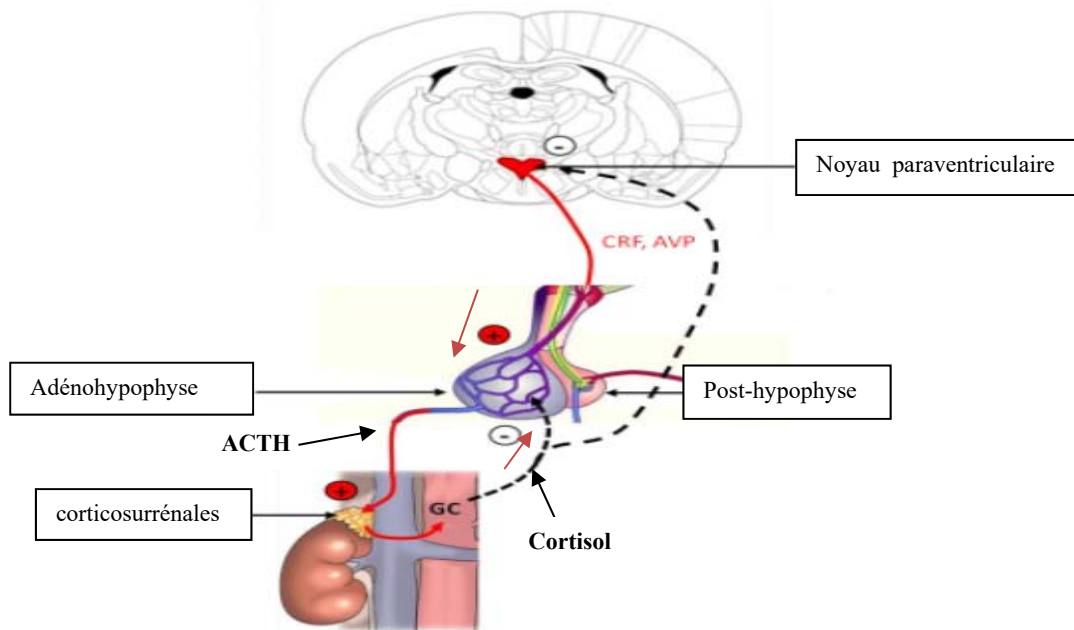


Figure 2. Organisation de l’axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (adapté de Jaglin, 2013).

1.5 Identification et traitement de la caudophagie

Le phénomène de la CP peut être assimilé à une épidémie, puisqu’il débute par un individu et se propage graduellement au sein du groupe (Statham *et al.*, 2009). Pour éviter l’amplification du problème, il est nécessaire d’intervenir rapidement en identifiant les porcs mordeurs ainsi que les porcs mordus et surveiller de près les porcs à risque (Niemi *et al.*, 2011; Ifip, 2016). Un certain nombre d’indicateurs permettent d’identifier de manière précoce la CP chez le porc (Larsen *et al.*, 2016; D’Eath *et al.*, 2014). En effet, les porcs mordeurs sont plus actifs, plus légers et très agités (Van de Weerd *et al.*, 2005). Les porcs mordus, par contre, sont plus lourds, se rendent plus souvent à la mangeoire 2 à 5 semaines avant l’apparition du phénomène (Wallenbeck et Keeling, 2013). Leurs queues sont droites (et non bouclées), dirigées vers le bas et placées entre les pattes arrières (Zonderland *et al.*, 2009; Zonderland *et al.*, 2011; Lahrmann *et al.*, 2017).

Certaines mesures aident à maîtriser un épisode de CP. Dès le début du comportement de CP, il est indispensable d’identifier l’animal à l’origine des morsures (mordeur) (Niemi *et al.*, 2011) pour, soit le retirer du parc, ou l’isoler du groupe à l’aide d’une barrière. La

queue lésée est alors traitée en la pulvérisant quotidiennement avec un agent cicatrisant. Pour limiter la douleur, un anti-inflammatoire peut être injecté dans la queue (Ifip, 2016). Si les lésions sont graves, les porcs mordus sont transportés dans la section infirmerie dans le but d'empêcher toute complication. Pour éviter la propagation au reste des porcs de l'enclos, un fort produit répulsif est appliqué sur leurs queues (Bracke, 2009). Enfin, l'environnement des porcs peut être enrichi par des produits manipulables (paille, bois tendre, chaînes...) (Holm *et al.*, 2008). Ceci va contribuer à les calmer et à rediriger leur attention (Taylor *et al.*, 2010).

1.6 Moyens de prévention de la caudophagie

1.6.1 Caudectomie

La caudectomie est traditionnellement préconisée comme un moyen de prévention contre la CP (EFSA, 2007). Il a été observé que les porcs dont on a gardé les queues entières étaient 2,73 fois plus exposés à des morsures que les porcs dont la queue a été sectionnée (Hunter *et al.*, 1999). Cependant, cette pratique, même si elle réduit ostensiblement l'apparition du phénomène, ne règle pas totalement le risque de CP (Paoli *et al.*, 2016; Sutherland *et al.*, 2011). En effet, une étude réalisée par Temple *et al.* (2011) a démontré que, même avec la caudectomie, plus de la moitié des élevages de porcs intensifs demeure touchée par ce phénomène de mordillage de la queue. Un autre défaut de cette technique est qu'elle a un effet néfaste sur le bien-être animal, puisqu'elle induit de la douleur, augmente la sensibilité de la queue, le risque d'arthrite, d'infections et de névromes. Elle provoque en général un stress élevé chez les porcelets (Di Giminiani *et al.*, 2017; Ifip, 2016; Valros et Heinonen, 2015; CIWF, 2012).

Il faut souligner que l'Agence européenne de sécurité des aliments (EFSA) interdit formellement la caudectomie comme procédure de routine, et ne l'autorise que sur prescription vétérinaire (directive 2008/120 / UE du Conseil). En dépit de l'existence de cette loi, presque 99% des porcs en Europe ont des queues coupées. Cette directive n'est respectée que dans quelques pays, comme la Finlande, la Suède et la Lituanie (EFSA, 2007; Nannoni *et al.*, 2014). Au Québec, dans les fermes de type commercial, la caudectomie et

l'utilisation des chaînes sont les pratiques de prévention les plus couramment appliquées pour prévenir ou diminuer la CP dans l'attente de solutions alternatives.

1.6.2 Enrichissement de l'environnement

Quand ils sont dans leur milieu naturel, les porcs en croissance emploient la majeure partie de leurs journées à chercher de la nourriture (Stern et Andresen, 2003). Comme déjà mentionné, les conditions de production industrielle ne répondent pas à ces besoins comportementaux des porcs; ce qui favorise chez eux le phénomène de mordillage de la queue (Van Putten, 1969). Plusieurs études ont démontré que l'enrichissement de l'environnement à l'aide d'un matériel adéquat comme le foin, la sciure de bois, le compost de champignon, les cordes, les chaînes, et en particulier la paille, diminue sensiblement l'agressivité et l'agitation des porcs et par la même occasion, la CP. Ces ajouts améliorent aussi considérablement leur bien-être (Studnitz *et al.*, 2007; Van de Weerd *et al.*, 2003; Holm *et al.*, 2008). Néanmoins, cette opération engendre des dépenses supplémentaires importantes, car ce matériel doit être entretenu et renouvelé régulièrement (D'Eath *et al.*, 2014). De plus, cette approche est incompatible avec la plupart des systèmes de gestion de lisier des fermes au Québec.

1.6.3 Alimentation

Tel qu'indiqué en introduction, diverses études ont mis en évidence la relation entre le régime alimentaire riche en fibres et la diminution du cannibalisme en général chez ces animaux, dont la CP (Blokhuys et Arkes, 1984; Steinfeldt *et al.*, 2007). Cependant, ces recherches sont encore au stade expérimental (Brunberg *et al.*, 2016). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que le risque de CP est réduit lorsqu'il y a de la paille à la disposition des porcs dans un enclos (Bracke *et al.*, 2004). Il est probable qu'une partie de cette paille soit consommée par les animaux; ce qui constitue un apport supplémentaire en fibres dans leur alimentation (Brunberg *et al.*, 2016).

De plus, des études ont établi que l'ajout de certains acides aminés dans l'alimentation des porcs, dans une situation où la CP existe déjà, diminue l'activité générale de ces derniers (Poletto *et al.*, 2010) et leur attraction au sang. En effet, des chercheurs ont

utilisé dans un modèle expérimental un tissu taché de sang comme remplacement de queue sanglante. Ensuite, ils ont ajouté du tryptophane dans l'alimentation des porcs. Ils ont alors constaté que l'attraction de ces animaux vers le sang a diminué (Fraser, 1987a, b; McIntyre et Edwards, 2002). Il faut préciser que les porcs ont besoin de ces acides aminés pour la synthèse de plusieurs neurotransmetteurs. À titre d'exemple, le tryptophane, un précurseur de la sérotonine (Brunberg *et al.*, 2016). D'après Fernstrom (1981), la quantité de sérotonine dans le cerveau est influencée par l'apport alimentaire du tryptophane. Aussi, d'autres études ont révélé un lien entre la sérotonine et le mordillage de la queue chez les porcs (Ursinus *et al.*, 2013; Valros *et al.*, 2015). Il faut ajouter que l'association des neurotransmetteurs avec les troubles de comportement a été faite chez d'autres espèces, comme le poulet pour le piquage de plumes (Hunter *et al.*, 2001; Harley *et al.*, 2012) et les chevaux pour le comportement stéréotypé (Thodberg *et al.*, 2010).

Enfin, il a été démontré que plusieurs de neurotransmetteurs sont synthétisés par le MI, tel que la sérotonine produite par *Candida spp*, *Streptococcus spp*, *Escherichia spp* et *Enterococcus spp*, la noradrénaline par *Escherichia spp*, *Bacillus spp* et *Saccharomyces spp*, la dopamine par *Bacillus spp* et l'acétylcholine par *Lactobacillus spp* (Bonaz et Bernstein, 2013; Lyte, 2011). En définitive, il y a de plus en plus d'évidence que le tractus gastro-intestinal joue un rôle important dans le phénomène de la CP (Brunberg *et al.*, 2016). Selon les recherches précédemment citées, il existe plusieurs facteurs qui peuvent être à l'origine du phénomène de la CP. En dépit de toutes ces informations, il reste difficile de déterminer la cause exacte du mordillage de la queue chez le porc, puisque les liens potentiels entre ces facteurs ne sont pas encore déterminés. De plus, on connaît mal ce qui déclenche ce trouble de comportement.

À cet effet, le MI a déjà été soupçonné de jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines maladies nerveuses comme le trouble du comportement chez l'homme, tel que le stress, la dépression, l'anxiété et l'autisme (Collins *et al.*, 2012; Wang et Kasper, 2014). Récemment, des études ont été menées dans le domaine de la neurophysiologie pour élucider chez l'homme et la souris la relation qui existe entre le stress et le MI,

appelé aussi l'axe microbiote-intestin-cerveau. Cet axe met en exergue les interactions bidirectionnelles entre le cerveau et le MI (Cryan et Dinan, 2012; Collins *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2016). Il existe plusieurs similitudes entre les humains et les porcs en termes d'absorption et d'utilisation des nutriments. C'est pour cela que les études sur le tractus gastro-intestinal des porcs peuvent paver la voie aux études chez l'homme et constituer à cet effet un modèle important (Hvistendahl, 2012). C'est cet axe (microbiote intestinal-cerveau) qui servira de base pour notre étude qui a pour but d'évaluer le lien entre le MI et ce comportement déviant (CP) chez le porc.

2. Microbiote intestinal

2.1 Présentation du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un écosystème composé en majorité de bactéries appartenant à plusieurs espèces différentes; mais aussi, des archées, des eucaryotes et des virus. Ces bactéries, en grande partie, vivent sans oxygène (anaérobie stricte) (Ley *et al.*, 2006; Sekirov *et al.*, 2010; Lynch et Pedersen, 2016; Lloyd-Price *et al.*, 2017). Depuis longtemps, on a réalisé que des micro-organismes étaient présents dans l'intestin. On a alors supposé qu'il y avait une relation entre l'hôte et ces micro-organismes (Delzenne *et al.*, 2011; Lozupone *et al.*, 2012). Toutefois, les moyens scientifiques permettant d'analyser les différents aspects de cette interaction étaient réduits. Par exemple, les techniques classiques microbiologiques ne permettaient de détecter que 20 à 30 % de la totalité du MI (Rambaud *et al.*, 2004). Avec l'apparition des techniques modernes basées sur le séquençage à haut débit du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, l'identification d'espèces nouvelles a été rendue possible (Looft *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016) sur la portion de bactéries difficiles à cultiver *in vitro* (environ 80 % des bactéries anaérobies). L'avancée spectaculaire des techniques de séquençage en métagénomique a relancé la recherche scientifique dans la description de la nature des interactions entre l'organisme et le MI, entre les différentes bactéries et les conséquences de ces interactions (Lepage *et al.*, 2013).

À la naissance chez l'humain, le tube digestif est envahi par des micro-organismes d'origine maternelle et environnementale après un accouchement par voie naturelle, alors que la colonisation est plutôt d'origine environnementale pour ceux nés par césarienne

(Konstantinov *et al.*, 2006; Sekirov *et al.*, 2010). Puis, des milliards de bactéries colonisent le tube digestif du nourrisson en l'espace de quelques jours. Cette colonisation bactérienne se fait graduellement : les premières bactéries intestinales qui s'établissent durant les premiers jours de vie sont des anaérobies facultatives (Favier *et al.*, 2002; Sommer et Bäckhed, 2013). Une fois que l'oxygène présent dans le tractus digestif du nouveau-né est épuisé, les bactéries anaérobies strictes prennent leur place, telles que les bactéries du genre *Bacteroides* et des phylums *Firmicutes* et *Actinobacteria* (Sommer et Bäckhed, 2013). Ces bactéries croîtront et prendront la première place dans l'intestin. Par la suite, la composition du MI change peu à peu en quantité et en qualité chez les animaux plus jeunes, sous l'influence de l'environnement et de l'alimentation, sans oublier la génétique de l'hôte (Khachatryan *et al.*, 2008; Benson *et al.*, 2010). La composition du MI se stabilise à un certain âge selon l'espèce (vers l'âge de 3 ans pour les humains). Toutefois, cette stabilité reste relative puisqu'elle peut varier suivant plusieurs facteurs (nourriture, âge, ATB, etc.) (Campeotto *et al.*, 2007; Lozupone *et al.*, 2012).

2.2 Composition et diversité du microbiote intestinal

Le MI renferme environ 100 000 milliards de micro-organismes (environ 2 kilos chez l'homme). Ce qui veut dire qu'il est 2 à 10 fois plus important que le nombre de cellules qui composent notre organisme (Ley *et al.*, 2006; Sekirov *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été avancé que chez le porc, la composition du MI a déjà été associée au poids du corps et au gain quotidien moyen (Ramayo-Caldas *et al.*, 2016).

Tout au long du tube digestif, la répartition du MI est hétérogène, le nombre de bactéries croît de la partie la plus proximale (estomac) à la plus distale (rectum) (Sekirov *et al.*, 2010). Très peu de bactéries sont retrouvées dans l'estomac, soit environ 10^1 unité formatrice de colonies (UFC)/ml de liquide gastrique, en raison de l'acidité gastrique. Dans l'intestin grêle, la composition du microbiote est diversifiée en quantité et en qualité. En effet, à l'échelle du duodénum-jéjunum se trouvent 10^1 à 10^3 UFC/g du contenu intestinal. L'iléon, par contre, affiche un microbiote plus riche, qui peut atteindre 10^4 à 10^7 UFC/g du contenu intestinal. Il est à noter que l'iléon joue un rôle important dans les interactions avec le système immunitaire et les pathogènes.

La partie du tube digestif la plus riche en bactéries (de 10^{11} à 10^{12} UFC/g) et aussi la section colonisée de façon la plus constante est le côlon. Les différentes fonctions bénéfiques du MI pour l'organisme seraient généralement produites à cet endroit (Arumugam *et al.*, 2011). Il renferme 80 % d'espèces anaérobies strictes appartenant aux phylums des *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Actinobacteria* (Eckburg *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2010; Arumugam *et al.*, 2011). Si la nature du phylum dominant ne change relativement pas au sein de l'espèce animale, il existe cependant d'importantes variations interindividuelles, qualitatives (nature des espèces bactériennes) et quantitatives (abondances relatives de ces espèces dans le tube digestif) (Sekirov *et al.*, 2010; Lozupone *et al.*, 2012; Rabot, 2015). D'autres micro-organismes, dont la présence n'est que transitoire, existent aussi dans le tube digestif, comme les levures ou les bactéries lactiques, mais aussi certaines bactéries pathogènes (Marteau, 2013).

Suite aux analyses faites sur le porc, il a été découvert qu'un gramme de matière fécale contient environ 10^{12} bactéries et 1000 espèces, avec 2 ou 3 phylums dominants (Lynch et Pedersen, 2016; Lloyd-Price *et al.*, 2017). Un catalogue de gènes du MI a été constitué par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) en collaboration avec le BGI (Beijing Genome Institute, Chine). Ainsi quelques 7,7 millions de gènes, pour la plupart bactériens, ont été identifiés. Ce catalogue lève aussi le voile sur la grande richesse du microbiote porcin. Cette découverte permettra certainement d'améliorer l'efficacité des élevages des porcs. Il faut signaler que 96 % des fonctions biologiques retrouvées dans le microbiote humain existent chez le porc (Dore *et al.*, 2017).

2.3 Méthodes de caractérisation moléculaire du microbiote intestinal

Des nouvelles techniques moléculaires excluant la culture, basées sur le séquençage à haut débit (Illumina, Ion Torrent, etc), ont été développées dans le but d'explorer la composition du MI et d'élucider l'interaction de ce dernier avec l'hôte (Lepage *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). Le MiSeq utilise une approche de séquence par synthèse, lors de laquelle des nucléotides modifiés sont utilisés. Ceux-ci sont porteurs de quatre fluorochromes différents, un pour chaque base nucléique. Le modèle MiSeq est utilisée pour sa grande précision de séquençage pour des longueurs variants entre 50 et 600

pb. Comparativement à d'autres méthodes, le séquençage de MiSeq génère moins d'erreurs, ce qui en fait une technologie des plus intéressantes (Siegwald, 2017).

Pour le séquençage, deux approches ont été favorisées : le séquençage de l'ADN total (Qin *et al.*, 2010) ou le séquençage des régions variables des gènes bactériens codants pour l'ARNr 16S (Eckburg *et al.*, 2005). Concernant le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) 16S (1500 pb), il s'agit d'une technique régulièrement utilisée pour l'étude phylogénétique et taxonomique des bactéries composant le MI. Ceci facilite de beaucoup les études sur la composition de MI des échantillons du contenu intestinal (Youssef *et al.*, 2009). Pour identifier et catégoriser les bactéries, on a souvent recourt à un locus génétique qui est le gène de l'ARNr 16S, du fait qu'il est constitué en même temps de 9 zones hypervariables entourées d'autres non variables. Ce gène est commun à l'ensemble du domaine Bacteria et Archea. Les zones hypervariables sont intéressantes, car elles comptent des séquences spécifiques à l'espèce qui permettent de faire la distinction entre les différentes bactéries et les archées (Cox *et al.*, 2013; Yarza *et al.*, 2014).

Le gène de l'ARNr 16S est le plus souvent obtenu à partir d'échantillons de matières fécales, en isolant l'ADN des microorganismes en qualité et en quantité suffisante par les différents kits d'extraction. Les tampons et les protocoles d'extraction de l'ADN dépendent du type et de la complexité de la matrice. Ces prélèvements de matières fécales sont reconnus comme représentatifs du MI d'un individu, particulièrement, de sa portion distale, malgré les différences dans la répartition du microbiote le long du tube digestif (Rogel-Gaillard, 2013; Eckburg *et al.*, 2005). Par la suite, des amorces spécifiques à certaines régions hypervariables plus adaptées à certains microbiotes (la plupart des études utilisent v4 ou v4-v3 ou même v4-v5 pour la comparaison de la composition du MI) (Nossa *et al.*, 2010) sont utilisées pour amplifier, par la PCR, les fragments d'ADN à séquencer (Zhao *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Après le séquençage, des méthodes et des algorithmes bio-informatiques (exemple : logiciel Mothur) sont utilisés pour identifier les OTU (unités taxonomiques opérationnelles) à partir du classement des séquences obtenues. Selon différents seuils de similarité atteints, les OTU sont désignées comme des phylums, classes, ordres, familles et même des genres bactériens. Par exemple, un OTU formé de séquences

ayant un seuil de similarité standard de 97%, représente ainsi une espèce bactérienne. Cette identification microbienne est faite suivant les séquences de bases de données de référence (Schloss *et al.*, 2009). Pour l'ADNr 16S bactérien, il existe trois bases de données de référence principales : RDP (Ribosomal Database Project) (Cole *et al.*, 2014), SILVA (Yilmaz *et al.*, 2013) et GreenGenes (McDonald *et al.*, 2012). Le choix de la banque de référence se fait selon différents critères tels que le type de microbiote étudié et les taxons ciblés.

La principale limite de cette technique est la longueur des lectures qui ne permet pas d'arriver jusqu'à l'identification de l'espèce. Une autre limite est d'ordre quantitatif. En effet, même si elle est très utilisée dans les études actuelles sur le microbiote, elle se bute sur le fait que le gène codant pour les sous-unités ribosomiques peut se répéter plus d'une dizaine de fois dans le génome d'une bactérie et que ces répétitions peuvent être variables. On ne peut donc pas faire une analyse quantitative précise des bactéries constituant le microbiote à partir de l'analyse des séquences codantes pour les ARNr. Par contre cette analyse permet de décrire la composition du MI. Enfin, les espèces les moins représentées sont difficilement ou pas du tout détectables puisqu'il existe une limite de détection d'environ 10^4 - 10^5 UFC/g à cette technique. Celle-ci est variable selon la richesse des écosystèmes séquencés (Garrett *et al.*, 2010). C'est pour cette raison qu'il faut recourir à la PCR quantitative (qPCR) avec une limite de détection de 10^2 – 10^3 UFC/g pour détecter les bactéries présentes en plus faible quantité dans les matières fécales. La qPCR est une technologie qui permet de détecter et de quantifier le gène grâce à un émetteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés tout au long de la réaction. Elle permet de collecter à chaque cycle de PCR les données de fluorescence et de représenter la quantité du produit amplifié (Cinquin, 2005).

En ce qui concerne le séquençage total de l'ADN, il se concentre, comme son nom l'indique, sur l'ensemble du matériel génétique microbien présent dans un échantillon. Cette technique est appelée approche métagénomique. Ceci permet de constituer un répertoire de gènes de référence (De Preter *et al.*, 2013; Lagier *et al.*, 2012). D'autre part, il est important de signaler qu'actuellement, il existe également des technologies capables

de caractériser les gènes bactériens transcrits (séquençage de l'ARN messager des microorganismes), soit la métatranscriptomique. Il existe aussi la métaprotéomique et métabolomique qui identifient respectivement les protéines et les métabolites produits (Lepage *et al.*, 2013).

2.4 Facteurs qui influencent la composition du microbiote intestinal

Il est nécessaire qu'il y ait une harmonie entre les multiples bactéries (symbiontes et pathobiontes) pour une physiologie intestinale normale (eubiose) (Lepage *et al.*, 2013). C'est d'ailleurs la richesse et la composition du microbiote qui stimulent les systèmes immunitaires innés et acquis en vue de garantir l'homéostasie intestinale, élément fondamental pour la santé de l'hôte (Zhou *et al.*, 2018). La composition du MI représente un écosystème actif. Avec le temps, sa composition peut être altérée par plusieurs éléments comme les maladies intestinales (Di Mauro *et al.*, 2013), les antibiotiques (Robinson et Young, 2010), la génétique (Goodrich *et al.*, 2014) l'alimentation (David *et al.*, 2014; Zeevi, 2015), le sexe (Markle *et al.*, 2013), l'âge (Yatsunenکو *et al.*, 2012), et, comme plus récemment démontré, le stress (O'Mahony *et al.*, 2010; Luna et Foster, 2015). Le déséquilibre du MI (dysbiose) peut survenir à tout âge et peut conduire à l'apparition de maladies (Lepage *et al.*, 2013). Néanmoins, du fait de l'absence d'étude probante, ces facteurs n'expliquent pas de façon exhaustive ce qui induit le trouble du comportement (Cryan et Dinan, 2012).

Tel que mentionné précédemment, le MI peut être déstabilisé par une alimentation déséquilibrée. En effet, les bactéries de fermentation se multiplient rapidement lorsque de la consommation d'aliments très riche en sucre. Aussi, lorsque l'alimentation est faible en fibres, ceci encourage la prolifération d'autres espèces. Par ailleurs, quand les aliments sont riches en protéines, ils aident à la croissance de bactéries associées à la putréfaction (Brown *et al.*, 2012). Le porc est, de par sa physiologie, omnivore. De ce fait, sa nourriture, et par le fait même son MI, est plus diversifiée que celui des herbivores et des carnivores. Or, dans l'environnement commercial, en raison des contraintes inhérentes, l'alimentation des porcs est restreinte en nutriments par rapport à un environnement naturel.

2.5 Principales fonctions du microbiote intestinal

Comme il a été expliqué précédemment, le MI constitue une biomasse microbienne très importante et dynamique. Il est indispensable, car il procure plusieurs types d'enzymes et de substrats pour l'organisme. Il remplit plusieurs fonctions physiologiques qui ne peuvent être accomplies par l'organisme seul (il travaille en symbiose avec l'hôte) (Marteau, 2013). Les grandes fonctions du microbiote sont les suivantes : trophique, métabolique, immunitaire et cérébrale.

2.5.1 Fonction trophique

Grâce à certaines espèces bactériennes comme les *Bacteroides thetaiotaomicron* (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2004), le microbiote favorise la maturation du tube digestif. En effet, il aide à la vascularisation épithéliale et à l'activité enzymatique de la muqueuse. Il affecte l'épaisseur de la muqueuse intestinale, la taille des villosités et la production de mucus. Aussi, il favorise le développement et la maturation du système immunitaire. En effet, une étude chez les souris axéniques (sans microbiote), a démontré qu'elles possèdent un système immunitaire immature qui présentent plusieurs anomalies physiologiques comme un nombre de lymphocytes intra-épithéliaux réduits ou une sécrétion intestinale d'immunoglobulines A réduite (Smith *et al.*, 2007; Arrieta et Finlay, 2012).

2.5.2 Fonctions métaboliques

Plusieurs études ont mis en lumière le rôle capital que joue le MI chez les porcs dans le traitement des nutriments et la récupération d'énergie. En effet, le MI joue un rôle important dans le métabolisme des lipides, glucides et protéines. De même, le MI aide la digestion des fibres alimentaires, lesquelles ne sont pas métabolisées par les enzymes de l'hôte (Looft *et al.*, 2014; Gérard et Bernalier-Donadille, 2007). Les processus de fermentation médiés par le MI induisent la production de nombreux métabolites comme les acides gras à chaîne courte, les neurométabolites, les acides aminés essentiels et les vitamines dans le gros intestin porcin (telles les vitamines K et B12 qui ne sont pas synthétisées par leur hôte) (Delzenne *et al.*, 2011). Il entraîne ainsi la production du gaz d'hydrogène qui est transformé, en majeure partie *in situ*, par des bactéries du microbiote colique. Par ailleurs, il contribue à extraire à partir des oligosides non digestibles par l'hôte, de l'énergie, et

régule enfin l'aptitude de l'assimilation de l'épithélium digestif à de multiples nutriments (Hooper *et al.*, 2001; Delzenne *et al.*, 2011).

2.5.3 Fonctions immunitaires

Il est important de souligner que le microbiote joue un rôle non négligeable au niveau du système immunitaire non-spécifique puisqu'il fait office de barrière. En effet, il limite l'établissement des bactéries pathogènes exogènes d'une part, et d'autre part, il combat les bactéries néfastes éventuellement présentes dans l'intestin si la quantité ingérée est trop importante (Rambaud *et al.*, 2004). Il existe plusieurs systèmes de protection. En effet, le MI empêche les bactéries nuisibles de s'installer dans le tube digestif en les privant des nutriments nécessaires à leur prolifération (par compétition). Enfin, le microbiote limite l'effet des toxines de trois manières : en les altérant, en les bloquant et en transformant la susceptibilité des cellules intestinales (Sommer et Bäckhed, 2013).

2.5.4 Fonction cérébrale

Des fonctions du MI ont été mises en lien avec le développement du cerveau et le comportement type anxieux chez la souris (Bravo *et al.*, 2011. Hooper *et al.*, 2001). Le MI joue un rôle actif dans la communication intestin-cerveau en réponse au stress (Hooper *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2016). En fait, des études auraient associé des changements de la composition du MI à une modification du comportement et psychologie (dépression, anxiété et autisme) d'un individu, à titre d'exemple *Bifidobacterium infantis* possédant des propriétés antidépressives (Cryan et O'Mahony, 2011). Cependant, cette hypothèse reste à valider (Collins *et al.*, 2012; Wang et Kasper, 2014).

2.6 Relation entre le microbiote intestinal et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Le dialogue entre le cerveau et MI est associé aux réponses neuroendocriniennes et émotionnelles au stress, lesquelles mettent en exergue l'axe physiologique hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). Ces aspects de l'axe HHS sont les mieux expliqués à ce jour (Cryan et Dinan, 2012; Luna et Foster, 2015). Une étude fascinante effectuée à l'université de Kyushu, au Japon, a démontré que le taux plasmatique de corticostérone

était deux fois supérieur chez les souris axéniques que chez les souris conventionnelles lorsqu'elles étaient soumises à un stress d'immobilisation pendant une heure (Sudo *et al.*, 2004). Ceci suggère une contribution du MI dans la régulation du taux plasmatique de corticostérone. Ces résultats ont été confirmés chez les rats. En effet, après avoir placé les rats pendant quelques minutes dans un endroit plus éclairé afin d'induire un stress, il a été remarqué que le taux plasmatique de corticostérone des rats axéniques était trois fois supérieur à celui de rats conventionnels (Rabot, 2015). La réactivité de l'axe de corticotrope a même été normalisée par une monocolonisation par *Bifidobacterium infantis*. Par contre, une monocolonisation avec une souche entéropathogène d'*Escherichia coli* produit l'effet inverse (Sudo *et al.*, 2004).

C'est durant la période postnatale et lors de la croissance que le microbiote s'établit graduellement alors que le cerveau se développe (Rabot, 2015). Pour démontrer ceci, des souris ont reçu du microbiote fécal, à divers âges de leur vie, prélevé de congénères conventionnels. Lorsque la colonisation microbienne a eu lieu à l'adolescence, la correction de l'hyperactivité de l'axe corticotrope a été vite réalisée. Cette opération s'avère vaine chez des souris à l'âge adulte (Sudo *et al.*, 2004). D'après Di Mauro *et al.* (2013), la sécrétion de cortisol, laquelle est régulée par le cerveau, est très importante lorsque le stress est mal géré. Cette molécule va influencer sur quelques paramètres de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale, et provoquer ainsi une perturbation du MI (Montiel-Castro *et al.*, 2013; Di Mauro *et al.*, 2013). Ces études, prises dans leur ensemble, indiquent que la perturbation du microbiote chez les rats et la souris augmente la réactivité de l'axe corticotrope en désorganisant divers niveaux de régulation (Crumevolle-Arias *et al.*, 2014).

2.7 Voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau

C'est à travers des molécules libérées dans le contexte de l'axe microbiote intestinal-cerveau que le MI arrive à réguler ce dernier en utilisant différentes voies (Cryan et Dinan, 2012).

2.7.1 Voie métabolique

Certaines molécules libérées dans la lumière intestinale comme les acides gras à chaînes courtes atteignent le cerveau. Elles vont être absorbées par l'épithélium intestinal (voie transcellulaire ou voie paracellulaire) pour rejoindre la circulation sanguine et traverser la barrière hématoencéphalique.

2.7.2 Voie nerveuse

Elle est basée sur la stimulation des neurones du système nerveux entérique et de la composante parasympathique du système nerveux autonome, et ce, de deux manières possibles : par des macromolécules de la cellule bactérienne, tels les lipopolysaccharide (LPS) ou par certaines molécules libérées (ex : acides gras à courte chaîne) par le microbiote. Par la suite, ces neurones entériques transmettent l'influx nerveux au système nerveux central.

2.7.3 Voie endocrine

Le microbiote synthétise certains métabolites (ex : acides gras à courte chaîne) ou produit des macromolécules de l'architecture cellulaire (ex : LPS) qui stimulent la production de neuropeptides par les cellules entéro-endocrines (Collins *et al.*, 2012; Wang et Kasper, 2014).

2.7.4 Voie immune

Les produits bactériens actifs (ex : LPS ou acides gras à courte chaîne) stimulent les cellules immunitaires intestinales et modifient l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires, ce qui affecte le fonctionnement du cerveau.

Un schéma présentant les différentes voies est proposé à la figure 3.

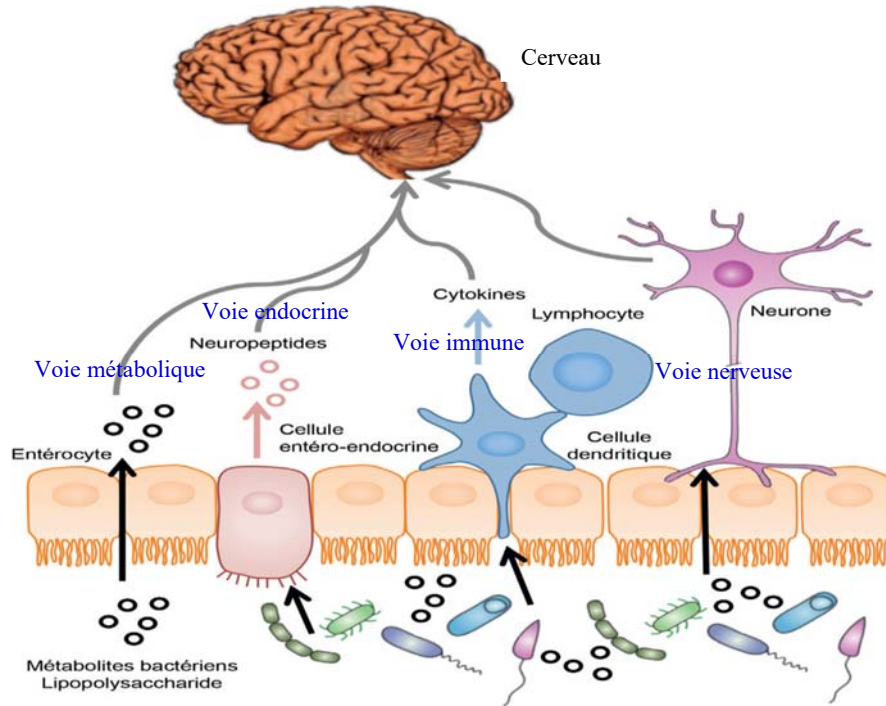


Figure 3. Voies de communication possibles entre le microbiote intestinal et le cerveau (adapté de Cryan et Dinan, 2012).

2.8 Effets du microbiote intestinal sur le comportement

Diverses expérimentations utilisant des souris axéniques ont porté sur les effets du microbiote sur l'axe HHS. Elles ont décrit l'influence du MI, particulièrement chez des animaux du type anxieux. Des tests basés sur la lumière (test clair et obscur), ont démontré l'effet de cette dernière sur l'anxiété (Diaz-Heijtz *et al.*, 2011; Neufeld *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2013). Il s'avère que les souris axéniques étaient plus anxieuses que leurs congénères classiques. Ces différences pourraient toutefois en partie s'expliquer par les caractéristiques génétiques, lesquelles jouent aussi un rôle dans la réaction émotionnelle au stress (Rabot, 2015).

Cependant, d'après Desbonnet *et al.* (2014), la composition du MI joue un rôle prépondérant dans le comportement social et répétitif chez la souris. En effet, il a été remarqué que des souris sans MI montrent des lacunes de sociabilité dans des examens comportementaux. Aussi, elles répètent davantage leur comportement pendant un test d'interaction social. Toutefois, ces comportements ont été rééquilibrés après une

colonisation bactérienne de l'intestin de ces souris. De ce fait, les chercheurs en sont venus à la conclusion que le microbiote est déterminant dans le comportement social normal et régule de façon considérable le comportement répétitif (Brunberg *et al.*, 2016).

De même, lors d'une autre recherche effectuée par Bercik *et al.* (2011), on a observé que lorsqu'on déplace le microbiote de souris de phénotypes peu anxieuses vers des souris axéniques, le comportement anxieux de cette dernière peut diminuer alors qu'il augmente dans le cas contraire. Ceci suggérerait que les caractéristiques du comportement peuvent être déplacées et que le MI est déterminant dans le comportement des souris. Ainsi, il est possible de conclure que le microbiote a un rôle dans la régulation de la réaction émotionnelle au stress, en réduisant son importance chez les lignées sensibles et en l'accroissant chez les lignées peu sensibles (Rabot, 2015).

2.9 Effets de manipulation du microbiote intestinal sur le comportement

La modification de la composition du microbiote à l'aide de probiotiques et de prébiotiques, aurait un effet bénéfique sur le cerveau, comme l'ont indiqué plusieurs études chez l'humain. En effet, une rectification du MI agit positivement sur les performances psychométriques, l'humeur ou l'état émotionnel d'individus en bonne santé (Liu *et al.*, 2004; Malaguarnera *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Malaguarnera *et al.*, 2010). Dans ce cadre, une recherche effectuée par Benton *et al.* (2007), a montré que l'humeur de sujets humains, initialement dépressive, s'est améliorée après la consommation de *Lactobacillus casei* Shirota. Dans la même ligne de pensée, lors d'une étude faite sur les sujets sains à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique, on a observé qu'après quatre semaines de consommations d'un mélange de probiotiques contenant du *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, et *Lactococcus lactis subsp lactis*, l'activité des structures cérébrales impliquées dans le contrôle des émotions a été modifiée (Tillisch *et al.*, 2013).

Également, plusieurs autres études chez la souris ont démontré une modification de la réactivité de l'axe HHS et de comportement anxieux après manipulation du MI. À titre d'exemple, lorsque la souris SPF (specific pathogen free) de la lignée consanguine

BALB/c, lignée sensible au stress, est assujettie au test clair/obscur, le comportement anxieux a été atténué par un traitement oral d'un cocktail d'antibiotiques et d'antifongiques. L'absence d'impact du traitement chez des souris axéniques de la même lignée confirme l'hypothèse que le déséquilibre du MI induit par le traitement antimicrobien est bien à l'origine de la modification du comportement chez les souris SPF (Bercik *et al.*, 2011). Une autre étude a démontré que le comportement de type anxieux a été atténué chez des souris BALB/c après un traitement avec l'association de *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 (Messaoudi *et al.*, 2011). Finalement, une autre étude a établi que le comportement de type dépressif se produisant chez le rat après un infarctus du myocarde, est annulé grâce à une combinaison de probiotiques, comme *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 (Arseneault-Bréard *et al.*, 2012).

3. Problématique générale et objectifs

À la lumière de cette recension de la littérature, il convient de faire le point quant à la problématique à la base de notre étude. Plusieurs recherches sur la CP chez le porc ont permis de récolter des informations sur les facteurs favorisant ce phénomène, tels que l'environnement, la génétique et l'alimentation. Toutefois, la relation entre les différents facteurs pouvant provoquer ce trouble de comportement n'a pas encore fait l'objet d'assez de travaux pour établir que le MI y joue un rôle de façon claire.

Sachant que le MI, chez plusieurs espèces animales, et particulièrement chez la souris, joue un rôle significatif dans le comportement de l'animal, il nous a semblé judicieux d'émettre l'hypothèse que la perturbation de la composition du MI peut être associée à changement de comportement de l'animal lors de stress et/ou des troubles anxieux. La CP a été choisi comme comportement déviant afin de déterminer s'il existe un lien entre la composition du MI et le comportement chez le porc. Si cela s'avère, des changements alimentaires pourraient être envisagés pour prévenir ou gérer la CP. Il nous a semblé intéressant d'explorer cette problématique d'autant plus que l'enjeu économique et celui du bien-être animal sont des plus importants pour la CP. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude de ce type chez l'espèce porcine. Dans ce projet, nous tenterons donc d'établir s'il

existe une relation entre le MI et la CP chez le porc. Pour y arriver, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

1. Caractériser le comportement chez les porcs lors d'un épisode de CP,
 - a. Sélectionner des groupes de porcs mordeurs, de porcs mordus, de porcs-contrôle négatifs (ni mordeurs ni mordus),
 - b. Étudier et comparer un paramètre physiologique lié au stress, le cortisol, chez les porcs mordeurs, les porcs mordus versus les porcs-contrôle négatifs,
2. Caractériser le MI chez les porcs mordeurs et les porcs mordus par rapport aux porcs contrôle-négatifs,
 - a. Étudier et comparer le MI, chez les porcs mordeurs et les porcs mordus versus les porcs contrôle-négatifs,
 - b. Identifier les populations bactériennes associées à la CP chez le porc.

CHAPITRE 3. Matériel, méthodes et résultats

Article Scientifique
(En préparation pour le journal Microbiome)

Association between intestinal microbiota and tail-biting in pigs.

Nassima Rabhi⁽¹⁾, Alexandre Thibodeau⁽¹⁾, Nicolas Devillers⁽²⁾, Benoit Laplante⁽³⁾,
Philippe Fravallo⁽¹⁾, Guillaume Larivière-Gauthier⁽¹⁾, Guy Beauchamp⁽¹⁾, Williams P.
Thériault⁽¹⁾, Luigi Faucitano⁽²⁾, Sylvain Quessey^{(1)*}

⁽¹⁾NSERC Industrial Research Chair in Meat-Safety (CRSV), Université de Montréal,
Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

⁽²⁾Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke Research and Development Centre,
Sherbrooke, Québec, Canada.

⁽³⁾F. Ménard Inc., Ange-Gardien, Quebec, Canada.

*Corresponding author: Tel : 450-773-8521 (8398)

e-mail: sylvain.quessey@umontreal.ca

Abstract

Background: Tail-biting is a serious behavior disorder seen in pigs defined as the pig's chewing of the tail of another pig. It represents an important challenge in swine production as it generates significant economic losses due to poor animal welfare, health and food safety. Some solutions are already available, but are not optimal. Among others, nutrition, in terms of feed type and composition, may have an effect on TB, probably through its effects on the intestinal microbiota composition. In humans, intestinal microbiota is, in fact, supposed to be a modulator of behavior. This study aimed at evaluating the association between tail-biting and intestinal microbiota in pigs through the assessment of the intestinal microbiota in biter and bitten pigs compared with a negative control group (non-biter and non-bitten). The groups (12 pigs per group) were selected at the beginning of the growing/finishing phase by a target behavior analysis centered on tail-biting (biter group) and a score of damages caused to the tail (bitten group). During and after a tail-biting episode, fecal and blood samples were collected for each animal. Cortisol serum level determined by ELISA was used as an indicator of stress. The pig's fecal microbiota was analyzed from DNA extracted from freshly collected fecal matter using amplicon sequencing of the V4 region of the genes coding for the 16S rRNA by Illumina MiSeq.

Results: The fecal microbiota beta diversity analysis revealed a significant difference between biter and bitten pigs in comparison to the negative control group in terms of structure and of the microbiota, where *Lactobacillus*, have been significantly higher ($p=0.001$) in the negative control group compared to other groups. Quantitative real-time PCR also confirmed that lactobacilli were more abundant in the negative control group. No significant difference was observed on the alpha diversity. Cortisol levels were significantly higher in biter and bitten pigs in comparison to the negative control group ($p=0.02$, $p=0.0076$ respectively).

Conclusions: This study demonstrates that tail-biting, a severe behavioural disorder is associated to the intestinal microbiota composition in pigs.

Keywords: Pigs, intestinal microbiota, behavioral disorder, tail-biting.

Introduction

Tail-biting (TB) is a behavior often observed at pig farms and is expressed by the pig's nibbling the tail of a penmate. For this reason, TB is considered a severe behavior disorder related to cannibalism (Taylor *et al.*, 2010; Temple *et al.*, 2014) causing pain, infection and stress (Sihvo *et al.*, 2012; Munsterhjelm *et al.*, 2013; Di Giminiani *et al.*, 2017) and reducing production performance (Valros et Heinonen, 2015) in bitten pigs.

The average incidence of TB reported by several studies varies between 1.3 and 7.2% (Taylor *et al.*, 2010; Valros et Heinonen, 2015). These results are however based on the assessment of *ante-* and *post-mortem* lesions and not on the observation of TB acts at the farm. At slaughter, the degree of lesions varies from detectable lesions (70%) to severe (1 to 3%) resulting in partial or total loss of the tail (EFSA, 2007; Harley *et al.*, 2012, 2014). Tail-biting does not only have consequences on animal welfare, but also on the economics of the pork chain. Costs for the industry are related to veterinary treatment (€ 0.59 per pig; Harley *et al.*, 2014), reduction of growth performance and total or partial carcass condemnation (approx. € 1.10 carcass value loss) at the abattoir (CIWF, 2012; Harley *et al.*, 2012, 2014).

Several risk factors have been associated with TB, most of them linked to a stressful environment, such as pigs raised on slatted floor, raised indoor (Richards, 2013), overcrowding (Moinard *et al.*, 2003) and poor air quality (Scollo *et al.*, 2017; D'Eath *et al.*, 2016; Sonoda *et al.*, 2013; EFSA, 2007). A strong correlation between the prevalence of diseases, such as respiratory disorders and TB has been reported (Nannoni *et al.*, 2014; Moinard *et al.*, 2003). Finally, individual and genetic characteristics seems to play a significant role in the presence of TB in pigs, the Yorkshire pigs are more likely to be victims compared to the landrace pigs. (Sinisalo *et al.*, 2012). Age (TB more present at the fattening stage), sex (females would bite more than males) (Keeling *et al.*, 2012) and susceptibility to rearing conditions (pigs do not react in the same way to rearing conditions and TB) were also reported as risk factors. However, not enough information is available about the possible correlation between these different risk factors, which makes it difficult to identify precisely what trigger the behavior (Brunberg *et al.*, 2016). Nutrition is also

considered as a risk factor for TB (Sonoda *et al.*, 2013). Indeed, pigs bite more due to increased attraction to blood, and thus to a bleeding tail, when their diet is low in proteins or minerals (i.e., sodium chloride), or fibre (Blokhuis et Arkes, 1984; Fraser, 1987b; Steinfeldt *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2015; Brunberg *et al.*, 2016). In addition, studies have found that the dietary supplementation with tryptophan decreased the general activity of pigs and their attraction to blood at farms where TB is present (Smith et Penny, 1986; Fraser, 1987a, b; Poletto *et al.*, 2010). As precursor of serotonin, tryptophan reduces the effects of this neurotransmitter on TB (Ursinus *et al.*, 2013; Valros *et al.*, 2015; Brunberg *et al.*, 2016).

Brunberg *et al.* (2016) formulated the hypothesis that the difference between biting and bitten pigs may be explained by the different intestinal microbiota (IM) composition, that can be regulated by nutrition (i.e., feed composition; Longpré *et al.*, 2016) and stress condition. Indeed, studies on mice have showed that the absence and/or modification of IM composition may influence the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) response to stress (Sudo *et al.*, 2004; Neufeld *et al.* 2011), resulting in anxiety and depression (Diaz Heijtz *et al.*, 2011; Cepeda *et al.*, 2017). Furthermore, some bacteria of the IM may regulate the pathophysiology of stress-related disorders through the synthesis of serotonin (i.e., *Candida* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. and *Enterococcus* spp.; Lyte, 2011; Bonaz and Bernstein, 2013) and gamma-aminobutyric acid (some strains of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.; Barrett *et al.*, 2012). Stressful condition may increase the permeability of the gastrointestinal mucosa and cause MI dysbiosis (Di Mauro *et al.*, 2013; Montiel-Castro *et al.*, 2013).

The aim of this study was therefore to assess the association between the intestinal microbiota and TB in pigs by characterizing and comparing the IM structure and composition and stress response (as assessed by serum cortisol) between biters, bitten and control pigs during and after a TB episode at the farm.

i- Materials and Methods

a- Animals and housing

A total of 352 pigs (Landrace x Large White hybrid sows sired with Duroc x synthetic hybrid boar), presenting undocked tail and of 8 weeks of age, were distributed into 32 growing-finishing pens (2.06 x 3.35 m) located in two separate rooms (16 pens/room) at a conventional farm. See description of the experimental setting in Additional file 1. Each pen contained 11 pigs (6 females and 5 males). To ease identification, pigs were tagged and their back painted with a 25-30 cm colored number (0-10). This labeling was supplementary to the ear-tag system already in place in the herd.

Pigs were fed a commercial corn and soy based granulated diet. The feeding protocol consisted of: pre-fattening feed with 0.5 kg/ton of Salinomycin for two and a half weeks, fattening feed with 0.5 kg/ton of Salinomycin for three and a half weeks, No.1 growth feed with 0.21 kg/ton of Salinomycin for three and a half weeks, No.2 growth feed with 0.21 kg/ton of Salinomycin for 10 days and finishing feed with 0.15 kg/ton of Narasin until the end of fattening. Animals had a free access to food and water at all times. Ambient conditions (ventilation and temperature) were established according to conventional breeding recommendations.

All pigs were handled and treated in accordance with the guidelines of the local animal welfare committee and the Canadian Council on Animal Care Guidelines (CCAC, 2009). The protocol was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, certificate number 17-Rech-1858.

b- Behavioral assessment

Tail-biting behaviors were recorded as two-dimensional images on video cameras (1080p resolution, day/night). The camera's caption frequency was 4 Hz with a recording capacity of 7 days. For 32 pens, 16 cameras were installed above the pens in a position that allowed to film two pens at a time. A continuous 24h/24h recording was done, from the beginning to the end of a TB episode. These recordings were transferred to a computer every two

days for analysis of pigs behavior. A two-minutes interval sampling (Darmaillacq et Lévy, 2015) on a 24 hours video in four pens from which animals presented tail-biting was done as a preliminary test in order to determine the periods when the biting of tails occurred.

Subsequently, five pens where tail-biting was present were selected for developing an ethogram (**Table 1**) based on a pre-observation period of 48 hours video recordings. The main behaviors presented in the ethogram included tail accessibility, nibbling of the tail by the biter, duration of the nibbling behavior, frequency of tail nibbling, time when the nibbling occurred and the receiver's response.

Table 1. Ethogram: behavior noted during the growing period (Adapted from Quent, 2015)

Behavioral classes	Codes	Behavioral Items	Description
Rest	R	Rest	Eyes closed (= not awoken) or open (= awoken)
Intake	N	Eating	Food intake from the feeder
	B	Drinking	Drinking water from the trough
Explorative behavior towards the enclosure	FL	Sniffing, licking of the enclosure, nosing	Orientation of the head towards a substrate (floor, walls) and sniffs, smells or licks
Harmless social behavior	CQ	Contact with the tail (with reaction -)	Touches the tail with a reaction from the receiver, who is startled or moves away.
	CQ ⁻	Contact with the tail (without reaction)	Touches the tail without a reaction from the receiver, who doesn't move.
	DQ ⁻	Moves the tail (with reaction -)	Moves the tail with a reaction from the receiver, who is startled or moves away.
	DQ	Moves the tail (without reaction)	Moves the tail without a reaction from the receiver, who doesn't move.
Harmful social behavior (biting of the tail)	PQG ⁻	Takes the tail in its mouth (with a reaction -)	Takes the tail in its mouth with a reaction from the receiver, who is startled or moves away.
	PQG		

		Takes the tail in its mouth (without reaction)	Takes the tail in its mouth without a reaction from the receiver, who doesn't move.
--	--	--	---

Ethogram elaborated from pre-observations of a 48h video recording in 4 pens where tail-biting was present, watching the behaviour of pigs and focusing on biting of the tail.

In order to further define groups of animals to be studied, the “target behavior sampling” method (Darmaillacq et Lévy, 2015) centered on observations of the behavior of interest (tail-biting) was used on recordings of the ten pens where tail-biting was present, based on the ethogram elaborated. Sampling observations were distributed among two periods: from 10:00 am to 12:00 am and from 20:00 pm to 22:00 pm, which corresponds to the culmination points of tail-biting activities, based on the ethogram. Sampling survey lasted for eight consecutive days until the study groups included 12 biter pigs, 12 bitten pigs and 12 negative controls (non-bitten, non-biter). Regarding the control pigs, they were selected in pens where tail-biting behaviors were absent, according to the criteria defined in the ethogram. For the group of bitten pigs, all animals were examined on the basis of a growing scale of tail damage scores from 0 to 3 (0: no lesion, 1: presence of scratches, 2: presence of a moderate bleeding lesion, 3: significant lesion with sometimes a loss of tail section) (Ifip, 2016). The bitter pigs were selected according to the elaborated ethogram. This examination was made in-farm every two days in the 10 pens where tail-biting was present among the 32 pens of the study. All selected pigs were kept in their respective pens to continue observing them in their original and known environment. The behavior of all groups were studied simultaneously throughout a tail-biting. During the same period, we analyzed intestinal microbiota and cortisol.

We also used a positive control group (12, non-bitter and non-bitten ATB treated) in which compositional changes of the intestinal microbiota were induced by the addition of the antibiotic (ATB) chlortetracycline at 1210 ppm to their diet during seven days before each sampling date. No blood sample has been taken for cortisol analysis in this group.

c- Blood and feces sampling

All pig groups (biter, bitten, negative controls), containing 12 pigs each, were sampled during two different periods: t0 (Pig age: around 12 weeks) started right after the selection of the groups and t1 (4 weeks after t0) which corresponded to the time when the tail-biting episode was considered finished.

For faeces sampling, fresh fecal material was collected directly from the rectum of animals. A one gram fraction (from five 200 mg subsamples from the same animal) was frozen immediately in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until DNA extraction.

Blood (approx. 5 ml) was collected from the jugular vein of snared pigs by an experienced technician in the pen. Blood samples were kept at room temperature for 2 h to allow blood to clot prior to centrifugation (15 min at 1,000 x g). The serum was transferred to 1.5-mL Eppendorf tubes and stored at -80°C pending cortisol concentration analysis.

d- ELISA targeting stress hormone

Serum cortisol concentration was determined using the Cortisol ELISA Kit (Pig) (Abnova, Taiwan, catalog number KA2338, 96 assays). The minimum detectable concentration of cortisol for this test was estimated at 0.2 ng/ml.

e- Sequencing of 16s ribosomal RNA genes

The total DNA was extracted from 500 µg of each frozen faeces sample with the phenol-chloroform technique, as described by Thibodeau *et al.* (2015). Briefly, the cells were lysed with 500 µl of lysis buffer composed of 500 mM of Tris-HCl (#BP-153-1 Fisher Chemical), 1% of SDS (#0-2674-25 Fisher Chemical) and 200 mM of EDTA (#BP-120-500 Fisher Chemical). A mechanical lysis was then executed using a FastPrep® during 40 seconds at 6 m/s and repeated 5 minutes later, with samples kept on ice between runs. Proteins were subsequently separated from the DNA by the use of phenol: chloroform: isoamylalcohol 25:24:1 (#P2062-100 Sigma-Aldrich). The phenol traces were removed by the use of chloroform: isoamylalcohol 24:1 (C0549-1QT Sigma-Aldrich). The DNA was precipitated by 90% ethanol and then solubilized in a solution of 1 mM Tris-HCl and 0.1

M EDTA. Negative controls without faeces and positive controls with a known bacterial community (ZymoBIOMICS™ microbial community standard from Epigenetics Company, Cederlane) were processed alongside the fecal samples. The purified DNA samples were quantified by QFX Fluorometer (DeNovix) with Qubit BR test (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). The DNA extracts were stored at -20°C for further analyzes. The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using primers 515FP1-CS1F ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA and 806RP1-CS2RTACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT (Invitrogen, United States) (Caporaso *et al.*, 2012). The Platinum SuperFi PCR Master Mix (Invitrogen, United States #12351-010) was used with 12.5 ng of DNA in a total reaction volume of 25 ng. The amplification was carried out according to the following conditions: 95°C for five minutes, followed by 23 amplification cycles and a final elongation at 72°C for 10 minutes. The three stages of amplification cycles were: 30 seconds at 98°C, 30 seconds at 55°C and three minutes at 72°C (Caporaso *et al.*, 2012). Subsequently, 20 µl of amplified fragments (PCR products) were sent to Genome Québec for sequencing (2x250 pb) by an Illumina MiSeq platform. All sequences obtained were analyzed using Mothur software version 1.35.5 (Kozich *et al.*, 2013), following the protocols developed in our laboratory (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017). A taxonomic assignment of the sequences was made using the Ribosome Database Project (RDP). The sequences with a 97% similarity (species level) were grouped into operational taxonomic unities (OTUs). Different indexes (number of OTUs, coverage, Shannon index and inverse Simpson's index) were calculated in Mothur to analyze alpha diversity of fecal samples from pigs of different groups, at t0 and t1, using a subsample of 32 374 sequences to decrease possible bias caused by non-uniform samples. For beta diversity analysis, the distance between all samples was measured by the Yue-Clayton calculator and the Jaccard index using the same number of sequences as previously used. Similarities of the bacterial communities were visualized by, a non-metric multidimensional scaling (NMDS) graph, and each two groups (Bitter/Bitten, Bitter/Negative Control, Bitten/Negative Control) were compared at t0 and t1 by the analysis of molecular variance (AMOVA) test (Martin., 2002). In addition, LEfSe analysis (Segata *et al.*, 2011) was used to discover bacterial taxa significantly associated with each group within each sampling (t0 and t1).

f- Real-time quantitative polymerase chain reaction of specific bacterial populations

In order to validate and quantify some of the results obtained from sequencing, a quantitative PCR targeting lactobacilli was performed on all samples (at t0 and t1). Standard curves were made from amplicons derived from control strains (*Lactobacillus acidophilus* atcc 314). Each well contained 4 µl of Evagreen (MBI Montreal Biotech inc., Kirkland, Canada), 0.6 µl of forward primer, 0.6 µl of reverse primer, 12.8 µl of water and 2 µl of DNA at 10 ng/µl. The amplification was done by a LightCycler 96 real-time PCR (Roche diagnosis, Mannheim, Germany) according to the following program: 50°C for two minutes, 95°C for ten minutes, followed by 45 amplification cycles of 95°C for fifteen seconds and 60°C for sixty seconds, with a high resolution fusion at the end.

The EvaGreen mastermix (Montreal Biotech, Montreal, Canada) and specific primers were combined to 10 ng of DNA for a reaction total volume of 30 µl. The results (number of gene copies) were expressed in log per ng of DNA.

g- Statistical analysis

The test used to compare the tail-biting frequencies was a linear model with repeated measurements and time used as an intra-subject factor. (software SAS v9.3).

Regarding the comparison of the different indexes of the alpha diversity, a linear model of repeated measurements with time used as intra-subject factor and the group as an inter-subject-factor was used.

The test used to compare the results obtained from quantitative PCR and serum cortisol levels was a linear model with the group as factor between subjects. A priori contrasts were used to compare the averages between the different groups.

The AMOVA test was used to compare the beta diversity between the different groups (comparison 2 groups at a time) using Mothur software (Kozich *et al.*, 2013).

Regarding the cortisol, a linear model used with a group as an inter-subject-factor was used. All the statistical tests were made at t0 and t1 by comparing the following groups: bitter/negative control, bitter/bitten, bitten/negative control. The alpha threshold (different than 0.05) was adjusted downwards with the sequential method of Benjamini-Hochberg.

ii- Results

a- Tail-biting behaviour

In this study, tail-biting behaviours were already observed in 10 pens (out of 32) after the first 5 weeks of the growing/finishing phase. About 40 biter pigs were then preselected by the “behavior sampling method” (two observations of two hours/24h for 7 days). Initial pig selection was determined based on tail-biting frequencies ranging from 5 to 39 bites during the pre selection period. To obtain the required sample size (12 pigs), biters were further selected based on the highest biting frequency (> 20 bites) in the different observation periods within the same week and allocated into 7 pens (**Fig. 4**).

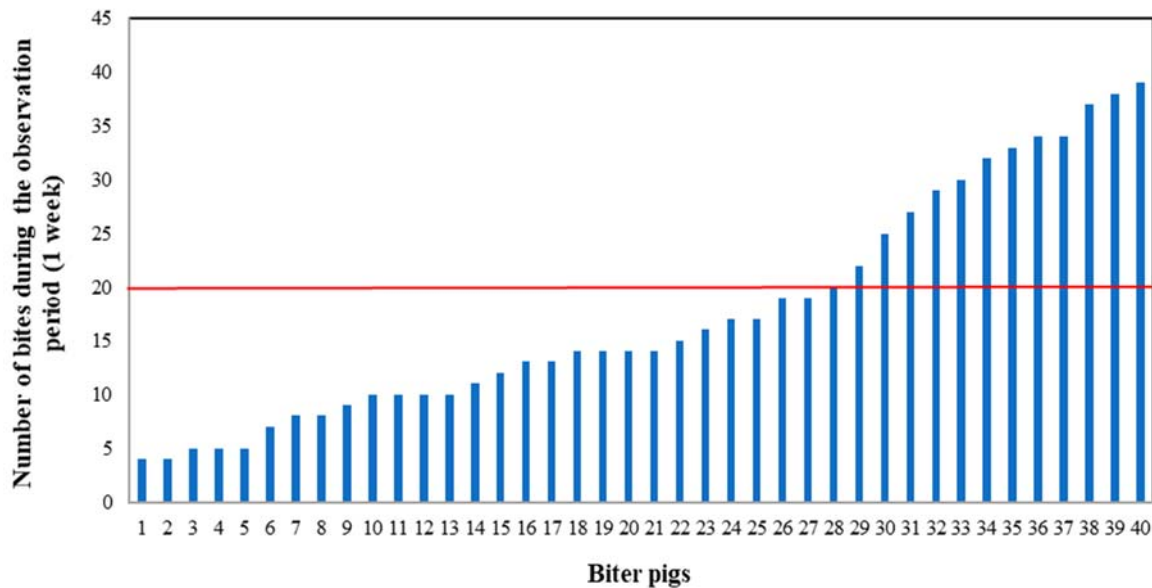


Fig. 4

Diagram showing bites number for each pig over a one week observation period and threshold retained to select biter pigs within the 10 pens where tail-biting was present. The threshold was selected based on the highest tail-bite number and according to the required number of pigs for the study.

Within the 10 pens where tail-biting behavior was observed, 70% of pigs presented no tail damage (0 score), while 13 and 17% showed some scratches (score 1) and a small bleeding lesion (score 2) on the tail, respectively. Twelve pigs chosen within the score 2 tail damage group were used to create groups of bitten individuals and were distributed into 7 pens. Furthermore, 12 pigs randomly selected out of the 0 score tail damage group were defined as control.

b. Behavior and tails condition through the study

In regards to the behavior of the biter pigs selected it was observed that tail-biting reached a peak at the moment of selection (t0) and then decreased in the following weeks until it became practically nonexistent at the fourth week (t1). This relatively quiet period continued until the end of the growing period for the twelve selected biter pigs (**fig. 5**). However, new cases of tail-biting occurred in other pens.

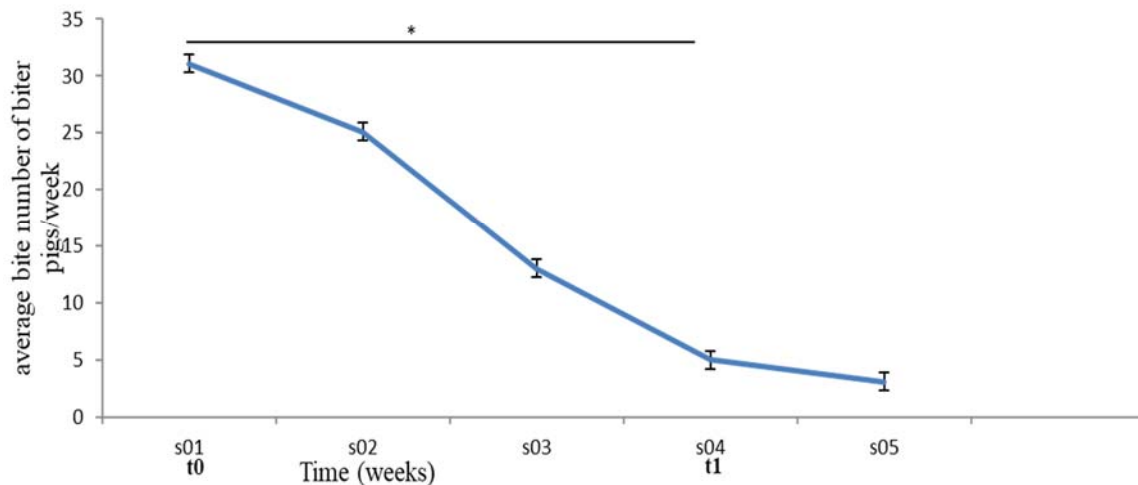


Fig. 5

Variation of tail-biting in biters over time. Graph representing the behavior tracking of the 12 selected biter pigs according to time during the tail-biting episode. t0: at the moment of biter pig's selection. t1: 4 weeks following selection. *p<0.0001.

All tails of bitten pigs healed between 2 and 4 weeks after selection (t1) and remained intact until the end of the finishing period. Finally, controls never become biters or bitten pigs during the study.

c. Variation of serum cortisol concentration

Serum cortisol levels were higher in biter and bitten pigs than negative control pigs at t0 (p = 0.2 and p < 0.01, respectively; **Fig. 6**). No difference in cortisol levels was found between groups at t1 (p>0.05).

No difference was observed between the bittens and bitters at t0 and t1.

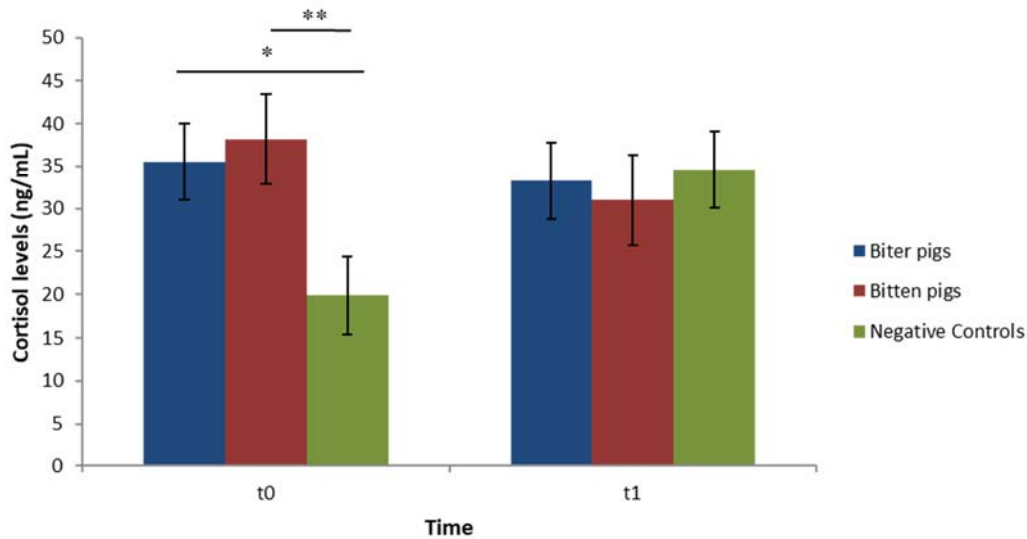


Fig. 6
Diagram representing the average cortisol serum concentrations of biter and bitten pigs versus the negative control pigs during a tail-biting episode. t0: started right after the selection of the groups. t1: started four weeks after the selection. * $p < 0.02$; ** $p < 0.0076$.

d. Alpha and beta diversity

A total of 6 434 624 sequences were obtained by sequencing 94 samples (at t0 and t1). The sequences were grouped into 12 810 OTUs with a 97% similarity. Samples contained in average 69 189 sequences and 136 OTUs. The lowest value observed for a sample was 32 374 sequences and 252 OTUs and the highest value was 92 843 sequences and 1 257 OTUs. Most of the sequences were bacterial (6 297 598 sequences, ie 97.01% of all the sequences) and Archean sequences (193 567 sequences, ie 2.98%).

The negative controls for DNA extraction and PCR presented respectively 139 and 4807 sequences. An acceptable error rate of 0.094% was observed, based on the composition of the reference community.

When we compared the positive control group (non-bitter and non-bitten ATB treated) with the negative control group (non-bitter and non-bitten), a significant difference was found in both alpha diversity and in beta diversity using the Yue & Clayton index (Yue and Clayton) that takes into account relative abundances. To visualize this result, a NMDS

graph was created for t0 and t1. This difference was also significant using the Jaccard index [see **Additional file 2**].

i) Alpha diversity

When comparing each two groups at t0 and t1, no significant variation in the alpha diversity was detected (**Table 2**).

Table 2

Comparison of alpha-diversity indices of the intestinal microbiota of selected groups

Indexes	Groups at t0			Groups at t1		
	Biter pigs	Bitten pigs	Negative controls	Biter pigs	Bitten pigs	Negative controls
OTUs	777.85	784.38	791.55	769.28	815.56	834.31
Shannon-even	0.7217	0.7323	0.7118	0.7099	0.7345	0.7356
Inverse Simpson	50.3186	55.6332	44.2283	44.2646	53.5795	55.216

Comparison of alpha-diversity indexes of the intestinal microbiota of biter and bitten pigs versus the negative control pigs during a tail-biting episode. t0: right after the selection of the groups. t1: four weeks later.

ii) Beta diversity

Beta-diversity was compared between selected groups using the AMOVA statistical test (**Table 3**).

Table 3 Comparison of beta-diversity of the intestinal microbiota of selected groups

Time	Compared groups		AMOVA (p-value)	
			Yue and Clayton	Jaccard
t0	Biter	Negative control	0.001*	0.246
	Bitten		0.001*	0.306
t1	Biter		0.244	0.318
	Bitten		0.295	0.55

Analysis of intestinal microbiota's beta diversity of biter and bitten pigs versus the negative control pigs during the tail-biting episode. t0: started right after the selection of the groups. t1: started four weeks later. Based on 1 000 subsampling of 32 374 sequences.

* Statistically significant after adjusting the alpha threshold downwards with the sequential method of Benjamini-Hochberg.

For the comparison of the negative control group with the biter and bitten pigs, a significant difference in structure was observed using the Bray-Curtis index at t0 (**fig. 7**), but none when using the Jaccard index. Conversely, no significant difference was observed at t1 (**fig. 7**), using both indexes.

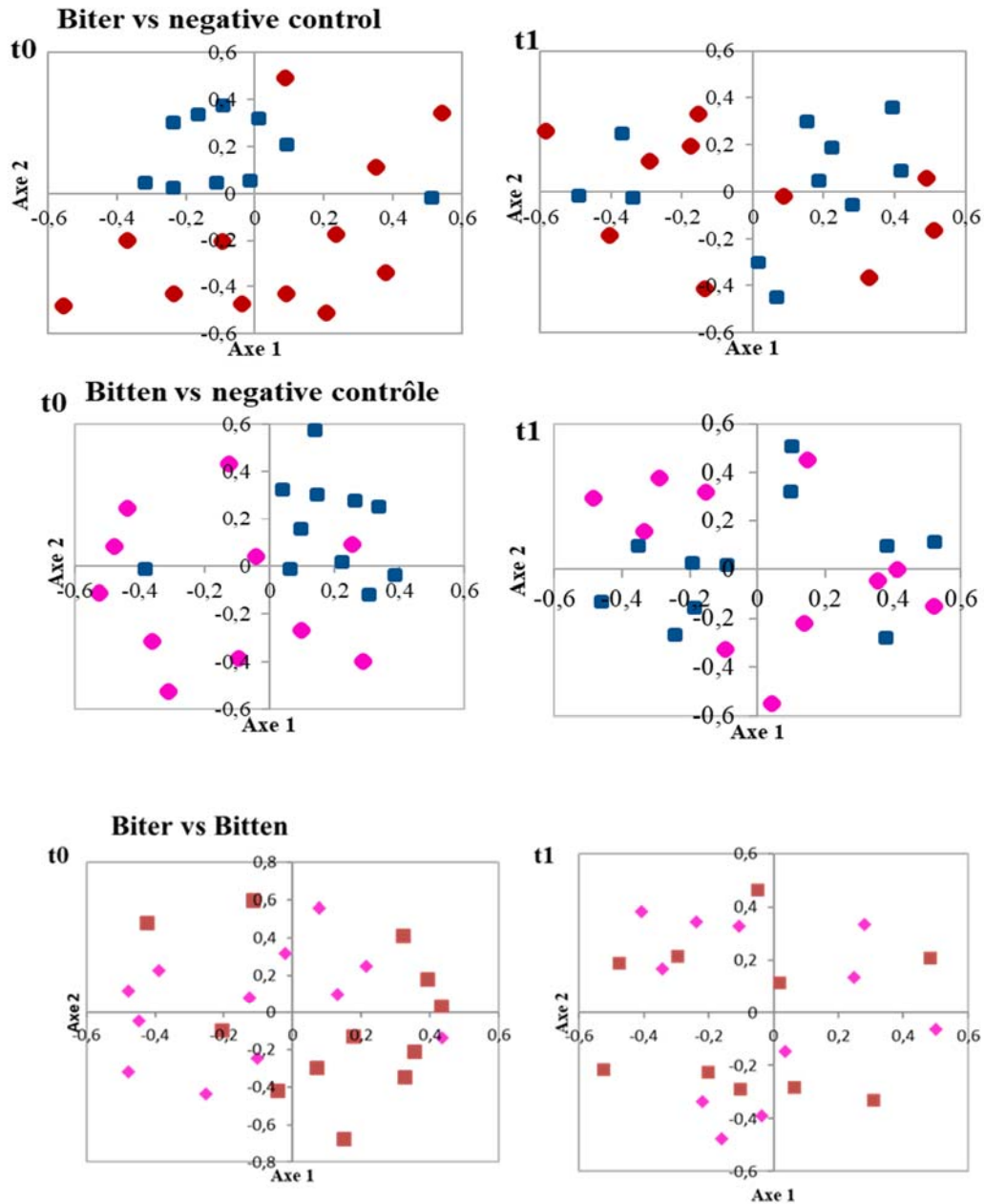


Fig. 7
 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the comparison of intestinal microbiota of biter and bitten pigs versus the negative control pigs. t0: started right after the selection of the groups. t1: started four weeks after the selection. Blue: negative control pigs; Red: biter pigs; Pink: bitten pigs.

Sequences with 97% similarity were grouped into OTUs which were considered equivalent to the species. To identify bacterial taxa associated with the intestinal microbiota between the different groups at each sampling time, a LefSe analysis was performed. When comparing the control group with the biter group at t0, two different genera and twenty-

two different species were associated with the biter group and seven genera and twenty species were only associated with the negative control group. It has been noticed that the genus *Corpococcus* and two unclassified species (bacteroidetes and firmicutes) of *Bacteroidetes_unclassified* were the most abundant, with the highest LDA scores followed by the genus *Corpococcus* (LDA= 3.3) in the biter group, the genus *Lactobacillus* and the *Lactobacillus* species (LDA= 4.47) in the negative control group [see Additional file 3].

At t1, two different genus and nine different species were associated with the negative control group. The most associated were the *Roseburia* genus and the species *Lachnospiraceae_unclassified*. [see Additional file 4].

When comparing the negative control group with the bitten group at t0, five different genera and thirty-three different species were associated with the bitten group. As for the negative control group, four genera and twenty-three species were associated with this group. It has been noticed that the genus *Sphaerochaeta* and the species *Phascolarctobacterium* (LDA= 3.61) were the most associated with the bitten group and the genus *Lactobacillus* while the species *Lactobacillus* (LDA= 4.58) with the negative control group [see Additional file 5].

As for t1, one genus (*Alistipes*) and five Species were found in the bitten group compared to five Species only found in the negative control group. The most associated species for the bitten group was *Prevotella*. A different *Prevotella* species was the most associated one with the negative control group [see Additional file 6].

e. Real-time quantitative polymerase chain reaction

A PCR assay was performed to quantify and confirm some results obtained by sequencing for lactobacilli. A significant difference was observed when comparing biter and bitten pigs with negative control pigs at t0, with respective average of 1.15 and 1.11 log of the number of copies of gene/ng of DNA. However, no difference was observed at t1 (**fig. 8**). This confirmed the results obtained during the LEfSe analysis.

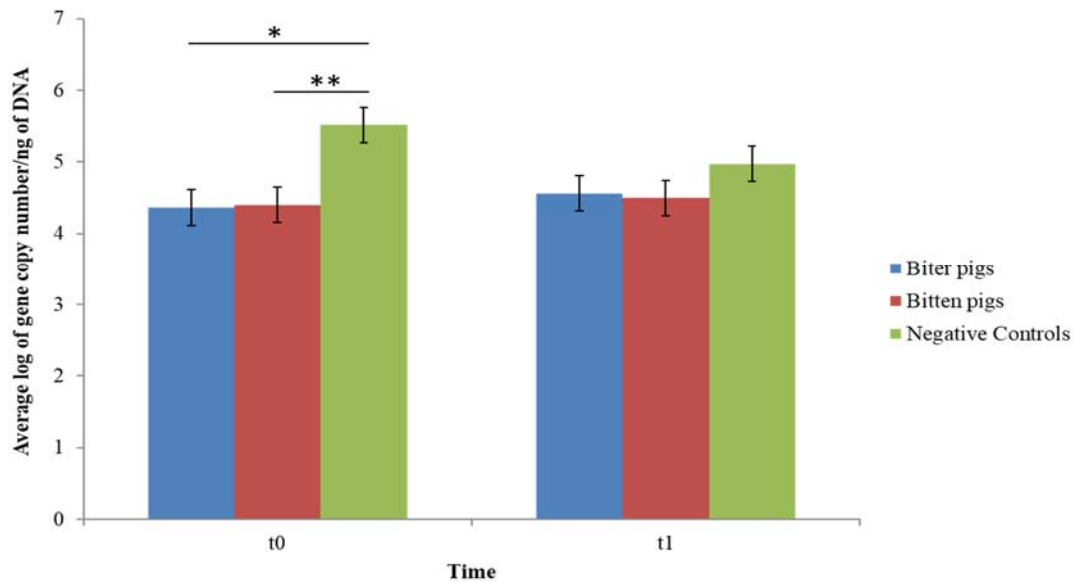


Fig. 8
 Diagram illustrating the average log of gene copy numbers of lactobacilli in biter and bitten pig's fecal matter samples versus the negative control pigs during the tail-biting episode. t0: started right after the selection of the groups. t1: started four weeks later. * $p < 0.003$

Discussion

The aim of this study was to determine a possible link between pigs tail-biting behaviour and their intestinal microbiota. In order to achieve this, a selection of different groups (biter, bitten and positive and negative controls) was done in a commercial fattening setting during a tail-biting episode with the help of video recordings. Similar to a number of studies (D'Eath *et al.*, 2014; EFSA, 2007; Taylor *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017), in this study tail-biting appeared two weeks after the start of the growing period and initially only in a couple of non-contiguous pens. Tail biting within the farm appeared heterologous in time (Ursinus *et al.*, 2014). The tail-biting behaviour decreased gradually in the 12 selected bitter pigs until it became practically nonexistent at the fourth week after t0. However, we noticed some new cases of TB in other pens emerging later on in the fattening unit. Tail biting within the farm appeared heterologous in time (Ursinus *et al.*, 2014).

The present study addresses this association and provides new information on the structure and the composition of the microbial community of biter and bitten pigs compared to pigs

not exhibiting any sign of biting or being bitten, raised in the exact same conditions as all other pigs in the study. We compared cortisol levels, a traditional measure of stress in pigs, (Ruis *et al.*, 2001) in the different groups. In comparison to the negative control group, at t0, cortisol levels were higher in both biter (when tail-biting was at its peak) and bitten pigs (where fresh lesions were present). In fact, it has been reported that acute stress in pigs causes higher cortisol levels (Ruis *et al.*, 2001; Valros *et al.*, 2013). In regards to the bitten pigs, our results are in agreement with previous results showing high cortisol levels for bitten pigs, as measured by sampling saliva from pigs showing moderate and fresh lesions (Smulders *et al.*, 2006).

At t1, contrary to t0, there was no significant difference in cortisol levels when we compared the bitter (after the tail-biting episode) and bitten pigs (when lesions on the tail were healed) to the negative control group. When we compared bitter and bitten pigs, there was no difference in cortisol levels either at t0 or t1. Many studies already used high throughput sequencing methods to explore the composition of animal's intestinal microbiota. In this study, we compared the structure and the composition of the microbial community in stool samples of biter and bitten pigs to negative controls, by sequencing the V4 region of the 16S RNA gene.

As part of the validation of our methodology to study the IM structure, one group of pigs was treated with antibiotics in order to have a positive control for intestinal microbiota changes. Our results showed that the antibiotic had indeed an impact on the relative abundance and the presence or absence of specific species, as expected. It is well-known that antibiotics have an important impact on the diversity and the representation of specific taxa in the intestinal microbiota (Jernberg *et al.*, 2007).

We observed that biter and bitten pigs have a different microbiota composition in comparison to negative control groups. In our current state of knowledge, these bacterial species found respectively in biter and bitten pigs (*Coprococcus*, *Phascolarctobacterium*), are not yet reported as having an association with behavioral disorders. The same observation stands for the *Coprococcus* and *Spaerochaeta* genera.

We described here for the first time the relationship between tail-biting and structure and composition of fecal microbiota of biter and bitten pigs in comparison to negative controls. Since this character is considered as a severe behavioral disorder in pigs, it could be interesting to analyze results in reference to what is already known in other species such as in human and mice, where it has been demonstrated that change in IM are related to stress.

We show here that, the relative abundance of *Lactobacillus* species allowed us to distinguish negative control groups from biter and bitten groups, as demonstrated by amplicon sequencing and qPCR. It has been already reported that some species of *Lactobacillus* are associated to behavior (anxiety and depression) in human (Cepeda *et al.*, 2017; McKean *et al.*, 2016; Maes *et al.*, 2012) and mice (Wikoff *et al.*, 2009; Valladares *et al.*, 2013). Therefore, different species of the *Lactobacillus* genus are widely used in probiotics for decreasing behavior disorders, such as *Lactobacillus rhamnosus JB-1* for anxiety and stress (Bravo *et al.*, 2011) and *Lactobacillus helveticus R0052* for depressif behaviors (Messaoudi *et al.*, 2011). It would nevertheless be appropriate to establish a cause-effect relationship between the species and genera found and tail-biting.

Since this study was carried out in the field, it must be noted that different risk factors most of which are also stress factors (Richards, 2013) (associated with tail-biting were already present, such as entire tails, slatted floors without enrichment and a relatively high density (eleven pigs in each pen instead of ten) (EFSA, 2007). It's noteworthy to mention that biter and bitten pigs were in the same pens. Therefore, it is not possible to conclude on the impact of these factors, since all pigs were subject to the same environment. Also, we cannot exclude the possibility that one or more of these factors may have had a role in the emergence of TB. However, efforts were made to note changes in health conditions that could have influenced the emergence of tail-biting, but no apparent change was observed. Furthermore, the aim of our study was not to identify risk factors associated with TB; rather it was to investigate an association between TB and the IM.

Stress can generate an increase in the permeability of the gastro-intestinal mucosa (Gareau, 2008) and cause dysbiosis (imbalance of bacteria producing neurotransmitters that control animal behavior), that in return can cause a behavior disorder such as biting of the tail. The

opposite hypothesis is also possible, that is dysbiosis causing stress in pigs, which then transpires as a behavioral disorder: tail-biting. The present study doesn't allow us to determine the causal link of this phenomenon. Other studies will be needed in order to clarify this causal link and the involvement of other components of the intestinal brain axis in this behavioral disorder in pigs.

Conclusion

Overall, the results of this study provided the first ever evidence of a relationship between the expression of tail-biting in pigs (biters and bitten) and the intestinal microbiota diversity. We indeed demonstrated that the TB behavior is associated to the IM beta diversity. The microbiota of biter and bitten pigs was also different, in terms of structure and composition, from the negative control group. Furthermore, biter and bitten pigs were found to be stressed in comparison to the negative control group, as illustrated by higher cortisol levels. Pigs in the negative control group had more *Lactobacillus* genus, which has also been associated to human and mice behavior. However, the mechanisms underlying the association between tail-biting and IM are still unknown and further studies are needed in order to better understand the causal link between TB and IM.

Supplementary material

Additional file 1:

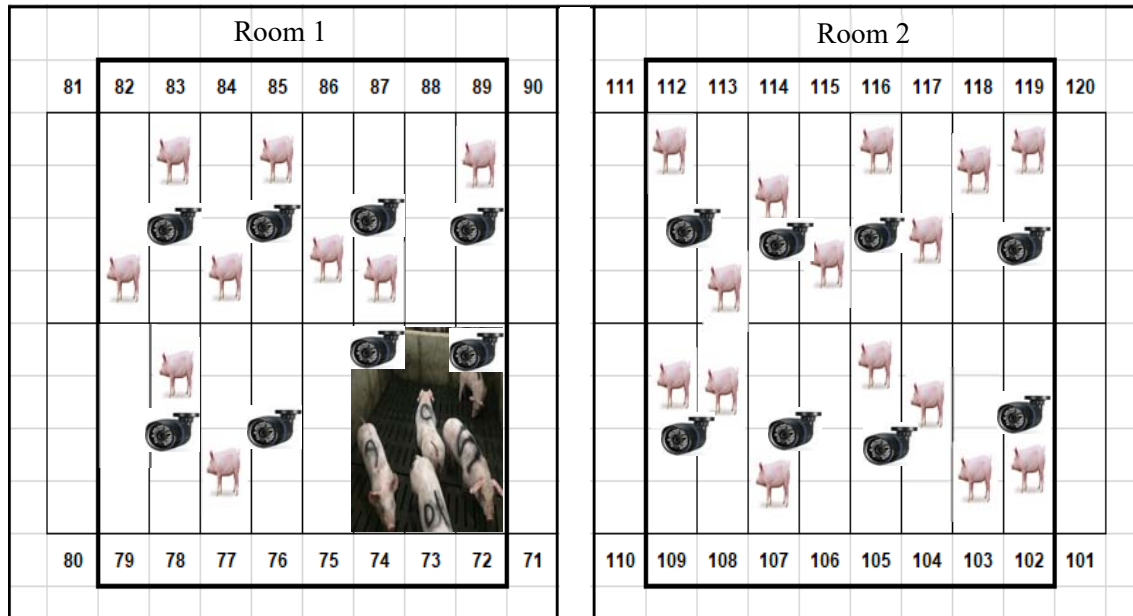


Fig. 9 On farm experimental setting. A total of 352 pigs were distributed into two rooms, in which 32 (2 x 16) flat deck pens of 2.06 m x 3.35 m were used. There were 11 pigs per pen (six females and five males). To facilitate the recognition of individuals in a pen, a colored number from 0 to 10 was painted on the animal's back. This labeling was supplementary to the ear-tag system already in place in the herd.

Their behaviour monitoring was made by using 16 surveillance cameras.

Additional file 2.

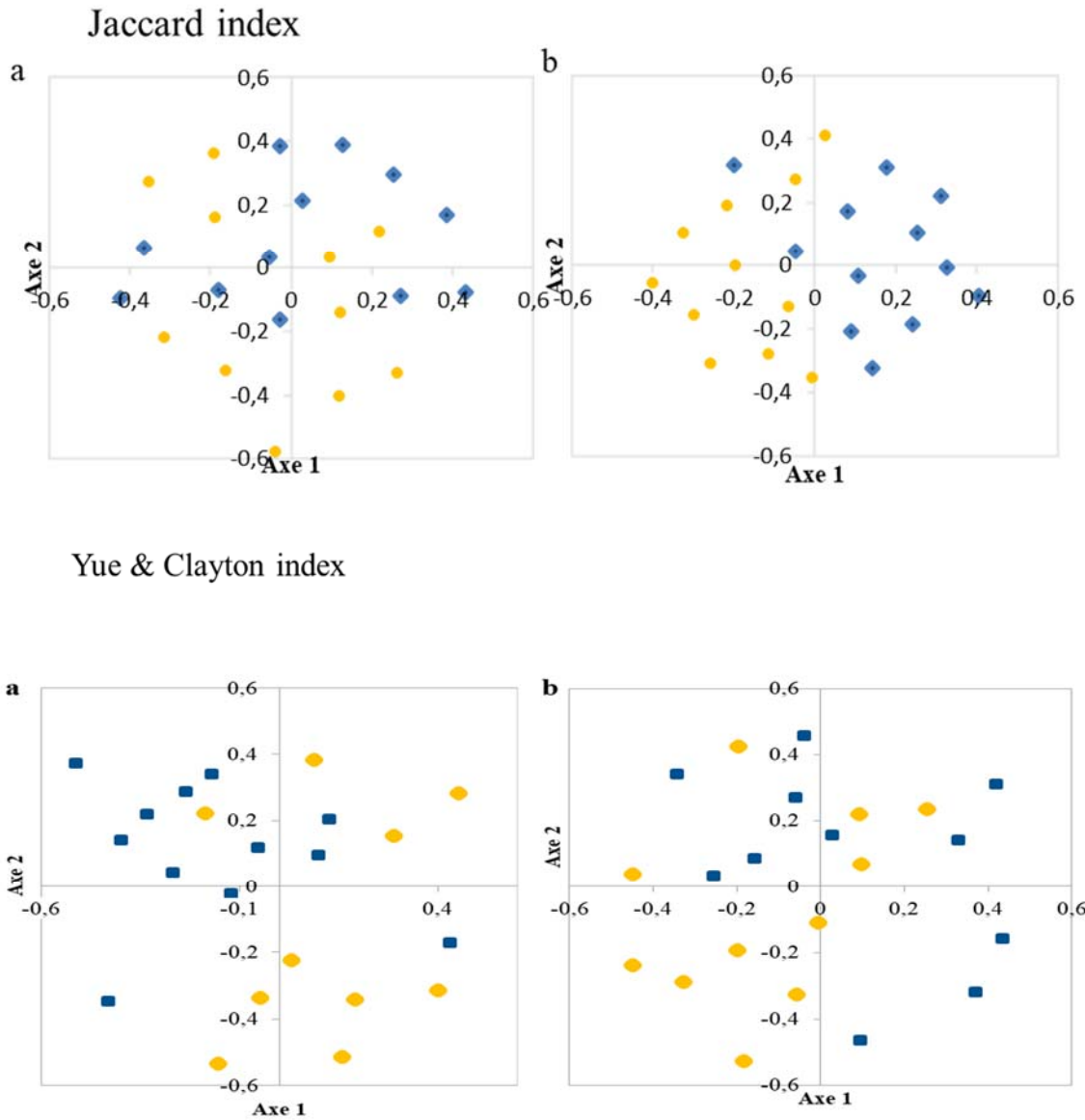


Fig. 10 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot illustrating the comparison of intestinal microbiota of the ATB treated positive control group with the negative control pigs. (a) t0: started right after the selection of the groups. (b) t1: started four weeks later. Blue: negative control pigs; yellow: ATB treated positive control group.

Additional file 3

Table 4: OTU and genera associated with biter pigs versus negative control pigs, at t0

GENUS				
	Taxonomy	Class	LDA	pValue
<i>Coprococcus</i>	<i>B.F.C.Clostridiales.Lachnospiraceae</i>	biter	3.30	0.0163
<i>Clostridium_IV</i>	<i>B.F.C.Clostridiales.Ruminococcaceae</i>	biter	2.69	0.0312
<i>Lactobacillus</i>	<i>B.F.Bli.Lactles.Lactctobacillaeae</i>	N. control	4.47	0.0031
<i>Butyricococcus</i>	<i>B.F.C.Cles.Bacteroidales</i>	N. control	3.54	0.0363
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	<i>B.F.C.Cles..Lachnospiraceae</i>	N. control	2.54	0.0163
OTU				
	Taxonomy	class	LDA	pValue
Otu00020	<i>B.Btes.Bacteroidetes_ucl</i>	biter	4.03	0.0097
Otu00069	<i>B.Firmicute_ucl</i>	biter	3.41	0.0007
Otu00045	<i>B.F.C.Cles.Lachnoe.Coprococcus</i>	biter	3.25	0.0163
Otu00096	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	biter	3.01	0.0476
Otu01288	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Faecalibacterium</i>	biter	2.86	0.0404
Otu00128	<i>B.F.C.Cles.Lachno.Blautia</i>	biter	2.79	0.0363
Otu00027	<i>B.Btes.Btes_ucl</i>	biter	2.77	0.0116
Otu00139	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Alloprevotella</i>	biter	2.72	0.0363
Otu00107	<i>B.Btes.Btes_ucl</i>	biter	2.70	0.0263
Otu01045	<i>Clostridiales_ucl</i>	biter	2.66	0.0036
Otu01146	<i>Clostridia_ucl</i>	biter	2.65	0.0404
Otu01361	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	biter	2.63	0.0414
Otu00975	<i>Ruminococcaceae_ucl</i>	biter	2.61	0.0113
Otu00797	<i>Clostridiales_ucl.</i>	biter	2.60	0.0404
Otu01377	<i>B.Firmicutes_ucl</i>	biter	2.60	0.0404
Otu01071	<i>Clostridiales_ucl</i>	Biter	2.58	0.0299
Otu01557	<i>Lachno_ucl</i>	Biter	2.54	0.0404
Otu00169	<i>Clostridiales_ucl</i>	Biter	2.54	0.0011

Otu00152	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	biter	2.54	0.0225
Otu00797	<i>Clostridiales_ucl</i>	biter	2.52	0.0404
Otu01506	<i>Bacteroidale_ucl</i>	biter	2.50	0.0404
Otu01628	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	biter	2.49	0.0404
Otu00002	<i>B.F.Bacilli.Lactles.Lactceae.Lactobacillus</i>	N. control	4.51	0.0016
Otu00016	<i>B.F.C.Cles.Lachno.Cellulosilyticum</i>	N. control	3.94	0.0056
Otu00037	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	N. control	3.42	0.0163
Otu00142	<i>Actinobacterium_ucl</i>	N. control	3.17	0.0193
Otu00164	<i>Ruminococcaceae_ucl</i>	N. control	3.02	0.0163
Otu00132	<i>B.F.C.Cles.Peptococcaceae_1.Peptococcus</i>	N. control	2.86	0.0488
Otu01257	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Ruminococcaceae_ucl</i>	N. control	2.77	0.0254
Otu00245	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	N. control	2.76	0.0422
Otu01360	<i>B.F.C.Clostridiales_ucl</i>	N. control	2.76	0.0105
Otu01975	<i>B.F.C.Cles.Lachno.Dorea</i>	N. control	2.76	0.0254
Otu01968	<i>Porphyromonadaceae_ucl</i>	N. control	2.73	0.0254
Otu00267	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Paraprevotella</i>	N. control	2.71	0.0362
Otu02401	<i>Ruminococcaceae_ucl</i>	N. control	2.70	0.0254
Otu01725	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Prevotella</i>	N. control	2.62	0.0141
Otu00258	<i>B.Oxalobacteraceae_ucl</i>	N. control	2.61	0.0080
Otu00241	<i>B.Prote.Gprot.Aerles.Suceae.Succinivibrio</i>	N. control	2.61	0.0312
Otu00181	<i>B.Spiro.Spirotia.Spiroles.Spiroceae.Treponema</i>	N. control	2.58	0.0116
Otu00175	<i>B.F.C.Cles.Lachno.Pseudobutyrvibrio</i>	N. control	2.54	0.0163
Otu00159	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Oscillibacter</i>	N. control	2.54	0.0488

Additional file 4

Table 5: OTU and genera associated with biter pigs versus negative control pigs, at t1

GENUS				
	Taxonomy	Class	LD A	pValu e
<i>Roseburia</i>	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae</i>	N. control	3.23	0.042 2
<i>Anaeroplasm a</i>	<i>Anaeroplasmataceae.Anaeroplasma</i>	N. control	2.91	0.042 2
OTU				
	Taxonomy		LD A	pValu e
Otu00051	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae_ucl</i>	N. control	3.46	0.019 3
Otu00075	<i>B.Btes.Bdia.Bacteroidales_ucl</i>	N. control	3.39	0.000 4
Otu00035	<i>B.F.C.Clostridiales_ucl</i>	N. control	3.23	0.042 2
Otu00114.	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae_ucl</i>	N. control	2.89	0.031 2
Otu00093	<i>B.Bacteroidetes_ucl</i>	N. control	2.79	0.011 6
Otu00149	<i>B.F.C.Clostridiales_ucl</i>	N. control	2.69	0.026 6
Otu00160	<i>B.F.C.Cles.Ruminococcaceae_ucl</i>	N. control	2.64	0.019 3
Otu00267	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prceae.Paraprevotella</i>	N. control	2.64	0.042 2
Otu00210	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Porphyrromonadaceae_u cld</i>	N. control	2.50	0.026 7

Additional file 5

Table 6: OTU and genera associated with bitten pigs versus negative control pigs, at t0

GENUS				
	Taxonomy	class	LD A	pValue
<i>Sphaerochaeta</i>	<i>B.Spt.Sptia.Sptales.Sptceae</i>	Bitten	3.21	0.0056
<i>Blautia</i>	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae</i>	Bitten	2.96	0.0312
<i>Lactobacillus</i>	<i>B.F.Bacilli.Lactobacillales.Lactobacillaceae</i>	n. control	4.57	0.0068
<i>Intestinimonas</i>	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc</i>	n. control	3.38	0.0363
OTU				
	Taxonomy	class	LD A	pValue
Otu00010	<i>B.F.Nega.Sel8moles.Ac.Phascolarctobacterium</i>	bitten	3.61	0.0487
Otu00027	<i>B.Btes.Btes_ucl.Btes_ucl.Btes_ucl.Btes_ucl</i>	bitten	3.26	0.0138
Otu00104	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Bles_ucl.Bles_ucl</i>	bitten	3.18	0.0068
Otu01288	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Faecalibacterium</i>	bitten	3.17	0.0405
Otu00174	<i>B.Spt.Sptia.Sptales.Sptceae.Sphaerochaeta</i>	bitten	3.16	0.0423
Otu01451	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Porphy.Parabacteroides</i>	bitten	2.90	0.0191
Otu00069	<i>B.F.F_ucl.F_ucl.F_ucl.F_ucl</i>	bitten	2.87	0.0068
Otu01334	<i>B.ActinoB.ActinoB.CorioBles.CorioBceae.ucld</i>	bitten	2.85	0.0405
Otu00128	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae.Blautia</i>	bitten	2.71	0.0267
Otu00950	<i>B.Btes.Bdia.Bles.preveceae.Alloprevotella</i>	bitten	2.70	0.0405
Otu00152	<i>B.Btes.Bdia.Bles.preveceae.Prevotella</i>	bitten	2.69	0.0132

Otu00169	<i>B.F.C.Cles.Cles_ucl.d.Cles_ucl.d</i>	bitten	2.69	0.0228
Otu00950	<i>B.Btes.Bdia.Bles.prevceae.Alloprevotella</i>	bitten	2.67	0.0405
Otu01231	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Ruminoc_ucl.d</i>	bitten	2.62	0.0405
Otu01557	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae.ucl.d</i>	bitten	2.55	0.0405
Otu00182	<i>B.F.C.Cles.Cles_ucl.d.Cles_ucl.d</i>	bitten	2.52	0.0228
Otu00266	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae.Blautia</i>	bitten	2.52	0.0228
Otu00002	<i>B.F.Bacilli.Lactles.Lactceae.Lactobacillus</i>	n. control	4.58	0.0031
Otu00016	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Bles_ucl.d.Bles_ucl.d</i>	n. control	4.03	0.0011
Otu00054	<i>B.Btes.Bdia.Bles.prevceae.Prevotella</i>	n. control	3.59	0.0423
Otu00090	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Intestinimonas</i>	n. control	3.38	0.0192
Otu01257	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Ruminoc_ucl.d</i>	n. control	2.62	0.0254
Otu00181	<i>B.Spt.Sptia.Sptales.Sptceae.Treponema</i>	n. control	2.59	0.0116
Otu01725	<i>B.Btes.Bdia.Bles.prevceae.Prevotella</i>	n. control	2.59	0.0359
Otu00258	<i>B.ProteoB.BetaproteoB.BurKles.Oxalo. ucl.d</i>	n. control	2.55	0.0228
Otu01975	<i>B.F.C.Cles.Lachnospiraceae.Dorea</i>	n. control	2.51	0.0254

Additional file 6

Table 7: OTU and genera associated with bitten pigs versus negative control pigs, at t1

GENUS				
	Taxonomy	class	LD A	pValue
<i>Alistipes</i>	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Rikenellaceae</i>	bitten	2.91	0.036
OTU				
	Taxonomy	class	LD A	pValue
Otu00021	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prevotellaceae.Prevotella</i>	bitten	3.52	0.019
Otu00174	<i>B.Sptes.Sptia.Sples.Spceae.Sphaerochaeta</i>	bitten	3.01	0.042
Otu00029	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prevotellaceae.Prevotella</i>	bitten	2.95	0.042
Otu00157	<i>B.F.C.Cles.Cles_ucl.d.Cles_ucl.d</i>	bitten	2.78	0.019
Otu00200	<i>B.Bacteroidetes_ucl.d</i>	bitten	2.53	0.036
Otu00001	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prevotellaceae.Prevotella</i>	N. control	3.90	0.022
Otu000054	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prevotellaceae.Prevotella</i>	N. control	3.37	0.011
Otu00121	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Prevotellaceae.Prevotellaceae_ucl.d</i>	N. control	2.82	0.036
Otu00231	<i>B.Btes.Bdia.Bles.Porphyceae.Porphy_ucl.d</i>	N. control	2.55	0.013
Otu00189	<i>B.F.C.Cles.Ruminoc.Ruminococcaceae_ucl.d</i>	N. control	2.51	0.036

Taxons Abbreviations:

B: Bacteria, Btes: Bacteroidetes, Bdia Bacteroidia: , Bles: Bacteroidales, F: Firmicute, C: Clostridia, Cles: Clostridiales, Ruminoc: Ruminococcaceae , Nega: Negativicutes, Spt: Spirochaetes, Sptia: Spirochaetia, Sptales: Spirochaetales, Sptceae: Spirochaetaceae, Lachno: Lachnospiraceae, proteob: Proteobacteria, Betapb: Betaproteobacteria, BurKles: Burkholderiales, Oxal: Oxalobacteraceae, prevceae: Prevotellaceae, Ac: acidaminococcaceae, Porphy: Porphyromonadaceae, ucl : unclassified, N. control: Negative control, LDA: Linear Discriminant Analysis, t0 : right after the selection of the groups. t1: started four weeks after selection of the groups.

CHAPITRE 4. Discussion générale

Chez le porc, il existe plusieurs types de troubles de comportements, tel que les stéréotypies chez les truies (Clubb et Mason, 2007) et le cannibalisme dirigé vers les oreilles ou la queue chez les porcs en croissance. Parmi autres, le mordillage de la queue ou caudophagie (CP) constitue le problème majeur durant les phases d'élevage de croissance et finition (Clubb et Mason, 2007; CIWF, 2012). Ce comportement a une origine multifactorielle (Nannoni *et al.*, 2014; Scollo *et al.*, 2017) en étant, entre autres, affecté par l'alimentation (Meyer *et al.*, 2015) via les changements du microbiote intestinal (MI) (Brunberg *et al.*, 2016).

Dans ce projet, nous avons étudié l'hypothèse qu'il existe un lien entre le MI et les troubles de comportement chez le porc, à l'instar de ce qui est connu chez l'humain et la souris (Cryan et Dinan, 2012; Collins *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Kelly *et al.*, 2016). Plus précisément nous voulions explorer le lien potentiel entre le phénomène de la CP et le MI chez le porc. Cependant, si la CP est facilement observable en élevage commercial et il n'existe pas de modèle permettant de reproduire le problème de façon prévisible en conditions expérimentales contrôlées. C'est pourquoi, afin d'étudier ce phénomène, nous avons choisi de le faire en condition terrain.

L'un des défis des études terrain est d'obtenir un nombre suffisant d'animaux démontrant le comportement ciblé. Pour ce faire, nous voulions idéalement pouvoir effectuer notre étude pendant un épisode de caudophagie. Le projet a donc été réalisé dans une ferme commerciale, et sur des porcs avec des queues entières sans mesures de prévention particulière (caudectomie ou l'enrichissement de l'environnement dans des parcs) (D'Eath *et al.*, 2014; EFSA, 2007), afin de faciliter et de pouvoir suivre l'apparition du phénomène de mordillage de la queue de façon naturelle.

Pour pouvoir relier le comportement déviant, la CP, au MI, il était primordial de pouvoir bien caractériser le phénomène et définir rigoureusement les paramètres permettant d'établir les différents groupes à l'étude. C'est pourquoi une partie importante du projet a consisté à bien étudier le phénomène de CP et identifier les individus qui démontraient ce comportement (mordeurs) ainsi que les individus qui le subissaient (mordus), en plus des porcs contrôles négatifs. Un total de 352 porcs étaient placés dans 32 parcs et le suivi de

leurs comportements a été fait à l'aide de 16 caméras. Chacune de ces dernières était fixées au plafond d'une façon qui permettait de filmer deux parcs en même temps. Dans cette étude, le phénomène de la CP est apparu 2 semaines après l'entrée des porcs à l'engraissement, dans 2 parcs. Le phénomène a commencé de façon sporadique et imprévisible dans ces parcs, en accord avec ce qui a été rapporté dans d'autres études (D'Eath *et al.*, 2014; EFSA, 2007, Taylor *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017). Au final, du début à la fin de l'engraissement, 18 sur 32 parcs ont été touchés par la CP. Donc, malgré le fait que nous avons laissé les queues des porcs entières, ce n'est pas la totalité des parcs qui a été touchée. Nous avons remarqué aussi, que même si des parcs sont voisins, il peut y avoir apparition de la CP dans l'un, et non dans l'autre, tel qu'aussi rapporté par Li *et al.* (2018). De plus, la CP disparaît au bout d'un certain temps dans ces parcs et elle recommence dans d'autres parcs. Les morsures de la queue chez les porcs n'étaient pas non plus constantes durant notre observation en accord avec ce qui a été rapporté dans d'autres études (Ursinus *et al.*, 2014). Finalement, dans les parcs touchés par ce trouble de comportement, ce ne sont pas tous les porcs qui deviennent des porcs mordus, ni des porcs mordeurs.

Selon diverses études, plusieurs facteurs de risque ont été associés à l'apparition du mordillage de la queue chez le porc (EFSA, 2007). Certains de ces facteurs de risque étaient déjà présents de manière intrinsèque soit à cause du type de bâtiment choisi, de la régie ou du design de l'étude. Par exemple, des facteurs tels que la queue intacte des porcs, le sol en caillebotis sans enrichissement de l'environnement et la densité relativement élevée est de 0,63 m²/porc. Il n'est donc pas possible de tirer de conclusion quant à la prévalence de la caudophagie puisqu'il y a possiblement eu une amplification du problème en raison de la présence de plusieurs facteurs de risque. Cependant, des efforts ont été faits pour noter l'apparition de changement dans les conditions de santé ou de régie qui auraient pu influencer l'apparition du phénomène. Toutefois, aucun changement évident n'est survenu. Par ailleurs, le but de notre étude n'était pas d'identifier les facteurs de risque associés à la CP, mais de tenter de trouver une association entre la CP et le MI.

Durant la période de sélection, nous avons identifié 12 porcs mordeurs et 12 porcs mordus dans les 10 parcs où la CP était présente. Nous avons également identifié 12 porcs contrôle-négatif dans des parcs où la caudophagie était absente. Dans cette étude, nous avons consacré un temps considérable pour l'observation (enregistrements vidéo) du comportement de mordillage de la queue afin d'optimiser la sélection des animaux. Suite à la sélection des différents groupes de porcs (mordeur, mordus, porc-contrôle négatif), nous avons réalisé un échantillonnage en 2 temps différents t0 : le moment où le phénomène de la CP a atteint son maximum dans les parcs sélectionnés et t1 : le moment où l'épisode s'est terminé selon les observations terrain au niveau des scores de lésions. Cet échantillonnage a d'abord été effectué en récoltant de la matière fécale afin caractériser le MI chez les porcs sélectionnés. Puis, nous avons prélevé du sang au niveau de la voie jugulaire afin d'analyser le cortisol par la technique ELISA.

La plupart des facteurs de risque connus qui sont associés à la CP sont des facteurs stressants (Richards, 2013). C'est dans cette perspective que nous avons comparé les taux de cortisol (une mesure traditionnelle du stress chez le porc) (Ruis *et al.*, 2001) des différents groupes de porcs. Nous avons obtenu des taux élevés de cortisol chez les mordeurs par rapport aux porcs-contrôle négatifs au moment de la sélection alors que le mordillage de la queue était à son pic. Ceci démontre clairement que ces animaux étaient, à ce moment, des porcs stressés, comparativement aux contrôles négatifs. En effet, il a été rapporté plusieurs fois chez le porc que lorsque le stress est aigu, le cortisol est élevé (Ruis *et al.*, 2001; Valros *et al.*, 2013).

Les taux de cortisol chez les mordus étaient plus élevés par rapport aux porcs-contrôle négatifs au moment de la sélection alors que les lésions étaient récentes. Nos résultats sont en accord avec des résultats antérieurs, montrant des taux de cortisol élevés chez les porcs mordus, mesurés à partir d'échantillons de salive prélevés chez les porcs avec des lésions modérées et fraîches (Smulders *et al.*, 2006). Quelques hypothèses peuvent expliquer cette augmentation. D'une part, la douleur est une cause de stress bien connue. De plus, un animal victime de CP peut montrer des signes d'anxiété telle que la peur d'exposer la queue et la fuite pour éviter les morsures (Schrøder-Petersen *et al.*, 2003).

Par contre, nous n'avons pas observé de différence dans le taux de cortisol chez les porcs mordeurs et les porcs mordus versus les porcs-contrôles négatifs au moment où les lésions de la queue ont été guéries. Nous pouvons supposer que les porcs n'étaient plus stressés à ce moment comparativement aux porcs-contrôle négatifs après la fin de l'épisode et la guérison des lésions de leurs queues. Il est à souligner que les taux de cortisol observé dans les différents groupes étaient inférieurs à ce qui est généralement rapporté dans la littérature pour les échantillons sanguins porcins (Ifip, 2016; Smulders *et al.*, 2006). Une explication possible est le fait que, pour des raisons logistiques (délais de commande du test, mise au point des paramètres par le laboratoire diagnostic de la FMV) nos échantillons de sérums ont été congelés quelques mois avant d'être traités. Ceci peut diminuer les concentrations détectables du cortisol. Cependant dans la mesure où tous nos échantillons ont été soumis au même traitement et considérant que nos résultats se situent dans les limites acceptables des paramètres de l'ELISA, nous sommes tout à fait confiants que ces résultats nous permettent de tirer les conclusions avancées. À noter qu'aucune différence significative de taux de cortisol n'a été observée entre le groupe mordeur et le groupe mordus.

Nous avons comparé la structure et la composition de la communauté microbienne d'échantillons de matière fécale de porcs mordeurs et de porcs mordus par rapport aux porcs contrôle négatifs, et ce, en utilisant le séquençage de la région V4 du gène de l'ARN 16S après une amplification du segment V4 par PCR. Dans le cadre de cette recherche, un groupe de porcs a été traité aux antibiotiques afin d'avoir un groupe témoin positif pour le changement de MI. Nos résultats montrent effectivement que l'antibiotique a un effet sur l'abondance relative et la présence ou l'absence des espèces spécifiques. Il est bien connu que l'antibiotique a un impact important sur la diversité et la représentation des taxons spécifiques du MI (Jernberg *et al.*, 2007). Ces résultats supportent que notre technique d'analyse de la structure du microbiote est adéquate et que les différences trouvées sont bien réelles.

Lors de la comparaison de la composition du MI des porcs mordeurs versus les porcs-contrôle négatifs, les taxons les plus associés étaient le genre et l'espèce de *Coprococcus* chez les mordeurs, versus le genre et l'espèce de *Lactobacillus* chez les porcs-contrôle

négatifs. En revanche, lors de la comparaison des porcs mordus versus les porcs-contrôle négatifs, il a été remarqué que le genre le plus associé aux porcs mordus était le *Sphaerochaeta* et l'espèce *Phascolarctobacterium* versus le genre et l'espèce de *Lactobacillus*. Dans l'état actuel de nos connaissances, les espèces et les genres bactériens (*Coprococcus*, *Sphaerochaeta*, *Phascolarctobacterium*) ne sont pas déjà associés aux troubles de comportement dans la littérature. Il conviendra de vérifier à l'avenir si ces genres pourraient avoir un lien avec la CP ou tout autre désordre du comportement chez le porc. L'abondance relative du genre et l'espèce *Lactobacillus* permettrait donc, selon nos résultats, de distinguer les porcs-contrôle négatifs des groupes de porcs mordus et mordeurs. Effectivement, dans la littérature, il a été déjà démontré que quelques espèces de *Lactobacillus* sont associées à l'humeur (Benton *et al.*, 2007; Tillisch *et al.*, 2013). C'est le genre le plus utilisé comme probiotique pour la diminution des troubles de comportement chez l'homme et la souris.

La composition et la diversité du microbiote intestinal n'est pas significativement différente entre le groupe mordeur et le groupe mordu. De plus, pour valider l'association des lactobacilles aux porcs-contrôle négatifs, une PCR quantitative a été effectuée avec une amorce spécifique aux lactobacilles afin de quantifier leur présence dans les échantillons de matière fécale des différents porcs. Les porcs mordeurs et les porcs mordus possèdent en moyenne une quantité moins élevée de lactobacilles que les porcs-contrôle négatifs. À la lumière des résultats discutés plus tôt pour *Lactobacillus*, il est possible d'avancer que le nombre moins important de lactobacilles chez les porcs mordeurs et les porcs mordus pourrait avoir un lien avec le trouble de comportement et l'état de stress chez les porcs. Il serait intéressant, dans une prochaine étude, de sub-diviser les groupes mordeurs et mordus afin d'administrer la souche de *Lactobacillus*, après une caractérisation de cette dernière par « whole genome sequencing », et de vérifier si les animaux traités manifestent moins les comportements anormaux.

Nous avons considéré qu'il était utile de porter une attention particulière, dans le cadre de ce projet, aux analyses reliées à la composition du MI du groupe des porcs témoins négatifs dans une perspective où ce groupe apparaît d'une importance capitale si l'on veut identifier

des taxons ou des genres qui pourraient prévenir ou protéger les animaux de ce comportement déviant. Nous avons étudié pour la première fois l'association de la diversité du MI et la caudophagie. Puisque ce phénomène est considéré comme un trouble de comportement chez le porc, il peut être intéressant d'analyser les résultats en référence avec ce qui est connu chez d'autres espèces comme l'homme et la souris où il a été démontré que ces changements du MI sont liés au stress. En supposant qu'un facteur de stress a un impact sur le porc, il est possible que cela puisse augmenter la perméabilité de la muqueuse gastro-intestinale (Montiel-Castro *et al.*, 2013; Di Mauro *et al.*, 2013) et causer une dysbiose (déséquilibre des bactéries productrices des neurotransmetteurs qui contrôle le comportement animal), telle que la diminution de l'espèce et le genre *Lactobacillus*. Il a déjà été rapporté chez d'autres espèces que cette bactérie produit un neurotransmetteur GABA (acide γ -aminobutyrique) qui agit comme inhibiteur de plusieurs voies d'excitation du cerveau (Gareau *et al.*, 2010; Cryan et O'Mahony, 2011). Donc, on pourrait émettre l'hypothèse que les mordeurs, qui ont moins de *Lactobacillus* par rapport aux porcs-contrôle, produisent moins de GABA et que cela a pu provoquer, au moins en partie, le trouble de comportement étudié: le mordillage de la queue.

L'hypothèse contraire est également possible, c'est à dire que la modification de composition du MI par des pathogènes intestinaux causerait le stress chez les porcs. Il a déjà été démontré chez la souris que la dysbiose a un rôle dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) qui cause un dérèglement du système neuro-hormonal et ceci se manifesterait alors par un trouble de comportement. Même si cette seconde hypothèse a été validée chez la souris (Zimomra *et al.*, 2011), la présente étude ne permet cependant pas de déterminer la causalité du phénomène.

En ce qui concerne les porcs mordus, on peut également supposer émettre les mêmes hypothèses tout en admettant que ces animaux aient pu subir un type de stress différent de celui que subissent les porcs mordeurs. Il faut signaler, que les porcs mordeurs et les porcs mordus ont été dans les mêmes parcs. De ce fait, les porcs mordus ont été exposés le ou les mêmes facteurs de stress environnementaux que les porcs mordeurs. Il n'est donc pas possible de déterminer si le stress observé chez les porcs mordus est principalement associé

à la douleur, ou au fait d'être pourchassé par ses congénères, ou s'il est lié à une plus grande susceptibilité aux autres facteurs environnementaux qui ont stressés les deux groupes.

Limites et perspectives

Lors de futures études, il conviendra de porter une attention particulière à certains paramètres reliés aux hôtes, lesquels n'ont pu être inclus dans la portée de la présente étude. Par exemple, le stress ou certaines conditions pathologiques peuvent affecter le système immunitaire de porcs. Le statut quant à la présence d'infection concomitante comme le Syndrome Respiratoire et Reproducteur Porcin (SRRP) ou le portage de salmonelle peut altérer nettement le système immunitaire ou l'équilibre du MI d'un animal. Même si nos observations terrain n'ont pas détectés d'épisodes cliniques, le statut des animaux en lien avec certains pathogènes devrait être mieux étudié dans de futures études. Il serait pertinent d'évaluer d'autres hormones de stress tel que l'ACTH ainsi que les neurotransmetteurs comme la sérotonine et GABA. De même, une autre limite de l'étude était que les animaux étaient alimentés avec une diète commerciale qui contenait des promoteurs de croissance antimicrobiens (Salinomycin) à des concentrations cependant relativement faibles afin de prévenir la diarrhée. Il est possible et même probable que cet ajout ait pu influencer le MI des porcs à l'étude. Toutefois, puisque tous les animaux étaient soumis au même régime alimentaire, nous croyons que les différences observées dans la composition et la structure demeurent valides. De plus, puisque ces produits sont couramment utilisés et que ceci reflète les conditions terrains, ceci présente l'avantage que nos MI reflètent ceux de nombres d'animaux qui reçoivent la même diète. Ce facteur devra néanmoins être pris en compte dans de futures études afin de prévenir la CP.

Finalement, il n'est pas impossible qu'un effet parc ait pu affecter nos résultats. Puisqu'il s'agissait d'une étude terrain observationnelle, il n'était pas possible de distribuer les animaux aléatoirement ou même d'atténuer un possible effet parc en choisissant des parcs situés à différents endroits pour s'assurer, par exemple, de considérer l'effet du circuit des employés sur les parcs atteints. Puisque la distribution des cas et témoins variait en nombre et en localisation dans le temps pendant la période de sélection qui s'est échelonnés sur quelques semaines, nous avons jugés mieux de ne pas déplacer les animaux des parcs

initiaux afin d'atténuer un possible effet parc. D'ailleurs, avec le design expérimental choisi, qui se voulait le reflet le plus fidèle de la situation terrain, les bio-statisticiens que nous avons consultés n'ont pu en arriver à un consensus sur la manière d'atténuer ou de mesurer cet effet. Il n'en demeure pas moins qu'un effet de ce type a pu influencer nos résultats.

CHAPITRE 5. Conclusion

À notre connaissance, cette étude est la première à avoir analysé le MI de porcs mordeurs et de porcs mordus en comparaison avec des porcs contrôle négatifs lors d'un épisode de caudophagie. Aucune étude n'avait jusqu'à maintenant évalué l'association entre le MI et le phénomène de la CP, lequel est considéré comme un problème majeur dans les élevages porcins.

La présente étude supporte cette association et fournit de nouvelles informations sur la structure et la composition de la communauté bactérienne des porcs mordeurs et des porcs mordus, mais également, et surtout, des animaux qui sont exempts de ces comportements déviants, ainsi que des genres et taxons qui peuvent y être associés. En effet, nous avons décrit pour la première fois la diversité et la composition du microbiote fécal des porcs mordeurs et des porcs mordus comparativement aux porcs-contrôle négatifs. Cependant, cette étude ne permet pas de déterminer la causalité du phénomène. Il faudra des études supplémentaires pour étudier ce lien de causalité.

Néanmoins les résultats de ce projet nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

- 1- Les porcs mordeurs et les porcs mordus, lors d'un épisode de CP, sont des porcs stressés (ie ayant des taux de cortisol significativement plus élevés par rapport aux porcs-contrôle négatifs).
- 2- La structure du MI des porcs mordeurs et des porcs mordus est différente des porcs non affectés par la CP quant à l'abondance relative des unités taxonomiques opérationnelles.
- 3- La composition du MI des porcs mordeurs et des porcs mordus est différente des porcs non affectés par la CP.
 - a- Le genre et l'espèce de *Lactobacillus* ont une abondance relative plus élevée chez les porcs-contrôle négatifs par rapport aux porcs mordeurs et aux porcs mordus lors d'un épisode de CP.
 - b- Les lactobacilles sont plus nombreux chez les porcs non affectés par la CP par rapport aux porcs mordus ou mordeurs lors d'un épisode de CP.

Bibliographie

- Arrieta, M.-C. et Finlay, B. B. (2012). The commensal microbiota drives immune homeostasis. *Frontiers in immunology*, 3, 33. doi:10.3389/fimmu.2012.00033.
- Arseneault-Bréard, J., Rondeau, I., Gilbert, K., Girard, S.-A., Tompkins, T. A., Godbout, R. et Rousseau, G. (2012). Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1793-1799. doi:10.1017/S0007114511005137.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180. doi:10.1038/nature09944.
- Barrett, E., Ross, R., O'Toole, P., Fitzgerald, G. et Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Applied microbiology*, 113, 411-417. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05344.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., ... Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18933-18938. doi:10.1073/pnas.1007028107.
- Benton, D., Williams, C., Brown, A. (2007). Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 355-361. doi:10.1038/sj.ejcn.1602546.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., ... Collins, S. M. (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology*, 141(2), 599-609. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.052.
- Blokhuis, H. J. et Arkes, J. G. (1984). Some observations on the development of feather-pecking in poultry. *Applied Animal Behaviour Science*, 12(1-2), 145-157. doi:10.1016/0168-1591(84)90104-7.
- Bolhuis, J. E., Schouten, W. G. P., Schrama, J. W. et Wiegant, V. M. (2005). Behavioural development of pigs with different coping characteristics in barren and substrate-enriched housing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 93, 3-4. doi:10.1016/j.applanim.2005.01.006.
- Bonaz, B. L. et Bernstein, C. N. (2013). Brain-Gut Interactions in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 144(1), 36-49. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.003.
- BPEX (2004). Evaluation of phase feeding in two contrasting finishing systems (fully slatted versus straw based housing). Finishing Pigs Systems Research Production Trial 2. British Pig Executive, *Milton Keynes*, 1-38. Retrieved Decembre 12, 2017,

from <https://pork.ahdb.org.uk/media/72770/finishing-pigs-systems-research-production-trial-2.pdf>.

- Bracke, M. B. M. (2009). Rope test may indicate efficacy of tail-biting treatments in growing pigs. *Animal Welfare*, 18 (3), 263-266. Retrieved November 21, 2017, from <http://edepot.wur.nl/10510>.
- Bracke, M. B. M., Hulsegge, B., Keeling, L. et Blokhuis, H. J. (2004). Decision support system with semantic model to assess the risk of tail biting in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 87(1), 31-44. doi:10.1016/J.APPLANIM.2003.12.005.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16050-5. doi:10.1073/pnas.1102999108.
- Breuer, K., Sutcliffe, M. E. M., Mercer, J. T., Rance, K. A., O'Connell, N. E., Sneddon, I. et Edwards, S. A. (2005). Heritability of clinical tail-biting and its relation to performance traits. *Livestock Production Science*, 93(1), 87-94. doi:10.1016/J.LIVPRODSCI.2004.11.009.
- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E. et Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, 4(8), 1095-119. doi:10.3390/nu4081095.
- Brunberg, E. I., Rodenburg, T. B., Rydhmer, L., Kjaer, J. B., Jensen, P. et Keeling, L. J. (2016). Omnivores Going Astray: A Review and New Synthesis of Abnormal Behavior in Pigs and Laying Hens. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 57. doi: 10.3389/fvets.2016.00057.
- Brunberg, E., Wallenbeck, A. et Keeling, L. J. (2011). Tail biting in fattening pigs: Associations between frequency of tail biting and other abnormal behaviours. *Applied Animal Behaviour Science*, 133(1-2), 18-25. doi:10.1016/J.APPLANIM.2011.04.019.
- Busch, ME., Wachmann, H., Nielsen, EO. et Petersen, HH. (2004). Halebid – Kan slagtedata anvendes til at identificere besætninger med høj forekomst? (Tail biting – can slaughter data be used to identify herds with a high prevalence?). Danish Pig Research Centre, Copenhagen, Denmark. Report: Meddelelse 643. Retrieved October 21, 2013, from http://vsp.lf.dk/Publikationer/Kilder/lu_medd/2004/643.aspx?full=1.
- Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A. J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C. et Butel, M. J. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né.

Gastroenterologie clinique et biologique, 31 (5), 533-542. doi:10.1016/s0399-832QQuW/0(07)89424-3.

Canadian Council on Animal Care. (2009). CCAC guidelines on: The care and use of farm animals in research, teaching and testing. Canada, Ottawa, ON.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), 1621-1624. doi:10.1038/ismej.2012.8.

Cepeda, M. S., Katz, E. G. et Blacketer, C. (2017). Microbiome-Gut-Brain Axis: Probiotics and Their Association With Depression. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 29 (1), 39– 44. doi: 10.1176/appi.neuropsych.15120410.

Chen X. X., Cheng B., Yang Y. X., Cao A., Liu J. H., Du L. J., Liu Y., Zhao Y. et Wang H. (2013). Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small*, 9, 1765–1774. doi: 10.1002/sml.201201506.

Cinquin, C. (2005). Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées (Thèse de doctorat, Université Laval). Retrieved October 2, 2017, from <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/QQLA/TC-QQLA-22769.pdf>.

CIWF. 2012. Techniques d'enrichissement pour les porcs. Retrieved septembre 10, 2017, from <http://www.ciwf.fr/media/29211/ciwf-france-techniques-enrichissement-porcs.pdf>.

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F.,... Dinan, T. G. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666-673. doi: 10.1038/mp.2012.77.

Clubb, R. et Mason, G. J. (2007). Natural behavioural biology as a risk factor in carnivore welfare: how analysing species differences could help zoos improve enclosures. *Applied Animal Behaviour Science*, 102, 303–28. doi:10.1016/j.applanim.2006.05.033.

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ... Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, 633–642. doi:10.1093/nar/gkt1244.

- Collins, S. M., Surette, M. et Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 735-742. doi: 10.1038/nrmicro2876.
- Courboulay, V. (2006). Point réglementaire sur le bien-être des porcs. *TECHNI Porc*, 29 (6), 3-5. Retrieved Decembre 20, 2016, from <https://www.ifip.asso.fr/sites/default/files/pdf/documentations/tp2006n6courboulay.pdf>.
- Cox, L. M., Cho, I., Young, S. A., Anderson, W. H., Waters, B. J., Hung, S. C., Gao, Z., Mahana, D., Bihan, M., Alekseyenko, A. V., Methé, B. A., ... Blaser, M. J. (2013). The nonfermentable dietary fiber hydroxypropyl methylcellulose modulates intestinal microbiota. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(2), 692-702. doi: 10.1096/fj.12-219477.
- Crumevolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Dauge, V., ... Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 42, 207-217. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.01.014.
- Cryan, J. F. et Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscie.* 13, 701-712. doi: 10.1038/nrn3346.
- Cryan, J. F. et O'Mahony, S. M. (2011), The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterology and Motility*, 23,187-192. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x.
- D'Eath, R. B., Niemi, J. K., Vosough Ahmadi, B., Rutherford, K. M. D., Ison, S. H., Turner, S. P., ... Sandøe, P. (2016). Why are most EU pigs tail docked? Economic and ethical analysis of four pig housing and management scenarios in the light of EU legislation and animal welfare outcomes. *animal*, 10(4), 687-699. doi:10.1017/S1751731115002098.
- D'Eath, R.B., Arnott, G., Turner, S.P., Jensen, T., Lahmann, H.P., Busch, M.E., ... Sandøe, P. (2014). Injurious tail biting in pigs: How can it be controlled in existing systems without tail docking? *Animal*, 8, 1-19. doi: 10.1017/S1751731114001359.
- Darmaillacq, S.A. et Lévy, F (2015). Éthologie animale: Une approche biologique du comportement. (1re éd., 29-36). *De boeck superieur*. ISBN 9782804190927.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., ... Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. doi: 10.1038/nature12820.

- De Preter, V., Rutgeerts, P., Schuit, F., Verbeke, K. et Arijs, I. (2013). Impaired expression of genes involved in the butyrate oxidation pathway in Crohn's disease patients. *Inflammatory Bowel Disease*, 19(3), 43-4. doi: 10.1002/ibd.22970.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Backhed, F. et Cani, P. D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7, 639-46. doi: 10.1038/nrendo.2011.126.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G. et Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry*, 19 (2), 146–8. doi:10.1038/mp.2013.65.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Daly, E., McDermott, K. W. et Dinan, T. G. (2008). Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 26 (3), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.02.004>.
- Di Giminiani, P., Edwards, S. A., Malcolm, E. M., Leach, M. C., Herskin, M. S. et Sandercock, D. A. (2017). Characterization of short- and long-term mechanical sensitisation following surgical tail amputation in pigs. *Scientific Reports*, 7(1), 4827. doi:10.1038/s41598-017-05404-y.
- Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R. et Indrio, F. (2013). Gastrointestinal function development and microbiota. *Italian journal of pediatrics*, 39, 15. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-15>.
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., ... Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3047-52. doi: 10.1073/pnas.1010529108.
- Dore, J., Ehrlich, D., Monnet, V., Le Chatelier, E., De Paepe, M., Thomas, M., ... et Blachier, F. (2017). Microbiote, la révolution intestinale. *Dossier de presse INRA*. Retrieved January 15, 2018, from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01605701/>.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., Lanctôt, K. L. (2010). A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*. 67(5): 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., ... Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635-8. doi: 10.1126/science.1110591.

- Edwards, S. A. (2006) Tail biting in pigs: Understanding the intractable problem. *The Veterinary Journal*, 171, 198–199. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.04.010>.
- Edwards, S.A. (2011). What do we know about tail biting today? *The Pig Journal*, 66, 81–86. Retrieved October 1, 2017, from https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=What+do+we+know+about+tail+biting+today?&publication+year=2011&author=Edwards+S&journal=The+Pig+Journal&volume=66&pages=81-86.
- EFSA. (2007). The risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA Journal*, 5(12), 611. doi:10.2903/j.efsa.2007.611.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. et Akkermans, A. D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and environmental microbiology*, 68(1), 219-26. doi :10.1128/aem.68.1.219-226.2002.
- Fernstrom, J. D. (1981). Effects of the diet and other metabolic phenomena on brain tryptophan uptake and serotonin synthesis. Dietary precursors and brain neurotransmitter formation. *Annual Review of Medicine*, 23:413–25. doi:10.1146/annurev.me.32.020181.002213.
- Fraser, D. (1987a). Attraction to blood as a factor in tail-biting by pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 17(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(87\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0168-1591(87)90008-6).
- Fraser, D. (1987b). Mineral-deficient diets and the pig's attraction to blood: implications. *Revue canadienne de science animale*, 67(4), 909-918. <https://doi.org/10.4141/cjas87-096>.
- Gareau, M. G., Sherman, P. M. et Walker, W. A. (2010). Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7(9), 503–514. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>.
- Gareau, M. G., Silva, M. A. et Perdue, M. H. (2008). Pathophysiological mechanisms of stress induced intestinal damage. *Current Molecular Medicine*, 8(4), 274–81. doi:10.2174/156652408784533760.
- Garrett, W. S., Gallini, C. A., Yatsunencko, T., Michaud, M., DuBois, A., Delaney, M. L., ... Glimcher, L. H. (2010). Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host & Microbe*, 8(3), 292–300. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.08.004>.
- Gérard, P. et Bernalier-Donadille, A. (2007). Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42(2), 28-36. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(07\)91318-8](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(07)91318-8).

- Goldstein, D. S. et McEwen, B. (2002). Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*, 5(1), 55-58. doi: 10.1080/102538902900012345.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., ... Ley, R. E. (2014). *Human genetics shape the gut microbiome*, 159(4), 789–799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053.
- Guise, H. J. et Penny, R. H. (1998). Tail-biting and tail-docking in pigs. *Veterinary record*, 142(2),46. Retrieved Decembre 21, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9481830>.
- Gustafsson, M., Jensen, P. et de Jonge, F. H. (1999). Domestication effects on foraging strategies in pigs (*Sus scrofa*). *Applied Animal Behaviour Science*, 62, 305–17. doi:10.1016/ S0168-1591(98)00236-6.
- Hansen, L. L., Hagelsø, A. M. (1980). A general survey of environmental influence on the social hierarchy function in pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 30, 388–92. doi:10.1080/00015128009435285.
- Harley, S., Boyle, L., O’Connell, N., More, S., Teixeira, D. et Hanlon, A. (2014). Docking the value of pigmeat? Prevalence and financial implications of welfare lesions in Irish slaughter pigs. *Animal Welfare*, 23(3), 275-285. doi:10.7120/09627286.23.3.275.
- Harley, S., More, S. J., O’Connell, N. E., Hanlon, A., Teixeira, D. et Boyle, L. (2012). Evaluating the prevalence of tail biting and carcass condemnations in slaughter pigs in the Republic and Northern Ireland, and the potential of abattoir meat inspection as a welfare surveillance tool. *Veterinary Record*, 171(24), 621-621. doi:10.1136/vr.100986.
- Hessing, M. J. C., Hagelsø, A. M., van Beek, J. A. M., Wiepkema, R. P., Schouten, W. G. P. et Krukow, R. (1993). Individual behavioural characteristics in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 37,285–95. doi:10.1016/0168-1591(93)90118-9.
- Holm, L., Jensen, M. B., Pedersen, L. J. et Ladewig, J. (2008). The importance of a food feedback in rooting materials for pigs measured by double demand curves with and without a common scaling factor. *Applied Animal Behaviour Science*, 111(1-2), 68-84. doi: 10.1016/j.applanim.2007.05.013.
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G. et Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881-884. doi: 10.1126/science.291.5505.881.
- Hunter, E. J., Jones, T. A., Guise, H. J., Penny, R. H. C., et Hoste, S. (1999). Tail biting in pigs 1: the prevalence at six UK abattoirs and the relationship of tail biting with docking, sex, and other carcass damage. *The Pig Journal*, 43, 18-32.

- Hunter, E. J., Jones, T. A., Guise, H. J., Penny, R. H. et Hoste, S. (2001). The relationship between tail biting in pigs, docking procedure and other management practices. *Veterinary Journal*, 161, 72–9. doi:10.1053/tvjl.2000.0520.
- Hvistendahl, M. (2012). Pigs as stand-ins for microbiome studies. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1250. doi:10.1126/science.336.6086.1250.
- Ifip (2016). Prévenir la douleur chez le porc. Retrieved January 30, 2018, from <https://www.ifip.asso.fr/sites/default/files/pdf-documentations/dossier-prevention-douleur-porc-caudectomie-caudophagie.pdf>.
- Jaglin, M. (2013). Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central. (thèse de doctorat, Université Paris-Sud). Retrieved february 22, 2018, from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01057811/document>.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. et Jansson, J.K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal*. 1(1), 56-66. doi: 10.1038/ismej.2007.3.
- Keeling, L. J., Bracke, M. B. M. et Larsen, A. (2004). Who tail bites and who doesn't in groups of fattening pigs? *The 38th International congress of the ISAE, Helsinki, Finland, 2004-08-03/2004-08-07*. Retrieved February 8, 2018, from <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/337874>.
- Keeling, L. J., Wallenbeck, A., Larsen, A. et Holmgren, N. (2012). Scoring tail damage in pigs: an evaluation based on recordings at Swedish slaughterhouses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 32. doi: 10.1186 / 1751-0147-54-32.
- Kelly, J.R; Clarke, G., Cryan, J.F., et Dinan, T.G. (2016), Brain-gut-microbiota axis: challenges for translation in psychiatry. *Annals of Epidemiology*, 26 (5), 366-372. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.02.008>.
- Khachatryan, Z. A., Ktsoyan, Z. A., Manukyan, G. P., Kelly, D., Ghazaryan, K. A. et Aminov, R. I. (2008). Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One*, 3(8), e3064. doi: 10.1371/journal.pone.0003064.
- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., ... De Vos, W. M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental microbiology*, 8(7), 1191–1199. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. et Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina Sequencing platform.

Applied and environmental microbiology, 79, 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13.

- Lagier, J. C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., & Raoult, D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 136. doi:10.3389/fcimb.2012.00136.
- Lahrman HP., Hansen, C. F., D'Eath, R. B., Busch, M. E. et Forkman, B. (2017) Tail posture predicts tail biting outbreaks at pen level in weaner pigs. *Applied Animal Behaviour Science*. 200, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.12.006>.
- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É. et Fravallo, P. (2017). Reduction of *Salmonella* Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in microbiology*, 8, 2219. doi:10.3389/fmicb.2017.02219.
- Larsen, M. L. V., Andersen, H. M-L., Pedersen, L. J. (2016). Can tail damage outbreaks in the pig be predicted by behavioural change? *The Veterinary Journal*, 209, 50–6. pmid:26831153.
- Lepage, P., Leclerc, M. C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H. M., Raes, J., Ehrlich, D., Doré, J. (2013). A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*, 62,146–58.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124:837–48.
- Li, Y. Z., Zhang, H. F., Johnston, L. J., Martin, W., Peterson, J. D., Coetzee, J. F. (2017) .Effects of tail docking and tail biting on performance and welfare of growing–finishing pigs in a confinement housing system, *Journal of Animal Science*, 95, 4835–4845, <https://doi.org/10.2527/jas2017.1571>.
- Li, Y., Zhang, H., Johnston, L. J., et Martin, W. (2018). Understanding Tail-Biting in Pigs through Social Network Analysis. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 8(1), 13. <http://doi.org/10.3390/ani8010013>.
- Liu, Q., Duan, Z. P., Ha, D. K., Bengmark, S., Kurtovic, J., Riordan, S. M. (2004) Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 39(5): 1441-1449.
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., et al. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded human microbiome project. *Nature*, 550, 61-66.
- Longpré, J., Fairbrother, J. M., Fravallo, P., Arsenault, J., LeBel, P., Laplante B., ... Letellier, A. (2016). Impact of mash feeding versus pellets on propionic/butyric acid

levels and on total *Escherichia coli* load in the gastrointestinal tract of growing pigs. *Journal of Animal Science*. 2016.94:1053–1063. doi:10.2527/jas2015-9617.

Looft, T., Allen, H. K., Cantarel, B. L., Levine, U. Y., Bayles, D. O., Alt, D. P., ... Stanton, T. B. (2014). Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *The ISME Journal*, 8(8), 1566-1576. doi:10.1038/ismej.2014.12.

Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. et Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220-30.

Luna, R. A., Foster, J. A. (2015). Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. *Cur Opin Biotechnol*, 32, 35-41.

Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369-2379.

Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays*, 33, 574-581. doi:10.1002/bies.201100024.

Maes, M., Kubera, M., Leunis, J-C., Berk, M. (2012). Increased IgA and IgM Responses against Gut Commensals in Chronic Depression: Further Evidence for Increased Bacterial Translocation or Leaky Gut. *Journal of Affective Disorders*, 141 (1), 55-62.

Malaguarnera, M., Gargante, M. P., Malaguarnera, G., Salmeri, M., Mastrojeni, S., Rampello, L., ... & Galvano, F. (2010). Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 22(2), 199-206.

Malaguarnera, M., Greco, F., Barone, G., Gargante, M. P., Malaguarnera, M., & Toscano, M. A. (2007). Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(11), 3259.

Markle, J. G., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolle-Kampczyk, U., ... & Danska, J. S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339(6123), 1084-1088. doi: 10.1126/science.1233521.

Marteau, P. (2013). Microbiote intestinale. *EMC Gastroenterologie*, 8, 1-8. doi: 10.1016/S1155-1968(13)43247-9.

- Martin, A. P. (2002). Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3673-3682. doi: 10.1128/AEM.68.8.3673-3682.2002.
- Mason, G., & Rushen, J. (Eds.). (2008). Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare. *Cabi*.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6(3), 610–618. doi:10.1038/ismej.2011.139.
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*, 87(3), 873-904.
- McIntyre, J., & Edwards, S. A. (2002). An investigation into the effect of different protein and energy intakes on model tail chewing behaviour of growing pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 77(2), 93-104. doi:10.1016/S0168-1591(02)00044-8.
- McKean, J., Naug, H., Nikbakht, E., Amiet, B., & Colson, N. (2016). Probiotics and Subclinical Psychological Symptoms in Healthy Participants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 4, 249-258. doi:10.1089/acm.2016.0023.
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., ... & Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 755-764.
- MEYER, E., K. MENZER und S. HENKE (2015): Verminderung von Verhaltensstörungen beim Schwein- Evaluierung geeigneter Möglichkeiten zur Verminderung des Auftretens von Verhaltensstörungen beim Schwein. *Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie*. 1-56.
- Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C. J., & Green, L. E. (2003). A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 81(4), 333-355.
- Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G., & Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 70. doi: 10.3389/fnint.2013.00070.

- Munsterhjelm, C., Brunberg, E., Heinonen, M., Keeling, L. et Valros, A. (2013). Stress measures in tail biters and bitten pigs in a matched case-control study. *Animal Welfare*, 22(3), 331-338. doi:10.7120/09627286.22.3.331.
- Nannoni, E., Valsami, T., Sardi, L., & Martelli, G. (2014). Tail docking in pigs: a review on its short-and long-term consequences and effectiveness in preventing tail biting. *Italian Journal of Animal Science*, 13(1), 3095.
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J. A. (2011) Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice, *Neurogastroenterol. Motil.* 23(3), 255-264.
- Niemi, J. K., Sinisalo, A., Valros, A., & Heinonen, M. (2011). The timing and treatment of tail biting in fattening pigs. *NJF, Uppsala, Sweden*. 50-55.
- Nossa, C. W., Oberdorf, W. E., Yang, L., Aas, J. A., Paster, B. J., DeSantis, T. Z., ... Pei, Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, 16(33), 4135-4144. <http://doi.org/10.3748/wjg.v16.i33.4135>.
- O'mahony, S. M., Bulmer, D. C., Coelho, A., Fitzgerald, P., Bongiovanni, C., Lee, K., ... Cryan, J. F. (2010), 5-HT_{2B} receptors modulate visceral hypersensitivity in a stress-sensitive animal model of brain-gut axis dysfunction. *Neurogastroenterology & Motility*, 22, 573-e124. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01432.
- Palander, P. A., Heinonen, M., Simpura, I., Edwards, S. A., Valros, A. E. (2013). Jejunal morphology and blood metabolites in tail biting, victim and control pigs. *Animal*, 7, 1523-1531.
- Paoli, M. A., Lahrmann, H. P., Jensen, T., D'Eath, R. B. (2016). Behavioural differences between intact and docked tail pigs. *Animal Welfare*, 25(2),287-96.
- Poletto, R., Meisel, R. L., Richert, B. T., Cheng, H-W., Marchant-Forde, J. N. (2010). Aggression in replacement grower and finisher gilts fed a short-term high-tryptophan diet and the effect of long-term human-animal interaction. *Applied Animal Behaviour Science*, 122, 98-110. doi:10.1016/j.applanim.2009.11.015.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., ... Ehrlich, S.D. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59-65.
- Quent, D. (2015). Mise au point d'un modèle de déclenchement du cannibalisme en élevage porcin. Université paris 13 - UFR lettres, *sciences de l'homme et des sociétés*. INRA – umr pegase 1348.

- Rabot, S. (2015). Axe intestin-cerveau : comment le microbiote intestinal influence la réponse au stress. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 168 (3), 267-273. doi: 10.4267/2042/57938.
- Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in immunology*, 27(1), 24-31. doi: 10.1016/j.it.2005.11.006.
- Ramayo-Caldas, Y., Mach, N., Lepage, P., Levenez, F., Denis, C., Lemonnier, G., ... Estellé, J. (2016). Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *The ISME Journal*, 10(12), 2973–2977. doi: 10.1038/ismej.2016.77.
- Rambaud, J-C., Buts, J-B., Cortier, G., Flourié, B. (2004). Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestives. *John Libbey Eurotext*, 3(11), 201-237.
- Richards, D. (2013). Tail Biting. Retrieved Decembre 18, 2017, from <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/swine/news/mayjun12a2.htm>.
- Robinson, C. J., Young, V. B. (2010). Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*, 1, 279-284.
- Rogel-gaillard, C (2013). The microbiota of the gastro-intestinal tract: a biological compartment to explore in livestock species. *Académie vétérinaire de France*. 167 (2). 131-136. doi: 10.4267/2042/53808.
- Ruis, M. A., te Brake, J. H., Engel, B., Buist, W. G., Blokhuis, H. J., & Koolhaas, J. M. (2001). Adaptation to social isolation: acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiology & behavior*, 73(4), 541-551. doi: 10.1016/S0031-9384(01)00548-0.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75, 7537-7541.
- Schröder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., Lawson. L.G. (2003). Tail-in-mouth behaviour among weaner pigs in relation to age, gender and group composition regarding gender. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 53.
- Scollo, A., Gottardo, F., Contiero, B. et Edwards, SA (2017). A cross-sectional study for predicting tail biting risk in pig farms using classification and regression tree analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 146, 114-20. doi: 10.1016 / j.prevetmed.2017.08.001.

- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12, 60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
- Sharma, P., Sharma, B. C., Puri, V., & Sarin, S. K. (2008). An open-label randomized controlled trial of lactulose and probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 20(6), 506-511.
- Shini, S., Huff, G. R., Shini, A., & Kaiser, P. (2010). Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poultry science*, 89(4), 841-851. doi: 10.3382/ps.2009-00483.
- Siegwald, L. (2017). Solutions d'amélioration des études de métagénomique ciblée (Doctoral dissertation, Université de Lille). Retrieved May 11, 2018, from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01575747/document>.
- Sihvo, H.-K., Simola, O., Munsterhjelm, C. et Syrjä, P. (2012). Systemic Spread of Infection in Tail-bitten Pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 146(1), 73. doi:10.1016/J.JCPA.2011.11.112.
- Sinisalo, A., Niemi, J. K., Heinonen, M., & Valros, A. (2012). Tail biting and production performance in fattening pigs. *Livestock Science*, 143(2-3), 220-225. doi.org/10.1016/j.livsci.2011.09.019.
- Smith, K., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2007, April). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. In *Seminars in immunology*, 19, (2), 59-69. doi: 10.1016/j.smim.2006.10.002.
- Smith, W. J., & Penny, R. H. C. (1986). Behavioral problems, including vices and cannibalism. Retrieved October 11, 2017, from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8903385>.
- Smulders, D., Hautekiet, V., Verbeke, G., & Geers, R. (2008). Tail and ear biting lesions in pigs: an epidemiological study. *Animal Welfare*, 17(1), 61-69. Retrieved Novembre 30, 2017, from <https://www.ingentaconnect.com/content/ufaw/aw/2008/00000017/00000001/art00008>.
- Smulders, D., Verbeke, G., Mormède, P., & Geers, R. (2006). Validation of a behavioral observation tool to assess pig welfare. *Physiology & behavior*, 89(3), 438-447. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.07.002.

- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 227. doi:10.1038/nrmicro2974.
- Sonoda, L. T., Fels, M., Oczak, M., Vranken, E., Ismayilova, G., Guarino, M., ... & Hartung, J. (2013). Tail biting in pigs-causes and management intervention strategies to reduce the behavioural disorder. A review. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, *126*(3-4), 104-12. doi: 10.2376/0005-9366-126-104.
- Statham, P., Green, L., Bichard, M., & Mendl, M. (2009). Predicting tail-biting from behaviour of pigs prior to outbreaks. *Applied Animal Behaviour Science*, *121*(3-4), 157-164. doi:10.1016/j.applanim.2009.09.011.
- Steenfeldt, S., Kjaer, J. B., & Engberg, R. M. (2007). Effect of feeding silages or carrots as supplements to laying hens on production performance, nutrient digestibility, gut structure, gut microflora and feather pecking behaviour. *British poultry science*, *48*(4), 454-468. doi:10.1080/00071660701473857.
- Stern, S., & Andresen, N. (2003). Performance, site preferences, foraging and excretory behaviour in relation to feed allowance of growing pigs on pasture. *Livestock Production Science*, *79*(2-3), 257-265. doi: 10.1016/S0301-6226(02)00171-9.
- Stolba, A., et Wood-Gush, D. G. M. (1989). The behaviour of pigs in a semi-natural environment. *Animal Science*, *48*(2), 419-425. doi: 10.1017/S0003356100040411.
- Studnitz, M., Jensen, M. B., & Pedersen, L. J. (2007). Why do pigs root and in what will they root?: A review on the exploratory behaviour of pigs in relation to environmental enrichment. *Applied Animal Behaviour Science*, *107*(3-4), 183-197. doi: 10.1016/j.applanim.2006.11.013.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., ... & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*, *558*(1), 263-275. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388.
- Sutherland, M. A., et Tucker, C. B. (2011). The long and short of it: A review of tail docking in farm animals. *Applied Animal Behaviour Science*, *135*(3), 179-191. doi:10.1016/j.applanim.2011.10.015.
- Taylor, N. R., Main, D. C., Mendl, M., & Edwards, S. A. (2010). Tail-biting: a new perspective. *The Veterinary Journal*, *186*(2), 137-147. //doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.08.028.
- Taylor, N. R., Parker, R. M., Mendl, M., Edwards, S. A., et Main, D. C. (2012). Prevalence of risk factors for tail biting on commercial farms and intervention strategies. *The Veterinary Journal*, *194*(1), 77-83. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.03.004.

- Temple, D., Courboulay, V., Manteca, X., Velarde, A., et Dalmau, A. (2011). The welfare of pigs in five different production systems in France and Spain: assessment of behavior. In *Proceedings of the 45th congress of the ISAE* (p. 45).
- Temple, D., Mainau, E., Manteca, X. (2014) la caudophagie chez les porcs. *Farm Animal Welfare Education Centre (FAWEC)*. Retrieved October 30, 2017, from https://www.fawec.org/media/com_lazy/pdf/pdf/fs8-fr.pdf.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, É., Arsenault, J., Lahaye, L., & Letellier A. (2015) Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLOS ONE*. (10), 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0131978.
- Thodberg, K., Jensen, K. H., & Jørgensen, E. (2010). The risk of tail-biting in relation to level of tail-docking. In *Proceedings of the 44th Congress of the International Society for Applied Ethology (ISAE): Coping in large groups*, 91-91.
- Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., ... Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7), 1394-401. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.043.
- Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., ... Kokešová, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology letters*, 93, 97-108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005.
- Ursinus, W. W., Bolhuis, J. E., Zonderland, J. J., Rodenburg, T. B., de Souza, A. S. et Koopmanschap, R. E. (2013). Relations between peripheral and brain serotonin measures and behavioural responses in a novelty test in pigs. *Physiology & Behavior*, 118, 88-96. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.05.018.
- Ursinus, W. W., Van Reenen, C. G., Kemp, B. et Bolhuis, J. E. (2014). Tail biting behaviour and tail damage in pigs and the relationship with general behaviour: Predicting the inevitable? *Applied Animal Behaviour Science*, 156, 22-36. doi:10.1016/j.applanim.2014.04.001.
- Valladares, R., Bojilova, L., Potts, A. H., Cameron, E., Gardner, C., Lorca, G. et Gonzalez, C. F. (2013). Lactobacillus Johnsonii Inhibits Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Alters Tryptophan Metabolite Levels in BioBreeding Rats. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (4): 1711–1720. doi: 10.1096/fj.12-223339.
- Valros, A. et Heinonen, M. (2015). Save the pig tail. *Porcine Health Management*, 1(1), 2. doi:10.1186/2055-5660-1-2.

- Valros, A., Ahlström, S., Rintala, H., Häkkinen, T. et Saloniemi, H. (2004). The prevalence of tail damage in slaughter pigs in Finland and associations to carcass condemnations. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal*, 54, 213-9. doi: 10.1080/09064700510009234.
- Valros, A., Munsterhjelm, C., Puolanne, E., Ruusunen, M., Heinonen, M., Peltoniemi, O. et Reeta Pösö, A. (2013). Physiological indicators of stress and meat and carcass characteristics in tail bitten slaughter pigs. *Acta veterinaria Scandinavica*. 55. 75. doi: 10.1186/1751-0147-55-75.
- Valros, A., Palander, P., Heinonen, M., Munsterhjelm, C., Brunberg, E., Keeling, L. et Piepponen, P. (2015). Evidence for a link between tail biting and central monoamine metabolism in pigs (*Sus scrofa domestica*). *Physiology & Behavior*, 143, 151-157. doi:10.1016/j.physbeh.2015.02.049.
- Van de Weerd, H. A., Docking, C. M., Day, J. E. L., Edwards, S. A. (2005). The development of harmful social behaviour in pigs with intact tails and different enrichment backgrounds in two housing systems. *Animal Science Journal*, 80, 289-98. doi:10.1079/ASC40450289.
- Van de Weerd, H. A., Docking, C. M., Jour, J. E. L.; Avery, P. J. et Edwards, S. A. (2003). A systematic approach towards developing environmental enrichment for pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 84(2), 101-118. doi:10.1016/S0168-1591(03)00150-3.
- Van Putten, G. (1969). An investigation into tail-biting among fattening pigs. *Br Vet J*, 125, 511–7. Retrieved Decembre 11, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5394071>.
- Vignola, M. (2002). Des porcelets plus lourds au sevrage: de l'argent en banque. *Porc Québec juin–2002 RÉGIE*. Retrieved October May 22, 2018, from [https://www.agrireseau.net/porc/Documents/Regie porcelets%20plus%20lourds.pdf](https://www.agrireseau.net/porc/Documents/Regie%20porcelets%20plus%20lourds.pdf)
- Viitasaari, E., Hänninen, L., Raekallio, M., Heinonen, M., Valros, A. (2011). Tail biting alters feeding behaviour of victim pigs. In *Proceedings of the 45th Congress of the International Society for Applied Ethology: 31 July – 4 August 2011. Indianapolis, USA: Wageningen Academic Publishers*, 61.
- Wallenbeck, A. et Keeling, L. J. (2013) Using data from electronic feeders on visit frequency and feed consumption to indicate tail biting outbreaks in commercial pig production. *Animal Science Journal*, 9,2879–84. doi: 10.2527/jas.2012-5848.
- Wang, Y. et Kasper, L. H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, behavior, and immunity*, 38, 1-12. doi: 10.1016/j.bbi.2013.12.015.

- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C. et Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3698-703. doi: 10.1073/pnas.0812874106
- Wu, X., Zhang, H., Chen, J., Shang, S., Wei, Q., Yan, J. et Tu, X. (2016). Comparison of the fecal microbiota of dholes high-throughput Illumina sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(8), 3577-3586. doi: 10.1007/s00253-015-7257-y.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, FO., Ludwig, W., Schleifer K-H., ... Whitma, W.B. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 635–645. doi:10.1038/nrmicro3330.
- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. doi: 10.1038/nature11053.
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., ... & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*, 42(D1), D643-D648. doi: 10.1093/nar/gkt1209.
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najjar, F. Z., Roe, B. A. et Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and environmental microbiology*, 75(16), 5227-36. doi:10.1128/AEM.00592-09.
- Zeevi, D., Korem, T., Zmora, N., Israeli, D., Rothschild, D., Weinberger, A., ... Segal, E. (2015). Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*, 163(5), 1079-1094. doi:10.1016/j.cell.2015.11.001.
- Zeng, B., Han, S., Wang, P., Wen, B., Jian, W., Guo, W., ... Li, Y. (2015). The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits. *Scientific Reports*, 5(1), 9342. doi:10.1038/srep09342.
- Zhang, D., Ji, H., Liu, H., Wang, S., Wang, J. et Wang, Y. (2016). Changes in the diversity and composition of gut microbiota of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 10081-10093. doi:10.1007/s00253-016-7845-5.
- Zhao, Y., Li, B., Bai, D., Huang, J., Shiraigo, W., Yang, L., ... Dugarjaviin, M. (2016). Comparison of Fecal Microbiota of Mongolian and Thoroughbred Horses by High-throughput Sequencing of the V4 Region of the 16S rRNA Gene. *Asian-*

Australasian Journal of Animal Sciences, 29(9), 1345–1352. doi: 10.5713/ajas.15.0587.

Zhou, H., Yu, B., Gao, J., Htoo, J. K. et Chen, D. (2018). Regulation of intestinal health by branched-chain amino acids. *Animal Science Journal*, 89, 3–11. doi: 10.1111/asj.12937.

Zimomra, Z. R., Porterfield, V. M., Camp, R. M., & Johnson, J. D. (2011). Time-dependent mediators of HPA axis activation following live *Escherichia coli*. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 301(6), R1648-57. doi: 10.1152/ajpregu.00301.2011.

Zonderland, J. J., Bracke, M. B. M., den Hartog, L. A., Kemp, B. et Spoolder, H. A. M. (2010). Gender effects on tail damage development in single- or mixed-sex groups of weaned piglets. *Livestock Science*, 129(1-3), 151-158. doi:10.1016/j.livsci.2010.01.018.

Zonderland, J. J., Kemp, B., Bracke, M. B. M., den Hartog, L. A. et Spoolder, H. A. M. (2011) Individual piglets' contribution to the development of tail biting. *Animal*, 5, 601–7. doi:10.1017/S1751731110002132.

Zonderland, J. J., van Riel, J. W., Bracke, M. B. M., Kemp, B., den Hartog, L. A. et Spoolder, H. A. M. (2009). Tail posture predicts tail damage among weaned piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, 12,165–70. doi:10.1016/j.applanim.2009.09.002.