

Université de Montréal

**Modulation de l'action antimicrobienne in vitro d'extraits de plantes en condition de
compétition par un dérivé de microbiote d'origine fécale porcine**

par Mélodie Langlais

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

Décembre 2018

© Mélodie Langlais, 2018

Résumé

L'incorporation de composés antimicrobiens non antibiotiques à l'alimentation des animaux est une piste abondamment explorée pour contrôler la prévalence des pathogènes et améliorer la santé intestinale générale des animaux. Certains types d'extraits de plante (EPs) et d'huiles essentielles (HEs) ont un pouvoir antimicrobien marqué *in vitro*, qui ne concordent pas aux résultats obtenus lors d'un passage à l'expérimentation *in vivo*. Cette étude a permis d'évaluer le caractère antimicrobien de plusieurs composés par diffusion sur gélose, dilution en tubes et par une méthode de dilution en tubes adaptée avec incorporation d'un dérivé de microbiote de porc. Les résultats ont permis de déterminer que le camphre, le carvacrol, le cinnamaldéhyde et l'eugénol ont la même efficacité antimicrobienne en absence qu'en présence d'un microbiote complexe. Rendant ces composés les plus pertinents dans le cadre du développement d'additifs alimentaires, des analyses métagénomiques ont été effectuées pour mesurer l'évolution (qualitative) du microbiote dans ces conditions en contact avec différentes concentrations d'HEs. Les concentrations plus élevées que la CMI avaient un impact significatif sur la diversité alpha (augmentation de la richesse et de l'Evenness) et la diversité beta. De plus, chaque HE à concentration élevée avait un impact significativement différent sur la structure et la composition microbienne. Aussi, des analyses qPCR ont également permis de quantifier des indicateurs du microbiote intestinal en présence de concentrations croissantes en HEs; diminution (significative) des *Escherichia coli*, stabilité des Lactobacilles pour presque toutes les concentrations et augmentation (significative) des *Lachnospiraceae*. Ainsi, cette étude a permis de développer un modèle *in vitro* permettant d'analyser l'efficacité de différents composés en présence d'un dérivé de microbiote intestinal et leur impact sur ce dernier. Cela permet de conclure que certaines HEs pourraient avoir un impact significativement différent sur le microbiote intestinal, lorsqu'elles sont utilisées à une concentration spécifique, et cette caractéristique pourrait être exploitée pour développer des additifs alimentaires efficaces ayant des effets précis.

Mots-clés : Additifs alimentaires, antimicrobiens, extraits de plante, huiles essentielles, métagénomique, microbiologie, microbiote, salubrité alimentaire

Abstract

The incorporation of non-antibiotic antimicrobials compounds to animal feed is extensively used to control the prevalence of pathogens and enhance general gut health. Few plant extracts (PEs) and essential oils (EOs) have a strong antimicrobial effect *in vitro* which does not concur with the results obtained when the experiment is translated *in vivo*. This study evaluated the antimicrobial potential of several compounds by agar diffusion assay, tube dilution and by a novel tube dilution method incorporating a pig intestinal microbiota derivative. Results of this study showed that carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil have the same efficiency in the absence or presence of a complex microbiota, thus making these compounds the most relevant for the development of food additives. Metagenomics analyzes were performed to measure the (qualitative) evolution of the microbiota considered under these conditions. Eos concentrations that are higher than the minimal inhibitory concentration (MIC) had a significant impact on both alpha diversity (increase in richness and Evenness) and beta diversity. Furthermore, every EOs, used at high concentration, had a significantly different impact on the microbial structure and composition. Also, qPCR analyses were used to quantify indicators of the intestinal microbiota in the presence of increasing concentrations of EOs; a (significant) decrease of *Escherichia coli*, stability of Lactobacilli for almost all of the concentrations and a (significant) increase of *Lachnospiraceae* were observed. Therefore, this study led us to develop an *in vitro* model which can be used to analyze the efficacy of different organic compounds in the presence of an intestinal microbiota derivative. This suggests that some EOs could have a significantly different impact on the gut microbiota when used at a specific concentration. This feature could be exploited to develop effective food additives with targeted effects.

Keywords : Antimicrobials, essential oils, food additives, food safety, metagenomics, microbiota, plant extracts, veterinary microbiology

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Recensement de la littérature.....	4
1. Toxi-infections alimentaires.....	5
1.1. Interventions à la ferme.....	5
2. Antimicrobiens.....	5
2.1. Antibiotiques.....	5
2.1.1. Utilisation des antibiotiques.....	6
2.1.2. Résistances.....	7
2.2. Alternatives.....	8
3. Les dérivés de plantes.....	9
3.1. Les huiles essentielles.....	10
3.1.1. Mode d'action.....	11
3.1.2. Démontrer le pouvoir antimicrobien.....	12
3.1.2.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	12
3.1.2.2. Méthode de dilutions en tubes.....	13
4. Les enjeux du développement d'additifs alimentaires.....	13
5. Microbiote intestinal du porc.....	14
5.1. Caractéristiques du microbiote intestinal.....	14
5.2. Implantation et développement.....	15

5.3. Composition.....	15
5.4. Fonctions du microbiote	17
5.4.1. Métaboliques.....	17
Synthèse de vitamines.....	17
Production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC).....	17
Synthèse d'acides aminés	18
Absorption d'ions.....	19
Dégradation des polysaccharides non digérés	19
5.4.2. Structurales	19
5.4.3. Protectrices.....	20
Par la résistance à la colonisation intestinale par des pathogènes	20
5.5.1. Compétition spatiale	20
5.5.2. Compétition nutritionnelle	20
5.5.3. Compétition selon les interactions spécifiques entre les bactéries	21
5.5.4. Compétition directe hôte-bactéries	21
Production d'antimicrobiens.....	21
Régulation de l'immunité	21
5.5. Santé intestinale	22
5.5.1. Déséquilibres du microbiote	23
5.5.2. Influence du régime alimentaire	24
6. Étude du microbiote intestinal	24
6.1. Quantification des indicateurs majoritaires du microbiote	24
6.1.1. Principe de la qPCR	25
6.1.2. Avantages d'utilisation de la qPCR	26
6.1.3. Exemples d'applications de la technique aux contenus intestinaux	26
6.2. Le séquençage.....	28
6.2.1. Évolution technique	28
6.2.2. ARN ribosomal 16S et choix de la région	29
6.2.3. Méthodologie Miseq.....	30
6.2.4. Manipulations bio-informatiques.....	30
Hypothèses et Objectifs	33

Article scientifique.....	35
Abstract.....	37
Introduction.....	39
Materials and Methods.....	41
Results.....	47
Discussion.....	52
Tables.....	56
Figures.....	63
Supplementary materials.....	69
Discussion générale	73
4.1. Interprétation des résultats	74
4.2. Aspects innovateurs	77
4.3. Limites de l'étude	78
4.4. Directions futures.....	80
Conclusion	82
Bibliographie.....	84

Liste des tableaux

Article scientifique

Table 1. Bacterial species and strains, source and culture conditions.	56
Table 2. Plant compounds used in the present study	57
Table 3. Bactericidal activities of plant compounds on bacterial species and strains determined by agar disk-diffusion assay inhibition zone and minimum inhibitory dilution.....	58
Table 4. Comparison of alpha-diversity indices of the pig feces bacterial microbiota in presence of different concentrations of four essential oils or colistin.	59
Table 5. Beta-diversity of pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota from different groups.....	60
Table 6. Alpha-diversity indices of pig feces bacterial microbiota in presence of the high concentrations (High [C]) of each of four essential oils.....	61
Table 7. Beta-diversity of pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota in presence of the high concentration (High [C]) of essential oils.....	62

Supplementary materials

Table S1. Lefse analysis of pig feces treated with a) low and b) high [C] of EOs.....	69
Table S2. Lefse analysis of pig feces treated with a) low and b) high [C] of EOs.....	71

Liste des figures

Recensement de la littérature

Figure I. Composition bactérienne intestinale du porc selon différentes localisations..... 17

Article scientifique

Figure 1. Broth dilution assay of six plant extracts in absence or presence of pig feces, with the addition of a) *L. monocytogenes*, or b) *S. Enteritidis*. 63

Figure 2. NMDS plot illustrating beta-diversity of incubated pig feces with different concentration of EOs..... 64

Figure 3. NMDS plot illustrating beta-diversity of pig feces treated with high concentration of different EOs. 65

Figure 4. Bacterial population quantification of the samples treated with different concentrations ([C]2-, [C]-, MID, [C]+, [C] 2+ and [C] 3+) of 4 EOs; a) Carvacrol, b) cinnamaldehyde, c) eugenol and d) white camphor oil..... 66

Figure 5. NMDS plot illustrating beta-diversity of samples inoculated with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. 67

Figure 6. NMDS plot illustrating beta-diversity of the samples in triplicate (Day 1, 2 and 3). 68

Liste des sigles

CRSV : Chaire de recherche en salubrité des viandes

CRSNG : Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AGCC : Acide gras à chaînes courtes
AMOVA : Analysis of MOlecular VAriance
ARNr 16S : Acide ribonucléique ribosomique de la sous-unité 16
ATP : Adénosine Triphosphate
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CSI : Cellules souches intestinales
Ct : Nombre de cycles
DMI : Dilution minimale inhibitrice
DnaK : Protéine chaperonne moléculaire
EOs : Essential oils
GroEL: Protéine chaperonne moléculaire
HOMOVA : HOmogeneity of MOlecular VAriance
HEs : Huiles essentielles
IgA : Immunoglobulines A
IL-1 β : Interleukine 1 bêta
IL-22 : Interleukine 22
ISO : Organisation internationale de normalisation
LDA : Linear discriminant analysis
LEfSe : Linear discriminant analysis effect size
MIC : Minimal inhibitory concentration
MID : Minimal inhibitory dilution
NGS : Next-generation sequencing
NMDS : Non-metric multidimensional scaling
OTU : Operational taxonomic unit
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction
PEs : Plant extracts

pH : Potentiel hydrogène

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction

Spi-1 : Gène codant un facteur de transcription à domaine ETS (E26 transformation-specific)

*"Tu n'es pas comme nous, mais on t'aime
beaucoup. Maintenant tu fais partie de la famille" -Petit pied*

Ce mémoire est dédié à tous les humains de ma vie ;

Yassou, papa, moum, les bobottes et les dévissés

Remerciements

J'ai eu le privilège de me joindre à l'équipe de la Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV) dès mon baccalauréat en Biochimie et médecine moléculaire lors de mon stage sous la supervision du Dr Sylvain Quessy. Leur merveilleuse équipe et leur expertise en santé publique et vétérinaire m'ont motivée à poursuivre dans le domaine. Dr. Philippe Fravallo m'a accueillie chaleureusement pour la maîtrise en tant que directeur de recherche. Je remercie grandement son support, sa confiance, son accessibilité et tous ses conseils judicieux m'ayant permis de me rendre jusqu'ici.

Mes remerciements sincères à Dr Alexandre Thibodeau pour son partage de connaissances et ses encouragements à développer mon sens critique et mes habiletés en bio-informatique. Un énorme merci à William Thériault pour avoir répondu à mes mille et une petites questions, parfois, pas si petites. Merci pour sa disponibilité, ses explications claires et son écoute inestimable. Une attention spéciale à tous mes autres collègues de la CRSV qui m'ont donné de leur temps précieux et une aide si appréciée. Un merci spécial à Jean-Charles Côté pour sa disponibilité et son travail minutieux. Merci aux membres de mon Comité-conseil ainsi qu'aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire; Philippe Fravallo, Alexandre Thibodeau, Julie Brassard, Marie Archambault, Sylvain Quessy, Marie-Lou Gaucher. J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires de ce projet; la CRSV, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA).

Finalement, merci à mon époux, mes fabuleux parents et mes amis si précieux pour leur soutien moral, leurs encouragements et leur amour durant tout ce parcours.

Introduction

La viande de porc est la cause de 9.8% de toutes les maladies d'origine alimentaire bactérienne aux États-Unis (1). *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* spp., des pathogènes zoonotiques, sont les agents responsables des listérioses et des salmonelloses (2, 3). Le porc peut être infecté à la ferme par ces pathogènes zoonotiques (2, 3). Plusieurs types de traitements ou de procédures sont mis en place à divers stades de la production pour réduire la prévalence de ces pathogènes. L'une des stratégies est d'intervenir au premier stade de la production, c'est-à-dire dès la ferme, pour éviter une propagation de la contamination aux étapes ultérieures. Ainsi, le contrôle des pathogènes zoonotiques à la ferme doit s'effectuer de pair avec l'amélioration de la santé globale, et surtout intestinale, des animaux (4). Outre les procédures de biosécurité à la ferme pour réduire la contamination, des composés antimicrobiens peuvent être administrés aux animaux de façon préventive (5, 6). Les antibiotiques sont des antimicrobiens grandement utilisés dans les élevages à des fins de prévention et de contrôle, et plus spécifiquement, 73% du volume total d'antibiotiques vendus est destiné à un usage vétérinaire (7). L'utilisation massive de ces composés dans le monde vétérinaire est un enjeu préoccupant et celle-ci est remise en cause du au développement de la résistance des bactéries aux antibiotiques (40, 48). La limitation de leur usage devient essentielle, mais des solutions alternatives doivent être développées pour maintenir une bonne santé chez l'animal.

Parmi ces alternatives, l'incorporation d'additifs alimentaires à la nourriture des animaux est une stratégie assez prometteuse (8). Il existe des additifs alimentaires contenant différents composés et ciblant différents objectifs. L'objectif principal est généralement de contrôler la prévalence des pathogènes à la ferme, mais aussi de favoriser une bonne santé intestinale ou même d'augmenter les performances de l'animal (9, 10). Ainsi, parmi les composés antimicrobiens connus et pouvant être utilisés comme additif alimentaire, les dérivés de plantes, comme les extraits de plantes (EPs) ou les huiles essentielles (HEs), sont une option intéressante (11). Plusieurs dérivés de plantes ont un pouvoir antimicrobien marqué lorsqu'ils sont testés *in vitro*, des résultats qui corrélaient rarement à ceux obtenus en expérimentation animale *in vivo* (12, 13).

Certaines études portant sur le microbiote intestinal mènent à se questionner sur son impact sur l'efficacité des composés testés (14, 15). En effet, il est possible que la multitude de

bactéries présentes puisse mener à un effet dilution de l'efficacité antimicrobienne. De plus, sachant que le microbiote intestinal est très sujet aux variations, le changement de la diète de l'animal pourrait être une façon de favoriser un environnement intestinal sain (16).

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de la présence d'une communauté bactérienne complexe sur le niveau d'activité antimicrobienne des composés testés, EPs et HEs, contre des bactéries pathogènes. De plus, une évaluation qualitative et quantitative du microbiote en présence de diverses concentrations en HEs fut effectuée.

Recensement de la littérature

1. Toxi-infections alimentaires

Les toxi-infections alimentaires sont contractées suite à une ingestion de nourriture ou de boissons contaminées par des agents pathogènes (bactéries, virus, parasites ou prions). Les infections bactériennes sont une cause très fréquente de toxi-infections alimentaires (17). Chaque année au Canada, on estime à plus de 4.0 millions le nombre d'épisodes de maladies alimentaires causées par des pathogènes zoonotiques tels que *Salmonella spp.* ou *Listeria monocytogenes*. Les données de la surveillance de ces maladies au Canada indiquent que ces bactéries y sont respectivement responsables de 1565 et 190 hospitalisations chaque année (2). Ces pathogènes sont par ailleurs bien connus pour être présents dans toutes les productions animales, y compris porcine, augmentant le risque de contamination des carcasses puis des produits de viande (6, 18).

1.1. Interventions à la ferme

Afin de réduire le risque de contamination des carcasses, des interventions au premier stade de la production, c'est-à-dire à la ferme, sont pertinentes (5, 6). Certaines mesures et réglementations permettant une réduction du risque de contamination sont déjà établies dans ces productions animales (de la pouponnière à l'abattoir) (19). L'administration de composés antimicrobiens non antibiotiques ajoutés à l'alimentation des animaux est une piste abondamment explorée (20), en complément des traditionnelles mesures d'amélioration de l'hygiène et de la biosécurité pour le contrôle de la prévalence des pathogènes dans les fermes (21).

2. Antimicrobiens

Un antimicrobien est un membre d'une famille de composés ayant la capacité de tuer (bactéricidie) ou de ralentir (bactériostase) la croissance des microorganismes, principalement les bactéries (22).

2.1. Antibiotiques

Les antibiotiques sont les antimicrobiens les plus connus par leur pouvoir antibactérien et antimycotique. Actuellement, ces molécules sont majoritairement synthétiques ou semi-

synthétiques, mais elles sont originellement produites par d'autres micro-organismes (23). Celles-ci sont généralement classées selon leur mécanisme d'action, leur structure chimique ou leur spectre d'activité. Plus récemment, une catégorisation au regard de leur importance en santé publique (maintien de la capacité de traitement des infections humaines) est proposée, tenant compte de l'acquisition d'une antibio-résistance par ces bactéries pathogènes (24).

2.1.1. Utilisation des antibiotiques

En santé publique, la résistance aux antibiotiques continue d'être un enjeu majeur pour la capacité de traitement des infections bactériennes chez les humains. De plus, les antibiotiques sont également utilisés en agriculture et donc en médecine vétérinaire (25). Les antibiotiques destinés à un usage vétérinaire se chiffrent à plus de 73 % du volume total d'antibiotiques vendu. Cette majorité d'antibiotiques à usage vétérinaire se compare aux mêmes catégories d'antibiotiques que celles utilisées en médecine humaine (7).

La production animale utilise les antibiotiques pour divers objectifs. D'abord, ceux-ci peuvent être utilisés dans une optique thérapeutique, mais aussi à des fins de prévention, de contrôle ou de traitement (26). Pour ce qui est de l'utilisation des antibiotiques pour des fins de traitement, il s'agit simplement de traiter individuellement les animaux malades. L'utilisation préventive des antibiotiques intervient lorsque le risque de développement d'une infection bactérienne dans l'élevage à court terme est élevé. L'administration proposée est effectuée sur tous les animaux d'un même groupe, même s'ils ne présentent pas de signes cliniques. Lorsque les antibiotiques sont utilisés pour des fins de contrôle, ces derniers sont administrés à un groupe d'animaux dans lequel certains d'entre eux présentent des signes d'une infection. Cette façon de faire permet de traiter les animaux malades et d'aussi diminuer la propagation de l'infection. La ligne est parfois mince entre la prévention et le contrôle puisque ceux-ci dépendent de la capacité à détecter les animaux malades de façon prématurée. L'utilisation des antibiotiques peut aussi s'effectuer de façon non-thérapeutique comme facteur de croissance pour une meilleure conversion énergétique ou en usage de routine non justifié (27).

La pertinence de ces usages est actuellement questionnée et certains pourraient être interdits, comme l'est en Europe depuis 2006, l'utilisation des antibiotiques pour stimuler la croissance des animaux (promoteurs de croissance pour augmenter le gain de poids quotidien

et/ou l'efficacité de conversion énergétique). L'utilisation préventive est également remise en question car elle est souvent confondue à celle des promoteurs de croissance puisque toutes deux se définissent par une administration par l'alimentation à un groupe d'animaux et sur une longue durée d'élevage d'antibiotiques à de faibles concentrations. La surveillance de cet usage est plus organisée dans les filières avicoles au Canada (28). Les données publiées pour l'industrie porcine au Québec datent de 2006, et font état d'une utilisation à 43% des antibiotiques prescrits de façon préventive, 29% à titre curatif, 24% comme facteurs de croissance et 4% de façon préventive et curative (29). Ainsi, les antibiotiques sont encore grandement utilisés pour l'élevage des animaux de rente puisqu'ils sont efficaces tant sur le plan médical, zootechnique et donc économique (30, 31).

2.1.2. Résistances

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène documenté et décrit comme une capacité évolutive. En effet, le phénomène de l'antibiorésistance est un mécanisme utilisé par les espèces bactériennes permettant une défense contre les antibiotiques naturels produits par d'autres microorganismes. Plus ancien que la découverte des antibiotiques par l'humain, ce phénomène a pris une ampleur considérable due à l'utilisation massive des antibiotiques (32).

Une résistance peut être dite naturelle ou acquise. Les résistances naturelles sont intrinsèquement présentes chez toutes les souches d'une même espèce. Les résistances acquises sont celles qui résultent d'une adaptation d'un microorganisme pouvant se produire de différentes façons, généralement par des mutations génétiques aléatoires ou par des échanges de gènes de résistance entre les bactéries (transformation et transduction), qui vont conduire à contrer les modes d'action des antibiotiques. Les mécanismes de résistance peuvent être enzymatiques menant à une modification de la cible de l'efflux ou de la perméabilité membranaire. En effet, certaines résistances peuvent permettre au microorganisme l'expression d'une activité enzymatique capable de détruire ou d'inhiber la molécule biocide (eg. production de bêta-lactamases contre les pénicillines). Grâce à une modification de la protéine bactérienne cible, la bactérie ne peut pas être reconnue par l'antibiotique (eg. les topo isomérases ou gyrases cibles des fluoroquinolones) (32, 33). Aussi, les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par

exportation active grâce à des transporteurs membranaires tels les pompes d'efflux qui subissent généralement des mutations nuisant à leur bon fonctionnement (34). Une diminution de la perméabilité à la suite d'une modification qualitative ou quantitative de plusieurs porines nuit aussi à l'efficacité des antibiotiques (eg. résistance aux β -lactamines due à une mutation menant à une imperméabilité de la cellule) (32, 33).

Généralement, lorsque des bactéries sont soumises à des faibles concentrations d'un antibiotique pendant une longue période, le risque qu'elles acquièrent des résistances à celui-ci est important. Ainsi, les utilisations préventives en médecine vétérinaire peuvent être à risque en ce qui a trait à l'émergence de résistances (29). Un traitement aux antibiotiques peut mener à la sélection d'une souche bactérienne ayant la capacité physiologique ou génétique de survivre à celui-ci. Puisque son utilisation massive dans le monde vétérinaire est un enjeu préoccupant et remis en cause, et les productions animales travaillent en réponse pour définir et privilégier un usage judicieux des antibiotiques et ainsi limiter l'apparition et freiner la dissémination de la résistance aux antibiotiques (27, 35).

2.2. Alternatives

Afin de faire la promotion d'une utilisation responsable des antibiotiques, plusieurs mesures sont mises en place. L'une de ces mesures est d'encourager la recherche d'alternatives aux antibiotiques en médecine vétérinaire (36). Ainsi, pour maintenir les performances des animaux de rente, l'incorporation de divers additifs dans l'alimentation est une avenue explorée (13). L'objectif principal est d'améliorer la santé générale des animaux (37, 38). L'intérêt plus spécifique de ces alternatives contre le portage de pathogènes zoonotiques alimentaires en production, par leur capacité antimicrobienne, est un critère d'efficacité également recherché (39).

Connaissant la capacité antimicrobienne de certaines molécules produites par des bactéries, il est intéressant d'intégrer l'une ou l'autre à l'alimentation (16). Ce principe est mis de l'avant avec les probiotiques permettant de renforcer les microorganismes commensaux. En effet, les probiotiques sont des microorganismes vivants bénéfiques pouvant être intégrés à l'alimentation de l'hôte. Ceux-ci permettent un effet bénéfique global, lorsque consommés en quantités suffisantes, dans le tractus gastro-intestinal, améliorant ainsi la santé de l'hôte (40).

Lactobacillus plantarum B2984 est un exemple de probiotique utilisés chez les porcelets pour contrer les bactéries zoonotiques telles que *Salmonella* Typhimurium (41). Un principe complémentaire est celui de l'usage des prébiotiques, qui sont des molécules non digestibles par l'hôte, mais métabolisables par certaines communautés microbiennes intestinales spécifiques, qui auront alors un impact bénéfique sur la santé de l'hôte (42, 43). Par exemple, les oligosaccharides fermentables ayant des influences positives sur la santé du microbiote des poulets sont ciblés par les filières avicoles comme alternative aux antibiotiques (44). Il est aussi possible de faire une combinaison des prébiotiques et des probiotiques pour former des symbiotiques qui assurent une plus grande survie des probiotiques et facilitent leur implantation dans le tractus intestinal (45). Cependant, on retrouve plusieurs publications remettant en cause l'efficacité à long terme de ces composés (46, 47).

L'utilisation des acidifiants en alimentation animale fait aussi pleinement partie des stratégies alternatives (48). En effet, les acides organiques permettent de baisser le pH stomacal pour « valoriser » l'aliment et permettre une diminution des pathogènes. Chez la volaille, ils semblent grandement améliorer les performances et augmenter la digestibilité des nutriments (49). L'efficacité des acides organiques contre les pathogènes est plus grande chez les espèces gram-négatives (entérobactéries) (50). Ayant démontré une bonne efficacité dans certaines situations, les acides organiques semblent avoir moins d'impacts en aval de la poche stomacale. Les extraits de plantes, utilisés seuls ou avec des acides organiques, sont souvent proposés pour leur effet au niveau intestinal. Les dérivés de plantes représentent une vaste catégorie de composés, certains mieux connus que d'autres, dans le domaine de la nutrition animale (51).

3. Les dérivés de plantes

Les plantes sont des organismes vivants qui effectuent des réactions enzymatiques et biochimiques essentielles à leur survie. En effet, tout comme les animaux, les végétaux renferment des composés nommés métabolites, qui sont issus du métabolisme de l'organisme. Les métabolites forment deux classes distinctes : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (52, 53).

Les métabolites primaires (glucides, lipides et acides aminés) sont essentiels à la survie de l'organisme, alors que les métabolites secondaires ne le sont pas. Ces derniers sont présents

en moins grande proportion, mais apparaissent nécessaires à la défense de l'organisme contre des agressions extérieures (par des insectes par exemple) (54). Chez la plante, les métabolites secondaires sont multiples et variables selon l'espèce. Ils possèdent près de 200 000 structures définies, complexifiant les études sur leurs fonctions et modes d'action. Ils sont loin d'être tous caractérisés. Cette diversité rend ainsi leur classification chimique ardue. Certaines familles sont présentées dans cette liste non-exhaustive : les composés phénoliques (huiles essentielles), les hétérosides (sulfurés), les flavonoïdes (tannins), les saponines (stéroïdes), les alcaloïdes, les composés terpéniques, les mucilages, les gommes ou résines et les latex (53, 55).

Certains d'entre eux sont mis à profit dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires ou anti-carcinogènes. Une même espèce végétale peut produire plusieurs composés phénoliques différents agissant de façon distincte ou en synergie. Les propriétés antimicrobiennes de certains composés sont bien documentées et sont privilégiées dans le développement d'additifs alimentaire (56). Par exemple, l'extrait d'ail contient des coumarines, flavonoïdes, saponines, tanins, dérivés phénoliques, quinones libres, stéroïdes et hétérosides. Les huiles essentielles restent, malgré tout, une catégorie d'extraits particulièrement intéressante pour l'industrie des additifs alimentaires pour les propriétés antimicrobiennes qu'elles peuvent présenter (57).

3.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont principalement, dépendamment du niveau de pureté, constituées de molécules aromatiques volatiles de faible masse moléculaire. Ces molécules sont hydrophobes, inflammables et très odorantes. Les HEs se solubilisent facilement dans l'alcool et dans les huiles (végétales ou minérales), cependant, il est à noter que malgré leur nom, elles ne possèdent aucun corps gras. La composition biochimique des huiles dépend du type de végétal, du principe d'extraction, de la qualité de la procédure, et est donc très variable (58). Certaines HEs ont un caractère antimicrobien marqué (11).

Les HEs sont obtenues par extraction mécanique, par entraînement à la vapeur ou par distillation à sec. Seuls certains végétaux (environ 10%) sont capables de synthétiser une essence puisqu'elle doit être aromatique (59). Selon l'espèce végétale, l'HE peut provenir de différentes parties de la plante telles que l'écorce, les graines, les feuilles, les racines, les fleurs

ou le bois. Par ailleurs, comme la teneur est faible, les niveaux de rendement le sont aussi, et variables selon le type de végétal (60).

3.1.1. Mode d'action

Les composés phénoliques, terpéniques et aliphatiques caractéristiques des huiles essentielles sont à l'origine de leur activité antimicrobienne (61). Cette dernière est généralement décrite comme une fragilisation de la membrane cytoplasmique des microorganismes (11, 59). Celle-ci mène à une augmentation de la perméabilité, qui nuit aux activités cellulaires comme la production énergétique, le transport membranaire ou les fonctions métaboliques. Ces perturbations entraînent une libération du contenu cellulaire et éventuellement la mort du microorganisme. Peu d'études s'attardent aux modes d'action spécifiques puisque les structures variables des différentes HEs suggèrent de multiples mécanismes différents (62).

Les HEs affectent l'enveloppe externe de la cellule bactérienne, ainsi que le cytoplasme. Certaines molécules augmentent la perméabilité non-spécifique de la membrane par une altération des acides gras membranaire la composant ou en changeant la morphologie cellulaire. La perméabilisation peut être associée à une perte des ions et une réduction du potentiel membranaire (destruction de la pompe à protons et épuisement du réservoir d'ATP) (63). Cette dépolarisation entraîne une altération de l'organisation cellulaire. Par exemple, une augmentation de la perméabilité peut mener à une perte des ions K^+ et une perturbation de la respiration cellulaire (64). De plus, les HEs peuvent avoir un effet sur les membranes en inhibant la sécrétion des toxines dans l'environnement externe (eg. l'exposition de *B. cereus* au carvacrol inhibe toute production de toxine). Les HEs peuvent aussi mener à des perturbations protéiques ou enzymatiques chez la cellule. Par exemple, le carvacrol peut nuire aux protéines comme DnaK ou GroEL et les empêcher d'adopter une bonne conformation, ce qui inhibe la synthèse de la flagelline bactérienne. Aussi, l'eugénol a la capacité d'inhiber des enzymes comme l'ATPase, l'amylase, l'histidine, la carboxylase et la protéase (65, 66).

Les mêmes molécules peuvent user de modes d'actions différents contre divers pathogènes. En effet, une analyse des différentes publications portant sur les mécanismes d'inhibition de l'eugénol, par exemple, confirme cinq modes d'action différents (67). Ainsi

l'eugénol induit chez *L. monocytogenes* l'augmentation de la perméabilité du microorganisme aux ions K⁺ (68), alors que chez *Salmonella spp.*, l'eugénol est capable de modifier le profil en acides gras de la membrane, altérant sa perméabilité et libérant les ions et le contenu cellulaire (69). L'eugénol est toxique pour *S. Typhimurium*, mais aussi pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et pour le Gram positif *Staphylococcus aureus* (70).

De façon générale dans la littérature, les bactéries gram-négatives semblent moins sensibles aux antimicrobiens dérivés des plantes (71). En effet, la membrane externe présente des lipopolysaccharides qui rendent plus difficile la diffusion des composés hydrophobes (72). Cependant, la sensibilité des Gram-positives n'est pas systématique (59).

3.1.2. Démontrer le pouvoir antimicrobien

L'activité antimicrobienne d'une substance peut se définir comme bactéricide (activité létale) ou bactériostatique (inhibition de la croissance). Certaines substances peuvent posséder les deux types de propriétés dépendamment de leur composition chimique, de leur concentration, des groupes fonctionnels présents et des effets synergiques entre ceux-ci (73). La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration de la substance inhibant la croissance bactérienne (74) et est utilisée pour comparer les efficacités entre composés. La CMI apparaît bactérie spécifique. La CMI peut être déterminée *in vitro* selon différentes méthodes, dont deux plus utilisées : la diffusion sur gélose et la dilution en tubes (75). Ces méthodes sont déjà hautement standardisées pour l'évaluation des antibiotiques.

3.1.2.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

Cette méthode est généralement utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien d'un composé. Globalement, elle consiste àensemencer un tapis bactérien d'une concentration standardisée sur une gélose et y déposer un disque stérile de papier filtre imbibé d'une concentration définie de composé à tester. Après une incubation à une température optimale pour la croissance du microorganisme rapporteur, la présence d'une zone d'inhibition de croissance, dont le diamètre est mesuré, permet d'objectiver la capacité antimicrobienne du composé. Le diamètre de cette zone d'inhibition, qui correspond au gradient de concentration de la molécule lors de sa diffusion dans la gélose, corrèle de façon inversement proportionnelle avec la CMI (76).

3.1.2.2. Méthode de dilutions en tubes

Le principe des dilutions en tubes consiste à présenter la molécule à différentes concentrations dans un bouillon de culture contenant une même quantité de bactéries. Après une incubation adaptée au microorganisme, l'efficacité de la substance, correspondant à la perte de turbidité du milieu, est vérifiée (77). Il devient ainsi possible de déterminer la plus faible concentration d'un composé nécessaire à l'inhibition de la croissance d'un microorganisme spécifique. Cette méthode, standardisée, permet de donner une valeur de CMI et de comparer l'effet d'un produit donné sur différentes espèces bactériennes.

4. Les enjeux du développement d'additifs alimentaires

Un additif alimentaire peut être administré à des animaux pour plusieurs raisons, mais le contrôle des pathogènes à la ferme et l'amélioration de la santé globale sont des objectifs actuels (37). Le développement d'un additif alimentaire est un processus nécessitant plusieurs essais et études préalables.

Avant de confirmer quantitativement le potentiel antimicrobien d'une molécule donnée, contre une ou des bactéries données, le processus préalable est une sélection d'une ou de plusieurs molécules d'intérêt ayant une capacité antimicrobienne confirmée. Les meilleurs candidats sont déterminés grâce à des méthodes classiques, telles que la diffusion sur gélose ou des dilutions en tubes (75). Ces techniques très reconnues permettent de mesurer le pouvoir antimicrobien d'une molécule précise contre un pathogène seul.

Il est essentiel pour les développeurs de considérer au préalable les études toxicologiques des substances et les dosages considérés comme sécuritaires pour l'animal (78, 79).

L'additif doit parcourir le tractus digestif de l'animal et agir à un endroit ciblé. Le principe actif doit donc résister aux premières étapes de la digestion (enzymes, pH, température, etc) et être encore actif à l'endroit voulu (80, 81). Le caecum et l'iléon sont le siège d'intenses interactions bactéries hôtes, ce qui font d'eux une localisation souvent privilégiée. Pour stabiliser le composé, l'adsorption sur un support inerte (exemple argile) ou l'encapsulation sont des options couramment utilisées.

En théorie, un choix judicieux du dosage et de la présentation, déterminés à partir d'essais *in vitro*, permettrait d'observer une bonne efficacité lors du passage au modèle animal. Malheureusement, les effets attendus des additifs alimentaires lorsque testés *in vivo* sont souvent peu concluants comparativement à ceux obtenus *in vitro* (12, 13). Le système digestif est un milieu complexe où plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité d'un composé. En effet, la température, le pH, les enzymes digestives et les interactions complexes au sein du microbiote ne sont pas prises en compte lors des essais *in vitro* (14, 15, 82, 83).

5. Microbiote intestinal du porc

5.1. Caractéristiques du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des microorganismes résidents du tractus digestif (4). Le microbiote intestinal est relatif aux microorganismes de la voie gastro-intestinale et le nombre de ces espèces est estimé entre 500 et 1000 pour un mammifère (84, 85). L'estomac et l'intestin grêle au niveau proximal sont peu peuplés en bactéries, avec entre 10^3 et 10^5 bactéries/g, du fait d'un faible pH et un débit rapide du bol alimentaire. La partie distale de l'intestin grêle permet un meilleur établissement des bactéries, entre 10^6 et 10^7 bactéries/g, avec un débit ralenti et un pH légèrement plus élevé. Contenant respectivement environ 10^9 et 10^{13} bactéries/g, le caecum et le colon sont les sections intestinales les plus colonisées, avec la caractéristique supplémentaire d'une lumière intestinale anoxique (86, 87). L'épithélium intestinal constitue une barrière séparant l'hôte de l'environnement extérieur. Ainsi, les intestins sont le résultat de la coexistence d'un environnement externe et interne permettant une compétition entre les bactéries ingérées par l'hôte et celles déjà présentes. Ces bactéries peuvent être associées aux muqueuses ou à la lumière de l'intestin (88, 89).

Ce milieu forme une communauté écologique complexe active, différente pour chaque espèce animale (voire pour chaque individu) et qui varie aussi selon la section intestinale, l'âge, le sexe et différents facteurs environnementaux, comme l'alimentation ou le stress (90, 91).

5.2. Implantation et développement

À la naissance, les intestins sont très peu peuplés et deviennent rapidement colonisés par différentes bactéries. Celles-ci proviennent des bactéries vaginales et fécales de la mère, de l'alimentation du nouveau-né (colostrum, peau maternelle) et de l'environnement (84, 92).

On retrouve une constante évolution de la composition et de la structure chez les animaux plus jeunes. En effet, les variations observées sont plus marquées chez les porcelets qui semblent être davantage sensibles aux différents facteurs influents. Chez le porc, le microbiote devient relativement stable à environ 6 mois d'âge (93). Une fois établie, la composition est spécifique à l'hôte (individu). Des variations plus légères, souvent réversibles, mais continues, dans les différentes sections intestinales, sont observées selon la diète (composition, voire la forme), la prise d'antimicrobiens (e.g. antibiotiques), l'âge, l'environnement, le stress, la présence de phages ou l'immunité de l'hôte (16, 85).

Chez les porcelets, dans le cadre de la production animale commerciale, le sevrage est très rapide. Une transition précoce est effectuée, entre 21 et 28 jours de vie, d'une alimentation lactée à un régime alimentaire solide riche en polysaccharides végétaux. Les porcelets post-sevrés sont très sensibles, de par les fortes variations induites sur le microbiote, à des infections par des pathogènes. C'est pourquoi l'incorporation d'additifs alimentaires chez un porcelet semble pertinente vu sa grande sensibilité intestinale et sa prédisposition aux infections (94).

5.3. Composition

Dès la naissance, le système gastro-intestinal devient rapidement colonisé par différents microorganismes, majoritairement des bactéries anaérobies (95). Les bactéries, très majoritairement commensales, ainsi que diverses levures et autres micro-organismes coexistent dans un équilibre écologique dynamique (84, 96). Le règne *Procaryotae* sont divisés en deux types cellulaires, les archéobactéries et eubactéries. Ces dernières sont divisées selon une classification spécifique ; phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce.

Les niveaux taxonomiques les plus décrits dans la littérature sont les phylums et les familles. Cependant, comme il a été mentionné, la variation inter-individus est souvent élevée, menant à des variations importantes inter-études (variations amplifiées avec l'utilisation de

méthodologies parfois divergentes entre les études), complexifiant ainsi les synthèses entre les résultats (97). Un porc adulte en santé possède globalement un microbiote intestinal composé en proportion assez constante des grands phylums que sont les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes* et les *Proteobacteria* (31). Selon une majorité d'informations recensées dans la littérature, les *Firmicutes* sont dominants au niveau iléal. Au niveau caecal, une augmentation de la représentation des *Bacteroidetes* est observée au détriment des *Firmicutes* qui forment alors moins de la moitié des phylums. Les *Proteobacteria* sont toujours présents de façon minoritaire (3%). Les phylums du colon sont similaires à ceux du caecum, mais la diversité des familles présentes est plus grande. Le caecum et le colon sont composés aussi des *Proteobacteria*, des *Spirochaetes*, des *Synergistetes* et quelques autres phylums (97, 98), mais au total ne représentent pas plus d'environ 10% du microbiote. En raffinant le niveau taxonomique considéré, en analysant la composition au niveau des familles bactériennes représentées, la richesse et la diversité de composition de ces microbiotes apparaît de façon spectaculaire et ce d'autant plus pour des environnements fortement concentrés en bactérie : de l'iléon au colon, avec un environnement de plus en plus anoxique. La littérature compare les familles bactériennes au niveau de l'iléon, du caecum et du colon, pour la lumière de l'intestin et ses muqueuses. Les communautés bactériennes ou leur proportion associées aux muqueuses peuvent être en effet différentes de celles de la lumière de l'intestin, mais majoritairement similaires (88, 89). Généralement, les bactéries tolérantes aux pH acides, comme les lactobacilles et streptococci, sont prédominantes au niveau de l'estomac et de la partie proximale de l'intestin grêle (86, 99). Les familles retrouvées dans l'iléon, le caecum et le colon sont si nombreuses et variables qu'il est presque impossible d'en faire une liste exhaustive. Les distributions des phylums sont présentées pour chaque section intestinale sur la figure 1.

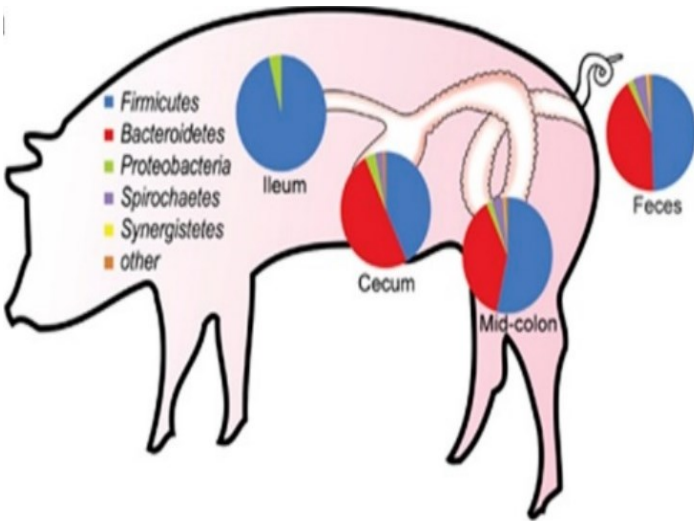


Figure I. Composition bactérienne intestinale du porc selon différentes localisations.

a) Distribution des phylums du tractus gastro-intestinal. (98)

5.4. Fonctions du microbiote

Le microbiote intestinal est d'une importance capitale pour le développement et le maintien de la santé gastro-intestinale. En effet, la communauté microbienne joue un rôle métabolique, structural et protecteur, essentiel non seulement au niveau du tube digestif, mais également au niveau systémique (86).

5.4.1. Métaboliques

Synthèse de vitamines

L'apport en vitamines provenant du microbiote intestinal est essentiel pour la santé de l'hôte (100). Par exemple, les vitamines B, C et K peuvent être synthétisées par les bactéries comme les *Prevotella* ou les *Bacteroides*. D'ailleurs, on retrouve, dans le microbiote intestinal, les voies métaboliques de synthèse des vitamines B1 (thiamine), B6 (pyridoxine), B7 (biotine), B9 (folate), ainsi que B12 (cobalamine) (86, 101, 102).

Production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC)

Les acides gras à chaînes courtes (AGCC) sont des acides gras saturés agissant comme des acides faibles. Ils comprennent les acides acétiques (C2), propioniques (C3) et butyriques

(C4). Le lactate, le succinate et le formate sont moins abondants, mais sont aussi produits par le microbiote (103). Les bactéries anaérobies les produisent par fermentation, à partir des glucides et des acides aminés provenant des substrats exogènes et endogènes (42, 100, 104). Ce phénomène se produit majoritairement dans le caecum et le colon. En effet, les fibres coliques (polysaccharides non-amylacés, amidons résistants et oligosaccharides non-digestibles) n'ayant pas été dégradées par l'intestin grêle y sont fermentées par des bactéries (105).

Les concentrations de ces AGCC contenus dans le tractus gastro-intestinal varient beaucoup selon la composition du microbiote, le temps du transit intestinal et les substrats disponibles. Ces AGCC sont rapidement absorbés par la muqueuse colique et permettent en parallèle l'absorption d'eau et d'électrolytes à mesure que le digestat se déplace distalement (100). Les AGCC possèdent diverses fonctions. Ils agissent sur la motricité gastro-intestinale de façon concentration-dépendante. Ils jouent également un rôle dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale et diminuent la capacité des pathogènes à adhérer à la muqueuse, directement (action du butyrate sur Spi-1 de *Salmonella*) et indirectement en favorisant la croissance de bactéries endogènes aidant à maintenir l'équilibre du microbiote intestinal et à limiter l'accès des pathogènes à la muqueuse. D'ailleurs, les AGCC semblent contrôler la sécrétion du mucus dans le colon (16, 106, 107).

Synthèse d'acides aminés

Les bactéries présentes dans le microbiote ont une influence sur la biodisponibilité en acides aminés pour l'hôte. En effet, tout au long du tractus gastro-intestinal, des protéines alimentaires et endogènes sont hydrolysées en peptides et acides aminés par les bactéries (108). Ceci contribue à la digestion des protéines et facilite l'absorption des acides aminés dans le tractus gastro-intestinal. Les peptides et acides aminés libres sont ensuite recyclés pour accomplir différentes fonctions, dont la formation d'AGCC évoquée plus haut (109). La fermentation des acides aminés s'effectue grâce à des bactéries fermentaires appartenant à des familles telles que *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus* ou *Streptococcus* (110, 111).

Absorption d'ions

L'environnement intestinal est composé de différents complexes de transporteurs d'ions. Si le microbiote influence significativement le transport des ions, il est aussi influencé par ce dernier compte tenu qu'il est grandement sensible aux ions intestinaux (Na⁺, K⁺ et Cl⁻). En effet, plusieurs études s'attardent sur les impacts de certaines bactéries (pathogènes ou non) sur le transport d'ions. Par exemple, *Shigella* et *Salmonella* interagissent avec des polymorphonucléocytes, permettant une régulation de l'absorption intestinale grâce à une sécrétion de cytokines (IL-1 β), et sécrètent un précurseur de l'adénosine qui entraîne la sécrétion de Cl⁻. De plus, il a été démontré que certaines espèces du microbiote nécessitent une certaine concentration en ions comme le Na⁺ et le K⁺. Le transport des ions aurait donc une influence sur les espèces microbiennes composant le microbiote, ou sur leur représentation dans ce dernier (112).

Dégradation des polysaccharides non digérés

Le microbiote joue un grand rôle dans la dégradation des polysaccharides non digérés par l'hôte. En effet, les bactéries ont développé des mécanismes leur permettant de maximiser l'énergie globale du bol alimentaire. Des bactéries, considérées comme des dégradeurs primaires ou secondaires, sont spécialisées pour la dégradation de polysaccharides spécifiques. Ce réseau métabolique est essentiel puisque le produit de dégradation d'un organisme servira de ressources à un autre (113). Les activités métaboliques influencent la physiologie de l'hôte par la formation de métabolites secondaires et de produits de fermentation qui peuvent être absorbés par l'organisme. Les composés peuvent avoir divers effets en influençant la prolifération cellulaire et l'apoptose, en modulant la réponse immunitaire ou l'apport énergétique. Par exemple, dans l'embranchement des *Firmicutes*, les *Ruminococcus bromii* sont connus pour jouer un rôle dans la dégradation de l'amidon résistant au niveau du colon (114).

5.4.2. Structurales

Le microbiote intestinal joue un grand rôle dans la stimulation de l'angiogenèse intestinale. En effet, la vascularisation des intestins est favorisée par la présence de certaines bactéries, spécifiquement *Bacteriodes thetaiotaomicron* qui induit la vascularisation en

stimulant les cellules de Paneth (115). Plusieurs études ont démontré qu'il existe un dialogue constant entre le microbiote, l'épithélium et la muqueuse intestinale en ce sens. Cette interaction harmonieuse implique également des composants du système immunitaire. La grande capacité de régénération de l'épithélium intestinal dépend des cellules souches intestinales (CSI) à fort potentiel prolifératif. Certains récepteurs, transmembranaires ou cytosoliques, exprimés par des CSIs, reconnaissent sélectivement des composants bactériens conservés. Ceci entraîne une cascade de réactions intracellulaires et favorise le développement de la muqueuse intestinale (116). L'assemblage des jonctions cellulaires comme les jonctions serrées est aussi favorisé par des bactéries telles que les *Bifidobacterium* (117).

5.4.3. Protectrices

Par la résistance à la colonisation intestinale par des pathogènes

Les bactéries naturellement présentes dans le tractus gastro-intestinal assurent une certaine résistance à la colonisation par des pathogènes (118).

5.5.1. Compétition spatiale

Il existe une compétition entre les bactéries, permettant la formation d'une barrière physique protectrice empêchant les agents infectieux d'adhérer aux parois intestinales (86, 118). Ce principe est décrit dans le mécanisme de « flore d'exclusion compétitive » ou de barrière, où les pathogènes cible les mêmes sites de fixation à l'épithélium digestif. La flore d'exclusion, par son métabolisme, peut aussi renforcer l'hostilité de l'environnement face à la croissance de bactéries pathogènes (119-121).

5.5.2. Compétition nutritionnelle

Les différentes espèces de microorganismes, en plus d'occuper l'espace, sont en compétition constante pour les nutriments présents dans le milieu intestinal. Ainsi, le pathogène utilise les nutriments et les électrons des acides provenant de l'hôte pour croître et se répliquer (86, 94).

5.5.3. Compétition selon les interactions spécifiques entre les bactéries

Les interactions spécifiques entre les bactéries comme le « quorum sensing » ou la libération de peptides antimicrobiens permettent la sélection de certaines espèces bactériennes au détriment d'autres (122). La production d'antimicrobiens permet de protéger l'hôte d'une colonisation par certains de pathogènes. Moins spécifiquement, par exemple, certains constituants du microbiote ont la capacité de nuire à la croissance ou à la colonisation des pathogènes par la production d'acide lactique (*Lactobacillales*) (123).

5.5.4. Compétition directe hôte-bactéries

Finalement, une compétition directe entre l'hôte et les bactéries est enclenchée par la réponse immunitaire. Des facteurs d'inflammation et d'immunité spécifique sont exploités et peuvent parvenir à contrer le pathogène (119, 124). Cependant, il arrive que *Salmonella* exploite l'immunité pour se développer dans l'intestin en supplantant les entérobactéries du microbiote commensale. Par exemple, *Salmonella* capte spécifiquement l'IL-22 (un régulateur de l'immunité nutritionnelle qui provoque la libération de sidérophores) et séquestre donc le fer, privant spécifiquement les entérobactéries de ce nutriment, ces dernières devenant non fonctionnelles à la protection de l'hôte (125).

Production d'antimicrobiens

Comme il a été mentionné, l'équilibre des populations microbiennes constituant le microbiote est en partie auto-assuré par les bactéries produisant différents composés antimicrobiens tels que les bactériocines ou les acides organiques comme l'acide lactique et acétique (produits respectivement par les lactobacilles et les bifidobactéries). En effet, ces acides, aux propriétés antimicrobiennes, sont produits grâce à la fermentation des hexoses. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit par certaines bactéries lactiques (126) contribue également à la constitution et au maintien de cet équilibre.

Régulation de l'immunité

Le microbiote dans son ensemble joue un rôle clé et complexe dans la calibration et la stimulation de différents aspects du système immunitaire. Les interactions entre le système immunitaire et le microbiote s'effectuent très tôt dans le développement des nouveau-nés,

majoritairement grâce au lait maternel. Les cellules immunitaires résident en plus grand nombre sur des sites déjà colonisés par des bactéries commensales comme la peau ou le tractus gastro-intestinal. Ainsi, une mise en place harmonieuse du microbiote intestinal est essentielle à une bonne santé à long terme pour l'animal (118).

Les commensaux sont des inducteurs actifs ou passifs des réponses immunitaires (eg. établissement de la tolérance aux aliments ingérés par voie orale; suppression des réponses inflammatoires). Les bactéries commensales permettent l'éducation et la stimulation de l'immunité innée et adaptative, par la stimulation de la production de macrophages ou monocytes, ainsi que la production d'anticorps (e.g. IgA), respectivement. Le recrutement, l'activation ou la régulation des différents acteurs de l'immunité innée ou adaptative dépendent des signaux qui proviennent du microbiote (119).

5.5. Santé intestinale

Le concept de « santé intestinale » a été proposé par Conway en 1994 (127). Ce concept expose que la santé intestinale vise une amélioration générale de la résistance à la colonisation assurée par la flore commensale afin d'exclure l'établissement de potentiels pathogènes. D'un point de vue écologique, la santé intestinale dépendrait donc de la stabilité des communautés de microorganismes s'y trouvant. En effet, la stabilité se rattache aux termes de résistance et de résilience : une capacité à résister aux changements lors d'un stress ou à retourner à un état d'équilibre suite à une perturbation pour la communauté de microorganismes (85).

Certaines familles de bactéries sont associées à cette meilleure santé intestinale comme les *Lactobacillus*, alors que d'autres, comme les *Salmonella* ou *Listeria*, à la maladie ou des infections. Cependant, il est très idéaliste et simpliste d'associer quelques « bonnes » bactéries à une santé intestinale (85, 128). Effectivement, le microbiote forme un écosystème très complexe dont la qualité dépend aussi de la diversité microbienne. Des résultats récents suggèrent même qu'une plus grande diversité corrèle avec une plus grande santé de l'animal hôte. Ainsi, une perte de diversité (dysbiose) serait associée avec la maladie, ayant un effet direct sur le métabolisme de l'hôte et altérant les niveaux d'immunité (96, 107, 129, 130).

Comme il a été précédemment mentionné, les fluctuations de la composition et de la structure sont très grandes chez les animaux en bas âge. Une fois adulte, un équilibre de la

composition s'établit, n'empêchant pas une constante variation, exercée par différents facteurs environnementaux. En effet, la composition et la structure du microbiote intestinal peuvent être influencées par de nombreux facteurs. Au niveau individuel, les variations se définissent par l'espèce animale, le sexe ou l'âge. Au niveau environnemental, le stress, la diète ou la localisation géographique (fermes, villes ou pays différents) peuvent influencer grandement le microbiote (131). La prise de médicaments a aussi un impact significatif sur la composition microbienne, principalement la médication chronique (132).

À l'âge adulte, les variations sont donc moins grandes, mais tout de même fréquentes. Les modifications peuvent être une réponse appropriée à un changement chez l'hôte et ne présenter aucune implication pathophysiologique (107). Cependant, l'impact de ces variations peut être bénéfique, ou parfois problématique en amenant un déséquilibre du microbiote (107).

5.5.1. Déséquilibres du microbiote

Le microbiote intestinal a donc un rôle homéostasique bien établi pour l'hôte. Les déséquilibres ou les changements de la composition (dysbiose) et de la fonction du microbiote sont souvent étroitement liés à des maladies intestinales, métaboliques ou auto-immunes (133). En effet, une composition microbienne et une activité métabolique perturbées sont connexes à certains problèmes ou maladies comme la diarrhée, l'inflammation gastro-intestinale (entérocolite nécrosante), les infections bactériennes ou l'obésité (134, 135). Une altération de cet équilibre peut rendre un individu à risque de développer des infections par des pathogènes opportunistes rendant la prévention de la maladie plus difficile dans ces conditions (85). De plus, certaines populations microbiennes (les salmonelles, les shigelles, les staphylocoques ou les *E.coli*) sont fortement associées à des inflammations chroniques (85, 136). De plus, certaines populations microbiennes (les salmonelles, les shigellas, les staphylocoques ou les *E.coli*) sont fortement associées à des inflammations chroniques (85, 136). Des maladies intestinales inflammatoires ou l'obésité seraient majoritairement associées à un microbiote de moindre diversité (137, 138). L'association entre les déséquilibres et les maladies est belle et bien démontrée, mais les liens cause-effet sont beaucoup moins documentés.

5.5.2. Influence du régime alimentaire

Le maintien de la santé générale de l'hôte et la prévention de maladies infectieuses dépendent donc principalement de la stabilité du microbiote intestinale. Cet équilibre est défié par la variation quasi continue du contenu du tube digestif, les bactéries commensales interagissent donc de façon constante avec les composants du mucus et avec ce qui est ingéré par l'animal afin de former un équilibre dynamique (139).

La diète d'un animal, sa composition mais aussi sa structure, jouent un rôle significatif sur le microbiote intestinal, et a donc la capacité de l'influencer directement de façon positive ou négative. Ainsi, les aliments et additifs alimentaires peuvent être sélectionnés dans le but de promouvoir un équilibre favorable entre l'hôte, le microbiote et l'environnement (84, 140). La composition chimique de la diète serait le facteur majeur déterminant les changements de la composition microbienne lors de l'enfance et de sa structure chez l'adulte (84). Josephs-Spaulding J. et al. mentionnent que la composition du régime alimentaire influe sur l'écosystème dont fait partie le microbiote intestinal et que chaque aliment a le potentiel d'être « un ami ou un ennemi » pour l'hôte (141).

6. Étude du microbiote intestinal

La grande majorité des espèces bactériennes qui composent le microbiote intestinal ne sont pas facilement détectables par des méthodes classiques basées sur la culture bactérienne (142). Cette difficulté a été en partie surmontée grâce à la découverte de nouvelles méthodes de biologie moléculaire, basées principalement sur les approches par PCR pour des espèces connues ou sur l'étude de la diversité de séquence des ADNr 16S présents dans un échantillon dans le but d'obtenir une vision plus écosystémique. L'utilisation de ces outils moléculaires a donc permis de mieux connaître le microbiote intestinal que certains chercheurs considèrent comme un organe à part entière placé dans un organisme hôte (135, 143). Même à ce jour, le microbiote intestinal humain n'a pas encore été totalement décrit.

6.1. Quantification des indicateurs majoritaires du microbiote

Afin de comparer les quantités respectives de certains indicateurs majoritaires de microbiotes, la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) peut être utilisée. La

qPCR est très pratique pour étudier un environnement microbien complexe et est grandement utilisée pour l'identification et la quantification de pathogènes présents dans les aliments ou dans l'eau (123, 144). Elle peut s'appliquer à l'étude des contenus digestifs pour l'analyse de la présence des microorganismes commensaux ou des probiotiques (145). Cette technologie est ciblée par l'industrie agroalimentaire, car elle permet de suivre la croissance (indirectement l'activité) des populations microbiennes (146).

6.1.1. Principe de la qPCR

La PCR consiste en une succession de changements de température entraînant la dénaturation des doubles brins d'ADN, l'hybridation d'amorces spécifiques de gènes cible la réaction en chaîne d'élongation de ces fragments ciblés par une polymérase thermostable, ce qui mène à une amplification spécifique de ceux-ci dans le milieu réactionnel. (147). D'abord, l'ADN double brin est dénaturé à haute température séparant les brins simples de l'ADN qui peuvent s'hybrider avec les amorces sens 5'-3' et anti-sens 3'-5'. Ensuite, la polymérase thermostable peut amorcer l'élongation des brins d'ADN avec des désoxyribonucléotides présents en solution. Il est bien important de sélectionner des amorces courtes (taille optimale entre 18 et 22 pb) et spécifiques au microorganisme recherché. Par exemple, dans le cas de *Salmonella*, on pourrait choisir une amorce spécifique au genre permettant l'identification de *Salmonella spp.*, ou d'une sous-espèce bien précise (148). La PCR peut devenir quantitative (qPCR) si la réaction peut être suivie en temps réel. En effet, grâce à l'utilisation d'agents fluorescents qui se lient à l'ADN et n'émettent que lorsqu'ils sont incorporés à de l'ADN double brin, on peut quantifier la fluorescence émise lors de l'amplification qui est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits lors de la réaction (149). Le signal de fluorescence est mesuré à la fin de l'élongation de chacun des cycles permettant d'observer l'apparition, puis l'augmentation d'ADN amplifié. La fluorescence peut être émise, par exemple, grâce à divers composés comme un agent intercalant l'ADN double brin, des sondes d'hydrolyse ou des sondes doubles d'hybridation. (150, 151). Comme chaque copie d'ADN est amplifiée de façon exponentielle, il est possible de suivre la progression de l'amplification en fonction du nombre de cycles (Ct) et selon une courbe standard et ainsi de quantifier le produit. Le Ct correspond au nombre de cycles pour lequel la fluorescence entre dans une phase exponentielle (presque linéaire) (149). Ct est le point où le signal de fluorescence est significativement plus élevé que le bruit de fond (147).

Cette valeur est liée à la concentration initiale d'ADN ajouté et peut servir comme modèle de quantification absolue ou relative par comparaison à une courbe standard obtenue en parallèle avec différents nombres de copies d'ADN connus. Ainsi, on peut connaître, une à une, les quantités de différentes espèces analysées dans le microbiote (152).

6.1.2. Avantages d'utilisation de la qPCR

Cette technique, abordable, rapide, sensible et spécifique, est de plus en plus utilisée dans les guides ISO pour la détection de pathogènes alimentaires afin de remplacer les techniques de culture traditionnelle qui sont suivies d'analyses biochimiques (146, 153). La détection de pathogènes alimentaires par des méthodes de qPCR nécessite au préalable jusqu'à deux jours d'enrichissements contrairement aux 5 à 7 jours de cultures avec la méthode standard. La détection de pathogènes alimentaires par des méthodes de qPCR nécessite très peu de temps contrairement au 5 à 7 jours d'enrichissement avec la méthode standard. En plus d'être beaucoup plus rapide que les cultures, la spécificité de la PCR et sa sensibilité permettent de détecter des microorganismes de populations non dominantes (154, 155). L'analyse cible une population bactérienne (espèce ou genre), et en considérant que le microbiote intestinal contient plus de 10^{11} bactéries par gramme, et jusqu'à 1000 espèces, tant la PCR que les méthodes de culture ne permettent aujourd'hui que l'analyse d'environ 1 à 15 % de ces dernières (91). L'approche par PCR ou qPCR, si elle peut s'affranchir de la culture pour les populations dominantes ou sous dominantes, cible une seule espèce/genre. De plus, elle va concerner l'analyse d'une bactérie déjà identifiée comme importante (pathogène ou bactérie indicatrice), on doit donc connaître une séquence spécifique de l'espèce à identifier. Les bactéries mortes ou vivantes sont amplifiées de manière similaire par cette approche, il est donc essentiel de faire preuve de vigilance lors de la quantification (144). En plus, dû à la forte sensibilité de la technique, les risques de contamination sont élevés, et celle-ci peut générer autant de faux positifs que de faux négatifs. Il est donc essentiel d'avoir des réplicats de chaque échantillon et des contrôles pour chaque analyse (149).

6.1.3. Exemples d'applications de la technique aux contenus intestinaux

En connaissant les principaux microorganismes présents dans le microbiote intestinal, on peut utiliser l'approche par qPCR pour les quantifier et connaître leur proportion respective

dans le microbiote analysé. D'ailleurs, comme il a été mentionné, beaucoup de microorganismes anaérobiques sont présents dans cet environnement et sont donc impossibles à cultiver. Avec cette méthode de détection ne dépendant pas de cultures bactériennes, on peut avoir une meilleure représentation du contenu intestinal (91, 156).

La méthode a ainsi été développée pour :

Les *Escherichia coli* (*E.coli*), des bactéries gram-négatives commensales aéro-anaérobiques qui sont prédominantes dans le tractus digestif des animaux. *E.coli* vit en symbiose avec l'hôte, mais certaines souches peuvent être responsables d'infections intra ou extra-intestinales (157). De la famille des *Enterobacteriaceae*, elles sont déterminantes dans le maintien d'un système digestif sain puisqu'elles permettent la digestion des aliments et la production de vitamine K. Ces bactéries agissent aussi directement sur leur hôte en stimulant le système immunitaire, et en modulant son appétit et le niveau de satiété. De plus, elles permettent à l'hôte une protection physique à la colonisation de bactéries pathogènes en occupant sa niche écologique et en produisant des bactériocines (37, 158). Quantifier l'espèce *E. coli* est pertinent et possible grâce à plusieurs amorces disponibles (159).

Les *Lactobacilli* sont des gram-positives, aéro-tolérantes ou anaérobies de la famille des *Lactobacillaceae*, participant aux processus de fermentation. Ces bactéries dites lactiques ne sont pas majoritaires dans le microbiote intestinal, mais elles sont associées à sa santé (160). Cette bactérie peut aider à rétablir un système digestif déséquilibré suite à une infection, une maladie ou la prise d'antibiotiques (161). La quantification de ce microorganisme dans les fèces est tout aussi pertinente (162).

Les *Lachnospiraceae* sont présentes en assez grandes quantités dans le microbiote intestinal des mammifères. Faisant parties de la classe des *Clostridia*, elles représentent une famille de bactéries anaérobiques strictes (163, 164) ce qui explique que la documentation sur ces bactéries reste assez limitée (165). Cependant, les *Lachnospiraceae* présentent aujourd'hui un intérêt marqué dans l'analyse des microbiotes intestinaux, car elles semblent posséder des rôles clés dans le maintien de la santé intestinale (166). Certaines espèces, un peu moins de la moitié des génomes des *Lachnospiraceae*, ont la capacité de produire de l'acide butyrique, connu pour prévenir la croissance de certains microorganismes dans le tractus gastro-intestinal.

6.2. Le séquençage

Comme il a été mentionné précédemment, la qPCR est très utile pour étudier les indicateurs majoritaires du milieu intestinal. Cependant, cette méthode peut devenir très fastidieuse lorsqu'on veut analyser un microbiote complet sans connaître nécessairement toutes les espèces présentes (167). La mise en place du séquençage à haut débit a permis de développer une méthode qui permet une analyse globale des genres bactériens majoritaires dans le microbiote.

6.2.1. *Évolution technique*

Le but du séquençage est de déterminer précisément l'ordre des nucléotides d'une séquence d'ADN donnée (168). Dans les années 1970, deux méthodes différentes permettant le séquençage ont été développées. La méthode de Sanger se base sur les principes de biologie moléculaire, alors que celle de Maxam et Gilbert se base sur les propriétés chimiques des nucléotides (169-171). La méthode de Sanger consiste à une initiation de la polymérisation de l'ADN grâce à une courte amorce. L'élongation se fait avec quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) ainsi que l'un des quatre didésoxyribonucléotides en faible concentration ajoutés dans la réaction. Ces derniers ont la propriété d'arrêter l'élongation au niveau du nucléotide correspondant au désoxyribonucléotides. Ainsi, on peut déterminer la position de chacun des nucléotides dans la séquence grâce à une électrophorèse. C'est cette technique qui fut le plus utilisée dans les laboratoires (172). La méthode Maxam et Gilbert se base plutôt sur la dégradation chimique de l'ADN grâce à six étapes; marquage par un traceur radioactif, isolement du fragment d'ADN à séquencer sur un gel de polyacrylamide, séparation des brins par dénaturation thermique, modifications chimiques spécifiques à chacune des bases (A, C, G et T), clivage au niveau de la modification chimique et analyses par électrophorèse. Ainsi, on peut déterminer l'ordre des coupures et reconstituer la séquence.

Les avancées technologiques ont permis le développement du séquençage de nouvelle-génération (NGS) dit à haut débit, présentant des améliorations majeures. En effet, ces appareils ont la capacité d'effectuer des millions de réactions de séquençage de façon parallèle et avec une grande vitesse. Les résultats obtenus sont ensuite analysés grâce à la bio-informatique (169).

Les plateformes de séquençage à haut débit sont de plus en plus utilisées du fait de leur haut rendement et des coûts de séquençage moins élevés. Le séquençage à haut débit de nouvelle génération requiert une étape d'amplification des molécules d'ADN en amont du décodage. Trois différents groupes proposent ce type de plateformes : Roche, Illumina et Life Technologies. Chacune des plateformes disponibles possède des caractéristiques spécifiques, des avantages et des inconvénients. Le choix de plateforme NGS dépend du type d'analyse à effectuer (173).

La plateforme Miseq d'Illumina (séquençage pairé et faible taux d'erreur) est très adaptée et souvent utilisées lors de l'analyse du microbiote. (174). La taille des régions à analyser doit être bien adaptée à la taille des séquences que l'appareil peut séquencer (175).

6.2.2. ARN ribosomal 16S et choix de la région

L'ADN codant pour l'ARN ribosomal de la sous-unité 16S (ARNr 16S) est un gène rapporteur de 1500 pb, et est jusqu'à maintenant le plus utilisé pour l'analyse d'un écosystème microbien. L'ARNr 16S est une cible de choix en raison de sa présence chez les procaryotes, de sa faible capacité à faire des transferts horizontaux et par ses caractéristiques permettant la différenciation des diverses espèces de microorganismes. Effectivement, ce gène est composé de 9 régions hypervariables (V1 à V9) encadrées par des séquences très conservées sur lesquelles on construit des amorces « universelles ». Les régions hypervariables permettent la distinction des bactéries. (175, 176). Ce gène est donc un marqueur moléculaire très utilisé, ce qui fait en sorte que les banques de données contenant l'information des séquences deviennent de plus en plus complètes et permettent une meilleure analyse du microbiote (167). La plateforme Miseq d'Illumina est capable de séquencer jusqu'à 300 paires de bases pairées et la région de l'ARN ribosomal 16S à analyser est choisie en conséquence. En effet, dans le but d'obtenir un chevauchement maximal des 2 brins d'ADN séquencés, ce qui minimise les erreurs de séquençage, la région V4 est souvent privilégiée due à sa taille permettant un pairage parfait des 2 brins d'ADN séquencé. Avant le séquençage, cette région est amplifiée de l'ADN total extrait d'un environnement donné grâce à une PCR. D'ailleurs, il est important de ne pas avoir un trop grand nombre de cycles d'amplification afin d'éviter les chimères ou d'autres erreurs (175).

6.2.3. Méthodologie Miseq

La technologie Miseq d'Illumina est très performante et rapide, mais nécessite quelques manipulations au préalable. En effet, comme il a été mentionné, une fois que la région du gène à séquencer est sélectionnée, une amplification PCR des échantillons d'ADN extrait à analyser est nécessaire. Les amorces de la région sélectionnée permettant l'hybridation doivent contenir une séquence supplémentaire nommée adaptateur. Les produits PCR de la région V4 obtenus doivent subir une purification, une quantification et une normalisation. Par la suite, il est nécessaire de préparer une bibliothèque, par une ligation d'index aux extrémités des fragments grâce à une PCR supplémentaire. La bibliothèque est conçue pour interagir avec la technologie de séquençage Illumina et elle permet de minimiser les erreurs générées par l'étape de PCR.. Après la PCR, une purification est requise afin d'éliminer les fragments de mauvaises tailles et les dimères formés par auto-ligation. Une quantification de la bibliothèque est ensuite effectuée afin de permettre une normalisation des échantillons et de procéder au séquençage Miseq (177, 178).

6.2.4. Manipulations bio-informatiques

Après un séquençage, la quantité d'information recueillie est très importante, mais non organisée et impossible à lire par un humain. C'est pourquoi une approche bio-informatique est requise et Mothur est un des logiciels souvent utilisé pour ce type d'analyses. La première étape consiste en un « nettoyage » (175). Premièrement, un assemblage de tous les résultats permet de vérifier si tous les brins d'ADN (forward et reverse) s'alignent correctement. On élimine également ce qui n'est pas de la taille du fragment attendu. Le logiciel éliminera aussi toutes les séquences de faible qualité et les chimères présentes (179). Chacune des étapes du nettoyage sont essentielles afin de ne pas surestimer le nombre de séquences uniques, attribuées à des espèces bactériennes différentes, et de ne pas biaiser l'analyse de la richesse (180).

Ensuite, les séquences sont regroupées en OTU (Unité taxonomique opérationnelle), un certain niveau de dissimilarité est autorisé, variant de 1 à 5%. Le niveau de similarité, regroupant les séquences en OTUs, est classiquement établi à 97%, seuil employé pour définir une espèce bactérienne. De plus, ce seuil permet de diminuer les séquences uniques et les erreurs potentielles (181, 182). Une fois les séquences regroupées, on peut effectuer une assignation

taxonomique de la séquence majoritaire représentant grâce à des classificateur qui vont interroger les bases de données de références (SilVa, RDP) (180).

Différents types d'analyses peuvent permettre de comparer la diversité et la composition des échantillons : diversité alpha ou bêta. Ces analyses de diversité nécessitent une même profondeur de lecture pour chaque échantillon (donc la prise en compte d'un même nombre de séquences : celui de l'échantillon qui en présente le moins). La diversité alpha permet d'établir et de comparer la richesse et la distribution des espèces dans les échantillons. La richesse d'un échantillon est calculée comme la quantité d'OTUs différentes qu'il contient. La richesse moyenne peut être comparée entre groupes d'échantillons. La distribution compare le nombre de séquences attribuées à chaque OTU identifiée. Ces 2 paramètres sont ensuite combinés pour obtenir une mesure globale de la diversité alpha. Les informations sur la diversité alpha sont représentées grâce à différents index (les plus souvent utilisés dans ce cas-ci sont ceux de Shannon et de Simpson) et des tests statistiques (ANOVA ou Test T) permettent de comparer des groupes d'échantillons entre eux. Il a été montré qu'une plus grande diversité alpha du microbiote intestinal corrélait avec une meilleure santé (183, 184).

L'étude de la diversité beta se base sur les comparaisons multiples d'échantillons d'une population et permet de situer un échantillon par rapport aux autres selon les différences au niveau de la structure et de la composition (185). D'abord, des calculs de matrices permettent de mesurer les niveaux de dissimilarité entre les différents échantillons de microbiote. Différents indices existent pour ces calculs tels que l'indice de Yue & Clayton ou de Jaccard. L'indice de Yue & Clayton évalue les proportions de ce qui est similaire (abondances relatives). L'indice de Jaccard, quant à lui, donne plus de poids à ce qui est présent ou absent lors des comparaisons.

Ces différences structurales de microbiotes, peu importe l'indice utilisé, ont "n" dimensions. Pour visualiser les résultats, ces données sont projetées sur un plan (2D ou 3D), qui représente graphiquement, le plus fidèlement possible, la distance entre tous les échantillons. Chaque point est une projection, sur ce plan, de la diversité d'un échantillon par rapport aux autres. L'analyse graphique permet, visuellement, d'identifier des proximités pour des populations (groupes d'échantillon) dans l'étude. Le NMDS (Non-metric multidimensional scaling) est souvent utilisé pour une visualisation de la répartition structurale des différents échantillons, en 2 ou 3 dimensions. Des tests statistiques comme l'AMOVA/test ADONIS ou

l'HOMOVA viennent supporter la signification des distances calculées (186). Ces analyses, à l'OTU, ne tiennent pas compte des liens taxonomiques existants entre les bactéries composant ces microbiotes.

Pour les analyses de la composition, une banque de données (Silva, RDP) doit être utilisée afin d'associer les OTUs à des genres bactériens en allant jusqu'à l'espèce. Un LEFSE (Linear discriminant analysis Effect Size) permet de comparer l'abondance relative des taxons identifiés selon les conditions comparées (groupes d'échantillons). Ce type d'analyse permet de savoir si un genre bactérien est plus associé à une condition (LDA effect size). Par exemple, les *Lactobacilli* sont généralement plus associées aux animaux en bonne santé (18, 82). Pour les analyses de la composition, l'assignation taxonomique des OTU est mise à profit. Un LEFSE (Linear discriminant analysis Effect Size) permet de comparer l'abondance relative des OTUs identifiés selon les conditions comparées (groupes d'échantillons). Ce type d'analyse permet également de savoir si un OTU est plus associé à une condition (LDA effect size). Ensuite, il est possible de retracer l'assignation taxonomique pour des niveaux supérieurs des OTU identifiés grâce à des banques de données. Ces résultats dépendent évidemment des banques de données utilisées, mais peuvent donner des informations sur ce qui est plus associé à une condition, du genre jusqu'au phyla. Par exemple, les *Lactobacilli* sont généralement plus associées aux animaux en bonne santé (18, 82).

Il n'y a pas de consensus clair dans la littérature sur les méthodes de traitement des échantillons et des analyses de résultats. La variabilité inter-études est donc aujourd'hui très élevée, de par la sensibilité de la méthode et par le fait que de nombreux facteurs influencent les résultats, qu'ils concernent l'animal (variabilités inter-individuelles), le traitement des échantillons ou les analyses bio-informatiques (97, 187).

Hypothèses et Objectifs

Comme il a été présenté, les additifs non antibiotiques en alimentation animale ont vocation à être de plus en plus utilisés dans l'agro-industrie (20). Certains dérivés de plantes montrent des effets antimicrobiens intéressants *in vitro*, ce qui fait d'eux des candidats privilégiés pour être des constituants de ce type d'additifs. Mais les impacts *in vivo* restent insuffisamment détaillés à ce jour. Plusieurs études sont mêmes contradictoires quant à l'efficacité de certains composés lors du passage aux essais sur modèle animal. De plus, il reste beaucoup à connaître sur leurs modes d'actions spécifiques (12, 13). La revue de la littérature a exposé la complexité des dérivés de plantes composés de multiples molécules qui semblent intervenir différemment contre divers microorganismes. De plus, cette revue a permis d'enrichir nos connaissances sur le microbiote intestinal, un sujet complexe comprenant d'innombrables subtilités.

Ainsi, dans le cadre de ce mémoire de maîtrise, les hypothèses suivantes ont été posées:

1. Les méthodes *in vitro* classiques utilisées pour déterminer le caractère antimicrobien d'un composé sont trop loin d'un modèle animal pour donner des informations sur l'efficacité d'un composé *in vivo*.
2. Les multiples communautés microbiennes du microbiote intestinal peuvent influencer l'efficacité des composés généralement testé contre un pathogène seul.
3. Les composés additifs peuvent influencer quantitativement et qualitativement certaines communautés du microbiote.

L'objectif de ce projet de recherche était d'abord de déterminer l'efficacité de différents composés et extraits de plante par des méthodes classiques. La mise au point d'une méthodologie *in vitro* plus complexe a ensuite permis d'évaluer l'efficacité des composés en présence d'une communauté bactérienne complexe dérivée du microbiote digestif du porc. Finalement, l'impact des candidats additifs (sélectionnés pour leur efficacité) sur l'évolution du microbiote (qualitatif) et de certains indicateurs (quantitatif) a été évalué.

Article scientifique

En préparation pour la revue Environmental Microbiology

**Development of an *in vitro* model for the screening of plant compounds and their effects
on the modulation of the pig gut microbiota**

Mélodie Langlais^{1,2,3}, Alexandre Thibodeau^{1,2,3}, Jean-Charles Côté^{1,2,3} and Philippe Fravalo^{1,2,3*}

¹ Chaire de recherche industrielle du CRSNG en salubrité des viandes, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

² Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

³ Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

* Corresponding author. E-mail address: Philippe.Fravalo@umontreal.ca

Abstract

The addition of antibacterial plant compounds, notably essential oils and other plant extracts, in feeds has proven effective in promoting the general well-being of farm animals. Nonetheless, there are gaps in the understanding of their modes of action and to which extent their measured *in vitro* effects can transpose *in vivo*. Here, the bactericidal activities of nine plant compounds, seven essential oils and two plant extracts, were assayed *in vitro* on 13 bacterial strains by agar-disk diffusion and broth dilution assays. Next, six of the most active plant compounds, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, garlic extract, menthol and white camphor oil, were assayed in a broth dilution assay containing pig feces and two reporter bacterial foodborne pathogens, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis Rif^R. The presence of pig feces and either of the two reporter bacteria decreased the bactericidal activities of some plant compounds but did not decrease the activities of others. The most active plant compounds, four essential oils, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil, were retained to further study their effects on the evolution of the pig feces bacterial microbiota. Comparisons of alpha-diversity indices showed that increased essential oil concentrations led to an increase in richness and evenness. Pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota showed significant changes in beta-diversities according to increased essential oil or colistin concentrations (Fig 2; Table 5, 7). Samples treated with high concentrations of essential oils or colistin showed similar beta-diversities. Quantitative PCR of three bacterial indicators, *E. coli*, Lactobacilli and *Lachnospiraceae*, showed that an increase in the concentrations of essential oils decreased the number of copies of *E. coli*, showed little effects on Lactobacilli, and increased the number of copies of *Lachnospiraceae*.

The *in vitro* model developed here, owing to the addition of pig feces and reporter bacteria, has filled gaps prior to a true *in vivo* assay. It has proven powerful in providing a much better understanding of the effects of plant compounds on intestinal bacterial microbiota. These include measures of bactericidal activities, alpha- and beta-diversities, and specific bacterial indicators. Our *in vitro* model could be used to assay a much wider variety of plant compounds and other extracts, and to monitor their effects on pig feces bacterial microbiota. It could lead to a better selection of tailor-made feed additives and be used for the modulation of swine intestinal microbiota for specific purposes. Our *in vitro* model could also be regarded as a

generic model amenable to much broader uses. Its various components, plant compounds, pig feces and bacterial microbiota, could not only be replaced by different plant and animal compounds, animal feces and other bacterial microbiota but also by other biological materials and microbiota at large.

Introduction

In Canada, each year, four million domestically acquired foodborne illnesses are caused by zoonotic pathogens (2). One of the main causes is the consumption or mishandling of food contaminated with pathogenic bacteria. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. are the causal agents of listeriosis and salmonellosis, respectively, two important foodborne diseases (188). In Canada, each year, these two bacteria cause an average of 178 and 88,000 food-related illnesses, 150 and 925 hospitalizations, and 35 and 17 deaths, respectively (2, 3). Both bacteria can contaminate meat, eggs, dairy products, fruits and vegetables (188).

Hog production is an important component of Canada's agriculture with a yearly average of 13 million pigs on farms (189). *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. may infect swine at the farm, be carried asymptotically within the intestinal tract, and excreted intermittently, increasing their prevalence (190, 191). Pork meat accounts for 9.8% of total bacterial foodborne illnesses in the US (1).

Prophylactic treatments, feeding only pathogen-free feedstuffs, preventing infection, the use of antibiotics, at the first stage of swine production, the farm level, is a key component in the chain of meat contamination prevention and control (5, 6). Among other various strategies, the use of plant extracts in feed additives has proven helpful in improving the animal gut health, in limiting the use of antibiotics (8) and in controlling pathogens (37).

Several plant-derived compounds, including essential oils (EOs), volatile aromatic compounds (VACs), and other plant extracts (PEs), have proven *in vitro* antibacterial activities (66). The EOs antibacterial activity often rests on their phenolic, terpenoid and/or aliphatic compounds that may permeabilize the phospholipid layer of the bacterial membrane (11). This leads to the leakage of phosphate and other elements, to a change in the membrane potential and cell environment, and ultimately to bacterial cell death (192). Other antibacterial PEs show a variety of mechanisms of action more or less understood that vary depending on the targeted pathogen (193).

Various plant-derived compounds with proven *in vitro* antibacterial activities have been added to animal feeds (37) with mixed results. The *in vitro* antibacterial activity rarely correlates with *in vivo* antibacterial activity in field or animal models (12, 13). Their exact *in vivo* mechanism of action is poorly understood, but it has been postulated that their efficacy could be modulated by the gut microbiota (194).

The gut microbiota plays a proven significant role in the development and maintenance of gastrointestinal health by contributing metabolic, structural and pathogen protection roles (4). Haphazardly at an early age, the gut microbiota stabilizes after a few years (84), and its composition becomes host-specific (195). Gradual variations in the different intestinal sections can be observed based on diet, antimicrobial consumption, age, environment, stress level, presence of phages or host immunity (95). In some cases, microbiota dysbiosis may render an animal at risk of developing infections with opportunistic pathogens (85, 196).

The diet plays a major role in the establishment of the intestinal microbiota (131), and greater microbiota diversity has been correlated with improved animal health and performance (196). Feed additives have been tailored to (16) modulate the microbial homeostasis by favoring beneficial bacteria and selecting against pathogenic ones (196, 197).

There are still major gaps in our understanding on how intestinal microbiota can be modulated by plant-derived compounds. The aim of our study was four-fold; 1- to determine the *in vitro* antibacterial activity of selected plant compounds on selected bacterial species and strains using classical methods, agar disk-diffusion and broth dilution assays; 2- to develop a pig feces-containing *in vitro* model for the determination of bactericidal activity of selected plant compounds on the feces bacterial microbiota; 3- to determine the effects of selected plant compounds on the pig feces bacterial microbiota diversity using high throughput sequencing; and 4- to determine the effects of selected plant compounds on the dynamics of specific bacterial indicators using quantitative PCR.

Materials and Methods

Bacterial species and strains and culture conditions

The 13 bacterial strains and their culture conditions; incubation time, temperature, and under either aerobic, microaerobic or anaerobic atmosphere, are listed in Table 1. Together, they cover five Gram-negative and four Gram-positive species. They include four *Salmonella* serovars.

All bacterial strains were grown in Brucella broth (BD, Mississauga, ON, Canada), except *Lactobacillus acidophilus* which was grown on Difco Lactobacilli MRS broth (BD), or plated on their respective agars. The microaerobic cultures, were carried in a sealed gas jar containing a CampyGen sachet (Oxoid, Nepean, ON, Canada) and the anaerobic cultures were in a sealed gas jar containing an AnaeroGen sachet (Oxoid). Bacterial counts at $OD_{625}=0.08$ and $OD_{625}=0.15$ were determined by serial dilutions in saline solution and plating. For each of the following tests, bacterial suspensions were collected from fresh 24h-old colonies and adjusted to 1.5×10^8 and 3×10^8 CFU/mL in sterile saline (0.85% (p/v) NaCl).

Plant compounds

The nine plant compounds assayed in this study, seven essential oils (EOs) and two plant extracts (PEs), the solvent used, and their origins, are listed in Table 2.

Agar disk-diffusion assay

The antibacterial activity of the nine plant compounds (Table 2) was assayed on 13 bacterial strains (Table 1) using the agar disk-diffusion assay, in triplicate. A 1.5×10^8 CFU/mL bacterial suspension was prepared and spread on agar plates. Two sterile Whatman filter paper No 1 discs of 6 mm in diameter (VWR, Mississauga, ON, Canada) were placed on the surface of the agar and 10 μ L of one of the nine undiluted plant compounds were put on one paper disc and 10 μ L of paraffin oil (Biomérieux, Oakville, ON, Canada) were put on the second filter paper disc which served as a negative control. Growth of bacteria elsewhere on the agar plate was considered a positive control. The agar plates were incubated under conditions described

above, for 24 hours. The antibacterial activity was determined quantitatively by the diameter in cm of the inhibition zone around the paper disk (198) and expressed qualitatively; 0 cm = no antibacterial activity, 0.1-0.2 cm = very low, 0.3-0.7 cm = low, 0.8-1.2 cm = medium and 1.3-2 cm = high.

Broth dilution assay

The antibacterial activity of the nine plant compounds (Table 2) was assayed on the 13 bacterial strains (Table 1) using the broth dilution assay, in triplicate. Bacterial suspensions were added to glass tubes containing 5 mL of appropriate broth as indicated above to a final concentration of 6×10^6 CFU/mL. The plant compounds were added either undiluted or serially-diluted from 10^{-1} to 10^{-5} . Cultures were incubated on a rotary platform at 250 rpm for 24 h at 37°C. The minimum inhibitory dilution (MID) was the lowest concentration in $\mu\text{L/mL}$ at which no bacterial growth was observed. The most bactericidal EOs and PEs were re-assayed using additional serial dilutions beyond 10^{-5} to determine their MID.

Feces collection

Feces from six 16-week-old pigs at the fattening stage were collected in six different plastic containers and put on ice until further processing within 12 h. 50 g of each of the six samples were pooled in a Whirl-Pak sample bag (VWR, Mississauga, ON, Canada) and 120 mL of a 50:50 glycerol (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada):buffered peptone water (Innovation Diagnostics, Blainville, QC, Canada) solution was added to the 300 g of pooled feces and homogenized for 1 min using a Seward Stomacher 400C Lab Blender (Cole-Parmer, Montreal, QC, Canada). 5 mL aliquots of the mixture were distributed in 10 mL sterile Falcon tubes (Sarstedt Inc., Saint-Léonard, QC, Canada) and stored at -80°C until use.

***Listeria monocytogenes*- and *Salmonella* spp.-free pig feces**

Pig feces were tested for the presence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp.

For the detection of *L. monocytogenes*, 25 g of pooled feces were homogenized in 225 mL University of Vermont broth (UVM; Innovation Diagnostics, Blainville, QC, Canada) and incubated for 48 h at 30°C. Next, 100 μL of the 48 h culture were spread on RAPID'*L.mono*

agar plates (BioRad, Mississauga, ON, Canada) and incubated for 24 h at 30°C. In parallel, 10 µL of the 48 h culture were transferred in a tube containing 10 mL Fraser broth (Innovation Diagnostics) and incubated for 48 h at 42.5°C. Next, 100 µL of the latter 48 h culture were spread on RAPID'*L.mono* agar plates and incubated for 24 h at 30°C. All plates were monitored for growth of *L. monocytogenes*.

For the detection of *Salmonella* spp., 25 g of pooled feces were homogenized in 225 mL buffered peptone water and incubated for 48 h at 30°C. Next, 1 mL of the 48 h culture was transferred into a tube containing 9 mL tetrathionate brilliant green broth (TBG; Innovation Diagnostics) and incubated for 24 h at 42.5°C. In parallel, 100 µL of the 48 h culture were spread on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MRSV; Innovation Diagnostics) agar plates and incubated for 24 h at 42.5°C. Next, 100 µL of the TBG 24 h culture were spread on xylose lysine deoxycholate (XLD; Innovation Diagnostics) and brilliant green sulfa (BGS) agar plates, the latter supplemented with either novobiocin (20 mg/L; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) or rifampicin (20 mg/L; Sigma-Aldrich). Likewise, bacteria isolated on the MRSV agar plates after 24 h were toothpick transferred on XLD and BGS agar plates, supplemented with antibiotics. All XLD and BGS plates were incubated for 24 h and 48 h, respectively, at 37°C. They were monitored for growth of *Salmonella* spp.

Broth dilution assay with the addition of pig feces

The plant compounds that showed antibacterial activity in the initial broth dilution assay described above in absence of feces, were assayed in a broth dilution assay in presence of pig feces extract. A 5 mL aliquot of the pig feces mixture was thawed, diluted 1:10 in buffered peptone water and homogenized for 1 min. The fecal suspension was added to a glass tube containing 5 mL Brucella broth to a final concentration of 0.007 g/mL. 100 µL of either of two reporter bacteria, *L. monocytogenes* or *S. Enteritidis*-rifampicin-resistant (Rif^R), were added to a final concentration of 6x10⁶ CFU.

Based on the plant compound MID determined in the initial broth dilution assay, four different MID final concentrations, 0.1X, 1X, 10X and 100X, were assayed. All tubes were incubated under aerobic conditions and shaken on a rotary platform at 250 rpm for 5 h at 37°C.

For the test in presence of *L. monocytogenes*, 100 µL of each tube were spread on RAPID'*L.mono* agar plates. For the test with *S. Enteritidis-Rif^R*, 100 µL of each tube were spread on Brucella agar plates containing rifampicin at 25 mg/L. All plates were incubated 24 h at 37°C. The experiment was done in triplicate. The MID in presence of pig feces was the lowest plant compound concentration at which no bacterial growth was observed on the plates.

The broth dilution assay in presence of pig feces was repeated with four EOs as described above, here with the addition of either of two reporter *Salmonella* serovars, *S. Enteritidis-Rif^R* as above and *S. Typhimurium* in place of *L. monocytogenes*. Carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol were added at seven different concentrations, 0.1, 0.2, 0.3, 0.8, 1.0, 2.0 and 3.0 µL/mL, later referred to as [C]-2, [C]-1, MID (minimum inhibitory dilution), [C]+1, [C]+2, [C]+3 and [C]+4, respectively. Results obtained with each of these seven concentrations were pooled into three groups referred to as Low [C] (a pool of [C]-2 and [C]-1), MID, and High [C] (a pool of [C]+1, [C]+2, [C]+3 and [C]+4), for later analyses of bacterial alpha- and beta-diversities, linear discriminant analysis effect size. Likewise, white camphor oil was assayed at six concentrations, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0 and 10.0 µL/mL, later referred to as [C]-2, [C]-1, MID, [C]+1, [C]+2 and [C]+3, respectively. Here also, results with these six concentrations were pooled into three groups, Low [C] (a pool of [C]-2 and [C]-1), MID, and High [C] (a pool of [C]+1, [C]+2 and [C]+3), for later analyses. Two pig feces EO-free controls were added, one without and one supplemented with colistin (4 µg/mL). All assays were done in triplicate. All tubes were incubated under aerobic conditions and shaken on a rotary platform at 250 rpm for 5 h at 37°C and submitted to DNA extraction.

DNA extraction

A 1.5 mL volume of each culture was transferred in DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit PowerBead tubes (Qiagen, Hilden, Germany), centrifuged 20 min at maximum speed (13 600 rpm, 16 800 g), the supernatant discarded, and the tube containing the pellet kept at -80°C until use.

DNA was extracted using DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions with two modifications. First, a 70°C, 10 min heating step was done

following the incorporation of the C1 solution to improve cell lysis. Second, bead beating was done in a FastPrep-24™ 5G Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), for 45 sec at 6.0 m/sec. The recovered DNA was quantified on a QFX Fluorometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) using the Qubit BR assay (Fisher Scientific) and kept at -20°C until further analysis.

Evolution of the pig feces bacterial microbiota

All DNA samples were normalized at 1 ng/μL. The 16S rRNA gene amplicon libraries were prepared using the universal primer pair 515FP1-CS1F 5'-ACACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' and 806RP1-CS2R 5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (Life Technologies, Pleasanton, CA, USA) which amplifies a 292 bp segment of the variable V4 region (199). For each sample, 12.5 ng of DNA were amplified in a final volume of 30 μL using Invitrogen Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. A sample containing the ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Zymo Research, Irvine, CA, USA) was used as a positive control. Water was used as a negative control. The amplification was done with an initial step of 5 min at 95°C followed by 20 cycles at a denaturing temperature of 95°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, elongation at 72°C for 180 sec and a final extension at 72°C for 10 min. All amplifications were done in triplicate. PCR amplification was confirmed by visualization of the stained 292 bp amplified fragment following electrophoresis on a 2% agarose gel. Barcoding and DNA sequencing were done on an Illumina MiSeq PE250 (Illumina, San Diego, CA, USA) at The McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, QC, Canada).

Reads were cleaned and analyzed using Mothur version v.1.39.5 (200) with some modifications according to Larivière-Gauthier et al. (18). Suspicious sequences, too long or unusual, containing polymers or ambiguity, and sequences from negative controls were discarded. The sequences were aligned using the Silva database v.128 (201). The chimeras were removed with USEARCH (202). The clustering of the sequences was performed according to operational taxonomic units (OTUs) with a genetic distance dissimilarity of 3%. A classification was done with Mothur-formatted Ribosomal database project (181) trainset version 16. Prior

to OTUs clustering, the negative control samples and one sample which contained too few reads were removed.

For the diversity analyses, sequences were subsampled in Mothur with the lowest number of reads (56,125) found in a single sample. Alpha-diversity indices, the species diversity within a sample, OTUs (Sobs: total number of OTUs), Inverse Simpson, Shannon, and Shannon's evenness were calculated in Mothur and compared with GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) using one-way ANOVA with multiple comparisons (p -value < 0.05). The beta-diversity analysis, a measure of dissimilarity between sample pairs, was performed using the Jaccard similarity coefficient based on the observed richness and the Yue & Clayton theta similarity coefficient. The genetic diversity between sample pairs was compared by Analysis of molecular variance (AMOVA) (203) and visualized with 2 D nonmetric multidimensional scaling (NMDS) graphs (18). OTUs associated with each compared sample were determined with a linear discriminant analysis effect size (LEfSe; (204)) analysis using the Galaxy/Hutlab web application (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>). The results were restricted at a linear discriminant analysis (LDA) score over 2.5 with significant OTUs (p -value < 0.05).

Bacterial microbiota indicator quantification by Real-time quantitative Polymerase chain reaction (qPCR)

All DNA samples were normalized at 5 ng/ μ L. For each DNA sample, specific bacterial populations, *E. coli* (38), *Lachnospiraceae* (39) and Lactobacilli (40), were quantified by 16S rRNA-based qPCR (41). qPCR reactions were done in a LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), with EvaGreen Dye (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA). These specific bacterial population quantifications in each of six concentrations, referred to above as [C]-2, [C]-1, MID (minimum inhibitory dilution), [C]+1, [C]+2 and [C]+3, of the four EOs, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil, were compared using one-way ANOVA with multiple comparison test (p -value < 0.05).

Results

Agar disk-diffusion and broth dilution assays

The antibacterial activity of the nine plant compounds on the 13 bacterial strains under study using agar-disk diffusion and broth dilution assays are shown in Table 3. The agar disk-diffusion assay shows that for two plant compounds, eucalyptol and cranberry extract, the antibacterial activity varied from no bacterial growth inhibition to medium growth of the target bacteria. For both compounds, the broth dilution assay MIDs ranged from 1/10 to 1/1000. For the other seven plant compounds, six EOs, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, menthol, peppermint and white camphor oil, and one PE, garlic extract, the antibacterial activity varied with the target bacteria and ranged from very low to very high, and from 1/100 to 1/10000 as determined by agar-disk diffusion and broth dilution assays, respectively.

Six of the seven more active compounds, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, garlic extract, peppermint and white camphor oil were retained for further assays. The other more active compound, menthol was not included because its chemical structure is close to those found in peppermint, with the latter containing a mixture of menthol and menthone.

Broth dilution assay containing pig feces and reporter bacteria

First, the pig feces were determined to be *L. monocytogenes*- and *Salmonella*-free. Next, the MIDs of the six more active compounds identified above were measured in a broth dilution assay containing *L. monocytogenes*- and *Salmonella*-free pig feces. Either of two reporter bacterial pathogens, the Gram-positive *L. monocytogenes* and the Gram-negative *S. Enteritidis* Rif^R were added. Comparisons of MIDs obtained here with those obtained in the broth dilution assay presented above in absence of feces and reporter bacteria are presented in Fig. 1. The MIDs of garlic extract and white camphor oil were lowered 100-fold in presence of pig feces and *L. monocytogenes*. The MID of peppermint was lowered 10-fold. Interestingly, the presence of pig feces and *L. monocytogenes* did not change the MIDs of carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol. Likewise, the MIDs of garlic extract and peppermint were lowered 100- and 10-fold in presence of pig feces and *S. Enteritidis* Rif^R, respectively. Carvacrol, cinnamaldehyde, white

camphor oil, and to a lesser extent, eugenol, showed similar MIDs in absence of feces or in presence of feces and *S. Enteritidis* Rif^R. Four of these six compounds, all EOs, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil were retained to further study their effects on the evolution of the pig feces bacterial microbiota.

Evolution of the pig feces bacterial microbiota

Pig feces bacterial microbiota diversity analyses were done to better describe the effects of different concentrations of four EOs, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil, in presence of two reporter *Salmonella* serovars, *S. Enteritidis* Rif^R and *S. Typhimurium*. A total of 23,479,878 sequences were obtained covering 126,997 unique sequences grouped into 8,639 OTUs. All samples showed a good level of coverage (fraction of the bacterial microbiota sampled by DNA sequencing; data not shown; it is just # of seq) except one with a low number of sequences (9,279). It was discarded. After cleaning and removal of the suspicious and control sequences, the total number was reduced to 14,597,886 with an average of 81,552 sequences per sample. The lowest and highest numbers of sequences found in a sample were 56,125 and 128,915, respectively. The ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard gave 66,802 and 73,592 sequences.

Comparisons of alpha-diversity indices of the pig feces bacterial microbiota treated with four EOs, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil, or colistin are shown in Table 4. All EO concentrations were grouped into Low [C], MID and High [C] as described in Material and Methods. In Low [C], the indices, OTUs, Inverse Simpson, Shannon and Shannon's evenness are significantly different than those in MID and High [C] and the control, pig feces supplemented with colistin. Increased EO concentrations led to an increase in bacterial richness and evenness.

Beta-diversity of pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota from different groups, Low [C], MID and High [C], and two EO-free controls, pig feces and pig feces supplemented with colistin, using the Jaccard and Yue & Clayton indices, are shown in Table 5. All values < 0.001 indicate the compared groups are significantly different. Noteworthy,

comparison of beta-diversities between Low [C] and pig feces indicates their beta-diversities were not significantly different.

Distance matrices were determined for each sample and plotted on NMDS graphs (Fig. 2). Samples of the bacterial microbiota from a same group cluster together. Interestingly, samples from High [C] and pig feces with colistin are grouped within the same cloud. Significant differences in bacterial composition at the OTU level are found between the other groups. Clearly, High [C] samples, and pig feces with colistin samples, on one hand, and pig feces without colicin samples on the other hand, are distributed in two significantly distinct clouds. The same is true when High [C] samples, and pig feces with colistin samples, are compared with Low [C] or MID samples. Often, Low [C] samples appear indistinguishable from pig feces in absence of colistin samples. Low [C] had no effect on pig feces bacterial beta-diversity. The AMOVA analysis shows that both indices are in agreement (Table 5). The NMDS graph with the Yue & Clayton index reveals more clearly the distances amongst groups (Fig. 2).

The Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was performed to identify and compare OTU relative abundances associated to two different groups, the pig feces treated with EOs at Low [C] and High [C]. One Phylum of Archaea, Euryarchaeota and eight Phyla of Bacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Elusimicrobia, Lentisphaerae, Spirochaetes and Verrucomicrobia, and several Bacteria unclassified, were first revealed. Together, they encompass 19 Classes, 19 Orders, 28 families, 46 genera and 337 OTUs. Whereas Low [C] was associated with a greater number of the *Lactobacillaceae* and *Enterobacteriaceae*, High [C] was associated with a greater number of anaerobic bacteria, notably *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae*. The LEfSe analysis was done with the RDP database between the groups of pig feces treated with Low and High [C] of EOs.

Comparison of alpha-diversity indices of pig feces bacterial microbiota treated with High [C] of each of the four EOs, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil are shown in Table 6. Several differences are revealed. Noteworthy, the samples treated with carvacrol and eugenol showed higher richness and evenness than samples treated with cinnamaldehyde or white camphor oil.

Beta-diversity of pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota treated with high [C] of either of the four EOs, using the Jaccard and Yue & Clayton indices, are shown in Table 7. The AMOVA *p*-values are all <0.001 indicative that all pair-wise comparisons of microbiota were different. Here also, distance matrices were determined for each index and plotted on NMDS graphs (Fig. 3). Interestingly, all samples from each of the four EOs are not mixed together but rather separated into four clouds, one for each EO; this is more evident with the Jaccard index, indicative that different bacterial microbiota are present. Clearly, each EO had specific effects on the bacterial microbiota.

The LEfSe was performed to identify and compare OTU relative abundances associated to each of the four EOs at High [C]. A first total of 444 OTUs; bacterial phylum, classes, orders, families, genera, species and unclassified, were revealed. These encompassed 60 phylum, classes, orders, families and genera. Interestingly, each EO led to different bacterial families and genera complements.

qPCR was used to quantify three specific bacterial microbiota indicators, *E. coli*, Lactobacilli and *Lachnospiraceae* (Fig. 4). For each EO, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol or white camphor oil, the log number of copies of *E. coli* were significantly different between Low [C] and High [C]. An increase in EO concentrations from [C]-2 to [C]+3 led to a marked decrease in log number of copies of *E. coli*, with an average from 4.20 to 1.60, respectively. The EO-free pig feces control had 4.51 log of copies of *E. coli*, a number similar to the one in EOs at [C]-2.

For *Lactobacilli*, the variations in the log number of copies between all EO concentrations, [C]-2 to [C]+3, were much lower. The EO-free pig feces control had 5.189 log of copies, a number within 0.5 log of copies from those seen in EOs at [C]-2 but also, interestingly, at [C]+3.

For the *Lachnospiraceae* family, the log number of copies increased along with an increase in concentrations of each of the four EOs, with an average of 3.759 log of copies at [C]-2 and 4.737 log of copies at [C]+3. The EO-free pig feces control had 3.595 log of copies, a number similar to the one in EOs at [C]-2.

The quantification of total bacterial 16S rRNA copy number was also done as a control and no significant difference was found between the various conditions, four essential oils at different concentrations, from [C]-2 to [C]+3. The samples contained an average of $9.0 \times 10^5 \pm 0.15$ number of copies of 16 rRNA.

The two *Salmonella* serovars, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, showed no significant difference on the variation of the pig feces bacterial microbiota (Fig. 5) with a *p*-value of 0.131 and 0.255 for the Yue & Clayton and Jaccard indices, respectively. The presence of both *Salmonella* serovars had no influence on the evolution of the incubated *in vitro* complex microbiota.

Discussion

The aim of our study was four-fold; 1- to determine the *in vitro* antibacterial activity of selected plant compounds on selected bacterial species and strains using classical methods, agar disk-diffusion and broth dilution assays; 2- to develop a pig feces-containing *in vitro* model for the determination of bactericidal activity of selected plant compounds on the feces bacterial microbiota; 3- to determine the effects of selected plant compounds on the pig feces bacterial microbiota diversity using high throughput sequencing; and 4- to determine the effects of selected plant compounds on the dynamics of specific bacterial indicators using quantitative PCR. The plant compounds bactericidal activities measured using the agar disk-diffusion or the broth dilution assays did not always correlate (205). Some plant compounds are oils, hydrophobic, highly viscous or volatile and may not have diffused well in agar or dispersed well in broth (76) possibly leading to an underestimation of their true bactericidal activities.

For the tube dilution assay, up to 100-fold differences in minimum inhibitory dilutions of some plant compounds for some bacteria could be measured. The bacterial mechanisms of defense are not perfectly deciphered, they can vary from one species or strain to another and they certainly vary from Gram-positive to Gram-negative bacteria (67). EOs are more effective against Gram-positive bacteria owing to the interaction of hydrophobic components with the cell membrane. Conversely, the hydrophilic layer of Gram-negative bacteria could presumably increase their resistance to EOs (206) although some studies have shown Gram-negative bacteria to be very sensitive to EOs (39, 60, 207, 208). In the present study, we found no real difference in resistance between Gram-positive or Gram-negative bacteria. At times, no bactericidal activities were detected using the agar-disk diffusion assay. Sometimes, the tube dilution assay revealed bactericidal activities that were overlooked in the first method. Based on our results, we can assume that the broth dilution assay was the most suitable method for measuring the bactericidal activities of plant compounds.

Our assay in which pig feces were added in the assay sometimes modified the bactericidal activities of different plant compounds. Interestingly, the dose-response effect is not necessarily

diluted for all compounds; some have the same effectiveness against a targeted microorganism which is counter intuitive.

The loss of activities for some compounds when feces were added to the classical broth dilution assay can be explained in different ways. Their antimicrobial nature can be more specific to other bacteria present than the one screened (67), therefore driving all the available compound to a different target. Also, the bacterial competition can reduce the antimicrobial character of a compound against a specific pathogen. Thus, all the bacteria in contact with the compound will "consume" the EO, potentially leading to a different response context in which an oil acts against a specific concentration of a pathogen (119-121).

Thus, our assay is a step towards the search of effective compounds for the modulation of the gut bacterial microbiota. Our assay has shown that garlic extract and peppermint, although proven effective in classical agar-disk diffusion and broth dilution assays have lost some of their bactericidal activity in presence of pig feces. Our *in vitro* model, a broth dilution assay in presence of pig feces and reporter bacteria, could be used as a first assay of various feed additives, and as a substitute to the use of animals in *in vivo* assays (209).

The sequencing results revealed the effects of the studied EOs on the evolution of a complex microbiota. Alpha-diversity indices showed an increase of richness for the group treated with high [C] of EOs compared to low [C]. An increase in evenness is indicative of a decrease in dominant populations and a more even distribution of species. This is confirmed by qPCR quantification of *E. coli*, a dominant species, when a decrease is revealed along with EO concentrations above MID. This is also confirmed by a significant increase of a lesser dominant family, *Lachnospiraceae*, with EO concentrations above MID. Better gut bacterial diversity promotes health. For the development of feed additives, it would be interesting to compare low and high doses of a given feed additive to determine whether higher richness seen in *in vitro* assays can still be observed in an animal model (91, 135, 210). Beta-diversity was significantly different for the three main groups, (Low [C], DMI and High [C]), with the two indices revealing the impact on the bacterial microbiota of EOs at different concentrations. The LEfSe analysis is an indicator of the evolution of bacterial microbiota in our *in vitro* model. Interestingly, more

bacterial species were associated with EO high [C] confirming the increase of diversity revealed by alpha-diversity analysis.

Our work made it possible to select the four most efficient plant compounds, all essential oils, carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and white camphor oil, for their possible use as feed additives.

Synergistic effects of some plant compounds and EOs have been shown (65). Combinations of carvacrol-thymol can improve the efficacy of EOs against pathogenic micro-organisms (74). It would be interesting to combine some EOs and other plant compounds and measure their effects on the gut bacterial microbiota. We showed here that each EO had a significantly different effect on the bacterial microbiota (Fig. 3, Tables 6, 7). The LEfSe analysis, in which the effects of the four EOs at High [C] were compared showed that specific bacteria were associated with specific EO. In the development of feed additives, it would be interesting to select a combination of compounds according to the desired effects or the tailored modulation of the bacterial microbiota.

The main weakness in *in vitro* assays rests on how their results can transpose *in vivo*. Here, pig feces and EOs were incubated under aerobic conditions, a condition that has a significant impact on bacterial microbiota which are predominantly anaerobic. Improvements on our *in vitro* model developed here should include environmental conditions, temperature, pH and oxygen concentration similar to those found in pig gut. In addition, since feed additives are often administered to younger animals to induce a greater variation in the gut microbiota (93, 95), the substitution of pig feces by piglet ileal flora would be an interesting alternative (196). Our study presented here has to be regarded as a first model and one of its primary objectives was to determine how it could compare to currently used agar-disk diffusion and broth dilution assays. Clearly, several parameters were retained for ease of comparisons. However, it is now possible to build on our model and modify it to further close the gap towards a true *in vivo* assay. The use of fermenters would permit to control many factors, biological, chemical, physical (211). Their use would further close the gap between *in vitro* and *in vivo* assays. The relevance of the results presented has made it possible to select the best additives that will be tested in a fermenter

under more controlled conditions. This will deepen our knowledge of these compounds and their influence on the microbial communities of the intestinal microbiota.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, No: 412247-2010), the financial partner in the Industrial Research Chair in Meat Safety.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

Tables

Table 1. Bacterial species and strains, source and culture conditions.

Bacterial species and strains	Source¹	Culture conditions
<i>Campylobacter coli</i>	CRSV 3655	microaerobic (24h at 42°C)
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 700819	microaerobic (24h at 42°C)
<i>Clostridium perfringens</i>	CRSV 13124	anaerobic (24h at 42°C)
<i>Enterococcus faecalis</i>	CRSV-M	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	CRSV TV20156	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CRSV 314	anaerobic (24h at 37°C)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 43256	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Salmonella</i> Dublin	SHY-15-764	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Salmonella</i> Enteritidis Rif ^R	SHY 1540-M	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Salmonella</i> Heidelberg	CRSV-M	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	aerobic (24 h at 37°C)
<i>Yersina enterocolitica</i> O:3	CRSV-M	aerobic (24 h at 37°C)

¹ ATCC: American Type Culture Collection; CRSV: Chaire de recherche en salubrité des viandes; SHY: City of Saint-Hyacinthe, QC.

Table 2. Plant compounds used in the present study

Plant compounds	Solvent	Origin
Essential oils (EOs)		
Carvacrol	Alcohol 70 %	Jefo Nutrition Inc., Saint-Hyacinthe, QC, Canada
Cinnamaldehyde	Alcohol 70 %	Jefo Nutrition Inc.
Eucalyptol	Alcohol 70 %	Jefo Nutrition Inc.
Eugenol	Alcohol 70 %	Jefo Nutrition Inc.
Menthol	Alcohol 70 %	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada
Peppermint	Alcohol 70 %	Lotus Aroma, Sainte-Julie, QC, Canada
White camphor oil	Alcohol 70 %	Jefo Nutrition Inc.
Plant extracts (PEs)		
Cranberry extract	Sterile water	Canneberges Atoka Inc., Manseau, QC, Canada
Garlic extract	Sterile water	Divine Essence, Montreal, QC, Canada

Table 3. Bactericidal activities of plant compounds on bacterial species and strains determined by agar disk-diffusion assay inhibition zone and minimum inhibitory dilution

Plant compounds Bacterial species and strains	Essential oils (EOs)							Plant extracts (PEs)	
	Carvacrol	Cinnamaldehyde	Eucalyptol	Eugenol	Menthol	Peppermint	White camphor oil	Cranberry extract	Garlic extract
<i>Campylobacter coli</i>	High 1/1000	High 1/1000	Very low 1/100	Low 1/1000	Very low 1/1000	Low 1/1000	High 1/10000	Low -	High 1/10000
<i>Campylobacter jejuni</i>	High 1/10000	High 1/10000	Medium 1/100	High 1/10000	High 1/1000	High 1/10000	High 1/10000	Low -	High 1/10000
<i>Clostridium perfringens</i>	High 1/1000	High 1/10000	Low 1/1000	Low 1/1000	- 1/1000	Medium 1/1000	Medium 1/1000	Low -	Low 1/10000
<i>Enterococcus faecalis</i>	High 1/1000	Medium 1/100	Very low 1/100	Low 1/1000	Very low 1/1000	Very low 1/1000	Low 1/100	Medium 1/10	Medium 1/1000
<i>Escherichia coli</i>	High 1/1000	Medium 1/1000	Low 1/100	Low 1/1000	Low 1/1000	Low 1/1000	High 1/100	Low 1/10	Very low 1/1000
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	High 1/1000	Medium 1/1000	- 1/100	Medium 1/1000	Very low 1/1000	Low 1/1000	Low 1/100	Low 1/10	- 1/100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	High 1/100	High 1/100	Low 1/100	Medium 1/1000	- 1/1000	Very low 1/1000	High 1/1000	Low 1/100	Very low 1/1000
<i>Listeria monocytogenes</i>	High 1/1000	High 1/1000	Very low 1/100	Medium 1/1000	Very low 1/1000	Low 1/1000	Medium 1/1000	Medium 1/100	Medium 1/10000
<i>Salmonella</i> Dublin	High 1/1000	High 1/1000	Very low 1/100	Low 1/1000	- 1/1000	- 1/1000	Medium 1/100	Low 1/10	Very low 1/100
<i>Salmonella</i> Enteritidis Rif ^R	High 1/1000	Medium 1/1000	Very low 1/1000	Low 1/1000	- 1/1000	Very low 1/1000	Medium 1/100	Low --	Very low 1/100
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Medium 1/1000	Medium 1/1000	- 1/100	Low 1/1000	Very low 1/1000	Very low 1/1000	High 1/100	Low -	- 1/1000
<i>Salmonella</i> Typhimurium	High 1/1000	High 1/1000	- 1/100	Medium 1/1000	- 1/1000	Very low 1/1000	Medium 1/100	Low 1/10	Very low 1/100
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	High 1/10000	High 1/1000	Low 1/100	Medium 1/1000	Very low 1/1000	Low 1/1000	Low 1/100	Medium 1/100	Very low 1/1000

Bactericidal activities were determined by the agar disk-diffusion assay based on the diameter in cm of the inhibition zone around the filter paper disk (no bacterial growth inhibition = -, Very low = 0.1-0.2 cm, Low = 0.3-0.7 cm, Medium = 0.8-1.2 cm and High = 1.3-2 cm inhibition) and by the minimum inhibitory dilution (MID) of the broth dilution assay in $\mu\text{L}/\text{mL}$ at which no bacterial growth was observed.

Table 4. Comparison of alpha-diversity indices of the pig feces bacterial microbiota in presence of different concentrations of four essential oils or colistin.

	Low [C]	MID	High [C]	colistin
OTUs	745 <i>*a</i>	919 <i>*b c</i>	1035 <i>*b d</i>	941 <i>*b</i>
Inverse Simpson	6,4 <i>*a</i>	14,6 <i>*b c</i>	32,9 <i>*b d</i>	6,8 <i>*c</i>
Shannon	2,61 <i>*a</i>	3,64 <i>*b c</i>	4,68 <i>*b d</i>	3,34 <i>*b c</i>
Shannon's evenness	0,39 <i>*a</i>	0,53 <i>*b c</i>	0,67 <i>*b d</i>	0,49 <i>*b c</i>

Low [C], MID and High [C] refer to specific concentrations of a combination of four essential oils as described in Material and Methods. Colistin refers to the control containing the antibiotic but no essential oil. The values were based on 1000 subsampling of 56,125 sequences. On the same row **a* is significantly different from **b* and **c* from *d**, with significant p-values < 0.05.

Table 5. Beta-diversity of pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota from different groups

Compared groups		AMOVA (<i>p</i> -value)	
		Jaccard	Yue & Clayton
Low [C]	High [C]	< 0.001*	< 0.001*
	MID	< 0.001*	< 0.001*
	Pig feces	0.068	0.028
	Colistin	<0.001*	< 0.001*
High [C]	MID	<0.001*	< 0.001*
	Pig feces	<0.001*	< 0.001*
	Colistin	< 0.001*	< 0.001*
MID	Pig feces	< 0.001*	< 0.001*
	Colistin	0.022	< 0.001*
Pig feces	Colistin	0.002*	0.004

Table 6. Alpha-diversity indices of pig feces bacterial microbiota in presence of the high concentrations (High [C]) of each of four essential oils

	Carvacrol	Cinnamaldehyde	Eugenol	White camphor oil
OTUs	1105 <i>*a</i>	941 <i>*b</i>	1090 <i>*b</i>	964 <i>*a</i>
Inverse Simpson	43.0 <i>*a</i>	22.2 <i>*b c</i>	38.7 <i>*b d</i>	22.5 <i>*a</i>
Shannon	4.96 <i>*a</i>	4.37 <i>*b c</i>	4.87 <i>*b d</i>	4.37 <i>*a</i>
Shannon even	0.71 <i>*a</i>	0.64 <i>*b c</i>	0.70 <i>*b d</i>	0.64 <i>*a</i>

The values were based on 1000 subsampling of 56,125 sequences. On the same row **a* is significantly different from **b* and **c* from **d*, with significant p-values of 0.05.

Table 7. Beta-diversity of pair-wise comparisons of the pig feces bacterial microbiota in presence of the high concentration (High [C]) of essential oils

Essential oils		AMOVA (<i>p</i> -value)	
		Jaccard	Yue & Clayton
White camphor oil	Carvacrol	< 0.001*	< 0.001*
	Cinnamaldehyde	< 0.001*	< 0.001*
	Eugenol	< 0.001*	< 0.001*
Carvacrol	Cinnamaldehyde	< 0.001*	< 0.001*
	Eugenol	< 0.001*	< 0.001*
Cinnamaldehyde	Eugenol	< 0.001*	< 0.001*

Figures

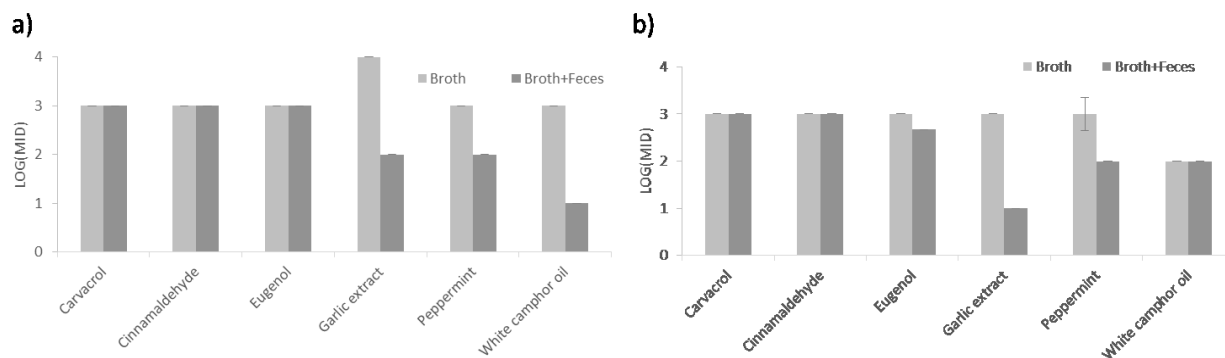


Figure 1. Broth dilution assay of six plant extracts in absence or presence of pig feces, with the addition of a) *L. monocytogenes*, or b) *S. Enteritidis*.

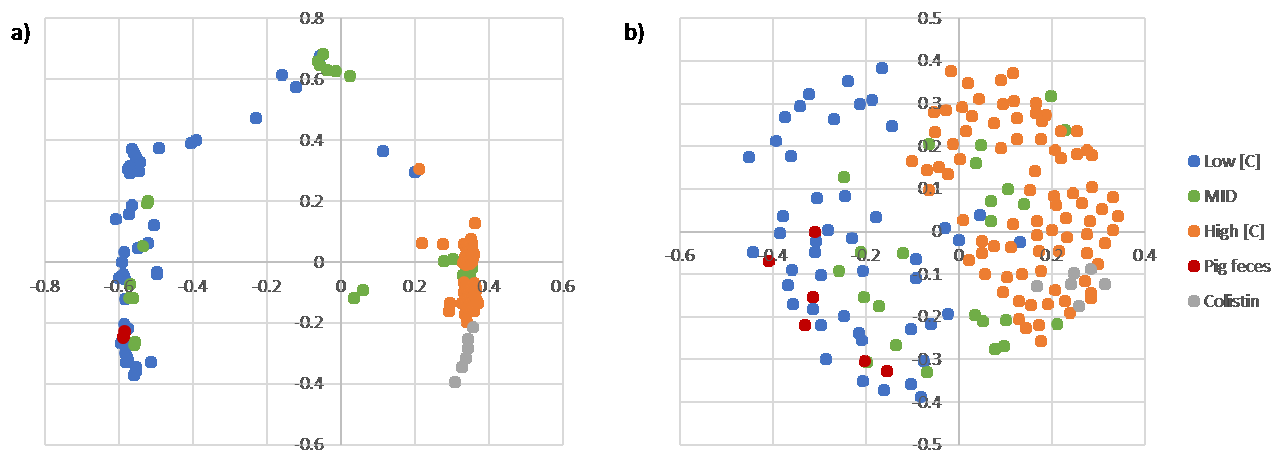


Figure 2. NMDS plot illustrating beta-diversity of incubated pig feces with different concentration of EOs. In a) the distance matrix was determined with the Yue & Clayton indice (stress = 0.085) and in b) with the Jaccard indice (stress = 0.363).

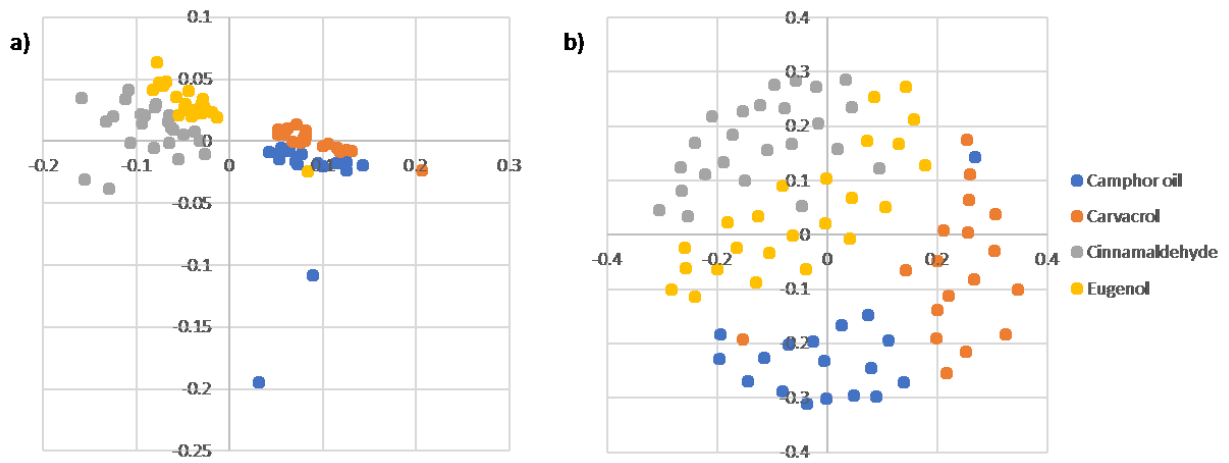


Figure 3. NMDS plot illustrating beta-diversity of pig feces treated with high concentration of different EOs. In a) the distance matrix was determined with the Yue & Clayton indice (stress = 0.117) and the Jaccard indice (stress = 0.391).

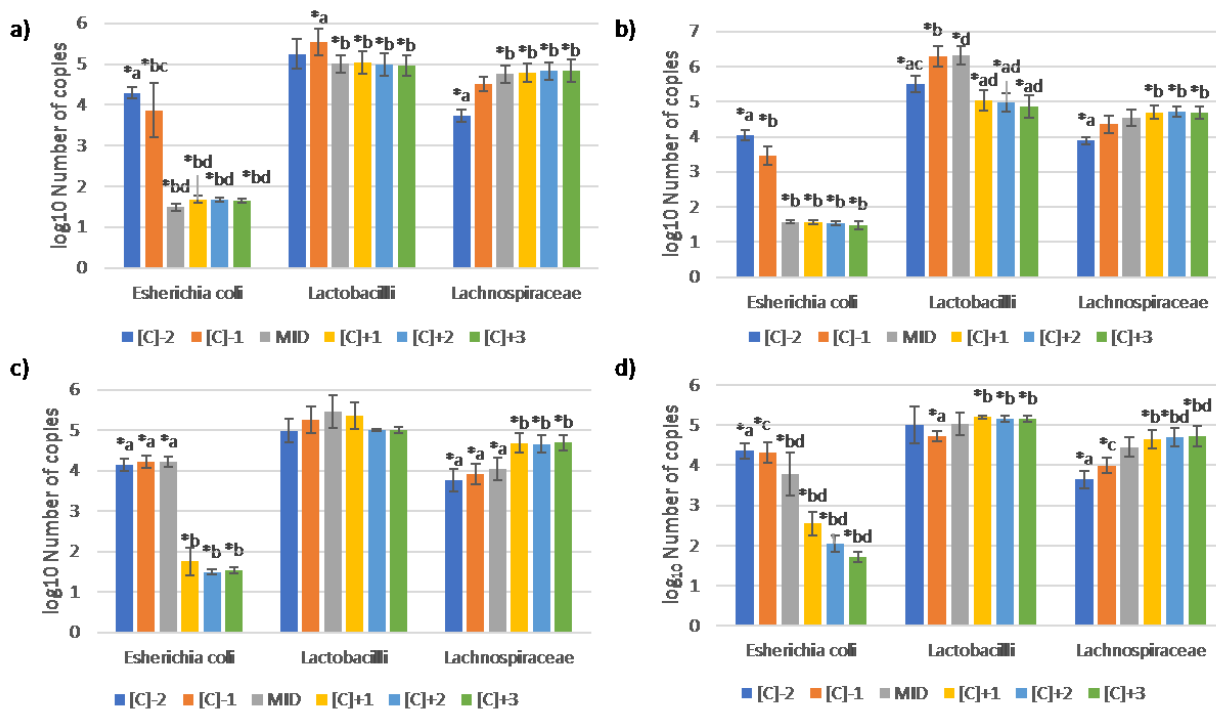


Figure 4. Bacterial population quantification of the samples treated with different concentrations ([C]2-, [C]-, MID, [C]+, [C] 2+ and [C] 3+) of 4 EOs; a) Carvacrol, b) cinnamaldehyde, c) eugenol and d) white camphor oil. *Escherichia coli*, *Lactobacilli* and *Lachnospiraceae* population were measured by qPCR (log₁₀ number of copies). Each vertical bar represents the mean and its standard error. Different *a, b, c or d letters indicate the compared values are significantly different (p-values of 0.05).

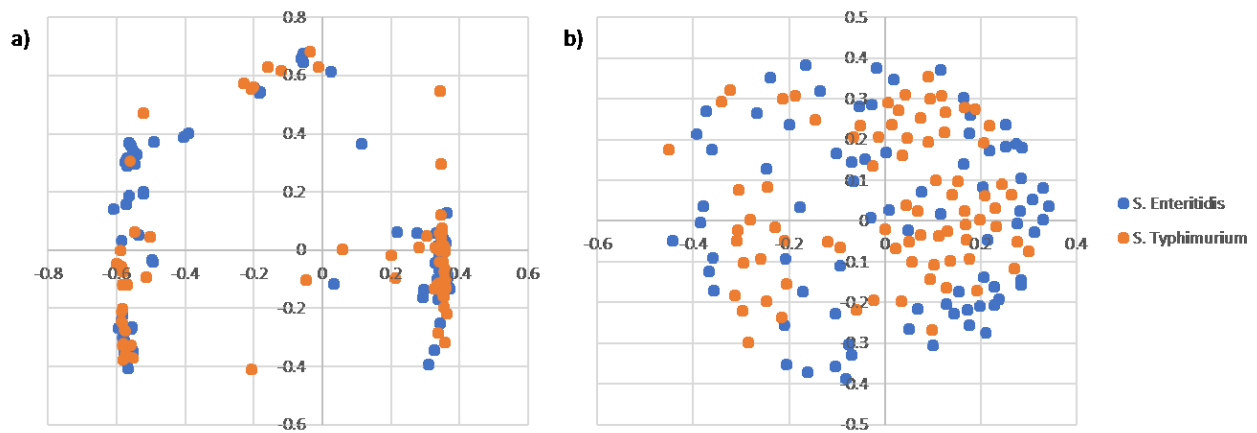


Figure 5. NMDS plot illustrating beta-diversity of samples inoculated with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *In a) the distance matrix was determined with the Yue & Clayton index (stress = 0.085) and in b) with the Jaccard index (stress = 0.363).*

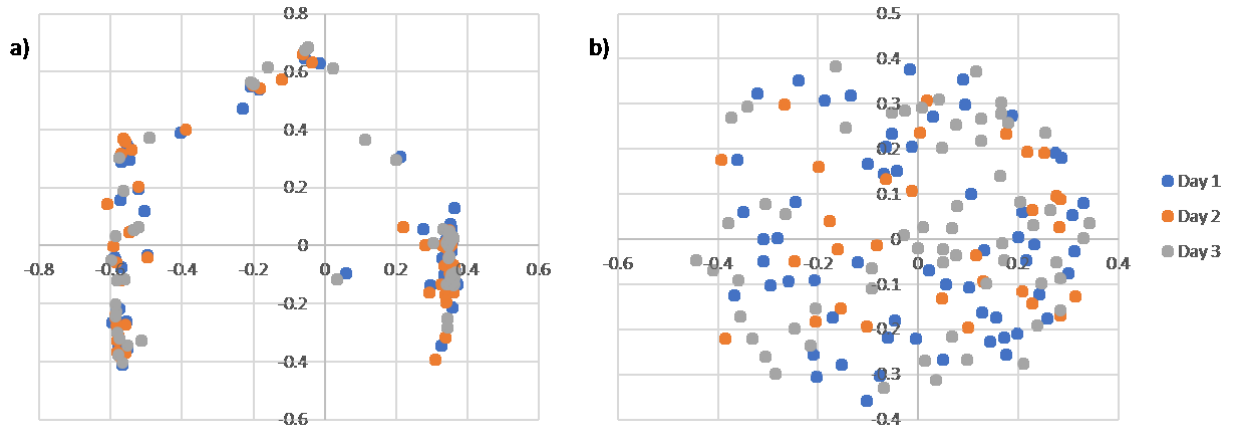


Figure 6. NMDS plot illustrating beta-diversity of the samples in triplicate (Day 1, 2 and 3). In a) the distance matrix was determined with the Yue & Clayton index (stress = 0.085) and in b) with the Jaccard index (stress = 0.363).

Supplementary materials

Table S1. Lefse analysis of pig feces treated with a) low and b) high [C] of EOs

a) Low [C]	LDA	p-value
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales	5.003	3.12E-12
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Lactobacillaceae	4.722	3.82E-12
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Lactobacillaceae.Lactobacillus	4.722	3.95E-12
Bacteria.Proteobacteria	5.327	9.25E-19
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria	5.332	6.84E-19
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Enterobacteriales.Enterobacteriaceae	5.332	5.28E-19
b) High [C]	LDA	p-value
Archaea.Euryarchaeota	3.930	1.12E-17
Archaea.Euryarchaeota.Methanobacteria.Methanobacteriales.Methanobacteriaceae	3.915	9.90E-18
Archaea.Euryarchaeota.Methanobacteria.Methanobacteriales.Methanobacteriaceae.Methanobrevibacter	3.875	1.85E-17
Archaea.Euryarchaeota.Thermoplasmata.Methanomassiliicoccales.Methanomassiliicoccaceae.Methanomassiliicoccus	2.481	7.31E-3
Bacteria.Actinobacteria	3.482	1.43E-19
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria	3.470	1.94E-19
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales	2.017	4.63E-18
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Nocardiopsaceae.Nocardiopsis	2.196	0.003912
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae	3.295	1.05E-19
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae.Collinsella	2.250	1.92E-17
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae.Slackia	2.006	1.05E-18
Bacteria.Bacteroidetes	4.584	1.88E-14
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales	4.380	5.50E-14
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Bacteroidaceae.Bacteroides	2.694	5.64E-20
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphryomonadaceae	3.592	1.81E-14
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae	4.114	2.46E-10
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Alloprevotella	2.697	1.62E-09
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Paraprevotella	2.067	8.77E-07
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella	4.091	2.31E-10
Bacteria.Elusimicrobia.Elusimicrobia.Elusimicrobiales.Elusimicrobiaceae.Elusimicrobium	2.036	2.06E-17
Bacteria.Firmicutes	5.113	4.30E-13
Bacteria.Firmicutes.Clostridia	5.280	2.41E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales	5.278	2.41E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiaceae_1.Clostridium_sensu_stricto	4.729	1.31E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII	3.130	3.14E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII.Mogibacterium	2.533	7.36E-20
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae	4.528	2.08E-18

Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Blautia	3.374	1.31E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Clostridium_XIVa	3.306	1.30E-18
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Coprococcus	3.192	1.49E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Dorea	2.513	3.73E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Roseburia	2.866	2.57E-17
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Peptostreptococcaceae	4.558	2.41E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae	4.677	4.84E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Butyricoccus	2.721	2.57E-17
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Clostridium_IV	2.938	9.66E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Faecalibacterium	3.265	1.10E-19
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Oscillibacter	3.052	8.03E-18
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Ruminococcus	3.197	6.84E-19
Bacteria.Firmicutes.Erysipelotrichia.Erysipelotrichales.Erysipelotrichaceae	4.301	8.41E-20
Bacteria.Firmicutes.Negativicutes.Selenomonadales	3.939	7.14E-19
Bacteria.Firmicutes.Negativicutes.Selenomonadales.Veillonellaceae	2.995	5.51E-19
Bacteria.Lentisphaerae	2.821	3.00E-21
Bacteria.Lentisphaerae.Oligosphaeria.Oligosphaerales.Oligosphaeraceae.Oligosphaera	2.810	3.14E-21
Bacteria.Proteobacteria.Alphaproteobacteria	2.289	1.45E-14
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria	2.467	7.70E-20
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales	2.401	2.75E-19
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria	2.955	3.95E-20
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales	2.955	3.78E-20
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae	2.951	3.95E-20
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae.Desulfovibrio	2.947	4.13E-20
Bacteria.Proteobacteria.Epsilonproteobacteria.Campylobacterales	2.952	1.17E-17
Bacteria.Proteobacteria.Epsilonproteobacteria.Campylobacterales.Campylobacteraceae.Campylobacter	2.945	1.08E-17
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae	2.289	1.14E-19
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae.Succinivibrio	2.288	8.78E-20
Bacteria.Spirochaetes.Spirochaetia.Spirochaetales.Spirochaetaceae	3.812	2.20E-16
Bacteria.Spirochaetes.Spirochaetia.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Treponema	3.808	1.88E-16
Bacteria.Verrucomicrobia	2.906	8.05E-20
Bacteria.Verrucomicrobia.Opitutae	2.052	8.02E-18
Bacteria.Verrucomicrobia.Subdivision5	2.797	8.05E-20

Table S2. Lefse analysis of pig feces treated with a) low and b) high [C] of EOs

a) Camphor	LDA	p-value
Archaea.Euryarchaeota	3.980	6.57E-12
Archaea.Euryarchaeota.Methanobacteria.Methanobacteriales.Methanobacteriaceae	3.927	1.99E-11
Archaea.Euryarchaeota.Methanobacteria.Methanobacteriales.Methanobacteriaceae.Methanobrevibacter	3.898	3.04E-11
Bacteria.Firmicutes.Bacilli	4.155	6.82E-10
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales	4.155	6.66E-10
Bacteria.Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Lactobacillaceae.Lactobacillus	3.870	3.51E-06
Bacteria.Firmicutes.Negativicutes.Selenomonadales.Veillonellaceae	2.828	1.17E-08
Bacteria.Proteobacteria	3.830	1.70E-11
Bacteria.Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales	2.052	4.48E-04
Bacteria.Proteobacteria.Epsilonproteobacteria.Campylobacterales	3.059	1.05E-13
Bacteria.Proteobacteria.Epsilonproteobacteria.Campylobacterales.Campylobacteraceae.Campylobacter	3.054	6.99E-14
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria	3.798	1.14E-11
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Enterobacteriales.Enterobacteriaceae	3.795	1.86E-11
Bacteria.Spirochaetes.Spirochaetia.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Sphaerochaeta	2.169	2.24E-10
b) Carvacrol	LDA	p-value
Archaea.Thaumarchaeota.Nitrososphaerales.Nitrososphaeraceae.Nitrososphaera	2.502	1.02E-02
Bacteria	3.980	6.57E-12
Bacteria.Actinobacteria	3.396	9.87E-13
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae	3.256	7.06E-13
Bacteria.Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacteriaceae.Collinsella	2.296	1.07E-10
Bacteria.Firmicutes	4.960	1.94E-15
Bacteria.Firmicutes.Clostridia	4.721	1.15E-12
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales	4.722	1.06E-12
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII.Mogibacterium	2.345	4.05E-08
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae	3.969	2.39E-07
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Blautia	3.214	1.13E-10
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Coprococcus	3.059	9.68E-11
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Dorea	2.300	7.69E-07
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Faecalibacterium	3.024	2.18E-12
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Oscillibacter	2.722	4.88E-08
Bacteria.Firmicutes.Erysipelotrichia.Erysipelotrichales.Erysipelotrichaceae	4.005	1.31E-14
Bacteria.Firmicutes.Erysipelotrichia.Erysipelotrichales.Erysipelotrichaceae.Bulleidia	2.818	7.65E-09
Bacteria.Firmicutes.Erysipelotrichia.Erysipelotrichales.Erysipelotrichaceae.Faecalicoccus	2.570	3.46E-07
Bacteria.Firmicutes.Negativicutes.Selenomonadales	4.079	3.02E-15

Bacteria.Lentisphaerae	2.538	4.99E-06
Bacteria.Lentisphaerae.Oligosphaeria.Oligosphaerales.Oligosphaeraceae.Oligosphaera	2.588	4.08E-07
Bacteria.Proteobacteria.Alphaproteobacteria.Rhizobiales.Brucellaceae	2.089	1.02E-02
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria	2.790	8.62E-10
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales	2.790	9.13E-10
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae	2.783	1.11E-09
Bacteria.Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae.Desulfovibrio	2.782	5.89E-10
Bacteria.Verrucomicrobia	2.885	1.37E-09
Bacteria.Verrucomicrobia.Subdivision5	2.797	3.88E-09

c) Cinnamaldehyde	LDA	p-value
Bacteria.Bacteroidetes	4.859	1.73E-16
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales	4.672	4.63E-16
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyrimonadaceae	3.851	4.01E-15
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae	4.501	1.44E-16
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Alloprevotella	3.044	1.52E-15
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Paraprevotella	2.578	3.88E-15
Bacteria.Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella	4.478	1.40E-16
Bacteria.Proteobacteria.Alphaproteobacteria	2.420	5.92E-10
Bacteria.Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Enterobacteriales.Enterobacteriaceae.Salmonella	3.756	1.59E-10
Bacteria.Spirochaetes.Spirochaetia.Spirochaetales.Spirochaetaceae	3.943	2.45E-14
Bacteria.Spirochaetes.Spirochaetia.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Treponema	3.936	2.43E-14
Bacteria.Tenericutes.Mollicutes	2.628	1.82E-12
Bacteria.Tenericutes.Mollicutes.Anaeroplasmatales.Anaeroplasmataceae	2.622	2.12E-12
Bacteria.Tenericutes.Mollicutes.Anaeroplasmatales.Anaeroplasmataceae.Anaeroplasma	2.618	2.27E-12

d) Eugenol	LDA	p-value
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Clostridium_XIVa	2.691	5.93E-03
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae	4.237	4.46E-11
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Clostridium_IV	2.737	1.10E-12
Bacteria.Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Ruminococcus	2.919	1.43E-10

Discussion générale

Le développement d'additifs alimentaires à base de composés antimicrobiens dérivés de plantes est un processus long, complexe et coûteux. Les extraits de plantes sont une alternative très intéressante pour favoriser la santé et le bien-être général des animaux d'élevages. Malgré les études de plus en plus nombreuses et l'engouement porté à ces composés, il y a toujours une lacune quant à la compréhension de leur mode d'action et leur impact *in vivo*. Ce projet d'étude a permis de sélectionner les extraits de plantes les plus efficaces en présence ou en absence d'un dérivé de microbiote intestinal porcin. De plus, ce projet a permis d'analyser l'impact de ces composés, à différentes concentrations, sur les communautés microbiennes, et ce, de façon quantitative (qPCR) et qualitative (Miseq).

4.1. Interprétation des résultats

Les propriétés antimicrobiennes des extraits de plantes dépendent de leur type, de leur composition et de la concentration utilisée (212). Dans un contexte d'industrie alimentaire, on cherche à inhiber des pathogènes spécifiques tels que *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. Dans de nombreuses études, on retrouve des informations sur l'efficacité de plusieurs composés différents contre un pathogène précis (11, 14), mais peu s'intéressent à ce qui se passe dans un contexte multi-bactérien, c'est-à-dire en présence d'une multitude d'autres bactéries (pathogènes ou non-pathogènes). Il est pertinent de mettre en lumière cette situation, puisqu'un additif alimentaire doit pouvoir avoir un impact antimicrobien dans le milieu gastro-intestinal, un environnement complexe et composé d'une multitude de bactéries en interaction.

La méthode avec incorporation de matières fécales a permis de déterminer que certains composés perdent en efficacité dans ce contexte multi-bactérien, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres; un résultat très intéressant et contre-intuitif. Ainsi, la présence d'un microbiote complexe ne mène pas systématiquement à une diminution en efficacité équivalente pour tous les composés; certains y résistent. Pour le développement d'additifs alimentaires, il devient très pertinent d'exploiter cette caractéristique présente chez seulement certains composés. Déjà suggéré, ce phénomène pourrait s'expliquer par une spécificité d'action des molécules. Par exemple, l'eugénol a un mode d'action spécifique à l'espèce bactérienne contre laquelle il agit (67), ainsi qu'une CMI qui lui est dépendante. De plus, on retrouve dans la littérature que les HEs ont une action antimicrobienne plus élevée chez les bactéries pathogènes telles que *E. coli*

O157:H7 (59), *Salmonella* Typhimurium (213), *Clostridium perfringens* (14), *Campylobacter jejuni* (214) et *Helicobacter pylori* (215) que sur des bactéries commensales (216). Une étude antérieure ayant analysé 96 HEs et 23 composés dérivés des huiles a obtenu des résultats similaires où le cinnamaldéhyde, le thymol, le carvacrol et l'eugénol étaient les agents les plus actifs contre *E.coli*, *Salmonella enterica* et *L.monocytogenes* (217). Cependant, à notre connaissance, notre approche est originale dans la mesure où elle permet un test d'efficacité en conditions de compétition bactérienne, une avenue jusque-là inexplorée. Celle-ci a permis d'identifier les candidats additifs les plus efficaces (carvacrol, cinnamaldéhyde, eugénol et camphre) pour le développement d'additifs alimentaires. De plus, en comparant chacune des méthodes utilisées pour déterminer le caractère antimicrobien des composés, on se rend vite compte de la variabilité des résultats. En effet, la méthode de diffusion sur gélose comparées à celle de dilution en tubes montre des efficacités antimicrobiennes différentes pour un même composé. Une

Le développement d'additifs alimentaires se fait dans une optique d'élimination des bactéries pathogènes, mais aussi avec pour but d'améliorer la santé intestinale. La structure et la composition du microbiote est modifiée par la présence des HEs à une concentration supérieure à la CMI (contre un microorganisme spécifique). D'abord, on a constaté une augmentation de la diversité alpha qui serait favorisée par la présence des HEs. Ainsi, sachant que la diversité est synonyme de santé intestinale (91, 135), l'incorporation d'HEs à l'alimentation des animaux devient très pertinente. Aussi, les analyses LeFSe confirment une variété d'espèces anaérobiques associées aux matières fécales traitées avec de fortes concentrations en HEs. Par exemple, les *Lachnospiraceae* sont associées à ce groupe; leur surreprésentation (LeFSe), confirmée quantitativement (qPCR), corrèle avec les concentrations plus élevées en HEs. Cette famille est associée au microbiote des mammifères au microbiote sain des mammifères et est capable de produire de l'acide butyrique. Cet AGCC inhibe la croissance de certains microorganismes et fournit une source d'énergie à l'hôte (218). De plus, les résultats de qPCR montrent que les *E. coli* subissent une diminution significative lorsque les HEs sont présentes à une concentration plus élevée que la CMI. Ce même phénomène est observé dans une étude *in vivo* comparant le nombre d'*E. coli* retrouvés chez des porcs ayant un régime à base d'HEs (à base de cinnamaldéhyde) à des porcs contrôles n'en recevant pas (219).

Dans cette même étude, plus de lactobacilles ont été retrouvés au niveau du côlon des porcs ayant un régime riche en HEs. Dans notre projet de recherche, les variations quantitatives de lactobacilles étaient moins systématiques puisque les différences significatives varient d'une huile à une autre. Cependant, ces bactéries sont effectivement retrouvées significativement en plus grand nombre lorsque le cinnamaldéhyde est à la concentration de la CMI. Une autre étude s'intéressant à l'impact des HEs sur un digesta de porc *in vitro* a identifié une diminution des *E. coli* et des bactéries coliformes, mais aucune inhibition significative des lactobacilli et des bactéries anaérobiques (213).

Les résultats de cette étude confirment que les HEs ont un impact significatif sur un microbiote issu d'un prélèvement intestinal et que leur efficacité (pour certaines) reste la même dans ce contexte. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les composés perdent en efficacité du seul fait d'un contact avec le microbiote dans un contexte *in vivo* est infirmée. Alors, comme le développement d'additifs alimentaires se heurte à une difficulté de transposition de résultats qui sont encourageants en conditions *in vitro* vers le modèle animal, des facteurs autres que la simple présence d'une flore complexe de compétition doivent être envisagés. Des études portant sur la prolongation de la conservation de la viande grâce à l'utilisation des huiles essentielles ont constaté que des caractéristiques comme le pH, l'activité de l'eau, la tension en oxygène ou la température ont un impact sur l'efficacité des HEs (212). Une autre étude, en alimentation animale cette fois, a décrit que la teneur en gras et en protéines modulent l'efficacité de ces composés (59, 220), suggérant que la composition de la moulée à laquelle les additifs sont incorporés pourrait elle-même influencer l'efficacité de ceux-ci. Par ailleurs, la physiologie de l'hôte, notamment l'intervention de l'immunité dans le contrôle des pathogènes dans l'intestin des animaux, joue aussi un rôle évident. Ainsi, on peut facilement imaginer la multitude de facteurs à considérer qui justifie *in fine* que le test ultime reste le passage à l'expérimentation animale. La contribution de ce travail permet ainsi de mieux comprendre l'efficacité des HEs, mais apporte une information quantitative essentielle en plus; la quantité d'HE à ajouter à la moulée pour que l'on puisse objectiver une efficacité sur le pathogène et sur un microbiote. La faisabilité devient alors une question d'accessibilité pour les industries (y compris pour des raisons de coûts) et de savoir si à cette dose, l'aliment reste consommable par les animaux (goût). Dans un recensement de la littérature (37), on retrouve généralement des taux d'inclusion

d'additifs qui varient de 100 à 1000 ppm, mais le plus souvent ce sont moins de 400 ppm qui sont ajoutés à l'aliment destiné aux animaux. La DMI du camphre est de 2000 ppm, alors que pour les trois autres composés sélectionnés la DMI est de 300 ppm. Ainsi, la sélection du camphre pour ces essais relève plus d'un intérêt scientifique que d'une perspective commerciale, le taux d'incorporation efficace étant d'emblée trop important dans une perspective de rentabilité économique.

Bien que les additifs alimentaires sont présents dans la nourriture des animaux tout au long du processus de production porcine. L'incidence de ces composés est généralement plus grande lors de la période de sevrage où les porcelets subissent des stress alimentaire, environnemental et social qui concourent à une forte incidence de troubles intestinaux avec diarrhée et d'impact sur les performances de croissance (219, 221). La région intestinale, la plus sensible aux variations et susceptible d'avoir un impact sur la santé intestinale, est l'iléon. Cependant, les HEs sont reconnues pour être absorbées très tôt (moyenne de 2h chez le porcelet) après leur entrée dans le tractus gastro-intestinal suite à une administration orale (197, 222). Ainsi, la livraison de l'additif alimentaire à l'endroit désiré dans l'intestin devient un enjeu pour le développement et l'efficacité de ces composés. L'encapsulation peut être une option très intéressante pour prévenir la libération et l'absorption précoces et ainsi améliorer la disponibilité et l'efficacité des composés actifs (67, 223). Par exemple, la microencapsulation à base d'hydrogel et de Ca-alginate a permis au carvacrol de conserver son activité antimicrobienne élevée contre *E. coli* dans un milieu intestinal simulé *in vitro* (221).

4.2. Aspects innovateurs

Ce projet d'étude a permis d'évaluer l'efficacité de dérivés de plantes en absence et en présence d'une communauté bactérienne complexe dérivée du microbiote intestinal porcine. Très peu d'études se sont attardées à l'efficacité antimicrobienne de ces composés en présence de microorganismes dérivés d'un microbiote intestinal. Même si certaines études soupçonnaient que l'inefficacité de certains composés testés *in vivo* était causée par le microbiote, peu ont réellement étudié la problématique (213, 224).

En plus de connaître les composés susceptibles de fonctionner en présence de plusieurs microorganismes, le modèle mis en place peut permettre l'étude d'une multitude d'autres

molécules. La méthodologie est assez simple à effectuer et peu coûteuse. Cette étape complémentaire aux méthodes traditionnelles peut permettre un tri hâtif de certains composés avant d'en arriver aux tests *in vivo* qui sont plus exigeants et coûteux. La règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement) est un principe bioéthique établi pour respecter le bien-être animal en recherche (209). Chaque planification d'expériences nécessitant des animaux doit être faite en fonction de cette règle pour minimiser leur nombre et leur souffrance. En remplaçant l'utilisation des animaux par des techniques alternatives comme la méthode de dilutions en tubes avec incorporation de matières fécales, on observe une réduction du nombre d'animaux utilisés puisque le nombre de composés à tester devient plus limité.

La méthode mise au point dans le cadre de cette étude permet de sélectionner des composés candidats efficaces en présence ou en absence du microbiote intestinal. De plus, une analyse des résultats plus poussée (qPCR et séquençage) a permis d'enrichir nos connaissances sur l'impact de ces composés sur le microbiote intestinal porcin. Il est essentiel d'identifier les candidats possédant les propriétés antimicrobiennes les plus intéressantes dans le cadre du développement d'additifs alimentaires efficaces, mais leur impact sur les communautés microbiennes du microbiote reste un aspect d'intérêt important considérant le rôle central que ces communautés jouent chez des animaux d'élevage (10, 20). Avec les connaissances actuelles sur le microbiote intestinal et la nécessité d'entretenir une santé intestinale (eg. administration de prébiotiques ou probiotiques) (16, 157), il est important de savoir comment les composés testés affectent celui-ci (85). Les études portant sur le développement d'additifs alimentaires peuvent maintenant choisir certains composés basés sur leur efficacité, mais aussi en s'appuyant sur leur impact sur le microbiote intestinal.

4.3. Limites de l'étude

L'étude est principalement limitée par la nature du modèle *in vitro* mis en place. Comme il a été précédemment mentionné, l'idée était de se rapprocher d'un environnement similaire à celui où le composé testé intervient dans le système digestif. En voulant se rapprocher du système digestif, un milieu très complexe, plusieurs composantes doivent être prises en considération. Ces composantes ne pouvaient pas toutes être intégrées dans le modèle et deviennent, d'une certaine façon, une limite prévisible de ce modèle. D'abord, la localisation

cible privilégiée pour une action contre un processus infectieux intestinal ou à des fins de préventions est l'iléon, une zone possédant des caractéristiques propres. L'objectif du projet était de déterminer l'efficacité et l'impact des candidats additifs en présence d'un milieu intestinal complexe. Le milieu que nous avons retenu était celui le plus accessible, c'est-à-dire des matières fécales de porcs fraîchement récoltées. Cependant, comme présenté dans la revue de la littérature, le microbiote intestinal est un milieu extrêmement variable et cette variabilité est notamment expliquée par sa localisation au sein du tractus digestif (98). En effet, par les changements de pH et de concentration en oxygène rencontrés tout au long du tube digestif, les communautés microbiennes présentes sont très variables. L'iléon, est situé à niveau proximal, faisant en sorte que le milieu est plus acide et oxygéné. Ainsi, le microbiote iléal est très différent de celui excrété par l'animal (97). L'utilisation de matières fécales d'origine iléale pourrait être considérée comme un choix plus judicieux pour se rapprocher d'un modèle réel, mais cela complexifie de beaucoup l'expérience, nécessitant une nécropsie d'animaux. Aussi, comme il a été mentionné, les communautés microbiennes sont sensibles aux facteurs environnementaux. Malgré la remarquable reproductibilité des résultats obtenus, un contrôle plus strict des conditions de concentration en oxygène et de pH auraient été souhaitable. Le tractus gastro-intestinal contient majoritairement des bactéries anaérobiques puisque les concentrations en oxygène y sont presque nulles. Notre modèle ne représente ainsi, que partiellement une situation *in vivo*, puisque l'incubation a été faite en conditions aérobiques sous agitation, favorisant ainsi des bactéries aérobiques ou anaérobiques facultatives. Cependant, l'analyse a montré que les bactéries anaérobies strictes avaient pu, même dans ces conditions, bénéficier d'un certain développement. Ceci confirme le manque de connaissances sur certaines bactéries plus difficilement cultivable, mais pourrait suggérer que ces bactéries sont plutôt anaérobies facultatives. Enfin, lors de l'expérimentation, la température d'incubation n'a pas été ajustée afin d'être représentative de la température interne de l'animal, bien qu'elle en était très près (37°C au lieu de 39°C chez un porc). Ce facteur est facilement contrôlable, et les résultats pourraient être obtenus dans des conditions encore mieux standardisées,

Ainsi, pour des fins pratiques et économiques, un modèle simplifié a été mis en place et a permis de récolter suffisamment d'informations pour justifier la conduite d'études

supplémentaires De cette façon, des améliorations pourront être apportées aux essais subséquents.

4.4. Directions futures

En se basant sur les limites de l'étude, l'expérimentation pourra être optimisée afin se rapprocher des conditions intestinales, en gardant en tête la nécessaire flexibilité opérationnelle du modèle. Une façon facilement réalisable d'améliorer le projet serait d'adapter les conditions d'incubation à un milieu anaérobique. Cette seule condition pourrait apporter des informations sans doute plus pertinentes encore sur les communautés microbiennes du microbiote et leur modulation en présence ou non d'extraits de plantes. De plus, sans savoir si cela aurait un impact significatif, la température pourrait être ajustée selon la température interne de l'animal à l'étude. Finalement, l'utilisation de contenu iléal en remplacement des matières fécales permettrait une meilleure représentation de ce qui se produit *in vivo*, tout en se rapprochant un peu plus d'un modèle réel.

Ultimement, le modèle *in vitro* sera reproduit avec toutes les conditions ci-dessus, et ces dernières contrôlées plus encore, grâce à un fermenteur. Cet appareil complexe permettra de réguler plusieurs composantes afin de se rapprocher davantage d'un système gastro-intestinal (211). Avec ce prototype, la sélection de candidats potentiellement additifs sera raffinée et pourra être envisagée de façon complémentaire au modèle présenté dans cette étude, modèle qui reste beaucoup plus rapide et tout de même efficace.

Finalement, un mélange de composés individuellement identifiés comme actifs est une suite logique à ce travail. La combinaison des effets de différentes substances testées pourrait mener à un effet synergique de ces composés effet qui reste à être évalué (59). Le principe de synergie a déjà été observé dans certaines études portant sur les huiles essentielles. Par exemple, la combinaison du carvacrol et du thymol peut permettre une augmentation de l'efficacité contre un pathogène testé (seul) *in vitro* (65, 74). Il devient donc pertinent de tester certaines combinaisons, soit grâce au modèle *in vitro* précédemment présenté, ou même grâce au fermenteur pour déterminer leur mode d'action sur le microbiote. Comme il a été observé, chaque huile possède un effet significativement différent sur le microbiote, un effet porté par certaines communautés bactériennes. Dans un contexte de développement d'additifs

alimentaires chez le porc, il serait intéressant de cibler deux composés, selon leur impact sur le microbiote et les communautés microbiennes associées, afin de favoriser un environnement intestinal en santé.

Conclusion

Ce projet d'étude a permis d'évaluer le caractère antimicrobien de plusieurs dérivés de plantes contre différentes bactéries grâce à la méthode de diffusion sur géloses et de dilution en tubes. Les résultats obtenus ont permis de conclure que la méthode la plus adaptée pour ce type de composés était celle utilisant les dilutions en tubes. Ensuite, cette dernière a été adaptée pour évaluer l'efficacité antimicrobienne des composés en présence d'un dérivé de microbiote intestinal de porc. Les résultats ont démontré que certains composés perdent en efficacité alors que ce n'est pas le cas pour d'autres. Ainsi, la présence d'un microbiote complexe ne mène pas à une diminution en efficacité équivalente pour tous les composés; certains y résistent mieux. La méthode mise au point a permis de sélectionner, parmi un éventail, les composés antimicrobiens les plus susceptibles de démontrer ce pouvoir antimicrobien dans un milieu intestinal (camphre, carvacrol, cinnamaldéhyde et eugénol) et donc, dans un contexte de développement d'additifs alimentaires.

De plus, une analyse plus poussée de l'impact des HEs sélectionnées sur le microbiote intestinal a été effectuée grâce à la méthode adaptée. En effet, il a été possible de montrer que les HEs utilisées à des concentrations plus élevées que la CMI augmentent la richesse bactérienne tout en modifiant la distribution des OTUs ainsi que la composition du microbiote. L'étude a aussi permis de confirmer que chacune des huiles avait un impact spécifique sur un milieu fécal complexe. Ainsi, dans le cadre du développement d'additifs alimentaires, il serait grandement envisageable d'exploiter ces caractéristiques pour favoriser certaines familles ou genres bactériens dans le but favoriser des microbiotes de porcs ultimement sur mesure. Ces résultats démontrent qu'au-delà de la CMI, dans des conditions de livraison de l'additif à l'endroit souhaité dans le tube digestif, celui-ci devrait avoir un impact réel sur le microbiote *in vivo*.

Grâce à cette étude, il a été possible de développer une méthode nous informant de l'efficacité de différents composés en présence d'un dérivé de microbiote et d'acquérir des connaissances sur l'action des dérivés de plante sur un milieu fécal. Ceci pourra servir de base pour le développement futur de modèles plus complexes où plusieurs facteurs seraient alors considérés dans le but de se rapprocher d'un modèle intestinal réel. Ainsi, avec les connaissances recueillies par cette étude, le développement d'un modèle *in vitro* plus complexe permettant d'exploiter les HEs pour leur effets précis *in vivo* serait possible.

Bibliographie

1. Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, et al. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(3):407-15.
2. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, et al. Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2013;10(7):639-48.
3. Canada Gd. Infographic: Food-related illnesses, hospitalizations and deaths in Canada 2016 [Available from: https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/food-nutrition/infographic-food-related-illnesses-hospitalizations-deaths-in-canada.html?_ga=2.102076993.1516681996.1523024493-1176873514.1516648595].
4. Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS letters*. 2014;588(22):4120-30.
5. Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, Schlundt J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003;35(3):263-7.
6. [BIOHAZ] EPoBH. Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs EFSA J. 2010;8 1547.
7. Canada PHAo. Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System—Report. Ottawa ON: PHAC. 2016.
8. Gouv. C. Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation : un cadre d'action pancanadien. 2017.
9. Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal biotechnology*. 2002;13(1):7-27.
10. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 2006;65(5):725-59.
11. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*. 2017;4(3):58.
12. Mathlouthi N, Bouzaienne T, Oueslati I, Recoquillay F, Hamdi M, Urdaci M, et al. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci*. 2012;90(3):813-23.
13. Thacker PA. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2013;4(1):35.
14. A.C. Ouwehand KT, H. Kettunen, S. Peuranen, H. Schulze, N. Rautonen. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Veterinari Medicina*. 2010;55:7.
15. Moreira MR, Ponce AG, del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology*. 2005;38(5):565-70.
16. Rist VT, Weiss E, Eklund M, Mosenthin R. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. *Animal : an international journal of animal bioscience*. 2013;7(7):1067-78.
17. García S, Labbé RG. Guide to foodborne pathogens. Second editon. ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Inc.; 2013. 1 ressource en ligne. p.
18. Larivière-Gauthier G, Thibodeau A, Letellier A, Yergeau É, Fravallo P. Reduction of *Salmonella* Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2219.

19. Andres VM, Davies RH. Biosecurity measures to control Salmonella and other infectious agents in pig farms: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015;14(4):317-35.
20. Markowiak P, Slizewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog*. 2018;10:21.
21. Alali WQ, Hofacre CL. Preharvest Food Safety in Broiler Chicken Production. *Microbiology spectrum*. 2016;4(4).
22. Pankey G, Sabath L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*. 2004;38(6):864-70.
23. J-P L. Effet des antibioques et mécanismes de résistance 2007 [
24. Orand JP. Antimicrobial resistance and the standards of the World Organisation for Animal Health. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2012;31(1):335-42, 25-34.
25. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. WHO Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals. Geneva: World Health Organization
Copyright (c) World Health Organization 2017.; 2017.
26. Diana A, Manzanilla EG, Calderon Diaz JA, Leonard FC, Boyle LA. Do weaner pigs need in-feed antibiotics to ensure good health and welfare? *PLoS One*. 2017;12(10):e0185622.
27. AVIA. L'usage judicieux des antibiotiques en médecine vétérinaire des grandes populations animales 2014.
28. Agunos A, Leger DF, Carson CA, Gow SP, Bosman A, Irwin RJ, et al. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179384.
29. Christian Klopfenstein CM. Étude sur l'usage actuel des antibiotiques en production porcine au Québec dans le groupe croissance-finitio. 2007.
30. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci*. 2005;84(4):634-43.
31. Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(5):1691-6.
32. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(1):42-51.
33. Sharma VK, Johnson N, Cizmas L, McDonald TJ, Kim H. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*. 2016;150(Supplement C):702-14.
34. Cattoir V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. 2004;52(10):607-16.
35. Price LB, Koch BJ, Hungate BA. Ominous projections for global antibiotic use in food-animal production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(18):5554-5.
36. Canada Gd. Le gouvernement du Canada encourage la recherche sur la réduction de l'utilisation des antibiotiques dans l'industrie avicole 2016 [
37. Zeng Z, Zhang S, Wang H, Piao X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of animal science and biotechnology*. 2015;6(1):1.

38. Cammarota G, Ianiro G, Bibbo S, Gasbarrini A. Gut microbiota modulation: probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? *Internal and emergency medicine*. 2014;9(4):365-73.
39. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*. 2015;54:111-9.
40. WHO. Document CX/NFSDU 02/2. 2002.
41. Naqid IA, Owen JP, Maddison BC, Gardner DS, Foster N, Tchórzewska MA, et al. Prebiotic and probiotic agents enhance antibody-based immune responses to *Salmonella* Typhimurium infection in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2015;201:57-65.
42. Bird AR, Conlon MA, Christophersen CT, Topping DL. Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics. *Beneficial microbes*. 2010;1(4):423-31.
43. Pourabedin M, Guan L, Zhao X. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome*. 2015;3(1):1-12.
44. Pourabedin M, Zhao X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*. 2015;362(15).
45. Ushakova N, Nekrasov R, Pravdin I, Sverchkova N, Kolomiyets E, Pavlov D. Mechanisms of the effects of probiotics on symbiotic digestion. *Biology Bulletin*. 2015;42(5):394-400.
46. Ramakrishna B. FAO/WHO Guidelines to Assess Probiotic Efficacy for Human Consumption–Would They Suffice? *ECAB Health Impact of Probiotics: Vision & Opportunities*. 2014:105.
47. Allen SJ, Wareham K, Wang D, Bradley C, Hutchings H, Harris W, et al. Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*. 382(9900):1249-57.
48. Wang JP, Yoo JS, Lee JH, Zhou TX, Jang HD, Kim HJ, et al. Effects of phenyllactic acid on production performance, egg quality parameters, and blood characteristics in laying hens. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2009;18(2):203-9.
49. Ghazalah A, Atta A, Elkloub K, Moustafa ME, Shata RF. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, nutrients digestibility and health of broiler chicks. *International Journal of Poultry Science*. 2011.
50. Hamed DM, Hassan AMA. Acids supplementation to drinking water and their effects on Japanese quails experimentally challenged with *Salmonella enteritidis*. *Research in Zoology*. 2013;3(1):15-22.
51. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry 1. *Journal of animal science*. 2008;86(14_suppl):E140-E8.
52. Bernhoft A. A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals*. 2010;50:11-7.
53. Shitan N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2016;80(7):1283-93.
54. Gurevitch J, Scheiner SM, Fox GA. *The ecology of plants*: Sinauer Associates Sunderland, MA; 2002.
55. Pichersky E, Gang DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*. 2000;5(10):439-45.
56. Ramawat KG. *Biotechnology: secondary metabolites*: CRC Press; 2007.

57. Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Yu Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *The Science of the total environment*. 2016;545-546:556-68.
58. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 2008;46(2):446-75.
59. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004;94(3):223-53.
60. Deans SG, Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 1987;5(2):165-80.
61. ERDOGAN C, C. FDY. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SPICES 1. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. 2004;12(1):1-55.
62. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010;21(9):1199-218.
63. R.J.W. L, P.N. S, P.J. C, G.-J.E. N. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(3):453-62.
64. Cox S, Gustafson J, Mann C, Markham J, Liew YC, Hartland R, et al. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 1998;26(5):355-8.
65. Santiesteban-López A, Palou E, López-Malo A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;102(2):486-97.
66. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;2016:21.
67. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*. 2017;43(6):668-89.
68. Filgueiras CT, Vanetti MCD. Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian archives of biology and technology*. 2006;49(3):405-9.
69. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;130(1):107-15.
70. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(12):4863-70.
71. Rameshkumar KB, George V, Shiburaj S. Chemical Constituents and Antibacterial Activity of the Leaf Oil of *Cinnamomum chemungianum* Mohan et Henry. *Journal of Essential Oil Research*. 2007;19(1):98-100.
72. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological reviews*. 1992;56(3):395-411.
73. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016;6(2):71-9.
74. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(3):453-62.

75. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition: American Society of Microbiology; 2015. p. 1253-73.
76. Golus J, Sawicki R, Widelski J, Ginalska G. The agar microdilution method - a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of applied microbiology*. 2016;121(5):1291-9.
77. Jehl F, Chabaud A, Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *Journal des Anti-infectieux*. 2015;17(4):125-39.
78. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 11th Edition By Richard J. Lewis, Sr. (Lewis Information Systems, Inc.). John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2004. \$595.00 print set (other pricings available for CD-ROM and online versions). ISBN 0-471-47662-5 for print set. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(8):2794-.
79. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour MJ Crifs, nutrition. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. 2015;55(3):304-18.
80. Van Immerseel F, Cauwerts K, Devriese L, Haesebrouck F, Ducatelle R. Feed additives to control Salmonella in poultry. *World's Poultry Science Journal*. 2002;58(4):501-13.
81. King AH. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. ACS Publications; 1995.
82. Thibodeau A, Fravallo P, Yergeau É, Arsenault J, Lahaye L, Letellier A. Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0131978.
83. Meunier M, Guyard-Nicodeme M, Dory D, Chemaly M. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal of applied microbiology*. 2016;120(5):1139-73.
84. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:494.
85. Backhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host & microbe*. 2012;12(5):611-22.
86. Gaskins H. Intestinal bacteria and their influence on swine growth. *Swine nutrition*. 2001;2:609-30.
87. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):667-85.
88. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 2013;502(7469):96-9.
89. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):141-53.
90. Kim HB, Isaacson RE. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary microbiology*. 2015;177(3-4):242-51.
91. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
92. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*. 2014;6(237):237ra65.

93. Zhao W, Wang Y, Liu S, Huang J, Zhai Z, He C, et al. The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. *PLoS ONE*. 2015;10(2):e0117441.
94. Hopwood D, Hampson D. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. *Weaning the pig: concepts and consequences*. 2003:199-217.
95. Schokker D, Zhang J, Zhang L-I, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, et al. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS One*. 2014;9(6):e100040.
96. Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Current opinion in gastroenterology*. 2010;26(6):564-71.
97. Holman DB, Brunelle BW, Trachsel J, Allen HK. Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems*. 2017;2(3).
98. Looft T, Allen HK, Cantarel BL, Levine UY, Bayles DO, Alt DP, et al. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J*. 2014;8(8):1566-76.
99. FEWINS BG, Newland L, Briggs C. The normal intestinal flora of the pig. III. Qualitative studies of lactobacilli and streptococci. *Journal of Applied Microbiology*. 1957;20(2):234-42.
100. Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods*. 2016;25:511-22.
101. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*. 2006;312(5778):1355-9.
102. Li Y, Tran H, Bundy J, Burkey T, Kerr B, Nielsen M, et al. Evaluation of collection method and diet effects on apparent digestibility and energy values of swine diets. *Journal of animal science*. 2016;94(6):2415-24.
103. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991;70(6):443-59.
104. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell host & microbe*. 2015;17(5):662-71.
105. Denbow DM. Chapter 14 - Gastrointestinal Anatomy and Physiology A2 - Scanes, Colin G. *Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 337-66.
106. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-73.
107. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(41):15163-76.
108. Macfarlane GT, Allison C, Gibson SA, Cummings JH. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *The Journal of applied bacteriology*. 1988;64(1):37-46.
109. Neis E, Dejong C, Rensen S. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients*. 2015;7(4):2930.

110. Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti P-H, Sanz Y, et al. Reprint of “Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host”. *Pharmacological Research*. 2013;69(1):114-26.
111. Dai Z-L, Wu G, Zhu W-Y. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front Biosci*. 2011;16(1):1768-86.
112. Engevik MA. *Ion Transport and the Gut Microbiota*: University of Cincinnati; 2014.
113. Cockburn DW, Koropatkin NM. Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease. *Journal of molecular biology*. 2016;428(16):3230-52.
114. Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*. 2012;6(8):1535-43.
115. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(24):15451-5.
116. Stedman A, Nigro G, Sansonetti PJ. Le dialogue microbiote-cellules souches. *Med Sci (Paris)*. 2016;32(11):983-90.
117. Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *BioMed Research International*. 2010;2010.
118. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(11):790.
119. Olive AJ, Sasseti CM. Metabolic crosstalk between host and pathogen: sensing, adapting and competing. *Nat Rev Micro*. 2016;14(4):221-34.
120. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2015;74(1):13-22.
121. de Muinck EJ, Stenseth NC, Sachse D, vander Roost J, Rønningen KS, Rudi K, et al. Context-dependent competition in a model gut bacterial community. *PloS one*. 2013;8(6):e67210.
122. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol*. 2012;152(3):189-205.
123. Roslan AM, Sakai K, Tashiro K, Osman M, Ishida N, Nordin SA, et al. The prevalence of foodborne pathogenic bacteria on cutting boards and their ecological correlation with background biota. *AIMS Microbiology*. 2016;2(2):138-51.
124. Pamer EG. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nature immunology*. 2007;8(11):1173-8.
125. Monack Denise M. The Battle in the Gut. *Immunity*. 2014;40(2):173-5.
126. Lievin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(2):315-37.
127. Conway P, Henriksson A. Strategies for the isolation and characterisation of functional probiotics. 1994.
128. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012;336(6086):1262-7.
129. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*. 2012;336(6080):489-93.

130. Virgin Herbert W, Todd John A. Metagenomics and Personalized Medicine. *Cell*. 2011;147(1):44-56.
131. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-7.
132. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ, et al. Differential Effects of Antibiotic Therapy on the Structure and Function of Human Gut Microbiota. *PLOS ONE*. 2013;8(11):e80201.
133. Aziz Q, Dore J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2013;25(1):4-15.
134. Valdes L, Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Gonzalez S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food & Function*. 2015;6(8):2424-39.
135. Fouhse JM, Zijlstra RT, Willing BP. The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*. 2016;6(3):30-6.
136. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.
137. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-131.
138. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55(2):205-11.
139. Montagne L, Pluske J, Hampson D. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal feed science and technology*. 2003;108(1):95-117.
140. Chaloeamnon P, Chomnawang MT, Junlapho W, Paraksa N. Application of Real-Time PCR for Quantifying Gastrointestinal Microbiota in Weaning Pigs Influenced by Dietary Feed Additive Supplementation. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2016;46(1):23.
141. Josephs-Spaulding J, Beeler E, Singh OV. Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(11):4845-63.
142. Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us. *Molecular microbiology*. 2006;59(6):1639-50.
143. Onrust L, Ducatelle R, Van Driessche K, De Maesschalck C, Vermeulen K, Haesebrouck F, et al. Steering Endogenous Butyrate Production in the Intestinal Tract of Broilers as a Tool to Improve Gut Health. *Frontiers in veterinary science*. 2015;2:75.
144. Kim J, Lim J, Lee C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*. 2013;31(8):1358-73.
145. Sheu SJ, Hwang WZ, Chiang YC, Lin WH, Chen HC, Tsen HY. Use of tuf gene-based primers for the PCR detection of probiotic *Bifidobacterium* species and enumeration of bifidobacteria in fermented milk by cultural and quantitative real-time PCR methods. *Journal of food science*. 2010;75(8):M521-7.

146. Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohier D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*. 2011;28(5):848-61.
147. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*. 2002;2(2):2-11.
148. Nwabor OF, Dickson ID, Ajibo QC. Epidemiology of Salmonella and Salmonellosis. *International Letters of Natural Sciences*. 2015;47.
149. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 2014.
150. Zhao X, Lin CW, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2014;24(3):297-312.
151. Law JW-F, Ab Mutalib N-S, Chan K-G, Lee L-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*. 2015;5(770).
152. Kim D-H, Kang I-B, Jeong D, Kim H, Kim H-S, Lee S-K, et al. Development of rapid and highly specific TaqMan probe-based real-time PCR assay for the identification and enumeration of *Lactobacillus kefir* in kefir milk. *International Dairy Journal*. 2016;61:18-21.
153. Giuseppe Spoto RC. 2. DNA analyses in food safety and quality: Current status and expectations. 1 ed. New York Springer; 2012. 318 p.
154. Välimaa A-L, Tilsala-Timisjärvi A, Virtanen E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. *Food Control*. 2015;55:103-14.
155. Maurischat S, Baumann B, Martin A, Malorny B. Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:- by real-time multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;193:8-14.
156. Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009;68(3):351-62.
157. Lodemann U, Strahlendorf J, Schierack P, Klingspor S, Aschenbach J, #xf6, et al. Effects of the Probiotic *Enterococcus faecium* and Pathogenic *Escherichia coli* Strains in a Pig and Human Epithelial Intestinal Cell Model. *Scientifica*. 2015;2015:10.
158. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(3):207.
159. Clifford R, Milillo M, Prestwood J, Quintero R, Zurawski D, I Kwak Y, et al. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR 2012. e48558 p.
160. De Angelis M, Siragusa S, Berloco M, Caputo L, Settanni L, Alfonsi G, et al. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*. 2006;157(8):792-801.
161. Ruggiero P. Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2014;5(4):384.
162. Castillo M, Martín-Orúe SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martín M, Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. 2006;114(1–2):165-70.

163. Bayer EA, Shoham Y, Lamed R. Cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. *The prokaryotes*: Springer; 2006. p. 578-617.
164. Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. *Diversity*. 2013;5(3):627.
165. Kittelmann S, Seedorf H, Walters WA, Clemente JC, Knight R, Gordon JI, et al. Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e47879.
166. Petrof EO, Gloor GB, Vanner SJ, Weese SJ, Carter D, Daigneault MC, et al. Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome*. 2013;1(1):3.
167. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, et al. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS ONE*. 2015;10(2):e0117617.
168. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood-Education & practice edition*. 2013;98(6):236-8.
169. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*. 2014;30(9):418-26.
170. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463-7.
171. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(2):560-4.
172. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*. 2012;2012.
173. Wang Y, Qian P-Y. Conserved Regions in 16S Ribosome RNA Sequences and Primer Design for Studies of Environmental Microbes. *Encyclopedia of Metagenomics: Genes, Genomes and Metagenomes: Basics, Methods, Databases and Tools*. 2015:106-10.
174. Blervaque R. Séquençage haut-débit de deuxième génération: Principes et caractéristiques 2013 [
175. de la Cuesta-Zuluaga J, Escobar JS. Considerations For Optimizing Microbiome Analysis Using a Marker Gene. *Frontiers in nutrition*. 2016;3:26.
176. Wu D, Jospin G, Eisen JA. Systematic Identification of Gene Families for Use as "Markers" for Phylogenetic and Phylogeny-Driven Ecological Studies of Bacteria and Archaea and Their Major Subgroups. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77033.
177. Amplicon P, Clean-Up P, Index P. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.
178. Morgan XC, Huttenhower C. Human microbiome analysis. *PLoS computational biology*. 2012;8(12):e1002808.
179. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011;27(16):2194-200.
180. Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O'Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, et al. Comparing apples and oranges?: next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148028.
181. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D633-42.

182. Sul WJ, Cole JR, Jesus Eda C, Wang Q, Farris RJ, Fish JA, et al. Bacterial community comparisons by taxonomy-supervised analysis independent of sequence alignment and clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(35):14637-42.
183. Purschke O, Schmid BC, Sykes MT, Poschlod P, Michalski SG, Durka W, et al. Contrasting changes in taxonomic, phylogenetic and functional diversity during a long-term succession: insights into assembly processes. *Journal of Ecology*. 2013;101(4):857-66.
184. Choi KY, Lee TK, Sul WJ. Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens — A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2015;28(9):1217-25.
185. Legendre P, Cáceres M. Beta diversity as the variance of community data: dissimilarity coefficients and partitioning. *Ecology Letters*. 2013;16(8):951-63.
186. Xu J. Next-generation sequencing: Current technologies and applications: Caister Academic Press Ontario, Canada; 2014.
187. Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*. 2013;8(2):e57923.
188. Chlebicz A, Slizewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(5).
189. International CP. Hog Production in Canada 2019 [Available from: <http://www.canadapork.com/en/industry-information/hog-production-in-canada>].
190. Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary microbiology*. 2008;130(1-2):1-19.
191. Kanuganti SR, Wesley IV, Reddy PG, McKean J, Hurd HS. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. *Journal of food protection*. 2002;65(9):1470-4.
192. Nowotarska SW, Nowotarski K, Grant IR, Elliott CT, Friedman M, Situ C. Mechanisms of antimicrobial action of cinnamon and oregano oils, cinnamaldehyde, carvacrol, 2, 5-dihydroxybenzaldehyde, and 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). *Foods*. 2017;6(9):72.
193. Singh I. Antimicrobials in higher plants: Classification, mode of action and bioactivities 2017. 48-62 p.
194. Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*. 2018;4(2):126-36.
195. Heinritz SN, Mosenthin R, Weiss E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutrition research reviews*. 2013;26(2):191-209.
196. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in microbiology*. 2017;25(10):851-73.
197. Michiels J, Missotten J, Fremaut D, De Smet S, Dierick N. In vitro characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. *Animal feed science and technology*. 2009;151(1-2):111-27.
198. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1749-55.

199. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. 2012;6:1621.
200. Schloss PD, Jenior ML, Koumpouras CC, Westcott SL, Highlander SK. Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system. *PeerJ*. 2016;4:e1869.
201. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*. 2013;41(Database issue):D590-D6.
202. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010;26(19):2460-1.
203. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131(2):479-91.
204. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*. 2011;12(6):R60-R.
205. Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *Journal of Essential Oil Research*. 2003;15(6):428-33.
206. Sung-Youn K, Dong-Hyun K, Jin-Ki K, Yong-Geun H, Young HJ, Taewan K, et al. Antimicrobial Activity of Plant Extracts Against *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. *Journal of food science*. 2011;76(1):M41-M6.
207. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006;6(1):39.
208. D. DHJ, G. DS. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;88(2):308-16.
209. CCAC. About the Three Rs 2005 [
210. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-30.
211. Cinquin C, Le Blay G, Fliss I, Lacroix C. New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006;57(2):324-36.
212. Boskovic M, Baltic M, Ćirić J, Djuric J, Djordjevic J, Dokmanovic M, et al. Use of essential oils in order to prevent foodborne illnesses caused by pathogens in meat 2013. 14-20 p.
213. Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;100(2):296-305.
214. Anderson R, Krueger N, Byrd J, Harvey R, Callaway T, Edrington T, et al. Effects of thymol and diphenyliodonium chloride against *Campylobacter* spp. during pure and mixed culture in vitro. *Journal of applied microbiology*. 2009;107(4):1258-68.
215. Bergonzelli G, Donnicola D, Porta N, Cortesy-Theulaz I. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(10):3240-6.
216. Thapa D, Losa R, Zweifel B, Wallace RJ. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. *Microbiology*. 2012;158(11):2870-7.

217. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of food protection*. 2002;65(10):1545-60.
218. Meehan CJ, Beiko RG. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. *Genome Biology and Evolution*. 2014;6(3):703-13.
219. Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L, Zhang H. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2012;25(11):1617-26.
220. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol*. 2009;26(2):142-50.
221. de Lange CFM, Pluske J, Gong J, Nyachoti CM. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science*. 2010;134(1):124-34.
222. Majeed M, Nagabhushanam K, Natarajan S, Sivakumar A, Ali F, Pande A, et al. *Bacillus coagulans* MTCC 5856 supplementation in the management of diarrhea predominant Irritable Bowel Syndrome: a double blind randomized placebo controlled pilot clinical study. *Nutrition Journal*. 2016;15(1):21.
223. Watkins R, Wu L, Zhang C, Davis RM, Xu B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:6055-74.
224. Rubinelli PM, Kim SA, Park SH, Roto SM, Ricke SC. Sodium bisulfate and a sodium bisulfate/tannin mixture decreases pH when added to an in vitro incubated poultry cecal or fecal contents while reducing *Salmonella Typhimurium* marker strain survival and altering the microbiome. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2017;52(8):607-15.