

Université de Montréal

Influence du microbiote intestinal et de la présence de *Salmonella* chez la truie gravide sur l'établissement du microbiote intestinal des porcelets et leur excrétion de *Salmonella* dans des conditions d'élevage en milieu commercial

Par

Guillaume Larivière-Gauthier

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophia doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Juillet 2020

© Larivière-Gauthier, 2020

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

Influence du microbiote intestinal et de la présence de *Salmonella* chez la truie gravide sur l'établissement du microbiote intestinal des porcelets et leur excrétion de *Salmonella* dans des conditions d'élevage en milieu commercial

Présentée par

Guillaume Larivière-Gauthier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

André Ravel

Président-rapporteur

Philippe Fravalo

Directeur de recherche

Sylvain Quessy

Membre du jury

Martin Lessard

Examineur externe

Résumé

L'industrie porcine met beaucoup d'efforts pour contrôler la contamination par *Salmonella* en fin de production. Malgré tout, d'après des données européennes de la European Food Safety Authority (EFSA), les produits de viande porcine pourraient être responsables de 10 à 20 % des cas rapportés de salmonellose chez l'Homme. Il semble donc qu'une approche incluant des actions en amont, c'est-à-dire à la ferme, pourrait permettre de réduire la pression de contamination au niveau de l'abattoir et donc la contamination de la viande. Le transfert de *Salmonella* entre les truies contaminées et les porcelets pourrait être une source importante de contamination dans la filière porcine. Cependant au Canada peu d'information est disponible sur cette voie d'introduction. Nous avons donc décrit le lien entre les souches retrouvées chez les truies et celles retrouvées chez leurs porcelets dans les étapes subséquentes d'un système de production commercial Québécois. De plus, l'établissement du microbiote intestinal chez le porc en production est directement influencé par le microbiote maternel et celui-ci influence l'excrétion de *Salmonella* chez les porcs en engraissement. Dans cette étude, nous avons donc tout d'abord décrit, dans ce même système, le microbiote des truies en lien avec leur excrétion de *Salmonella*. Nous avons ensuite décrit le microbiote des porcelets et des porcs en engraissement en relation avec ce microbiote maternel et avons tenté d'identifier des déterminants de l'excrétion qui peuvent être transférés de la truie à sa progéniture à l'intérieur de cette pyramide de production.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord échantillonné les matières fécales de truies à différents moments de la gestation dans une maternité. Une détection de *Salmonella* a été effectuée et les populations bactériennes retrouvées dans le microbiote fécal de ces truies ont été décrites par séquençage à haut débit de type MiSeq. Ceci nous a permis de mettre en évidence une réduction significative du niveau de *Salmonella* excrétées par ces truies entre le début et la fin de la gestation. Nous avons aussi pu mesurer des variations dans le microbiote fécal de celles-ci selon l'excrétion de *Salmonella*, mais aussi selon le moment de la gestation. Un séquençage a aussi été effectué sur les fèces des porcelets nés de ces truies avant leur sevrage. Ceci nous a permis de

démontrer que le statut d'excrétion de la truie influence leur microbiote fécal. Cependant, aucun transfert direct de taxon spécifique de cette relation n'a pu être mesuré. De plus, indépendamment du statut d'excrétion de *Salmonella* des truies, nous avons démontré qu'à ce moment les porcelets d'une portée avaient des microbiotes fécaux plus semblables entre eux que comparativement à ceux de leurs contemporains, confirmant l'influence de la truie sur le microbiote des porcelets dans les fermes échantillonnées. Finalement, des échantillonnages de matière fécale de ces porcs ont aussi été effectués en engraissement. Leur statut d'excrétion de *Salmonella* et la composition de leur microbiote ont aussi été évalués à cette étape. Grâce à ces échantillons, nous avons démontré que, dans le système de production étudié, le statut d'excrétion de la truie n'avait pas d'impact sur le microbiote des animaux après l'étape du sevrage. Nous avons cependant démontré que dans les fermes faisant partie de l'étude, les porcs nés d'une même mère avaient toujours un microbiote fécal différenciable de celui de leurs congénères. Ceci suggère ainsi le potentiel d'actions visant à moduler le microbiote intestinal de la truie et qui pourrait être transféré au bénéfice de leurs porcelets.

Nous avons aussi décrit par typage, à l'aide de courbes de fusion à haute résolution (HRM), la circulation et le transfert des *Salmonella* de la maternité vers les autres étapes de la production dans cette pyramide de production. Les résultats obtenus démontrent ici que, malgré une excrétion des truies dans la période périnatale, les souches retrouvées plus tard chez les porcelets en pouponnière et dans leur environnement ont des profils HRM différents de celles retrouvées en maternité. Les truies auraient donc, dans le système de production étudié, un effet marginal sur la contamination des porcelets et ceux-ci se contamineraient plutôt dans l'environnement de la pouponnière ou de l'engraissement.

Cette étude a permis de mieux décrire la présence de *Salmonella* dans un système de production porcine commercial au Québec et ainsi de mieux comprendre l'impact de la transmission de *Salmonella* entre les truies et les porcelets. Ces nouvelles connaissances permettront de mieux cibler les étapes où des mesures efficaces pourraient être implantées pour réduire la contamination du produit fini. L'étude du microbiote a aussi permis de mettre en évidence une influence de la truie sur le microbiote fécal de ses porcelets et ce jusqu'en engraissement, sans pour autant avoir pu identifier de taxons directement transférés, ni avoir pu mesurer d'effet de

cette influence sur l'excrétion de *Salmonella*. Néanmoins, au-delà de la problématique spécifique de *Salmonella*, cette étude ouvre des perspectives de modulation du microbiote intestinal de la truie au bénéfice de l'orientation du microbiote digestif du porc pendant toute la production, microbiote dont les effets sur la santé et le bien-être sont de mieux en mieux documentés.

Mots-clés : Microbiote, *Salmonella*, Truie, Porcelet, Porc.

Abstract

The pork industry is putting a lot of effort into controlling *Salmonella* contamination at the end of production. However, according to the European Food Safety Authority (EFSA) data, pig meat products may be responsible for 10-20% of reported cases of salmonellosis in humans. It therefore seems that an approach including actions upstream, on the farm, could make it possible to reduce the pressure of contamination at the slaughterhouse and therefore the contamination of the meat. The transfer of *Salmonella* between contaminated sows and piglets could be an important source of contamination in the pig sector. However, in Canada little information is available on this route of introduction. We have therefore described the link between the strains found in sows and those found in their piglets in the subsequent stages of production in a Quebec commercial production system. In addition, the establishment of this microbiota in pigs in production is directly influenced by the maternal microbiota and that the intestinal microbiota influences the excretion of *Salmonella* in fattening pigs. In this study, we therefore first described the microbiota of sows in relation to their excretion of *Salmonella* in this same production system. We then described the microbiota of piglets and fattening pigs in relation to this maternal microbiota and attempted to identify determinants of shedding that can be transferred from the sow to its offspring within this production pyramid.

To do this, we first sampled the feces of sows at different times of gestation in a maternity unit. *Salmonella* was detected and the bacterial populations found in the fecal microbiota of these sows were described by high-throughput sequencing of the MiSeq type. This allowed us to highlight significant variations in the level of *Salmonella* excreted by these sows at different times of gestation. We were also able to measure variations in the fecal microbiota of these depending on the excretion of *Salmonella*, but also according to the time of gestation. Sequencing was also carried out on the feces of piglets born from these sows before weaning. This allowed us to demonstrate that the sow's shedding status influences their fecal microbiota. However, no direct taxon transfer specific to this relationship could be measured. In addition, up to the nursery, we have demonstrated that piglets from the same litter have more similar fecal microbiota than compared to other contemporary animals, confirming the influence of the sow on the piglet

microbiota in the sampled farms. Finally, fecal samples from these pigs were also carried out for fattening. Their *Salmonella* excretion status and the composition of their microbiota were also assessed at this stage. Using these samples, we demonstrated, in the production system that was studied, that the impact of the sow's status on the microbiota was not retained for fattening after the weaning stage and did not affect the risk of shedding during fattening. However, we have shown that on the farm included in our study that pigs born to the same mother always have a differentiated fecal microbiota from that of their counterparts. This thus demonstrates the potential for actions aimed at modulating the intestinal microbiota of the sow and which could be transferred to the benefit of their piglets.

We have also described by High Resolution Melt typing (HRM) the circulation and transfer of *Salmonella* from the maternity to the other stages of production in this production pyramid. The results obtained demonstrate here that despite the excretion of sows in the perinatal period, the strains found later in the piglets at the nursery and their environment have different HRM profiles from those found in maternity. In the studied production system, sows would therefore have a marginal effect on the contamination of piglets in the production system studied, compared to the environment in the nursery among other things.

This study made it possible to better describe the circulation of *Salmonella* in a commercial swine production system in Quebec and thus to better understand the impact of *Salmonella* transmission between sows and piglets. This new knowledge will allow us to better target the stages where effective measures could be implemented to reduce contamination of the finished product. The study of the microbiota also made it possible to highlight an influence of the sow on the fecal microbiota of its piglets and this until fattening, without being able to identify taxa directly transferred nor to have been able to measure the effect of this influence on the excretion of *Salmonella*. However, beyond the specific problem of *Salmonella*, this study opens up perspectives for modulating the intestinal microbiota of the sow for the benefit of the orientation of the digestive microbiota of pigs throughout production, a microbiota whose effects on health and well-being are getting increasingly well documented.

Keywords : Microbiota, Sow, Piglet, Swine, *Salmonella*

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	6
Table des matières.....	8
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	17
Remerciements.....	21
Chapitre 1 – Introduction.....	22
Chapitre 2 – Revue de littérature.....	25
Historique.....	25
Taxonomie et nomenclature.....	25
Caractéristiques phénotypiques.....	26
Salmonellose.....	26
Impact de <i>Salmonella</i> en santé publique.....	27
<i>Salmonella</i> chez le Porc.....	30
Épidémiologie de <i>Salmonella</i> dans la filière porcine.....	33
À la ferme.....	33
Transmission par d’autres animaux contaminés.....	33
Autres animaux et insectes vecteurs.....	35
Aliment.....	35
Environnement de la ferme.....	38
Détection de <i>Salmonella</i>	40
Échantillons.....	40
Pré-enrichissement.....	41
Enrichissement sélectif.....	41
Géloses sélectives et différentielles.....	42
Confirmation.....	44
Biais.....	44
Méthodes de séquençage à haut débit.....	46
Pyroséquençage/454 Roche.....	48
Life Technologies/ThermoFisher/Ion Torrent.....	50

Illumina.....	51
Pacific Biosciences Single-molecule real-time (SMRT) sequencing	54
Oxford Nanopore Technologies	56
Analyses bio-informatiques.....	58
Réduction des erreurs	59
OTUs contre ASVs.....	61
Profondeur de lecture et raréfaction	64
Analyse des séquences.....	67
Microbiote intestinal.....	72
Implantation du microbiote :	72
Intra-utero	72
Microbiote vaginal.....	75
Lait maternel	76
Effet de la génétique	80
Évolution du microbiote.....	81
Évolution géographique	81
Évolution temporelle.....	83
Après la naissance	83
Pendant l’allaitement.....	84
Transition au sevrage	85
Post-sevrage et microbiote mature	88
Facteurs pouvant affecter le microbiote porc	90
Système immunitaire	90
Stress	91
Gestation	92
Alimentation.....	93
Antibiotiques	94
Impact sur la santé et le développement du porc	95
Système immunitaire	95
Développement et santé du système digestif	98
Protection contre Salmonella.....	100
Molécules inhibitrices	101
Compétition passive	103

Mucus intestinal	104
Microbiote et <i>Salmonella</i>	105
Problématiques, hypothèses et objectifs.....	108
Chapitre 3 – Reduction of <i>Salmonella</i> shedding by sows during gestation in relation to its faecal microbiome	109
Abstract	110
Introduction.....	111
Material and method	113
Sampling	113
Detection.....	113
Genotypic characterisation	114
16S rRNA gene sequencing	114
Real time quantitative PCR of specific bacterial populations	116
Results	117
<i>Salmonella</i> detection.....	117
<i>Salmonella</i> typing.....	117
16S rRNA gene amplicon sequencing.....	118
Real time quantitative PCR for specific populations.....	120
Discussion	120
Conclusions.....	125
Acknowledgments.....	125
Tables	127
Figures	131
Supplementary material.....	134
References.....	136
Chapitre 4 – <i>Salmonella</i> shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning	143
Abstract	144
Introduction.....	145
Material and methods:.....	146
Sampling	146
<i>Salmonella</i> detection:	147
16S rRNA Gene Amplicon Sequencing	148

Results	150
<i>Salmonella</i> shedding	150
Contamination of the farrowing environment	150
Link between sows shedding and farrowing environment contamination	150
Sequencing results	151
Differences in the microbiota between sows and piglets.....	151
Differences in the microbiota according to sows shedding status	152
Identification of taxa associated with the different conditions.....	153
Discussion	154
Conclusion	159
Acknowledgments	159
Tables	161
Figures	165
Supplementary material.....	168
References.....	169
Chapitre 5 – <i>Salmonella</i> à la pouponnière	177
Chapitre 6 – Sows affect their piglets’ faecal microbiota until fattening but not their <i>Salmonella</i> shedding status	181
Significance and Impact of the Study:.....	182
Abstract	182
Introduction.....	183
Material and Methods.....	184
16S rRNA Gene Amplicon Sequencing	185
Results and Discussion	186
Fattening pen environmental contamination and Swine shedding status.....	186
Microbiota analysis	188
Conclusion	190
Acknowledgement	191
Figures	192
References.....	196
Chapitre 7 – Discussion	202
Contribution à une meilleure compréhension de la circulation de <i>Salmonella</i> dans la filière porcine québécoise	202

Méthode de détection	203
Méthode de typage.....	205
<i>Salmonella</i> à la maternité	206
Excrétion des truies.....	206
Circulation des souches à la maternité	207
À la pouponnière.....	208
En engraissement	211
La contribution du microbiote intestinal de la truie sur celui du porcelet.....	214
Collecte des échantillons et traitement	214
Méthode de séquençage et d'analyse	216
Microbiote des truies	217
Microbiote des porcelets	219
Microbiote des porcs en engraissement.....	222
Chapitre 8 – Conclusion.....	225
Références bibliographiques.....	227

Liste des tableaux

Chapitre 3

Tableau 1. –	Number of sows sampled in each parity and their <i>Salmonella</i> shedding status	127
Tableau 2. –	HRM types of <i>Salmonella</i> isolated from sows at the beginning and the end of gestation.	128
Tableau 3. –	Comparison of alpha-diversity indices across sow groups and according to <i>Salmonella</i> shedding status and time of gestation.	129
Tableau 4. –	Beta-diversity analysis across sow groups and according to <i>Salmonella</i> shedding or time of gestation.	130
Tableau 1. –	(supplementary) Complete list of features associated with gestation time, parity number and <i>Salmonella</i> shedding status.	134
Tableau 1. –	OTUs shared by all piglets and sows samples. Results observed for OTUs clustered at 97 % identity.	161
Tableau 2. –	Comparison of alpha-diversity indices across sow groups and according to <i>Salmonella</i> shedding status of the piglets' mothers.	162
Tableau 3. –	Features of piglets' microbiota significantly associated with <i>Salmonella</i> shedding status of the mother using MaAsLin. Results observed for OTUs clustered at 97 % identity.	163
Tableau 1. –	(supplementary) Features of piglets' or sows' microbiota significantly associated with the animal type using MaAsLin.	168
Tableau 2. –	(supplementary) Features of sows' microbiota significantly associated with the gestation room and parity using MaAsLin.	168
Tableau 3. –	(supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the birth mother using MaAsLin.	168
Tableau 4. –	(supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the lairage room using MaAsLin.	168
Tableau 5. –	(supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the <i>Salmonella</i> contamination of the farrowing environment using MaAsLin.	168

Tableau 6. – (supplementary) Features of piglets’ microbiota significantly associated with the parity using MaAsLin.	168
Tableau 1. – Types d’échantillons positifs à <i>Salmonella</i> et profils de courbes de fusion à haute résolution des isolats retrouvés dans ceux-ci les trois bâtiments de pouponnières lors de l’entrée des porcelets.	179
Tableau 2. – Types d’échantillons positifs à <i>Salmonella</i> et les profils de courbes de fusion à haute résolution retrouvés dans ceux-ci dans les trois bâtiments de pouponnières cinq semaines après l’entrée des porcelets.....	180

Liste des figures

Chapitre 2

Figure 1. – Méthode de PCR en émulsion utilisé lors de la préparation du séquençage 454 et Ion-Torrent	49
Figure 2. – Technique utilisée pour l’identification des bases dans le séquençage de type Ion-Torrent	51
Figure 3. – Méthode de « Bridge amplification » utilisée dans la préparation du séquençage MiSeq	53
Figure 4. – Étapes requises lors du séquençage de type Single Molecule Real-Time de Pacific Biosciences	55
Figure 5. – Description de la méthode de séquençage de type Oxford Nanopore	57
Figure 6. – Comparaison schématique de l’approche par OTUs et par ASVs pour la correction des erreurs de séquençage.	64
Figure 7. – Exemple de courbe de raréfaction démontrant l’augmentation du nombre d’OTUs détecté en lien avec le nombre de séquences échantillonnées et l’atteinte d’une phase de plateau.	66
Figure 8. – Calculs des indices de distance de Simpson et de Shannon utilisés pour évaluer la richesse des espèces retrouvées dans un échantillon et leur uniformité.	68
Figure 9. – Calcul des indices de distance de Jaccard et de Bray-Curtis utilisés pour comparer la dissimilarité de composition microbienne entre deux échantillons.....	69
Figure 10. – Exemple de graphique PCoA représentant deux groupes d’animaux ayant des microbiotes significativement différents.	70
Figure 1. – NMDS plot illustrating sow fecal microbiome beta-diversity according to the time of gestation, <i>Salmonella</i> shedding status and number of gestation.	131
Figure 2. – Stacked bar graphs showing the relative abundance at the phylum (A) and “genus” (B) levels using RDP classification (only taxa representing more than 1 % of the sequences) for the four groups of sows.....	132

Figure 3. – Enterobacteria (A) and *Lachnospiraceae* (B) 16S rRNA gene copies in sow fecal content at beginning and end of gestation.....133

Figure 1. – (supplementary) Rarefaction curve comparing the number reads with the average number of OTUs found in all sequenced samples of sows’ feces for 1000 iterations.....135

Figure 1. – Stacked bar graphs showing the relative abundance at the phylum (A) and order (B) levels using RDP classification (only taxa representing more than 1 % of the sequences) for the three groups of piglets and three groups of sows.165

Figure 2. – PCoA plot using Bray-Curtis index illustrating sows’ and piglets’ fecal microbiome beta-diversity.166

Figure 3. – Figure 3. PCoA plots using Bray-Curtis index illustrating piglets’ fecal microbiome beta-diversity according to A) their mothers’ *Salmonella* shedding status and B) their mother.....
.....167

Figure 1. – Distribution of sampled animals at different farms and buildings from gestation to fattening.192

Figure 2. – Distribution of piglets based on their mothers’ *Salmonella* status.193

Figure 3. – Stacked bar graphs showing the relative abundance at the phylum (A) and family (B) levels using RDP classification (only taxa representing more than 1 % of the sequences).194

Figure 4. – NMDS plots using the Bray–Curtis index illustrating swine faecal microbiome beta-diversity according to: A) the birth mother; B) the fattening farm.195

Liste des sigles et abréviations

ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique

APS : Adénosine 5'-phosphosulfate

AMOVA : Analysis of Molecular Variance / Analyse de variance moléculaire

ANOVA : Analysis of Variance / Analyse de la variance

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

ARNr/rRNA: Acide ribonucléique ribosomal / Ribosomal Ribonucleic Acid

ASV : Amplicon Sequence Variant / Variant de séquence d'amplicon

ATP : Adénosine triphosphate

BAM : Bacteriological Analytical Manual / Manuel bactériologique analytique

BGA : Brilliant Green Agar /Gélose au vert brillant

BGS : Brilliant Green Sulfa agar / Gélose sulfa verte brillante

bp : Paire de bases

BPW : Buffered Peptone Water / Eau peptonée tamponnée

BS : Bismuth Sulfite agar /Gélose bismuth sulfite

°C : Degré Celsius

CFI/FCI : Canada Foundation for Innovation / Fondation canadienne pour l'innovation

cm : Centimètre

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRIBIQ : Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis / Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant

dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid / Acide éthylènediaminetétraacétique

EFSA : European Food Safety Authority

FDA : Food and Drugs Administration

FRQ-NT : Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies

g : Gramme

g : Force *g*

h : Heure

HOMOVA: Homogeneity of Molecular Variance / homogénéité de la variance moléculaire

HRM : High Resolution Melt / Courbes de fusion à haute résolution

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

INRS : Institut national de la recherche scientifique

ISO : International standard association

kb : Kilobase

kpb : Kilopaire de bases

l : Litre

LIA : Lysine Iron Agar / Gélose lysine fer

LPS : Lipopolysaccharides

MaAsLin : Multivariate Association with Linear Models / Association multivarié avec modèles linéaire

MESI : Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec

min : Minute

mg : Milligramme

ml : Millilitre

mm : Millimètre

mmol : Millimol

MSRV : Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis agar / Gélose Rappaport-Vassiliadis modifiée semi-solide

M : Nanomolaire

mM : Millimolaire

m/s : Mètre par seconde

ng : Nanogramme

NMDS : Non-Metric Multidimensional Scaling / positionnement multidimensionnel non métrique

nmol : Nanomole

NSERC / CRSNG : Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada / Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie

OTU : Operational Taxonomic Unit / Unité taxonomique opérationnelle

PCoA : Principal Coordinates Analysis / Analyse en coordonnées principales

PCR : Polymerase chain reaction / Réaction de polymérisation en chaîne

qPCR: Real-time Polymerase chain reaction / Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

perMANOVA: Permutational Multivariate Analysis of Variance / Analyse de variance multivarié permutatif

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis / Électrophorèse en champ pulsé

PPI : Pyrophosphates inorganiques

REG3 : Regenerating islet-derived proteins / Protéine III-gamma en régénération d'îlots

RDP : Ribosomal Database Project

RV : Rappaport-Vassiliadis broth / Bouillon Rappaport-Vassiliadis

s : Seconde

SigA : Immunoglobuline A sécrétoire

SCFA : Short-Chain Fatty Acids / Acide gras à courte chaîne

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate / Dodécylsulfate de sodium

SFB : Segmented Filamentous Bacteria / Bactéries filamenteuses segmentées

SPI : *Salmonella* Pathogenicity Island / Ilot de pathogénicité de *Salmonella*

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism / Polymorphisme de conformation des simples brins

TLR : Toll-like receptor / Récepteur de type Toll

Treg : Cellule T régulatrice

TRFLP : Terminal restriction fragment length polymorphism / Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux

TSI : Triple sugar iron / Gélose aux trois sucres et au fer

UFC : Unité formatrice de colonie

USDA : United States Department of Agriculture

VNTR : Variable Number Tandem Repeat / répétition en tandem polymorphe

w/v : Masse / Volume

μl : Microlitre

μm : Micromètre

WGS : Whole Genome Sequencing / Séquençage de génome complet

XLD : Xylose Lysine Desoxycholate

XLT-4 : Xylose Lysine Tergitol-4

ZMW : Zero-Mode Waveguides

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Philippe Fravalo de m'avoir accueilli au laboratoire, de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenu depuis déjà presque 10 ans tout d'abord lors de ma maîtrise et maintenant pour mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié nos discussions scientifiques, sportives et politiques.

Merci à mes collègues et amis présents et passés de la Chaire de recherche en salubrité des viandes pour votre aide et vos conseils. Un merci spécial à mes stagiaires Gabriel, Servane, Éloïse et Clara pour leur aide lors des échantillonnages et des manipulations. Un grand merci à Alex pour les discussions stimulantes et les encouragements.

Merci aux membres du jury d'évaluation de cette thèse.

Merci au Centre de recherche en infectiologie porcine CRIPA, au Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ) et au Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique (GREZOSP) pour les bourses. Merci aussi au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRNSG) et aux industriels pour le financement du projet.

Merci à mes parents pour leurs encouragements et leur support constant tout au long de mes études.

Merci à tous mes amis et plus particulièrement Alexis et Sophie pour leurs encouragements.

Chapitre 1 – Introduction

Salmonella enterica est un important pathogène alimentaire qui cause la salmonellose, maladie en partie associée à la consommation de produits du porc contaminés. En effet, au Canada, il est estimé que cette bactérie cause environ 270 infections par 100 000 habitants chaque année, ce qui démontre son importance persistante en santé publique (Thomas *et al.*, 2013). La réelle proportion des salmonelloses causées par la consommation de produits de porc au Canada n'est pas bien connue. Cependant, des sollicitations d'experts ont permis d'estimer qu'entre 6 et 7 % des salmonelloses étaient liées à la consommation de porc, alors qu'entre 1975 et 2005, 1 % des éclosions confirmées étaient liées à la consommation de cette viande (Ravel *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2016). En Europe, il a été estimé qu'entre 10 et 20 % des cas sont dus à la consommation de produits de porc contaminés (EFSA, 2010).

Cette bactérie peut contaminer les porcs dès la ferme, et la plupart de ses nombreux sérotypes peuvent être portés de façon asymptomatique par les animaux au niveau du système digestif, des nœuds lymphatiques mésentériques et des amygdales (Boyen *et al.*, 2008). Dans certaines régions du Canada, il a été estimé que jusqu'à 60 % des porcs en finition étaient contaminés par cette bactérie (Rajic *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2008). Ces animaux contaminés entrent ensuite à l'abattoir où ils augmentent le risque de contamination de la carcasse, et ainsi le risque d'exposition pour les consommateurs (Letellier *et al.*, 2009; EFSA, 2010). *Salmonella* peut être introduite dans la ferme par une multitude de voies, telles que les aliments contaminés ou les employés (Funk et Gebreyes, 2004). Cependant, l'une des plus grandes sources d'introduction dans l'élevage est l'entrée d'animaux préalablement contaminés (Funk et Gebreyes, 2004; Gotter *et al.*, 2012b). Une fois présente dans l'environnement de la ferme, il peut être extrêmement difficile d'éliminer *Salmonella* par l'application conventionnelle des méthodes de lavage et de désinfection standard. La bactérie peut alors contaminer les animaux nouvellement arrivés et exempts de *Salmonella*, initiant un cycle de contamination récurrente des animaux de l'élevage (Argüello *et al.*, 2011; Dewaele *et al.*, 2012).

Dans un élevage de ce type, une des importantes sources potentielles de *Salmonella* est la truie. En effet, une étude canadienne a démontré que les truies à la maternité en Alberta et en Saskatchewan sont hautement contaminées par *Salmonella* avec une excrétion de 38 % (Wilkins *et al.*, 2010). Cette contamination des truies pourrait être transmise à leurs porcelets à la maternité et ceux-ci pourraient à leur tour propager la bactérie dans les phases suivantes de la production (Belœil *et al.*, 2004; EFSA, 2010; Hill *et al.*, 2016). Des variations de cette excrétion par les truies ont déjà été décrites entre la fin de la gestation et la période post-sevrage (Nollet *et al.*, 2005a; Magistrali *et al.*, 2011). Cependant, peu d'information est disponible sur la dynamique de cette excrétion durant la période de gestation elle-même et sur les causes de ces variations. La majorité des études ayant tracé des liens entre les *Salmonella* retrouvées chez les porcelets et celles chez les truies ont été effectuées en Europe dans des systèmes de production de type naisseur-finisser. L'impact du transfert de *Salmonella* entre les truies et les porcelets sur la contamination au cours des étapes suivantes de la production, pourrait cependant être différent dans les systèmes de type multisite tout-plein/tout-vide plus fréquemment retrouvés au Québec.

Le portage chez l'animal étant majoritairement cantonné à la sphère intestinale, une des façons de réduire la colonisation des porcs dans les différentes étapes de la production pourrait être d'influencer leur microbiote digestif. En effet, les études du microbiote intestinal, particulièrement celles utilisant le séquençage à haut débit, ont permis de démontrer toute l'importance de cet écosystème microbien dans le combat contre la colonisation par les pathogènes. Ce phénomène est par exemple lié à l'exclusion compétitive, la stimulation de l'immunité qu'il induit et éduque, ou encore la production de molécules antibactériennes (Ubeda *et al.*, 2017). Pour *Salmonella*, il a été démontré que certains acides gras volatils, qui sont des produits de la digestion de sucres complexes par le microbiote digestif, peuvent réduire la virulence du pathogène. Par exemple, il a été démontré que le butyrate cause une diminution de l'activation des gènes de l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* 1 (SPI-1) impliqués dans l'invasion de la bactérie (Gantois *et al.*, 2006). De même, la présence de *Bacteroides* produisant du propionate réduit la colonisation chez la souris (Jacobson *et al.*, 2018). Il a aussi été démontré que des porcs excrétaient *Salmonella* de façon active ou excrétaient à des niveaux différents, présentaient des différences au niveau de la composition de leur microbiote fécal (Fravalo *et al.*,

2013; Kim et Isaacson, 2017; Lebel *et al.*, 2017). Ainsi, certains animaux avec des microbiotes spécifiques pourraient être moins sensibles que d'autres à la colonisation par ce pathogène.

Il a été démontré qu'une fraction du microbiote intestinal du porcelet est héritée de la mère dès la naissance et lors de la lactation. Cette transmission est responsable en partie de l'implantation d'un microbiote digestif normal. En effet, il a été démontré que des porcelets nés de truies ayant été nourries d'un probiotique présentaient un microbiote altéré, et dans certains cas une meilleure productivité (Baker *et al.*, 2013; Starke *et al.*, 2013). Aussi chez l'humain, il a été démontré que les enfants nés par césarienne, et donc pour lesquels le contact initial avec le microbiote vaginal a été éliminé, avaient un microbiote différent de celui des enfants nés par voie naturelle (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Ces différences peuvent affecter la santé à long terme de ces enfants. Ils ont un risque plus élevé de souffrir de multiples maladies telles que des allergies, l'asthme et des maladies inflammatoires chroniques des intestins (Renz-Polster *et al.*, 2005; Bager *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). L'hypothèse de ce travail est que le microbiote transmis aux porcelets par la truie pourrait donc avoir un effet sur la sensibilité de ces animaux à la colonisation par *Salmonella* et que ces différences pourraient perdurer tout au long de leur vie.

Le premier objectif de cette thèse était alors de décrire la circulation de *Salmonella* dans une pyramide de production de type multisite tout-plein/tout-vide avec un accent plus particulier sur la transmission de ce pathogène entre la truie et les porcelets. Les informations ainsi obtenues pourraient nous permettre de mieux cibler les étapes où des mesures efficaces pourraient être implantées pour réduire la contamination du produit fini. Le deuxième objectif était d'étudier le transfert du microbiote fécal de la mère à ses porcelets et d'évaluer son impact sur la contamination de ces animaux par *Salmonella* au cours des différentes étapes de la production. Ceci a pour but d'identifier des taxons bactériens ayant possiblement des effets protecteurs vis-à-vis de la colonisation et/ou du portage intestinal du pathogène.

Chapitre 2 – Revue de littérature

Historique

C'est en 1880 que Karl Eberth décrit pour la première fois un bacille qu'il suspecte être responsable de la fièvre typhoïde dans les plaques de Peyer's et le pancréas d'un patient malade (Eberth, 1880). Quatre ans plus tard en 1884, le pathologiste Georg Theodor Gaffky confirme cette découverte en isolant à partir d'échantillons provenant de cas de fièvre typhoïde, une culture pure d'une bactérie qu'on nomme alors Eberthella ou Bacille Gaffky-Eberth (Gaffky, 1884). Un an plus tard Theobald Smith, alors assistant de recherche au Bureau of Animal Industry du United States Department of Agriculture, découvre chez un porc ce qui deviendra *Salmonella Choleraesuis*. Il pense alors de façon erronée avoir isolé l'organisme responsable de la fièvre porcine (choléra du porc) (Brands, 2006). Cependant, ce n'est qu'en 1900 que le bactériologiste Joseph Léon Marcel Lignières a proposé de renommer le micro-organisme *Salmonella* en l'honneur de Daniel Elmer Salmon qui administrait le laboratoire où la découverte a été faite (Brands, 2006).

Taxonomie et nomenclature

La taxonomie et la nomenclature du genre *Salmonella* sont complexes et ont beaucoup varié depuis sa découverte. Aujourd'hui, le genre *Salmonella* est divisé en deux espèces : *S. bongori* et *S. enterica*. L'espèce *enterica* est quant à elle divisée en six sous-espèces : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *indica* (IV), *houtenae* (VI). L'espèce *S. bongori* (V) était aussi initialement identifiée comme une septième sous-espèce (Brenner *et al.*, 2000).

Les *Salmonella* sont aussi classifiées à l'aide de leur sérotype basé sur un schéma proposé par Kauffman et White. Cette méthode est fondée sur l'identification de trois types d'antigènes à l'aide d'antisérums. L'antigène O qui correspond aux oligosaccharides associés aux lipopolysaccharides, l'antigène H qui correspond aux protéines flagellaires et l'antigène capsulaire Vi qui n'est retrouvé que chez trois sérotypes (Dublin, Paratyphi et Typhi) (Brenner *et al.*, 2000). Cette méthode permet de classer *Salmonella* en plus de 2579 sérotypes qui sont décrits

et listés dans le White-Kauffmann-Le Minor (WKL) scheme (Andino et Hanning, 2015). La majeure partie des sérotypes décrits appartiennent à la sous-espèce *enterica* (1585).

Caractéristiques phénotypiques

Salmonella est un bacille Gram négatif. C'est une bactérie anaérobie facultative de la famille des *Enterobacteriaceae* d'un diamètre variant entre 0,7 et 1,5 μm et d'une longueur de 2 à 5 μm . Elle est majoritairement motile et possède des flagelles péritriches. Cependant, certains sérotypes tels que *Salmonella* Gallinarum et Pullorum et certaines souches mutantes sont non-motiles. La taille de son génome varie selon les sérotypes de 4460 à 4857 kb. La majorité des *Salmonella* ne peuvent pas fermenter le lactose, produisent des sulfites d'hydrogène, et sont oxydase négative et catalase positive. Elles peuvent aussi utiliser le citrate comme seule source de carbone, décarboxyler la lysine mais n'hydrolysent pas l'urée (Andino et Hanning, 2015).

Salmonellose

La capacité de *Salmonella* à causer l'infection chez certains hôtes est associée à des sérotypes spécifiques. En effet, certains sérotypes tels que *Salmonella* Choleraesuis et Dublin sont dits adaptés à l'hôte puisqu'ils causent des infections sévères chez leurs hôtes, soient les porcs et les bovins respectivement. Ils peuvent aussi causer la salmonellose chez d'autres espèces. Alors que certains sérotypes tels que *S. Gallinarum* chez la volaille, *S. Abortusovis* chez les ovins et *S. Typhi* chez l'Homme sont plutôt dits restreints à l'hôte puisqu'ils ne peuvent normalement infecter qu'un seul hôte (Bäumler et Fang, 2013). Sauf pour les exceptions mentionnées précédemment, il semble que la totalité des sérotypes connus de *Salmonella* puissent causer la maladie chez l'Homme.

Les salmonelloses peuvent être classées en deux catégories : typhoïdes et non-typhoïdes. Les salmonelloses typhoïdes sont causées chez l'Homme par des sérovars (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*) adaptés à leur hôte et causant des infections systémiques (Gal-Mor *et al.*, 2014). Comme ces sérotypes ne se retrouvent pas chez les animaux et ne sont pas considérés comme sources de toxi-infections alimentaires, ils ne seront pas traités en profondeur dans cette thèse.

La salmonellose non-typhoïde, se contracte par voie orale, principalement par l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée, le contact avec les animaux ou plus rarement d'humain à humain. Les premiers symptômes apparaissent habituellement entre 6 et 72 heures d'incubation, en fonction de l'état de santé de l'hôte et de la dose ingérée (Abe *et al.*, 2004). Les données sur la dose infectieuse de *Salmonella* proviennent principalement d'analyses d'éclosions et il est difficile d'obtenir des résultats précis. Par exemple, dans une étude japonaise où neuf éclosions étaient étudiées, la dose ingérée variait de 12 à 10^6 ufc par personne (Abe *et al.*, 2004). L'infection par *Salmonella* suit une courbe dose-réponse où les chances d'infection augmentent et le temps d'incubation diminue en fonction de la dose ingérée (Abe *et al.*, 2004). On considère cependant que la dose infectieuse moyenne se situe en 10^6 - 10^8 chez les adultes en bonne santé, alors qu'elle pourrait être aussi faible que dix cellules chez les enfants et les personnes vulnérables (Abe *et al.*, 2004; Antunes *et al.*, 2016; Chlebicz et Śliżewska, 2018). Pour ce qui est de la forme entérique de la salmonellose, les symptômes consistent en des diarrhées parfois sanglantes accompagnées de fièvre, de vomissements et de crampes abdominales. Ces symptômes peuvent durer de trois à sept jours. Cependant, l'excrétion de *Salmonella* par le patient devenu asymptomatique est relevée pour une durée médiane de cinq semaines. La maladie est autolimitante et ne nécessite donc normalement pas d'hospitalisation. L'une des complications principales est la déshydratation lors de diarrhées sévères. Des fluides intraveineux peuvent alors être administrés. Dans 2 % des cas confirmés par culture, après trois à quatre semaines, l'infection peut être suivie de séquelles ou complications à long terme telles que l'arthrite réactionnelle (inflammation des articulations), d'urétrites, d'uvéites et/ou de conjonctivites. Dans 5 à 10 % des cas et principalement chez les patients immunosupprimés les *Salmonella* non-typhoïdes peuvent aussi quitter le tractus gastro-intestinal et causer des septicémies ou des bactériémies et atteindre les organes et/ou les articulations. Le taux de mortalité est généralement de moins de 1 % (Chen *et al.*, 2013).

Impact de *Salmonella* en santé publique

Salmonella est l'un des pathogènes alimentaires les plus importants dans le monde entier. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé estime dans un rapport de 2015 que, incluant les séquelles à long terme, les *Salmonella* non-typhoïdes sont responsables de 4 des 33 millions des

DALYs (Disability Adjusted Life Years) imputables aux toxi-infections alimentaires. Ce qui en fait le pathogène numéro un. Il est estimé dans ce même rapport que cette bactérie est quatrième pour le nombre de toxi-infections alimentaires derrière les norovirus, les *Campylobacter* spp. et les *Escherichia Coli* enterotoxigéniques (World Health Organization, 2015). Une étude similaire de 2010 a aussi démontré que l'impact global des *Salmonella* non-typhoïdes est élevé. Mondialement, on estime à 93,8 millions de cas, dont 80,3 millions associés à la consommation d'aliments contaminés par année et parmi lesquels 155 000 ont mené à un décès (Majowicz *et al.*, 2010). Comme il est estimé que 2,8 milliards de maladies diarrhéiques sont contractées chaque année, ces mêmes auteurs concluent que *Salmonella* est responsable d'environ 3 % de celles-ci. Au Canada, la surveillance de *Salmonella* se déroule tout d'abord au niveau des provinces. En effet, celles-ci colligent les informations sur leur territoire et transfèrent ces données de façon volontaire au Système canadien de surveillance des maladies à déclaration obligatoire (Fraser, 2008). La surveillance est variable selon les provinces. En effet, la province de l'Ontario collige les cas confirmés, c'est-à-dire où il a été possible d'isoler *Salmonella* à partir d'un échantillon biologique mais aussi les cas présumés où un malade présente des signes cliniques de salmonellose tout ayant un lien épidémiologique avec un cas confirmé. La province de Québec ne comptabilise que les résultats confirmés (Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2019; Ministry of Health and Long-Term Care of Ontario, 2019). Pour ce qui est de la surveillance canadienne seulement les cas confirmés sont pris en compte (Gouvernement du Canada, 2008). Ainsi pour qu'un cas de *Salmonellose* soit détecté par les systèmes de surveillance, la personne malade doit tout d'abord aller chercher des soins, un échantillon doit être collecté et soumis pour analyse, les analyses doivent pouvoir identifier l'agent causal et le résultat positif doit être transmis au système de surveillance de la province. Il est donc important de réaliser que les chiffres obtenus sont très probablement sous-estimés (Thomas *et al.*, 2013). En effet, comme plusieurs infections par *Salmonella* ne causent pas de symptômes nécessitant une visite à l'hôpital, les salmonelloses sont très probablement sous-diagnostiquées et, dans une plus faible proportion, peuvent être sous-déclarées par les professionnels de la santé (MacDougall *et al.*, 2008). Pour pallier ces problèmes, un modèle corrigeant pour le sous-diagnostic et la sous-déclaration a été mis au point. En utilisant ce modèle et pour des données collectées entre 2000

et 2010 il a été estimé que les *Salmonella* non-thyphoïdes étaient en 2006 la quatrième cause de toxi-infections alimentaires (87 500 cas ou 5 %) et que ces toxi-infections sont la deuxième cause d'hospitalisation (925 cas ou 24 %) et la troisième cause de décès (17 ou 16 %) (Thomas *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2015a). Alors qu'entre 2009 et 2013, une moyenne de seulement 6 500 cas de salmonelloses ont été rapportés annuellement au Canada démontrant bien l'écart entre les données confirmées et les estimations du réel nombre. Au Québec, *Salmonella* est la première cause de toxi-infection alimentaire confirmée par un diagnostic médical, un isolement dans l'aliment ou une enquête épidémiologique avec 24 cas sur un total de 183 (MAPAQ, 2017). Encore une fois, ces résultats sont très probablement sous-estimés et donc à voir d'un œil critique. Pour ce qui est des pertes économiques associées à cette bactérie, aux États-Unis il a été évalué qu'en 2013, plus d'un million de cas, ayant engendré près de 74 000 visites chez un médecin, 20 000 hospitalisations et 378 morts ont mené à des pertes économiques de 3,7 milliards de dollars en soins de santé, perte de productivité et morts prématurées (US Department of Agriculture, 2014). Ce qui fait de *Salmonella* la première cause de pertes économiques associées aux toxi-infections alimentaires dans ce pays.

Comme mentionné précédemment, les sources de ces infections sont multiples. Il peut donc être difficile de déterminer l'origine réelle des infections par *Salmonella* et la proportion de ces infections qui peut être attribuée à chacune de ces sources. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour tenter de répondre à cette question, par exemple par méthodes de sous-typages microbien, d'évaluations comparatives des risques, de sollicitations d'expertise et d'études cas-témoins. Ces méthodes ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients et doivent être choisies en fonction des données disponibles et des questions auxquelles on veut répondre (Mughini-Gras *et al.*, 2019). Cependant, les résultats obtenus par ces méthodes sont sensibles à différents biais qui peuvent donner un poids disproportionné à certaines sources. Finalement, la multitude de méthodologies tant dans l'acquisition des données que dans leur analyse rend la comparaison entre ces différentes études souvent très difficile. En Europe, dans une étude basée sur le sous-typage microbien, il a été estimé que les porcs sont la deuxième source la plus importante de contamination par *Salmonella* avec 26,9 % des cas rapportés derrière les poules pondeuses avec 43,8 % (Pires *et al.*, 2011). Dans cette même étude lorsque l'attribution de cas était basée sur les

éclosions ont obtenu plutôt 65,05 % des cas associés à la consommation d'œufs et 8,25 % à la consommation de porc (Pires *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2014). Pour ce qui est des sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les salmonelloses humaines, dans le dernier rapport de l'EFSA, on affirmait que les plus fréquemment retrouvés étaient *S. Enteritidis* (49,1 %) qui sont le plus souvent présents chez la volaille. Ce sérotype était suivi de *S. Typhimurium* (13,4%) et du variant monophasique 1.4.[5].12:i:- de *S. Typhimurium* (8 %) qui sont associés à une grande variété de sources (EFSA, 2018). Aux États-Unis, la contamination par la consommation de porc venait plutôt en troisième place, tant au niveau du nombre de cas avec 9 % derrière la volaille (30 %) et les œufs (24 %), qu'au niveau des pertes économiques (Gould *et al.*, 2013; Scharff, 2020). Comme en Europe, les cas rapportés étaient principalement causés par le sérotype Enteritidis (16,6 %), mais étaient suivis de Newport (10,1 %) et de Typhimurium (9,8 %) (National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), 2018). Pour ce qui est du Canada, les sérotypes les plus fréquemment identifiés par Foodnet Canada étaient *S. Enteritidis* (56 %) et Typhimurium (7 %) pour les deux premières places. Cependant, contrairement aux résultats obtenus en Europe, le troisième sérotype le plus fréquent était *Salmonella* Heidelberg (3 %) (Foodnet Canada, 2018). Pour ce qui est de la source des infections par *Salmonella* au Canada, on a estimé par sollicitation d'experts qu'entre 6 et 7 % des salmonelloses sont causées par la consommation de porc (Davidson *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2016). Une étude, faisant le recensement des éclosions où la source et l'agent causal étaient tous deux identifiés entre 1975 et 2005, n'a pu identifier que huit éclosions associées à la viande de porc pour seulement 1 % des éclosions de salmonelloses (Ravel *et al.*, 2009). Il est important de noter que dans l'étude canadienne, les aliments complexes préparés et qui pourraient potentiellement contenir du porc sont classés dans une catégorie séparée qui compte pour 24 % des éclosions de salmonelloses. Ceci pourrait être un facteur qui explique les différences entre les résultats élevés obtenus en Europe et ceux du Canada.

***Salmonella* chez le Porc**

Il est généralement accepté que les porcs sont majoritairement infectés par *Salmonella* par voie orale suite à l'ingestion de matière fécale lorsqu'ils entrent en contact avec un environnement ou un autre porc contaminé (Boyen *et al.*, 2008). Il apparaît que le tractus respiratoire supérieur soit aussi une porte d'entrée possible pour le pathogène (Oliveira *et al.*, 2006).

Chez le porc la majorité des infections par *Salmonella* sont asymptomatiques. Cependant, certains sérotypes spécifiques peuvent causer la salmonellose. Le sérotype Choleraesuis, qui est adapté au porc, peut causer des salmonelloses septicémiques principalement chez les porcs de moins de cinq mois. C'est une maladie systémique sévère caractérisée par de la léthargie, de l'inappétence et de la fébrilité avec des températures allant jusqu'à 41,6°C. Ces signes peuvent aussi être associés à une toux superficielle et humide. De plus, de la diarrhée peut apparaître après trois à quatre jours. La mortalité associée à *Salmonella* Choleraesuis est élevée allant jusqu'à 100% alors que la morbidité est variable et est normalement de moins de 10% mais ce sérotype est absent au Canada depuis plusieurs années (Griffith, 2019).

La majorité des infections causant des salmonelloses chez le porc sont causées par les sérotypes ubiquitaires Typhimurium et *S. enterica* 1,4,[5],12:i:-. Ces sérotypes causent chez le porc une diarrhée liquide, jaune et fétide ne contenant ni sang ni mucus et qui dure entre trois et sept jours. Ces épisodes de diarrhées peuvent se répéter deux à trois fois et la maladie peut se propager en quelques jours à toute la ferme. Cette diarrhée est normalement autolimitante. La majorité des porcs retrouvent leur état normal, mais certains peuvent tout de même rester porteurs et excréteurs pendant une période allant jusqu'à cinq mois. Ce sérotype peut cependant aussi mener à des septicémies et causer jusqu'à 4 % de mortalité en engraissement (Bergeron *et al.*, 2010; Griffith, 2019). Cette surreprésentation de *S. Typhimurium* dans les cas cliniques relevés en élevage semble surtout due à la forte prévalence de ce sérotype dans cette production plutôt qu'à des caractéristiques de virulence particulières portées par ce sérotype (Bergeron *et al.*, 2010).

Donc, excepté *S. Choleraesuis* et *S. Typhimurium*, les autres sérotypes sont plutôt portés asymptomatiquement au niveau des amygdales, du système digestif et des tissus lymphoïdes associés au tube digestif. Dans une étude canadienne menée en Alberta et en Saskatchewan les sérotypes les plus souvent excrétés par les porcs étaient *Salmonella* Derby, *S. Typhimurium* var. Copenhagen et *S. Putten* (Wilkins *et al.*, 2010). En Europe, d'après un rapport de 2018, c'est plutôt le variant monophasique de *Salmonella* Typhimurium qui est le plus fréquemment retrouvé chez le porc, suivi de *S. Typhimurium* (EFSA, 2018). Comme discuté précédemment, le sérotype

Typhimurium est l'un des plus fréquemment retrouvés dans les salmonelloses humaines tant en Europe et aux États-Unis qu'au Canada.

Épidémiologie de *Salmonella* dans la filière porcine

À la ferme

À la ferme, trois sources principales ont été identifiées comme contribuant à la contamination des porcs par *Salmonella* : l'exposition à d'autres porcs déjà contaminés, l'ingestion de nourriture contaminée et l'exposition à *Salmonella* déjà présente dans l'environnement.

Transmission par d'autres animaux contaminés

Dès le début de la production, certaines études ont démontré une possible contamination des porcelets par transmission directe de la truie ou en entrant par contact avec l'environnement de mise bas contaminé par celles-ci (Funk *et al.*, 2001; Belœil *et al.*, 2004; Nollet *et al.*, 2005b). En effet, il a été démontré que les truies peuvent être fréquemment contaminées avec 52,5 % des troupeaux reproducteurs contaminés en Europe (EFSA, 2009) et qu'elles ont un risque plus élevé d'excréter *Salmonella* que les animaux en pouponnière ou en engraissement (Wilkins *et al.*, 2010). Cette excrétion se fait aussi de façon variable à différents moments de la vie de la truie. Certaines études menées dans des fermes de type naisseur-finisseeur ont montré une augmentation significative de l'excrétion des truies sept jours après le sevrage des porcelets ou lors de l'insémination (Nollet *et al.*, 2005a; Lynch *et al.*, 2018). Dans ces études, cette augmentation était imputée au stress associé au déplacement des truies après le sevrage, aux changements hormonaux liés à l'ovulation et à l'œstrus, ainsi qu'à l'hygiène souvent plus faible de la zone d'insémination (Lynch *et al.*, 2018). Une autre étude menée dans un système de production multisite a plutôt démontré une augmentation de l'excrétion dans la dernière partie de la gestation (Funk *et al.*, 2001). Ceci suggère un potentiel important de dissémination de la contamination provenant des truies vers les animaux des étapes suivantes de la production (EFSA, 2009). Par exemple, la mauvaise hygiène de la salle de mise bas est un facteur de risque associé à l'excrétion des animaux en fin d'engraissement dans un système naisseur-finisseeur (Belœil *et al.*, 2004). En effet, dans cette étude le risque pour un lot de porcs d'excréter *Salmonella* en fin de production augmentait lorsque les fosses sous les parcs n'étaient pas vidées entre les lots ou que la matière fécale des truies n'était pas éliminée au moins une fois par jour lors de la lactation. Ceci suggère un possible impact des matières fécales de la truie dans la contamination initiale des

porcelets. De plus, les animaux qui sont nés de truies contaminées ou qui sont nés dans une cage de mise bas contaminée ont plus de chance d'excréter *Salmonella* plus tard dans leur vie que les porcelets dont la mère et l'environnement sont négatifs (Funk *et al.*, 2001). Un lien a aussi été démontré entre la séropositivité des truies et la contamination des porcelets au sevrage (Kranker *et al.*, 2001). Malgré tout, le transfert direct entre la truie et le porcelet après la naissance reste encore controversé. Plusieurs études ont plutôt démontré que cette transmission n'est pas une source principale de contamination chez les animaux en finition. Par exemple, il a été démontré dans l'étude de Lynch *et al.* qu'aucune des souches retrouvées chez les truies ne correspondait aux souches retrouvées chez les porcelets sous la mère. Elles étaient surtout liées à celles de l'environnement (Lynch *et al.*, 2018). Ces résultats sont en opposition avec une étude de modélisation de la transmission de *Salmonella* qui prévoyait plutôt que le niveau de contamination de l'environnement des parcs était trop faible pour causer l'infection et que la source la plus importante de contamination des porcelets provenait plutôt de truies super-excrétrices (Hill *et al.*, 2016). Malgré les résultats discordants, il semble que les truies puissent être une source importante de *Salmonella* dans certains systèmes de production.

Les animaux contaminés dans les premières étapes de la production peuvent aussi être une source de contamination pour leurs congénères. Ainsi, plusieurs études ont décrit que l'achat d'animaux de troupeaux contaminés et leur introduction dans un nouveau troupeau est une source de contamination pour les animaux sains. Il a été observé que le fait d'obtenir des porcs de multiples sources augmentait significativement le risque de contamination des animaux (Lo Fo Wong *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2007). De plus, il a été documenté que cette contamination entre les animaux peut survenir par contact de museau à museau. Il a aussi été démontré que les porcs qui ont la possibilité d'avoir des contacts museau à museau avec ceux de parcs voisins ont une chance plus élevée d'être séropositifs pour *Salmonella* (Lo Fo Wong *et al.*, 2004) et une plus haute prévalence de contamination (Wilkins *et al.*, 2010). Ceci démontre bien la possibilité des animaux préalablement contaminés de transmettre directement l'infection par *Salmonella* à leurs congénères en plus de contaminer l'environnement de la ferme par leurs fèces.

Autres animaux et insectes vecteurs

Comme *Salmonella* a la capacité de contaminer un large spectre d'espèces animales, les animaux sauvages ou domestiques qui peuvent entrer en contact avec les porcs de la ferme sont de possibles vecteurs de *Salmonella*. Ces animaux peuvent être responsables de l'introduction ou du maintien de *Salmonella* dans la ferme. Certaines études ont démontré que la présence d'animaux domestiques sur la même ferme que des porcs en finition était associée à une augmentation de la prévalence de *Salmonella*. Des études ont aussi démontré que les chats résidant sur les fermes peuvent excréter *Salmonella* tout comme les rats, les oiseaux sauvages et toutes autres espèces sauvages (Barber *et al.*, 2002; Horton *et al.*, 2013). Il a aussi été démontré dans plusieurs études que les souris et les rats retrouvés dans la ferme peuvent être infectés par les mêmes sérotypes de *Salmonella* que les porcs à de hauts niveaux (46,2 %). Ceci suggère qu'ils sont possiblement responsables du maintien de *Salmonella* dans la ferme (Sara *et al.*, 2014). Pour ce qui est des oiseaux présents autour des fermes, cette même étude a détecté une prévalence d'infections par *Salmonella* de plus de 20 % associée à des souches liées habituellement aux oiseaux, mais aussi aux porcs présents dans ces fermes (Sara *et al.*, 2014). Finalement, les invertébrés qui sont retrouvés dans les bâtiments de ferme peuvent aussi être vecteurs de contamination. Il a été démontré que les insectes tels que les mouches, les coquerelles et les coléoptères présents dans la ferme peuvent être vecteurs passifs mais animés de *Salmonella*. Ceux-ci ne peuvent être colonisés par la bactérie mais peuvent la transporter de façon transitoire au niveau du système digestif ou sur leur surface. Ainsi, une étude effectuée dans des fermes porcines de Taiwan a démontré la présence de souches de *Salmonella* ayant les mêmes profils PFGE sur les mouches et dans les fèces des porcs (Wang *et al.*, 2011).

Aliment

Les aliments qui entrent à la ferme peuvent aussi être une source de contamination des animaux. D'après l'EFSA en 2010, l'approvisionnement en nourriture contaminée est la seconde plus importante cause de contamination des animaux après l'introduction d'animaux déjà contaminés à la ferme (EFSA, 2010). Plusieurs modèles d'analyse du risque ont aussi mis en évidence la possible importance de ce facteur dans la contamination des porcs (EFSA, 2010; Jones *et al.*, 2019). Il a été rapporté que la nourriture qui est produite dans les meuneries peut être

contaminée par *Salmonella* et ainsi être une source potentielle de contamination à la ferme. Par exemple, en Suède, 14,6 % des échantillons de farine de soya et 10 % du colza utilisé dans la confection de nourriture pour les animaux de production étaient contaminés par *Salmonella* (Wierup et Häggblom, 2010). Dans une autre étude, l'environnement de 12 meuneries américaines était contaminé et 66,2 % des échantillons collectés étaient positifs à *Salmonella* (Magossi *et al.*, 2019). De plus, des souches des *Salmonella* retrouvées dans l'aliment peuvent aussi être présentes dans les matières fécales des porcs, montrant un lien entre l'aliment et la contamination des animaux (Molla *et al.*, 2010). Malgré tout, d'autres études ont semblé révéler que la contamination de la nourriture est plutôt faible et historiquement le lien entre la contamination des animaux ou des humains a été difficile à tracer (Magossi *et al.*, 2019). De façon similaire, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) en France conclut que la faible contamination des aliments et de leurs ingrédients et le faible niveau de contrôle des autres voies d'introduction de *Salmonella* dans la filière porcine, font de l'aliment une source possible d'introduction de ce pathogène, mais qui est cependant mineure (ANSES, 2018). Les résultats obtenus pourraient cependant être biaisés par la difficulté à récolter des échantillons significatifs. C'est-à-dire des échantillons qui vont permettre de représenter la contamination par *Salmonella* du volume total de la moulée échantillonnée. En effet, en plus d'être présente en moyenne à des niveaux de moins de 20 ufc / 100 g dans les ingrédients ou l'aliment complet, cette contamination n'est pas uniforme dans l'aliment (Jones, 2011). Il a donc été suggéré d'analyser jusqu'à 30 échantillons indépendants avant de confirmer le statut de l'aliment. Cette détection effectuée sur les poussières ou résidus de production de l'usine pourrait être plus sensible que la détection exécutée directement sur l'aliment (Davies et Wales, 2010; Jones, 2011).

Le risque associé à la contamination par l'aliment est aussi lié à sa présentation. Certains producteurs, particulièrement en Europe, utilisent une alimentation en soupe qui peut être fermentée et qui pourrait avoir des effets protecteurs contre *Salmonella*. Il a été démontré que lors de la fermentation, le pH de l'aliment peut diminuer sous 4,5 et que la concentration d'acide lactique peut monter au-dessus de 150 mmol/L, ce qui a pour effet de prévenir la multiplication de *Salmonella* dans l'aliment (van Winsen *et al.*, 2001). De plus, chez l'animal cet aliment réduirait

le pH principalement au niveau de l'estomac et modifierait le microbiote intestinal, ce qui pourrait augmenter la résistance à *Salmonella* (van Winsen *et al.*, 2001; Højberg *et al.*, 2003; Missotten *et al.*, 2015). Ces modifications sont liées à l'apport de souches probiotiques utilisées pour la fermentation de l'aliment tel que les *Bacillus* ou *Lactobacillus* mais aussi aux métabolites produits pendant la fermentation (par exemple : acides organiques, acides gras à courtes chaînes, enzymes, molécules antibactériennes) (Wang *et al.*, 2018). Pour ce qui est de la moulée cubée, qui est la plus fréquemment utilisée au Québec, le processus de cubage qui nécessite l'application de vapeur à haute température pourrait aussi avoir un effet réducteur sur la présence de *Salmonella*. Il a été prouvé que lorsque des températures de plus de 85°C étaient appliquées pendant au moins une minute à cette étape, *Salmonella* était éliminée (Jones et Richardson, 2004). Cette présentation de l'aliment est malgré tout la plus associée à l'excrétion et à la séropositivité à *Salmonella* chez les animaux (Lo Fo Wong *et al.*, 2004; Lebel *et al.*, 2017). Finalement, l'aliment peut aussi être présenté sous forme d'une moulée texturée. Dans plusieurs études, l'aliment sous cette forme a été lié à une plus faible excrétion de *Salmonella* bien que d'autres études aient démontré qu'il était plus contaminé que les autres types de moulées (Veldman *et al.*, 1995; Jones et Richardson, 2004; Alali et Ricke, 2012; Wilhelm *et al.*, 2012; Lebel *et al.*, 2017). Son effet protecteur pourrait être lié aux modifications du microbiote que la consommation de cette nourriture entraîne (Lebel *et al.*, 2017). De façon similaire, les aliments de plus grosse granulométrie, qu'ils soient cubés ou texturés, ont aussi un effet protecteur pour le système digestif en général mais aussi contre *Salmonella* et est lié à la modification du microbiote (Lebel *et al.*, 2017). En effet, les animaux nourris d'aliments ayant des particules de plus grosse taille ont une meilleure intégrité de la muqueuse stomacale (réduction des ulcères et de l'hyperkératose) et une meilleure structure au niveau du petit intestin et du côlon (cryptes plus profondes, villosités plus longues et épaisseur de l'épithélium réduit) (Brunsgaard, 1998; Morel et Cottam, 2007; Vukmirović *et al.*, 2017). De plus, le transit plus lent de ces aliments dans l'estomac et la plus grande quantité de matière sèche permet la promotion de l'activité microbienne au niveau gastrique et donc la production d'acides ayant un effet un protecteur contre *Salmonella* (Mikkelsen *et al.*, 2004). Au niveau de l'intestin, cet effet pourrait aussi être associé à la moins bonne digestibilité de l'aliment qui permet à un plus grand nombre de

carbohydrates d'atteindre l'intestin et de stimuler ainsi le microbiote rendant le milieu inhospitalier pour *Salmonella* (Lo Fo Wong *et al.*, 2004).

Environnement de la ferme

Comme il a été mentionné précédemment, plusieurs vecteurs tels que les porcs, la vermine et les aliments peuvent participer à l'introduction de *Salmonella* dans l'environnement de la ferme. La bactérie peut être extrêmement difficile à déloger après son entrée. Il est bien connu que *Salmonella* peut survivre pendant de longues périodes dans l'environnement de la ferme (jusqu'à six ans) et qu'il est très difficile de l'éliminer par les processus de lavage et de désinfection couramment utilisés en production. Cette capacité à survivre dans les fermes fait de l'environnement la source principale de contamination des animaux. Dans une ferme conduisant la production sous le système tout plein/tout vide (en bandes strictes) le protocole de lavage désinfection consiste à 1) laver l'environnement à l'aide d'eau sous-pression pour retirer le plus gros de la matière organique, 2) appliquer un détergent en lavant à l'eau sous-pression pour terminer de retirer la matière organique, 3) appliquer un désinfectant, 4) laisser les surfaces sécher (Argüello *et al.*, 2012; Walia *et al.*, 2017). Malgré l'application de ce protocole il a été démontré dans plusieurs études que *Salmonella* peut persister. En effet, il a été décrit qu'à la ferme, les surfaces irrégulières qui contiennent des trous rendent difficile la pénétration des désinfectants (Madec *et al.*, 1999). De plus, dans ces sites *Salmonella* peut produire des biofilms qui rendent l'action des désinfectants encore plus difficile (Marin *et al.*, 2009). Ainsi, plusieurs études ont démontré que même après le protocole de lavage et désinfection, l'environnement est souvent contaminé. Par exemple, dans une étude sur 36 fermes d'engraissement de type tout plein/tout vide, 22 % des locaux étaient toujours contaminés après lavage et désinfection, et les surfaces les plus contaminées étaient les planchers et les murs des parcs (Argüello *et al.*, 2011). De façon similaire une étude allemande avec les mêmes objectifs a montré des contaminations de 22 % des planchers, de 28 % des murs des parcs et de 32 % des couloirs centraux. Une autre étude a démontré jusqu'à 80 % de contamination des parcs après lavage et désinfection (Gotter *et al.*, 2012a). En plus des surfaces qui sont fréquemment contaminées, l'équipement de la ferme tel que les bottes, les jouets pour les porcs ou les planches utilisées pour déplacer les porcs sont

souvent contaminés et sont une source de contamination souvent sous-estimée (Gotter *et al.*, 2012a).

Au Canada, les dernières études sur la contamination des fermes porcines par *Salmonelle* datent de plusieurs années et ont démontré une contamination variant de 40 à 60 % des fermes de finition en Alberta et en Ontario (Rajic *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2008). Une étude portant sur l'entièreté du territoire européen a quant à elle démontré une contamination de 33 % des fermes avec une forte variation entre états membres (0-55,7 %) (EFSA, 2009). Pour ce qui est des porcs individuels à la ferme, une étude canadienne récente a détecté une excrétion chez 35 % des animaux du sevrage à l'engraissement (Ainslie-Garcia *et al.*, 2018). Dans cette même étude, les auteurs ont démontré une augmentation de l'excrétion de la pouponnière à l'engraissement passant de 10,5 % de porcs excréteurs au sevrage à 20,2 % en finition. Des prévalences légèrement plus élevées avaient précédemment été mesurées en Alberta et en Saskatchewan où 29 % des porcelets à la pouponnière et 28 % des porcs en engraissement excrétaient *Salmonella* (Wilkins *et al.*, 2010). Les résultats qui ont été obtenus dans l'étude de Ainslie-Garcia et al. en 2018, où l'excrétion est la plus élevée en finition sont différents de ceux d'autres études où le niveau le plus élevé d'excrétion était plutôt au niveau de la pouponnière et diminuait avec le temps (Kranker *et al.*, 2003; Vigo *et al.*, 2009). Ces dernières études ont cependant été effectuées dans des fermes de type naisseur-finiisseur alors que l'étude canadienne suit des porcs élevés dans un système multisite. Une hypothèse qui pourrait expliquer les disparités dans ces études est le déplacement des animaux vers des sites contenant de nouvelles souches de *Salmonella* dans les systèmes multisite qui pourrait être responsable de l'augmentation de la contamination mesurée dans l'étude canadienne.

Détection de *Salmonella*

De multiples méthodes ont été développées puis standardisées pour la détection de *Salmonella* à partir de différents types d'échantillons tels que les matières fécales, l'environnement et les aliments. Ainsi certaines des méthodes les plus utilisées dans le monde sont celles de la Food and Drugs Administration (Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5) (U.S. Food and Drug Administration, 2012) et du Department of Agriculture (MLG4.10) (US Department of Agriculture, 2017) aux États-Unis, les méthodes MFHPB-20 et MFLP-75 du gouvernement du Canada (Pope *et al.*, 2004; Reid, 2009) et la méthode ISO 6579-1 :2017 utilisée dans l'Union européenne (ISO, 2017).

Échantillons

Premièrement, pour ce qui est de la collecte des échantillons, presque toutes ces méthodes standard recommandent l'utilisation de 25 g de matrice comme unité d'analyse (Reid, 2009; U.S. Food and Drug Administration, 2012; ISO, 2017). La taille de l'échantillon peut cependant varier par rapport à la matrice et au niveau de contamination initiale attendue, allant par exemple jusqu'à 100 g dans les cas où cette concentration est faible. En effet, il semble que dans certains contextes, l'utilisation d'échantillons d'un volume plus élevé peut être pertinente pour obtenir une meilleure sensibilité. Par exemple, pour l'isolement de *Salmonella* à partir de fèces de porcs, il a été démontré que la taille de l'échantillon peut avoir un effet important. Une étude a mesuré une augmentation de la détection de *Salmonella* dans les matières caecales de porc, passant de 25 % d'échantillons positifs lorsque 1 g était utilisé à 32 % pour des échantillons de 10 g (Champagne *et al.*, 2005). De façon similaire, une autre étude a démontré une augmentation de la sensibilité relative lorsque l'on augmentait la taille de l'échantillon de 1 g à 25 g, passant de 22 à 78 % (Funk *et al.*, 2000). Comme la sensibilité relative des échantillons de 25 g n'était que de 78 % on peut aussi conclure qu'une augmentation supplémentaire de la taille des échantillons, par exemple jusqu'à 100 g, pourrait permettre une meilleure détection de toutes les *Salmonella*. Ces auteurs précisent aussi que cet effet est possiblement plus important chez les animaux qui sont porteurs chroniques puisque ceux-ci n'excrètent pas *Salmonella* en grande quantité contrairement aux animaux ayant une infection aiguë. L'augmentation de taille des échantillons

est cependant liée à certaines contraintes. En effet, il n'est pas toujours possible de récolter des échantillons de large volume, par exemple dans le cas des matières fécales d'animaux de petite taille comme les porcelets. De plus, la manipulation d'échantillons ayant un grand volume peut être fastidieuse au laboratoire.

Pré-enrichissement

Les méthodes standard relevant de l'hygiène alimentaire débutent par une étape de pré-enrichissement dans un bouillon nutritif non sélectif. Ceci permet d'augmenter la présence relative de *Salmonella* dans les échantillons où la présence de bactéries totales est élevée, mais où le nombre de *Salmonella* est faible comme au niveau des fèces des animaux porteurs asymptomatiques. Cependant cette étape n'est pas nécessaire lors de l'isolement dans les échantillons de cas cliniques, comme dans les organes pour lesquels la charge des autres bactéries est faible ou encore dans les fèces où la présence de *Salmonella* est élevée. Le réel mécanisme de cette étape est peu connu et est considéré comme une « boîte noire ». Il a été suggéré qu'elle permettrait la récupération des cellules endommagées et la prolifération de *Salmonella* à des niveaux détectables (Jacobson *et al.*, 2017). Dans une étude récente sur l'évolution du microbiote fécal dans du bouillon Brucella, il a été démontré que lors du pré-enrichissement, la croissance de bactéries compétitrices était réduite, alors que la compétitivité de *Salmonella* était augmentée (Langlais *et al.*, 2019). Lors de cette étape, les méthodes du gouvernement du Canada et ISO prescrivent une dilution de l'échantillon dans un ratio 1:10 dans l'eau peptonée tamponnée suivie d'une incubation de 24h à 35°C pour la méthode canadienne et entre 34 et 38°C pour la méthode ISO (Reid, 2009; U.S. Food and Drug Administration, 2012; ISO, 2017).

Enrichissement sélectif

Suite au pré-enrichissement, une étape d'enrichissement sélectif est effectuée. Dans toutes les méthodes, on recommande l'utilisation de deux types de milieux (Reid, 2009; U.S. Food and Drug Administration, 2012; ISO, 2017; US Department of Agriculture, 2017).

Premièrement un milieu utilisant la capacité de *Salmonella* à utiliser le tetrathionate comme accepteur final d'électron et qui permet donc la respiration de celle-ci dans un bouillon en

absence d'oxygène (Winter *et al.*, 2010). Ceci lui permet donc de croître plus rapidement que le reste des bactéries présentes dans le milieu.

Le deuxième type de milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la détection de *Salmonella* est basé sur le bouillon Rappaport-Vassiliadis (RV). Ce milieu utilise cinq caractéristiques de *Salmonella* qui vont permettre sa sélection positive. Ces caractéristiques sont sa capacité à survivre à des pressions osmotiques relativement élevées, sa capacité de se multiplier à des pH relativement faibles (pH 5,2), sa résistance au vert de malachite, ses faibles besoins en nutriments et sa capacité à croître à 41°C (Oxoid; Atlas, 2010). Une version modifiée de ce milieu nommé Modified Semi-Solide Rappaport-Vassiliadis (MSRV) est aussi fréquemment utilisée. Ce milieu a une composition très semblable au milieu RV classique auquel on ajoute de l'agar pour obtenir un milieu semi-solide (Worrcman-Barninka *et al.*, 2001; Atlas, 2010). Ainsi, après l'inoculation d'une goutte de bouillon de pré-enrichissement sur la gélose, les *Salmonella* mobiles migreront à la surface de ce milieu semi-solide et formeront un halo opaque. En plus d'être sélectif, ce milieu est donc différentiel, ce qui permet une identification rapide des échantillons possiblement positifs comparativement aux milieux en bouillons classiques. Un des désavantages de l'utilisation de la gélose MSRV est cependant que ce milieu donnera un résultat négatif pour les *Salmonella* non motiles, qui restent cependant peu fréquentes (Le Hello *et al.*, 2012).

La majorité des protocoles prescrivent l'utilisation des milieux basés sur les bouillons RV et TT en parallèle. Cependant, pour les échantillons de matière fécale, la méthode ISO recommande depuis 2017, l'utilisation du milieu MSRV seulement avec deux incubations de 24h à 42°C (ISO, 2017). Cette méthode est similaire à la méthode MFLP-75 du gouvernement canadien qui décrit la procédure d'isolement de *Salmonella* à l'aide de la gélose MSRV (Poppe *et al.*, 2004).

Géloses sélectives et différentielles

Après l'enrichissement sélectif, les échantillons sontensemencés sur des géloses sélectives et différentielles. Les méthodes officielles recommandent toutes l'utilisation d'au moins deux géloses en parallèle de façon à identifier les *Salmonella* qui pourraient avoir des caractéristiques phénotypiques non typiques. Les milieux recommandés sont très variables d'une méthode à l'autre.

Pour la méthode canadienne mfhpb-20, au moins deux milieux doivent être sélectionnés parmi les géloses suivantes : Bismuth Sulfite (BS), Brilliant Green Sulfa (BGS) agar et Brilliance *Salmonella* Agar. Ces géloses sont recommandées puisqu'elles sont considérées par le gouvernement canadien comme ayant été étudiées de façon extensive (Reid, 2009).

Les géloses BG (brilliant green agar) et BGS (brilliant green sulfa agar) sont des géloses hautement sélectives qui contiennent du vert brillant qui inhibe les bactéries Gram positif et une majorité des Gram négatif et qui permettent aussi de différencier les bactéries par leur utilisation du lactose (Oxoid; Atlas, 2010). Comme les *Salmonella* sont habituellement lactose négatif, elles pourront être identifiées sur la gélose. Ces géloses sont hautement sélectives et il est recommandé de les utiliser en combinaison avec une autre gélose moins inhibitrice.

La gélose BS (bismuth sulfite agar) est aussi approuvée par le gouvernement canadien. Ce milieu comme les géloses BG contient lui aussi du vert brillant comme inhibiteur, mais contient en plus du sulfite de bismuth. Contrairement aux géloses BG cette gélose utilise la production par *Salmonella* d'H₂S comme caractéristique différentielle. Cette gélose est aussi obligatoirement utilisée dans la méthode de la FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2012).

Finalement, la méthode canadienne recommande la gélose Brilliance *Salmonella* Agar qui est un milieu chromogénique et hautement sélectif (Oxoid; Reid, 2009; Atlas, 2010). Ce milieu contient tout d'abord une molécule nommée Inhibigen qui est composée d'un substrat enzymatique et d'une molécule inhibitrice, de la novobiocine et de la cefsulodine. Pour ce qui est de la différenciation des *Salmonella* sur le milieu, deux molécules chromogènes sont utilisées. Celles-ci ont comme cible les enzymes caprylate esterase et β -glucosidase. La caprylate esterase est présente chez toutes les *Salmonella*, mais aussi certaines espèces de *Klebsiella*, d'*Enterobacter* et de *Proteus*. Pour ce qui est de la β -glucosidase, elle est présente chez certaines *Enterobacteriaceae* comme les *Klebsiella* et les *Enterobacter*, mais pas chez *Salmonella*. L'avantage principal de l'utilisation de milieux chromogéniques pour la détection de *Salmonella* est sa plus grande spécificité permettant de réduire le recours à de multiples tests de confirmation sur des colonies qui sont de possibles faux positifs (Perry, 2017). Ces milieux ne semblent cependant pas plus sensibles que les milieux classiques (Martiny *et al.*, 2016).

Un des milieux que l'on utilise aussi fréquemment, et qui est obligatoire dans la méthode ISO adoptée en Europe et la méthode de la FDA, est la gélose XLD.

Les géloses xylose lysine desoxycholate (XLD) et xylose lysine tergitol-4 (XLT-4) utilisent le même principe pour isoler et identifier les possibles *Salmonella* (Oxioid; Oxoid; Atlas, 2010). Les *Salmonella* présentes sur la gélose, comme la presque totalité des autres entérobactéries, peuvent utiliser le xylose. Cependant, *Salmonella* est différenciée sur la gélose par son inhabilité à utiliser le lactose et le sucrose présents dans le milieu et par sa production H₂S. La gélose XLD contient aussi du desoxycholate qui inhibe la croissance des bactéries Gram positif alors que la gélose XLT-4 contient plutôt du tergitol-4 qui inhibe toutes les bactéries Gram positif et les moisissures en plus d'inhiber plusieurs Gram négatif incluant *Proteus*, *Providencia* et *Pseudomonas*. Comme certaines souches de *Salmonella* ne produisent pas de H₂S, il est recommandé dans la méthode ISO d'utiliser ce milieu en combinaison avec un autre milieu n'utilisant pas cette caractéristique comme facteur différentiel (ISO, 2017).

Confirmation

Après l'isolement de colonies typiques sur géloses sélectives, plusieurs tests biochimiques sont utilisés pour confirmer le genre *Salmonella*. Dans la méthode canadienne, trois de ces tests sont recommandés soit les tests TSI (Triple sugar iron agar), LIA (Lysine iron agar) et urée de Christensen (Reid, 2009). Finalement, la dernière étape de l'isolement de *Salmonella* est la confirmation par sérotypage qui est basé sur la classification Kauffman-White (Reid, 2009; U.S. Food and Drug Administration, 2012).

Biais

Malgré l'existence de plusieurs méthodes standard reconnues, des biais associés aux différents milieux utilisés dans la détection de *Salmonella* ont été mis en évidence (Gorski, 2012). En effet, il semble que certains sérotypes aient plus de facilité à croître dans certains milieux. Gorski et al. en 2012 ont émis l'hypothèse que les différences de sérotypes isolés sur différentes matrices et utilisant des protocoles différents pourraient être associées aux biais liés à ces méthodes. Des auteurs ont aussi discuté du fait que la sélection de multiples colonies pourrait être importante pour la description de la diversité dans le cas d'échantillons contenant plusieurs sérotypes

différents (Cox *et al.*, 2020). Dans une autre étude on a aussi démontré qu'en plus d'augmenter la sensibilité, la multiplication des milieux d'enrichissement utilisés, permettait l'isolement de souches de différents sérogroupes dans un même échantillon (Love et Rostagno, 2008). Il semble que ce soit la meilleure méthode pour augmenter la possibilité des populations minoritaires moins bien adaptées à émerger et donc en faciliter leur détection. Ils soulignent aussi l'importance, dans les études tentant de décrire la diversité de *Salmonella*, d'adapter des méthodes utilisant de multiples milieux de culture et de sélectionner de multiples colonies sur ces milieux de façon à permettre l'isolement de la plus grande diversité possible de souches présentes dans les échantillons traités.

Méthodes de séquençage à haut débit

C'est avec l'invention des techniques de culture anaérobie dans les années 1940 que l'exploration des communautés du microbiote a réellement pu commencer (Clark, 2019). On a alors tenté d'identifier et de mesurer la présence du plus grand nombre possible de micro-organismes différents dans une variété de niches écologiques en multipliant les milieux de culture (Mitsuoka, 2014). Cependant, cette méthode était longue et fastidieuse et ne permettait que l'identification de bactéries cultivables qui, on le sait maintenant, sont minoritaires dans plusieurs environnements. Dans les années 1990, vinrent les techniques basées sur la PCR. Tout d'abord l'invention de PCR en temps réel a permis de quantifier des bactéries qui étaient impossible à cultiver (Hermann-Bank *et al.*, 2013). Grâce à cette méthode on peut mesurer l'augmentation de la fluorescence liée à la présence d'ADN dans les échantillons à chaque cycle d'amplification PCR. Le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence liée à l'ADN dépasse le bruit de fond est comparé aux valeurs obtenues à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie. Ceci permet d'obtenir la concentration initiale de l'ADN cible dans l'échantillon et donc par exemple d'estimer la quantité d'une population bactérienne présente dans un échantillon étudié. Tout comme les études basées sur la culture, cette méthode ne permettait que de retrouver les bactéries qui étaient directement visées par les amorces sélectionnées en plus d'avoir une sensibilité réduite par sa haute limite de détection. Les méthodes par PCR ont ensuite évolué avec le développement d'amorces dites universelles visant le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et permettant d'amplifier l'ADN d'une très grande partie des bactéries présentes dans les divers environnements. Pour analyser ces résultats on a alors mis au point des techniques permettant de visualiser par électrophorèse sur gel ou capillaire ces communautés telles que le polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP), l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) ou le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (TRFLP) (Muyzer *et al.*, 1993; Hebenbrock *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997). À l'aide de ces techniques, on a alors pu vraiment comparer des écosystèmes bactériens complexes. Cependant, il nous était encore très difficile, voire impossible, d'attribuer les variations identifiées par ces méthodes à des populations précises. C'est cependant en 2005 avec la commercialisation de la première plateforme de séquençage à haut débit, le 454 de life

bioscience, que le domaine de l'étude du microbiote s'est réellement développé. Cette technique repose sur le principe du séquençage par synthèse qui est effectué par la détection de l'incorporation des nucléotides par la polymérase. Lors de l'incorporation du nucléotide, un pyrophosphate est libéré et mène à l'activation de la luciférine et donc l'émission de lumière. C'est la détection de cette émission lumineuse qui permet de déterminer la composition des différentes séquences. Cette technologie a permis une véritable révolution en permettant un séquençage rapide et relativement peu coûteux de millions de séquences en parallèle. Permettant ainsi une description rapide et beaucoup plus complète de la composition (taxons retrouvés) et de la structure (quantité de chacun des taxons) d'une multitude de microbiotes (Harrington *et al.*, 2013). L'apparition de cette technologie a permis de démontrer l'importance des microbiotes au niveau de la santé mais aussi de l'environnement notamment avec l'étude des microbiotes associés aux sols ou à l'océan. En moins de 30 ans, les méthodes moléculaires permettant d'étudier le microbiote ont donc fait des bonds de géant passant de l'étude de quelques types bactériens à des centaines en parallèle et sont toujours en constante évolution avec le développement de méthodes toujours plus précises, rapides et moins coûteuses à opérer.

La technique la plus fréquemment utilisée pour l'étude de la composition bactérienne d'un écosystème s'appuie sur le séquençage de régions variables du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S, préalablement amplifiées (Osman *et al.*, 2018). En effet, ce gène est retrouvé chez toutes les espèces bactériennes et de plus, contient neuf régions hypervariables espacées par des régions de séquences extrêmement conservées. Ces régions variables sont utilisées pour identifier les bactéries présentes dans le microbiote. Comme le gène complet de 1500 bp est trop long pour être séquençé dans sa totalité de façon pratique et économique, dans les expériences décrivant le microbiome, la plupart des méthodes d'analyse considèrent une seule ou une combinaison de nombre limité de ses régions variables. Le niveau taxonomique auquel cette identification peut aboutir avec précision est variable et dépend entre autres de la longueur du fragment séquençé, de la région choisie, mais aussi de la richesse des bases de données associant une séquence obtenue à une bactérie déjà rencontrée précédemment. Des études ont été effectuées pour déterminer les régions variables permettant la classification la plus sensible (se rapprochant le plus du séquençage du gène complet). Il n'y a cependant pas encore de consensus sur la ou les

régions de choix. En effet, certaines de ces études semblent démontrer que la section comprenant les régions variables V4-V5-V6 est la plus efficace pour représenter la totalité du gène (Yang *et al.*, 2016; Sperling *et al.*, 2017). D'autres études ont cependant obtenu des résultats différents démontrant, par exemple, que les régions V1 et V2 donnaient de meilleurs résultats (Guo *et al.*, 2013). Il semblerait que le choix de la meilleure région à séquencer dépende du type d'échantillon et de la question à laquelle l'expérience tente de répondre. Pour le moment, les régions les plus fréquemment utilisées dans les études de microbiote intestinal du porc sont les régions V3 et V4 qui donnent une bonne identification au niveau du genre. Jusqu'à présent, à cause des limitations techniques, c'est à ce niveau taxonomique que s'arrête la majorité des études de microbiotes.

Plusieurs technologies ont été développées pour le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S et peuvent être classifiées en trois catégories. Premièrement, les méthodes de première génération de type Sanger qui ont été développées à partir des années 1970 et qui ne permettaient le séquençage que d'une molécule d'ADN à la fois, rendant l'étude de microbiote complexe impossible. Puis les technologies de deuxième génération, développées à partir des années 2000, ont été les premières à permettre un séquençage à haut débit passant d'une à des millions de séquences en parallèle et permettant une révolution dans le monde de l'étude du microbiote. Ces méthodes ne peuvent séquencer que de courts fragments et nécessitent une amplification préalable d'un fragment de ce gène. Finalement, plus récemment on a vu l'émergence de technologies de troisième génération qui permettent le séquençage de longs fragments d'ADN permettant donc le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S complet et ne nécessitant pas d'amplification préalable.

Pyroséquençage/454 Roche

La technologie 454 a été la première technologie de séquence à haut débit à avoir été utilisée à grande échelle. Pour cette méthode, une PCR en émulsion est effectuée pour amplifier des fragments d'ADN liés, à l'aide d'adaptateurs, à la surface d'une bille isolée (Figure 1). Tout d'abord, des adaptateurs complémentaires de la séquence recouvrant les billes sont ajoutés aux gabarits à séquencer. En plus de ces adaptateurs, puisque le séquençage s'effectue en multiplex

où tous les échantillons seront mélangés, des séquences index permettant de déterminer leur appartenance sont aussi ajoutées, et ce, quelle que soit la technique de séquençage utilisée. Un mélange contenant l'ADN avec l'adaptateur et les billes en très grand excès est réalisé et une émulsion dans l'huile est effectuée. De cette façon, on obtient des gouttelettes ne contenant qu'un seul fragment d'ADN et qu'une seule bille. Ces gouttelettes agiront comme microréacteur PCR où chacune des réactions sera isolée. L'ADN est dénaturé pour obtenir de l'ADN simple brin qui s'attachera à la bille à l'aide de son adaptateur. Des cycles de PCR classiques seront ensuite effectués pour couvrir la bille du fragment qui lui est associé (Margulies *et al.*, 2005).

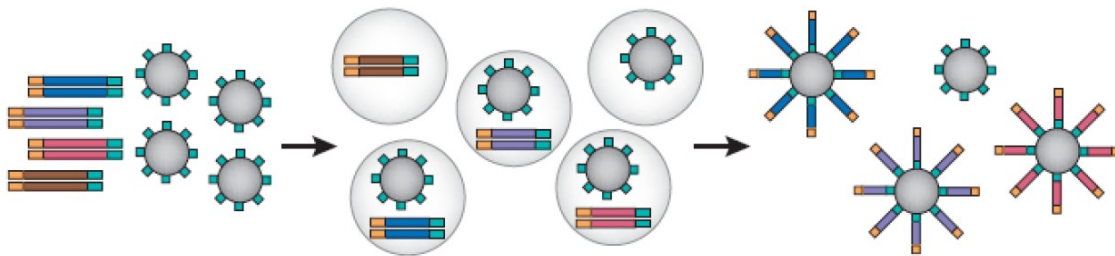


Figure 1. – Méthode de PCR en émulsion utilisé lors de la préparation du séquençage 454 et Ion-Torrent (adaptée de Leong *et al.*, 2015)

1) Les fragments d'ADN amplifiés et possédant des séquences adaptatrices (segments turquoise et jaunes entourant la séquence d'ADN) sont combinés avec des billes possédant une séquence complémentaire attachée à leur surface. 2) La réaction PCR se déroule dans les vésicules d'une émulsion d'eau dans l'huile. Chacune des gouttelettes ne contient qu'un fragment d'ADN en plus des réactifs nécessaires à l'amplification. 3) Lors de l'amplification les produits sont capturés sur les billes et chacune d'entre elles n'est couverte que d'une seule séquence. (Leong *et al.*, 2014)

Pour ce qui est du séquençage en tant que tel, les billes sont tout d'abord distribuées sur une puce contenant des micropuits. Une seule bille viendra se déposer dans chacun d'entre eux. Les puits sont ensuite remplis d'un autre type de billes qui sont couvertes des enzymes sulfurylase et lucyferase. Un mélange des amorces de séquençage, de polymérase, d'Adénosine 5'-

phosphosulfate (APS), de luciférine et d'apyrase est ajouté. Un premier type de dNTP (on utilise dATP α S qui n'est pas un substrat pour la luciférase) est alors ajouté. Si ce nucléotide est complémentaire à la séquence, il sera incorporé par la polymérase relâchant un pyrophosphate (PPi). En présence de la sulfurylase et d'APS ce PPi sera converti en ATP. Cet ATP permettra à la luciférase de convertir la luciférine en oxylucyferin, ce qui produira de la lumière qui sera captée par une caméra. L'intensité du signal correspond au nombre de nucléotides du même type incorporés lors du cycle. Les nucléotides supplémentaires seront dégradés par l'apyrase et le cycle sera repris avec le prochain type de nucléotide. (Margulies *et al.*, 2005)

Malgré sa capacité à séquencer de longs fragments 400 à 1000 pb, cette technologie n'est plus commercialisée depuis 2013 puisqu'elle n'est pas compétitive face aux nouvelles plateformes, plus rapides et moins coûteuses à opérer. De plus, cette technologie génère un taux d'erreur élevé dans les séquences homopolymériques. En effet, l'inclusion de plusieurs nucléotides du même type l'un après l'autre dans la séquence est mesurée par une augmentation du signal lumineux. Cependant, cette augmentation n'est pas linéaire et plafonne au-delà de quatre nucléotides identiques, rendant difficile la détermination de la longueur de ces séquences (Ivády *et al.*, 2018). Le taux d'erreur de cette technologie est estimé à 1 % des nucléotides (Kchouk *et al.*, 2017).

Life Technologies/ThermoFisher/Ion Torrent

La technologie Ion Torrent utilise sensiblement la même méthode de préparation des échantillons que pour le pyroséquençage où les fragments sont amplifiés sur des billes par PCR en émulsion et sont ensuite ajoutés sur une puce comportant des micropuits.

C'est cependant au niveau de la détection de l'incorporation des bases, lors du séquençage, que la technologie est différente. En effet, au lieu de détecter un signal lumineux, on mesure plutôt un changement de voltage (Figure 2). Un ion hydrogène est relâché à chaque incorporation de nouvelle base ce qui change le pH à l'intérieur du puits où est située la bille. Au fond de chacun de ceux-ci est situé un capteur qui convertit ce changement de pH en augmentation du voltage. Ce voltage est proportionnel au nombre de bases incorporées et l'addition séquentielle des

nucléotides individuels durant chaque cycle de séquençage permet la discrimination des bases (Rothberg *et al.*, 2011).

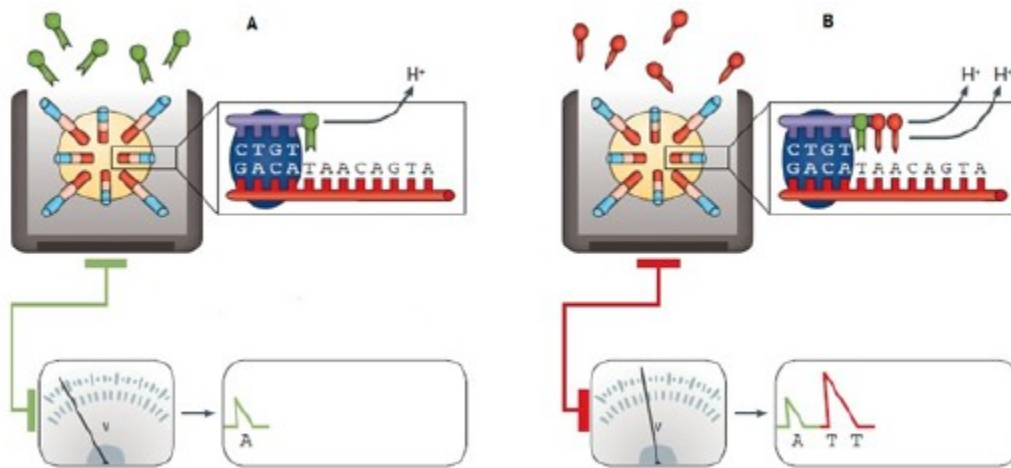


Figure 2. – Technique utilisée pour l'identification des bases dans le séquençage de type Ion-Torrent (adaptée de Goodwin *et al.*, 2016)

Après l'amplification sur billes, celles-ci sont déposées sur une microplaque couverte de puits dans lesquels se retrouvera une seule bille. Les différents nucléotides sont ensuite ajoutés de façon séquentielle et le changement de pH causé par la libération d'un ion H^+ lors de l'incorporation de la base est mesuré. A) L'ajout d'une arginine à la séquence cause une augmentation détectée par une augmentation de voltage. B) L'incorporation de deux thymines de suite dans la séquence cause la libération d'ions H^+ et donc une augmentation deux fois plus élevée du pH (Goodwin *et al.*, 2016).

Cette technologie supporte plusieurs puces ayant des rendements différents. Par exemple, la puce S5 530 permet l'obtention de 20 millions de séquences allant jusqu'à 600 bp alors que la puce S5 550 permet d'obtenir jusqu'à 130 millions de séquences d'une longueur maximum de 200 bp. Cette technologie comporte les mêmes limitations que le pyroséquençage 454 quant au séquençage des homopolymères et à son taux d'erreur (Feng *et al.*, 2016; Kchouk *et al.*, 2017).

Illumina

La société Illumina propose une approche permettant le séquençage à haut débit de type « paired-end ». Le processus de séquençage consiste tout d'abord en une amplification clonale

de fragments d'ADN liés par un adaptateur à la surface d'une lame de verre, nommée « bridge amplification » (Figure 3). Au préalable, des séquences terminales adaptatrices ont été ajoutées aux fragments à séquencer en plus des index par la réalisation de quelques cycles d'amplification. Ces séquences permettront aux fragments de s'attacher à la cellule de séquençage. En effet, celle-ci est couverte de deux types d'oligonucléotides qui correspondent aux séquences adaptatrices ajoutées aux extrémités 3' et 5' des fragments à séquencer. Ainsi, les séquences se lieront tout d'abord sur la cellule par leur oligonucléotide complémentaire et un premier cycle d'amplification les fixera sur la lame. Les fragments libres seront ensuite lavés. Les îlots de séquences seront ensuite créés par « bridge amplification ». L'extrémité libre du brin d'ADN se liera tout d'abord au deuxième type d'oligonucléotide présent sur la lame formant un pont, le fragment sera ensuite amplifié et le double brin dénaturé, ce qui doublera le nombre de brins d'ADN liés à la cellule. Ceci sera répété jusqu'à l'obtention d'une densité d'îlots suffisante. Avant le début du séquençage, toutes les séquences antisens seront clivées et les oligonucléotides qui leur correspondent seront bloqués (Bentley *et al.*, 2008). Ceci crée des îlots de fragments d'ADN identiques de forte densité qui seront séquencés.

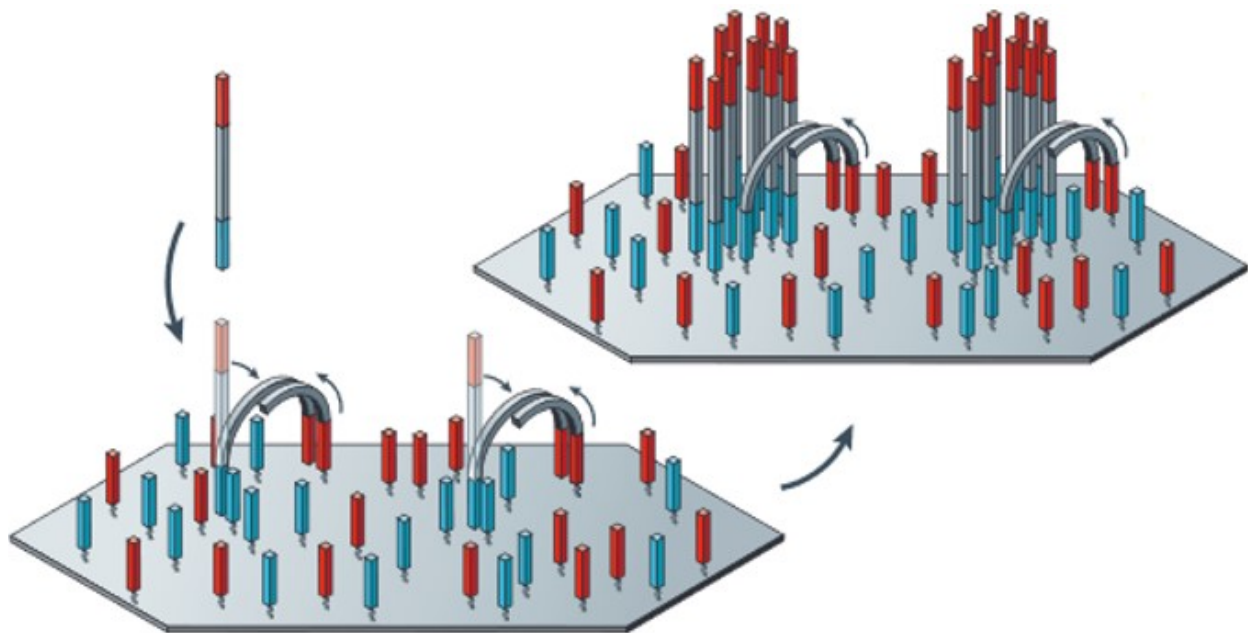


Figure 3. – Méthode de « Bridge amplification » utilisée dans la préparation du séquençage MiSeq
(adaptée de Metzker *et al.*, 2010)

1) Les fragments d'ADN amplifiés et possédant des séquences adaptatrices (segments turquoise et rouges entourant la séquence d'ADN) sont mis en contact avec une lame de verre couverte d'oligonucléotides complémentaires permettant ainsi l'immobilisation de l'ADN patron sur la lame. 2) Le fragment hybridé se pliera pour permettre l'attachement de sa partie distale au deuxième oligonucléotide complémentaire formant ainsi un pont. 3) Ce pont sera utilisé comme patron pour l'amplification du fragment, créant ainsi de nouveaux fragments directement liés à la lame. 4) Les fragments d'ADN double brin nouvellement créés seront dénaturés et le processus répété jusqu'à la formation d'îlots composés de séquences identiques d'une densité entre 100 et 200 millions de séquences. (Metzker, 2010)

La lecture des bases s'effectue par terminaison cyclique réversible. Cette stratégie séquence l'ADN gabarit une base à la fois, à travers des cycles d'incorporation de base, de lavage, d'imagerie et de clivage. Tout d'abord, un mélange de O-azidométhyl dNTPs marqués d'une molécule fluorescente (une couleur différente par type de nucléotide dans le cas du MiSeq et du HiSeq) est ajouté sur la lame de verre. Ces nucléotides sont des terminateurs réversibles de la réaction de synthèse de l'ADN. Ainsi, une seule base par cycle est ajoutée à chaque fragment à séquencer et la réaction arrêtée. Les bases non utilisées sont lavées. Les fluorochromes sont excités à l'aide de deux lasers et une image de la fluorescence est acquise à l'aide d'une caméra numérique. C'est la forte densité des îlots de même séquence qui permet au signal lumineux d'être ainsi détectable. Finalement, la molécule fluorescente ainsi que la molécule bloquant la réaction d'amplification sont clivées et le cycle est répété (Guo *et al.*, 2008).

Après avoir séquencé le brin d'ADN sens, une autre étape de bridge amplification permet de resynthétiser le brin antisens. Tous les brins sens sont alors clivés, les oligonucléotides les fixant sur la lame bloquée et le séquençage est répété pour les brins antisens. Ceci permet un séquençage de type « paired-end » qui résulte en une réduction des erreurs lors de l'analyse des séquences (Reuter *et al.*, 2015).

Plusieurs technologies sont offertes par Illumina. Les plus fréquemment utilisées sont le MiSeq et le HiSeq. Le séquenceur HiSeq X a deux cellules et peut produire jusqu'à 6 milliards de séquences d'une longueur de 2 X 150 pb. En comparaison, le MiSeq produit un nombre plus limité de séquences, jusqu'à 25 millions, mais d'une longueur de 2 X 300 pb avec un taux d'erreur faible estimé à 0,1 % (Kchouk *et al.*, 2017). Puisque les séquences produites sont divisées entre différents échantillons traités, un trop grand nombre d'échantillons peut réduire la profondeur de lecture obtenue pour chacun de ceux-ci et ainsi nuire à l'analyse et particulièrement dans les environnements au microbiote très complexe. Le grand nombre de séquences courtes produites par le HiSeq permet donc d'obtenir une très grande profondeur de lecture et une bonne couverture particulière adaptée au séquençage de type « shotgun ». Les fragments plus longs du MiSeq, font de cette technologie le choix le plus fréquent pour les analyses du microbiote intestinal par séquençage du gène de l'ARNr 16S, puisqu'ils permettent par exemple le séquençage complet de la région variable V4 qui est de 256 pb et donc une meilleure identification taxonomique. D'autres technologies, telles que le NextSeq et le NovaSeq qui ont été lancées en 2017, utilisent une technique de séquençage par synthèse à deux canaux de couleur contrairement aux quatre du MiSeq. La réduction du nombre de canaux de couleur augmente la vitesse de traitement. Cependant, ces appareils qui doivent remplacer le HiSeq n'ont pas encore été adoptés de façon généralisée.

Pacific Biosciences Single-molecule real-time (SMRT) sequencing

La technologie offerte par Pacific Biosciences (PacBio) est considérée comme une méthode de séquençage de troisième génération, puisque l'étape d'amplification clonale requise pour les autres technologies n'est pas nécessaire et qu'elle permet le séquençage de très longs fragments d'ADN. En effet, dans cette technique, en plus des séquences index, seuls des adaptateurs « hairpins » à simples brins sont liés aux deux extrémités des fragments d'ADN à séquencer, ce qui forme une structure fermée appelée SMRTbell (Figure 4). Ces fragments peuvent alors être séquencés individuellement.

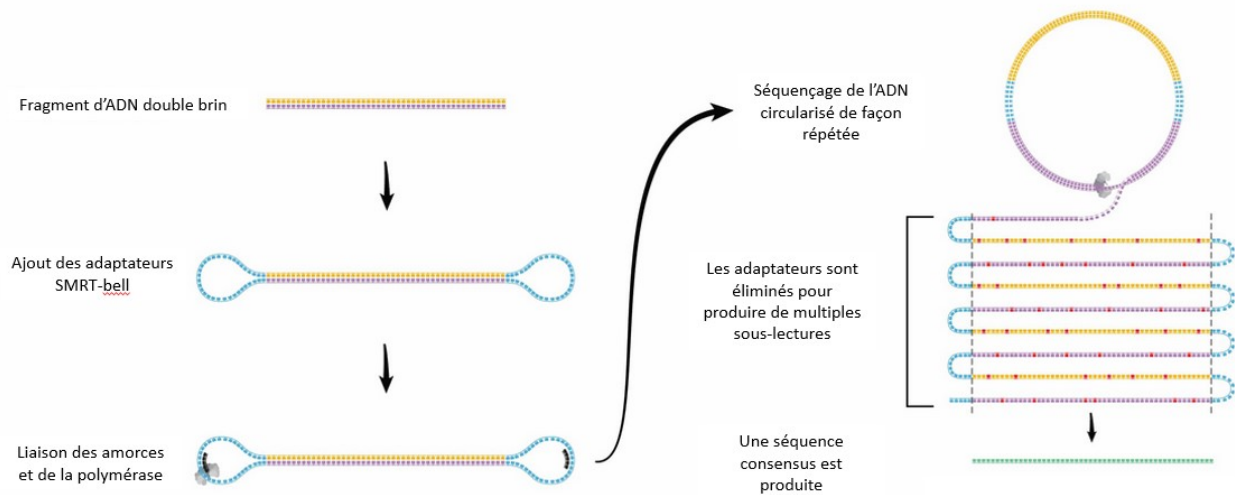


Figure 4. – Étapes requises lors du séquençage de type Single Molecule Real-Time de Pacific Biosciences (adaptée de Pacbio, 2020)

1) Des adaptateurs SMRTbell sont ajoutés à la séquence double brin pour la circulariser. 2) Les amorces de séquençage et la polymérase sont liées à la séquence. 3) L'ADN circularisé est séquençé de façon répétée dans les « zero-mode waveguides ». 4) Les parties des séquences correspondant aux adaptateurs SMRTbell sont éliminées et une séquence consensus est produite à l'aide des séquences obtenues lors des multiples passages. (Pacbio, 2020)

Pour la technologie PacBio, le séquençage se déroule sur une puce couverte de nanostructures microfabriquées appelées « zero-mode waveguides » (ZMW). Ces structures sont des puits formés sur un film métallique couvrant la puce. Cette technologie utilise les propriétés physiques de la lumière lorsqu'elle passe à travers une ouverture au diamètre plus petit que sa longueur d'onde. En effet, en entrant dans le ZMW, l'intensité de la lumière décline de façon exponentielle et n'éclaire donc que le fond de chaque puits. Ceci permet de n'exciter que le fluorophore le plus proche du fond du ZMW, et ce, malgré la présence des autres molécules adjacentes dans la solution. Pour le séquençage en lui-même, une molécule unique de polymérase est immobilisée au fond de chaque ZMW avec une molécule d'ADN. Lors de la réaction de polymérisation, les 4 dNTPs marqués par des molécules fluorescentes différentes sont présents dans la réaction et grâce au ZMW seul le nucléotide en train d'être intégré dans la synthèse est excité. La polymérisation se déroule en temps réel et le signal fluorescent est enregistré sous forme d'une

vidéo. En effectuant une amplification par déplacement de brin, et comme le fragment est circularisé par l'ajout des adaptateurs, chaque fragment peut être séquençé de multiples fois de façon à augmenter la précision (Rhoads et Au, 2015; Kchouk *et al.*, 2017).

Cette technologie permet le séquençage de très longs fragments avec la moitié des séquences obtenues de plus de 50 kb avec un maximum de 175 kb. La plateforme Sequel II v7.0 de Pacbio permet d'obtenir environ 50 millions de séquences par expérience. L'adoption de cette technologie a cependant été ralentie par le haut taux d'erreur (environ 10 %) observé. Toutefois, dans les dernières années des pipelines d'analyse ont été mis au point permettant de réduire considérablement ces erreurs en utilisant la capacité de cette technologie à séquençer de multiples fois le même brin d'ADN circularisé de façon à obtenir une séquence consensus (Callahan *et al.*, 2019). Cette méthode pourrait permettre de séquençer la totalité du gène codant pour l'ARNr 16s et ainsi augmenter la résolution obtenue jusqu'au niveau de l'espèce, ce qui n'est pas possible avec les technologies de deuxième génération comme le MiSeq (Earl *et al.*, 2018).

Oxford Nanopore Technologies

Comme la technologie PacBio, le Nanopore est une technologie de troisième génération qui permet le séquençage de molécule unique et qui ne nécessite pas d'amplification préalable. Pour un séquençage de type 1D², c'est-à-dire un séquençage des deux brins de l'ADN l'un après l'autre, la préparation de la librairie consiste tout d'abord à ajouter aux deux extrémités des fragments à séquençer les index et des adaptateurs de séquençage ayant des extrémités non complémentaires formant une structure en Y. Sur l'extrémité 5' se retrouve une protéine motrice et sur l'extrémité 3' se retrouve un ancrage qui permet d'accrocher la séquence sur la puce. Une autre technique nommée 2D a aussi été utilisée remplaçant l'adaptateur à l'une des extrémités par une séquence en épingle formant ainsi un long fragment continu. Cependant cette technique a été remplacée par la technique 1D² qui est plus efficace. Il est aussi possible de ne séquençer qu'un seul des deux brins en utilisant la méthode 1D, en ajoutant l'adaptateur à une seule des extrémités.

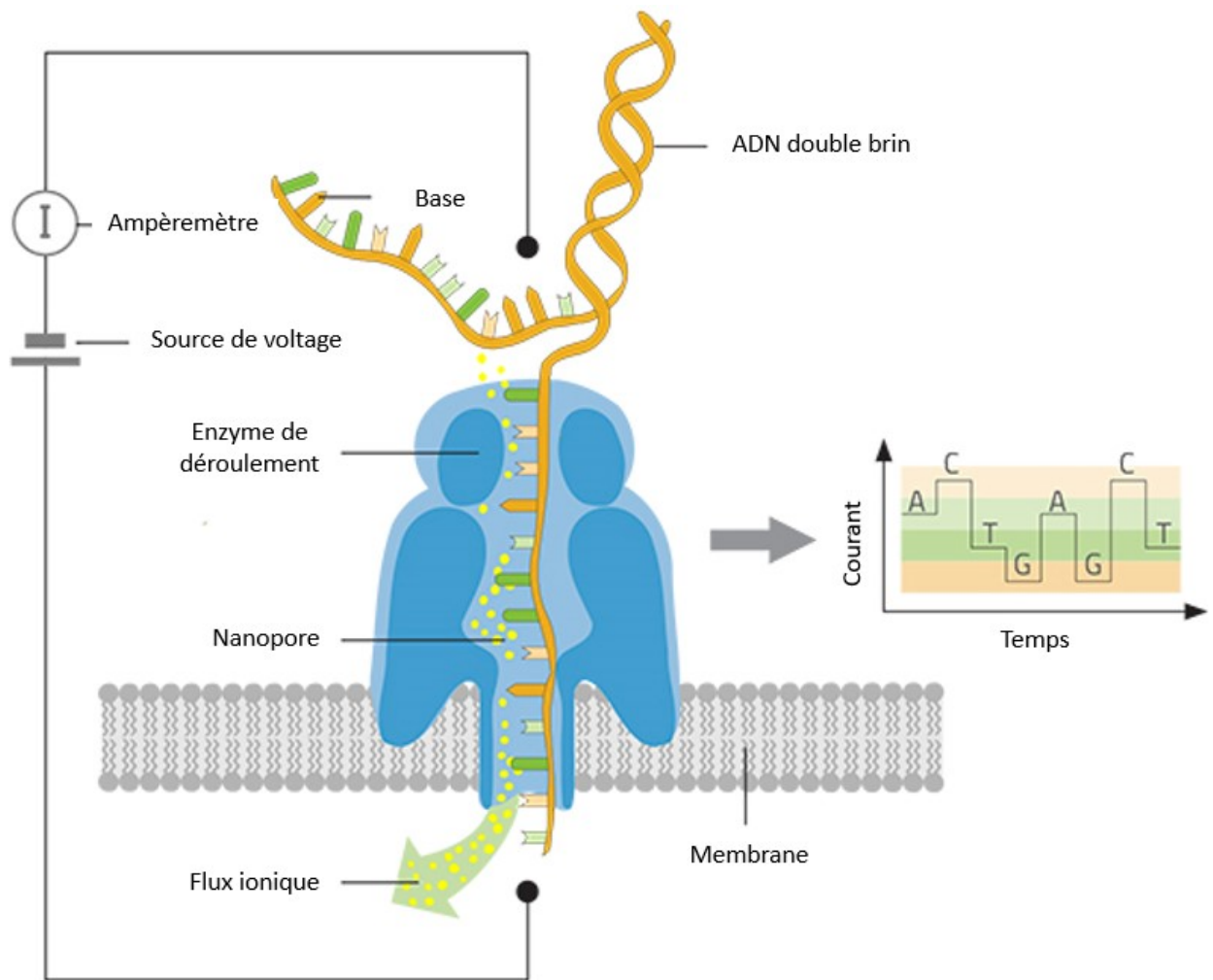


Figure 5. – Description de la méthode de séquençage de type Oxford Nanopore (adaptée de Göpfrich et Judge, 2018)

1) Un courant est appliqué sur un nanopore créant un flux d'ions à l'intérieur de celui-ci. 2) La séquence d'ADN est liée au nanopore par une molécule d'ancrage et y est introduite, un nucléotide à la fois, par une enzyme de déroulement. 3) Le passage de chacun des nucléotides dans le nanopore perturbe le flux ionique proportionnellement à sa taille. 4) Les changements de courant occasionnés par la perturbation du flux ionique sont mesurés pour identifier la base. (Göpfrich et Judge, 2018)

Pour ce qui est du séquençage en lui-même, il est effectué en mesurant le changement de courant associé au passage des molécules d'ADN dans les nanopores. En effet, la cellule de séquençage

de Nanopore est composée de micropuits indépendants contenant une bicouche synthétique perforée par un nanopore biologique qui est traversé d'un courant électrique et crée en lui un flux d'ions (Figure 5). Lorsque la librairie est mise en contact avec cette cellule, les séquences vont s'accrocher à ces nanopores grâce à leurs ancrages et à l'enzyme moteur. L'enzyme enfilera ensuite la séquence patron dans le nanopore, nucléotide par nucléotide obstruant le pore et crée ainsi une modification du flux d'ions. Comme chaque type de nucléotide a une taille différente, leur passage obstruera le pore de façon variable et réduira le flux d'ions en conséquence. La chute de ce courant sera mesurée pour chacun des nucléotides ce qui permettra de déterminer leur identité. Lorsque le séquençage du brin d'ADN patron sera terminé, le brin d'ADN complémentaire attaché à proximité du port par son ancrage le sera à son tour, permettant donc le séquençage des deux brins du fragment pour une meilleure précision (Kchouk *et al.*, 2017).

Comme pour le PacBio, l'appareil MinION de Nanopore (le plus populaire de la compagnie) permet d'obtenir de très longues séquences pouvant aller jusqu'à 150 kb. Les avantages principaux de cette méthode sont le faible coût (4 900\$ US pour le modèle MinION Mk1C comparé à 99 000\$ US pour le MiSeq) et la petite taille de l'appareil qui en font un choix idéal pour le séquençage *in situ* en régions éloignées. De plus, la technologie de Nanopore permet d'obtenir les résultats de séquençage en direct sans avoir à attendre la fin du processus. L'inconvénient principal est cependant le taux d'erreur élevé allant jusqu'à environ 12 % (Kchouk *et al.*, 2017).

Analyses bio-informatiques

Quelle que soit la méthode utilisée pour obtenir les séquences, celles-ci doivent être traitées de façon similaire à l'aide de logiciels bio-informatiques pour en tirer des résultats exploitables. Deux des logiciels les plus fréquemment utilisés, pour le traitement des données de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, sont Mothur et DADA2 (Schloss *et al.*, 2009; Callahan *et al.*, 2016). Ces deux méthodes utilisent des philosophies d'analyse différentes, basées sur la création d'unités taxonomique opérationnelle (OTUs) dans le cas de Mothur et de variants de séquence d'amplicon (ASVs) dans le cas de DADA2.

Après le séquençage, les séquences obtenues sont le plus souvent fournies sous format fastq qui contient, dans un fichier texte, la séquence nucléotidique, mais aussi le score de qualité associé

à chacun de ces nucléotides. Ce score appelé score Phred est issu de l'électrophorégramme produit lors du séquençage et est relié de façon logarithmique à la probabilité d'erreur d'identification d'une base. Par exemple, une base ayant un score de 10 n'a que 90 % de chance d'être identifiée correctement alors qu'une base ayant un score de 50 en aura 99,999 % (Ewing et Green, 1998).

Dans tous les cas, les séquences doivent tout d'abord être démultiplexées. Cette étape consiste à séparer celles qui proviennent des différents échantillons et qui ont été générées lors de la même réaction. Comme il a été précisé précédemment, celles-ci se distinguent à l'aide de courtes séquences index qui leur ont préalablement été ajoutées lors de la préparation des échantillons.

Réduction des erreurs

Les erreurs d'amplification et de séquençage doivent ensuite être réduites. En effet, la nécessité dans plusieurs méthodes d'amplifier par PCR les fragments d'ADN à séquencer peut introduire des erreurs. Une façon de limiter ces erreurs est de choisir une Taq à haute fidélité. Il a par exemple été démontré que le taux d'erreur de la Taq polymérase classique est de 1.5×10^{-4} substitution/base/doublement, alors que la Q5 DNA polymérase qui est une polymérase à haute fidélité génère un taux d'erreur plus faible de 5.3×10^{-7} substitution/base/doublement (en plus d'être une enzyme possédant un très faible taux de mésincorporation, elle possède aussi une activité de révision des bases) (Potapov et Ong, 2017). À ces erreurs inhérentes à l'amplification, s'ajoutent des erreurs lors du séquençage en lui-même. Comme évoqué précédemment, chaque technologie de séquençage comporte ses points faibles et le choix d'une méthode s'accompagne d'un taux d'erreur (*e.g.* de 0,1 % pour le Illumina MiSeq).

Les stratégies logicielles utilisées pour identifier et éliminer ces deux types d'erreurs s'appuient sur la disponibilité de multiples copies des séquences générées lors de la réaction. Dans le cas du logiciel Mothur et pour les méthodes de séquençage de type « paired-end », la première étape de réduction des erreurs est la formation des contigs, c'est-à-dire la combinaison des séquences sens et antisens. Dans ce logiciel, après alignement des séquences, les discordances dans les bases sont identifiées et peuvent être corrigées à l'aide des scores de qualité Phred. Les contigs contenant des ambiguïtés dans leurs séquences ou qui sont plus longs que la taille de la région

cible sont aussi éliminés. Ensuite, ces séquences sont alignées par comparaison avec les séquences de référence de la région variable contenues dans des bases de données, telles que SILVA, RDP ou Greengenes. Les séquences qui ne peuvent s'aligner ou qui s'alignent mal sont éliminées. On regroupe ensuite les séquences ayant moins d'une différence par 100 paires de bases. Finalement, les séquences chimériques sont identifiées et éliminées. Les chimères sont des séquences formées de la fusion de deux séquences ou plus, lors d'une amplification par PCR (Kozich *et al.*, 2013).

Pour la démarche DADA2, cette méthode débute par une étape d'élimination des nucléotides de mauvaise qualité en fin de séquence. Dans cette même étape, les séquences contenant au moins un nucléotide ambigu sont éliminées, tout comme les séquences qui dépassent le seuil d'erreur préalablement choisi.

Un algorithme d'apprentissage machine est ensuite utilisé pour déterminer un modèle paramétrique d'erreur. Cet algorithme établit ce modèle à partir des données fournies en alternant l'estimation du taux d'erreur et l'inférence de la composition des échantillons jusqu'à ce qu'elles convergent en une solution consistante commune (Callahan *et al.*, 2016). À l'aide de ce modèle, on peut inférer la composition réelle des échantillons. Pour ce faire, l'algorithme pose l'hypothèse nulle qu'une séquence ayant un taux d'erreur donné est trop abondante pour être expliquée par la présence d'une erreur. Ainsi, une valeur de p basse indique que la séquence est présente en trop grande quantité pour être simplement due à une erreur. Cette façon de procéder fait que toutes les séquences qui ne sont retrouvées qu'une seule fois dans les échantillons (singletons) sont automatiquement éliminées par l'algorithme en plus de certaines séquences présentes en faible nombre, ce qui peut mener à la perte de certaines espèces rares dans l'analyse. Les contigs sont ensuite formés. Cependant, dans ce cas, seulement les paires ayant moins de discordance que le seuil choisi par l'utilisateur sont conservées sans correction. Finalement, les séquences chimériques sont éliminées (Callahan *et al.*, 2016).

La variabilité du nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S dans le génome bactérien peut aussi être une source d'erreur. En effet, ce nombre peut être variable d'un taxon à l'autre allant de une à quinze copies (Klappenbach *et al.*, 2001). Ainsi d'après une étude, seulement 15 %

des génomes bactériens contiendraient une seule copie du gène et plus de la moitié en contiendraient plus de cinq. Ce nombre est très variable entre les taxons, et ce, jusqu'au niveau du genre, mais est plutôt conservé à l'intérieur d'une même espèce (Větrovský et Baldrian, 2013). Lors du séquençage, la présence de certaines populations bactériennes peut donc être fortement surestimée par rapport à d'autres. Pour le moment il n'existe aucun moyen efficace de corriger ce potentiel biais (Louca *et al.*, 2018). De plus, il a été démontré que des variations dans la séquence de ces différentes copies peuvent être retrouvées à l'intérieur d'un même génome. Cependant, ces variations sont souvent minimales. Par exemple, dans une étude sur 568 espèces bactériennes des différences de séquences de plus de 1 % n'ont été retrouvées que dans 10 % des génomes, alors que dans une autre étude seulement 2,4 % des génomes contenaient des séquences ayant moins de 99 % d'homologie (Pei *et al.*, 2010; Větrovský et Baldrian, 2013). Cette variabilité, si elle n'est pas corrigée, peut donc augmenter artificiellement la diversité mesurée dans les échantillons. Comme la différence entre ces séquences est très faible, ce type d'erreur peut potentiellement être corrigé lors de la formation des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) qui regroupe ensemble les séquences très semblables.

OTUs contre ASVs

Dans plusieurs méthodes la suite des manipulations consiste à former les unités taxonomiques opérationnelles (OTUs). Pour ce faire, dans le logiciel Mothur l'algorithme utilisé est le « average linkage ». Cependant, plusieurs autres méthodes sont aussi disponibles. Les OTUs consistent en un regroupement de séquences qui diffèrent entre elles, sous le seuil choisi par l'utilisateur. On utilise communément un seuil de 3 % de dissimilarité. À des fins d'analyse, chacune de ces OTUs est ensuite considérée comme équivalente à une espèce. Ces OTUs peuvent être formées par comparaison des séquences à une base de données (méthode par référence fermée) ou en comparant la similarité des séquences entre elles, par paires, sans référence (méthode *de novo*) (Kozich *et al.*, 2013; Callahan *et al.*, 2017). Cette méthode permet encore une réduction des séquences contenant possiblement des erreurs puisque, si elles divergent par moins de 3 % en composition, elles seront regroupées à la séquence originale. Un des désavantages importants associés à cette correction est que certaines séquences légitimes mais divergeant par moins de 3 %, seront perdues lors de la formation des OTUs, ce qui correspond à une perte de résolution.

Dans certains cas, des séquences qui contiennent réellement des erreurs répétées seront considérées comme réelles. De plus, si ces OTUs sont formées par méthode *de novo*, leur définition est dépendante des jeux de données traités puisque celles-ci sont définies à partir de l'abondance relative des différentes populations de séquences dans les échantillons. Ainsi, en utilisant cette méthode, il est impossible de comparer les OTUs de deux études ayant produit des jeux de données différents. Pour ce qui est de la méthode par référence fermée, comme la création des OTUs est basée sur la comparaison des séquences obtenues à celles retrouvées dans une banque de données, des études indépendantes utilisant des banques communes pourront être comparées. Cependant, le désavantage de cette méthode (qui ne considère que les séquences déjà connues et répertoriées dans la banque) est que toute variation biologique qui n'est pas représentée dans la banque de données utilisée est perdue. Une méthode hybride (méthode open-reference) a été proposée pour réduire ces problèmes. Elle consiste à combiner l'assignement des OTUs en référence fermée à la méthode *de novo* pour les séquences qui ne sont pas représentées dans la base de données utilisée (Callahan *et al.*, 2017).

Pour régler ces problèmes, une nouvelle technique, qui est entre autres utilisée dans le logiciel DADA2, a été mise au point. Cette méthode permet l'obtention de ce qui a été appelé variant de séquence d'amplicon (ASVs) (Figure 6). Contrairement aux OTUs, cette méthode n'utilise pas de seuil de similarité arbitraire pour regrouper les séquences. En effet, dans cette méthode, comme expliqué précédemment pour le logiciel DADA2, des algorithmes permettent d'inférer la réelle composition en séquence des échantillons. Ainsi, chaque séquence différente contenue dans l'échantillon après nettoyage et élimination des erreurs est considérée comme un ASV. Grâce à cette méthode, il est donc possible de distinguer des séquences ne discordant que par une base. Ainsi, en évitant l'utilisation du seuil de 3 % normalement choisi pour la formation des OTUs, une meilleure résolution est obtenue et permet par exemple d'atteindre la différenciation à l'espèce. Il a aussi été démontré qu'avec cette méthode le niveau d'erreurs résiduelles était jusqu'à 10^4 fois plus faible qu'avec les méthodes classiques par OTUs passant d'un niveau déjà très faible de 10^{-4} à 10^{-8} erreurs par paires de bases. De plus, comme chacun des ASVs représente une séquence unique et donc un micro-organisme présent dans l'échantillon, et non pas une construction artificielle dépendante du jeu de données utilisé, comme c'est le cas pour les OTUs, les ASVs

inférés dans plusieurs études indépendantes peuvent être comparés de façon valide (Callahan *et al.*, 2017; Callahan *et al.*, 2019). Cependant, comme il a été mentionné précédemment, certaines bactéries peuvent contenir plusieurs copies différentes du gène codant pour l'ARNr 16S. Ainsi, comme les ASVs ne regroupent pas les séquences semblables et considèrent chaque séquence unique comme une espèce, ce phénomène pourrait être responsable d'une augmentation erronée de la diversité mesurée.

Finalement, tant sur le logiciel Mothur que sur DADA2, les séquences des OTUs ou ASVs respectivement pourront être assignées à un niveau taxonomique, grâce aux banques de données consultées (*e.g.* Greengenes, RDP et SILVA), par un algorithme de classification bayésienne naïve (Wang *et al.*, 2007; Kozich *et al.*, 2013; Callahan *et al.*, 2016). Comme cette assignation taxonomique est importante pour les analyses futures, le choix de la banque de données à utiliser est très important puisqu'il peut mener à des biais. Par exemple, des différences ont été rapportées dans une étude de 2018 où les bases de données Greengenes et Silva ont été comparées à l'aide d'une communauté artificielle. En effet, la base de données Greengenes identifiait moins de genres que ce qui était réellement présent alors que Silva réussissait à identifier le bon nombre de genres, mais avec plusieurs faux positifs (Park et Won, 2018). Comme le reste des outils utilisés pour l'analyse du microbiote, ces bases de données sont en constante évolution avec l'addition de nouveaux micro-organismes et la correction des taxonomies erronées. La dernière version de Silva a été lancée le 16 décembre 2019 (Silva, 2019).

Pour le moment, aucune méthode d'analyse bio-informatique normalisée n'a été proposée, ce qui rend problématique la comparaison des résultats des différentes études. En effet, le choix du logiciel, les techniques de réduction des erreurs, les bases de données utilisées et même les paramètres choisis par l'utilisateur peuvent tous significativement affecter les résultats obtenus. Cependant, comme l'utilisation des ASVs dans les études de séquençage d'amplicons permet d'obtenir des résultats plus précis, réutilisables, reproductibles et plus exhaustifs que les méthodes par OTUs, il semble que dans le futur cette méthode s'imposera comme le nouveau standard pour l'analyse du microbiote.

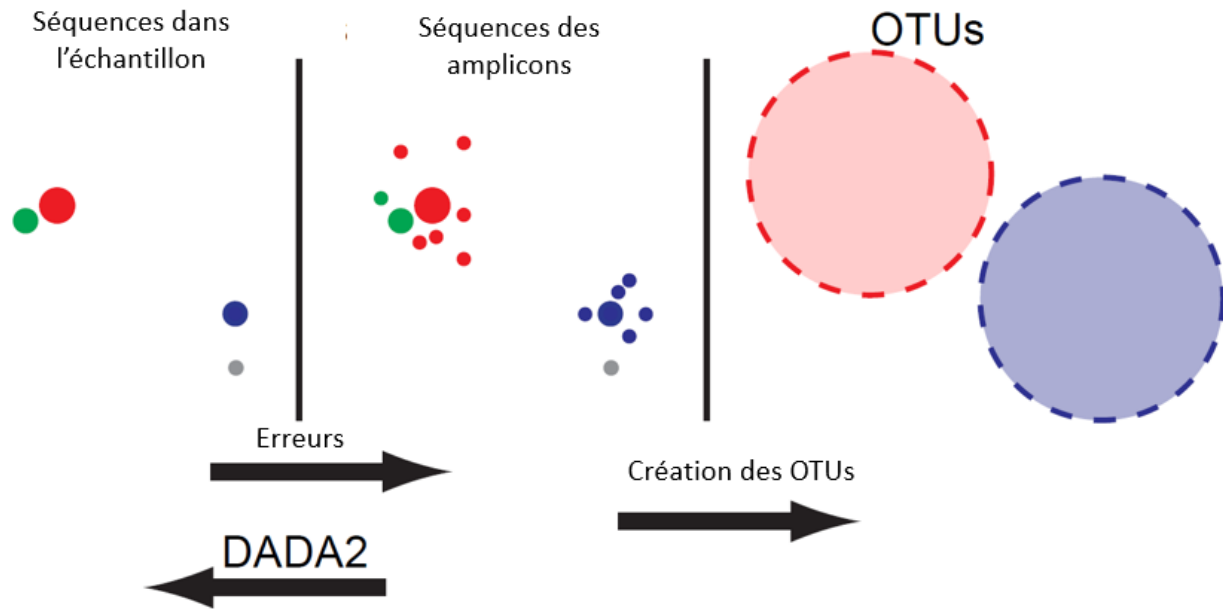


Figure 6. – Comparaison schématique de l’approche par OTUs et par ASVs pour la correction des erreurs de séquençage. (adaptée de Callahan *et al.*, 2016)

Les cercles représentent des séquences identiques et leur grosseur leur abondance. Il y a au départ dans l’échantillon quatre séquences différentes. Suite à la production des amplicons, des erreurs sont introduites. Les méthodes par OTUs éliminent ces erreurs en regroupant ensemble les séquences similaires. DADA2 utilise une méthode statistique pour inférer les séquences réelles et éliminer les erreurs. (Callahan *et al.*, 2016)

Profondeur de lecture et raréfaction

Comme il a été mentionné précédemment, chaque méthode de séquençage est limitée dans le nombre de séquences qu’elle peut produire. Lors d’un séquençage en multiplex, ce nombre de séquences sera divisé entre les différents échantillons. Par exemple, dans le cas du MiSeq, 96 index sont disponibles commercialement permettant donc le séquençage de 96 échantillons en parallèle. Comme le maximum théorique de séquences produites par cette technologie est de 25 millions de séquences en « paired-end », on peut dans les meilleures conditions, obtenir 260 000 séquences pour chacun de ces échantillons. Ainsi, plus le nombre d’échantillons séquencé en parallèle est élevé plus la couverture (nombre de séquences obtenues) par échantillon est faible. Dans les cas où cette couverture est faible, ceci peut avoir comme conséquences de réduire les

chances de détecter les membres les plus rares des communautés étudiées et donc de réduire la diversité microbienne mesurée (Pollock *et al.*, 2018b). Il n'y a pour le moment, pas de consensus sur le nombre de séquences nécessaires afin d'obtenir une bonne couverture, puisque cette valeur est très variable entre autres par rapport à la complexité de l'échantillon étudié. En effet, on aura besoin d'un plus grand nombre de séquences pour bien décrire la diversité d'un échantillon de matière fécale contenant une grande quantité de bactéries différentes, que pour décrire la communauté bactérienne présente sur une surface de travail en usine (Rodriguez-R et Konstantinidis, 2014). Pour déterminer le nombre de séquences nécessaires à une bonne couverture pour un type d'échantillon donné, il peut donc être intéressant de réaliser une étude pilote à l'aide d'un petit nombre d'échantillons. On pourra alors évaluer la quantité de séquences requises à l'obtention d'une couverture de qualité dans ceux-ci en traçant des courbes de raréfaction (Figure 7). Ces courbes sont créées en conduisant un échantillonnage aléatoire et répété d'un nombre de plus en plus grand de séquences dans un échantillon et en observant l'augmentation du nombre moyen d'espèces (OTUs ou ASVs) détectées (Gotelli et Colwell, 2001). La courbe augmente tout d'abord rapidement, alors que les espèces les plus abondantes seront détectées, et atteint par la suite un plateau tandis que seules les espèces plus rares restent à être échantillonnées. Lors de l'atteinte du plateau, on considère généralement que la couverture est bonne puisque l'augmentation du nombre de séquences n'aura qu'un très faible effet sur la diversité détectée. De plus, ces nouvelles espèces détectées ne seront présentes qu'en très faible quantité et leur effet sera très difficilement mesurable.

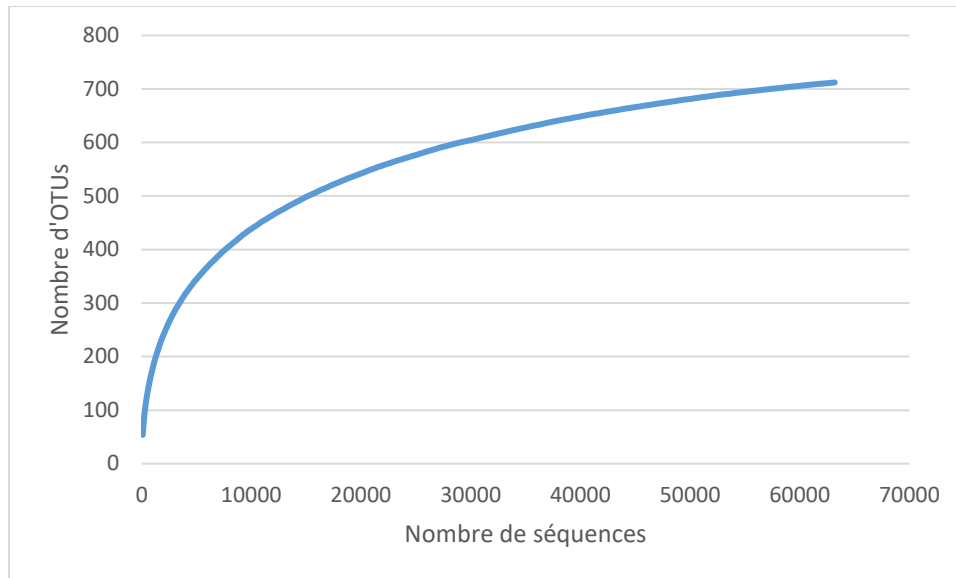


Figure 7. – Exemple de courbe de raréfaction démontrant l’augmentation du nombre d’OTUs détecté en lien avec le nombre de séquences échantillonnées et l’atteinte d’une phase de plateau.

En pratique, le nombre de séquences obtenues par échantillon est aussi très variable entre eux lors d’une même expérience de séquençage. Ces disparités sont liées à des différences dans l’efficacité de ce processus et n’ont pas de réelle signification biologique (Weiss *et al.*, 2017). Elles sont problématiques lors des analyses subséquentes puisqu’elles peuvent créer d’importantes variations dans le nombre d’espèces détectées. Pour pallier ce problème, on utilise des méthodes de normalisation. La méthode la plus fréquemment utilisée est la raréfaction où l’on sous-échantillonne aléatoirement un nombre égal de séquences dans chacun des échantillons (Weiss *et al.*, 2017). Ce nombre de séquences est souvent égal au nombre de séquences dans l’échantillon qui en contient le moins. Il faut cependant être critique face à cette méthode puisqu’une trop grande raréfaction peut causer une perte importante de couverture. Il peut donc être parfois avantageux d’éliminer d’une expérience certains échantillons contenant un nombre trop faible de séquences au profit d’une meilleure couverture totale.

Analyse des séquences

Les ASVs ou OTUs créés lors des étapes précédentes peuvent ensuite être utilisés pour comparer les différents échantillons tant au niveau de la composition que de la structure du microbiote. Ces analyses peuvent être divisées en deux catégories.

Premièrement, l'analyse de la diversité alpha est définie comme la variété et l'abondance des espèces dans une unité d'étude (Whittaker *et al.*, 2001). Dans le cas qui nous intéresse les OTUs ou ASVs sont les proxi des espèces bactériennes présentes, et leur nombre et leur distribution seront déterminés par échantillon. Plusieurs indices peuvent être utilisés pour mesurer cette diversité alpha. Ces indices permettent de décrire deux composantes : la richesse de l'échantillon, mais aussi son uniformité. La richesse est le nombre d'espèces (OTUs ou ASVs) différentes observées dans l'échantillon, indépendamment de leur fréquence et de l'uniformité de leur distribution. L'uniformité est aussi une expression de la diversité alpha. Elle correspond à la distribution de la fréquence de ces différentes espèces dans l'échantillon (*e.g.* un échantillon où toutes les séquences sont retrouvées avec la même fréquence aura une plus grande uniformité qu'un échantillon dans lequel certaines séquences sont retrouvées en plus grande quantité que dans les autres). Trois mesures sont fréquemment utilisées pour représenter la diversité alpha. Il y a d'abord la mesure des espèces observées qui est équivalente au nombre d'espèces dans l'échantillon. En second lieu, il y a l'indice de Shannon qui donne autant d'importance à la richesse qu'à l'uniformité et est donc fortement influencé par les espèces rares. Finalement, l'indice de Simpson donne plus d'importance à l'uniformité et aux espèces dominantes (Figure 8) (DeJong, 1975). L'indice de Shannon est une valeur logarithmique positive qui n'a pas de maximum théorique et qui augmente en même temps que la richesse et l'uniformité. D'autre part, l'indice de Simpson est représenté par une valeur entre 0 et 1 où 0 représente une diversité infinie et 1 aucune diversité. Comme ces valeurs sont contre-intuitives, on utilise souvent la valeur inverse de l'indice de Simpson où une valeur plus élevée correspond à une plus grande diversité. Ainsi, dans un échantillon où la richesse et l'uniformité sont élevées, les indices de Shannon et de Simpson inverse seront eux aussi élevés. Comme ces deux indices ne donnent pas la même importance aux espèces rares et dominantes, chaque indice donne des informations différentes et complémentaires pour chaque échantillon. Ces indices peuvent être comparés statistiquement

pour évaluer l'effet des conditions expérimentales tant pour la richesse que pour l'uniformité sur les différents échantillons (Legendre et Legendre, 2012).

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

Figure 8. – Calculs des indices de distance de Simpson et de Shannon utilisés pour évaluer la richesse des espèces retrouvées dans un échantillon et leur uniformité.

n_i = Nombre de séquences d'une espèce i dans un échantillon, N = Nombre total de séquences dans un échantillon, S_{obs} = Nombre d'OTUs observées dans un échantillon.

Deuxièmement, la diversité bêta est une mesure qui consiste à comparer différents écosystèmes en s'appuyant sur la diversité des espèces qu'ils contiennent (Whittaker *et al.*, 2001). C'est-à-dire dans le cas qui nous concerne, comparer les échantillons selon leur composition en OTUs ou ASVs. Pour représenter la variation de la composition des différents échantillons, plusieurs indices peuvent être utilisés. Deux des indices les plus fréquemment utilisés sont les indices de Jaccard et de Bray-Curtis (Figure 9) (Hao *et al.*, 2019). Ces indices permettent de mesurer de façon complémentaire la dissimilarité entre deux échantillons. Tout d'abord, l'indice de dissimilarité de Jaccard ne que tient compte que de la présence ou l'absence des différentes espèces dans ceux-ci. En effet, il correspond au nombre d'espèces représentées simultanément dans les deux échantillons comparés, divisé par le nombre d'espèces présentes dans seulement l'un ou l'autre de ces échantillons (Legendre et Legendre, 2012). L'indice de distance Bray-Curtis quant à lui tient compte de l'effet combiné de la présence/absence des espèces en plus de leur abondance. Pour ce faire, la somme des occurrences minimales des espèces (séquences par OTUs ou ASVs) entre les deux échantillons, pour chaque espèce, est divisée par le nombre total de séquences pour chaque espèce dans les deux échantillons (Legendre et Legendre, 2012). Ces deux indices peuvent

donc fournir des informations différentes sur les caractéristiques de composition des échantillons étudiés.

$$D_{Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}}$$
$$D_{Bray-Curtis} = 1 - 2 \frac{\sum \min(S_{A,i}, S_{B,i})}{\sum S_{A,i} + \sum S_{B,i}}$$

Figure 9. – Calcul des indices de distance de Jaccard et de Bray-Curtis utilisés pour comparer la dissimilarité de composition microbienne entre deux échantillons.

Jaccard : S_{AB} = Espèce présente dans les deux échantillons, S_A et S_B = Espèce présente seulement dans l'échantillon a ou b respectivement. Bray-Curtis : $S_{a,i}$, $S_{b,i}$ = Nombre de séquences d'une espèce i dans les échantillons a ou b respectivement.

Ces indices de dissimilarité sont calculés pour chaque paire d'échantillons et une matrice de distance est construite. Ces distances peuvent premièrement être représentées sur un graphique en deux ou en trois dimensions grâce à des méthodes d'ordination telle que le Principal Coordinates Analysis (PCoA) ou non-metric multidimensional scaling (NMDS) (Figure 10) (Kozich *et al.*, 2013). Dans ces graphiques, chaque point représente un échantillon et plus la distance entre deux points est grande, plus les communautés microbiennes qui composent ces échantillons sont différentes. Par la suite, cette matrice, basée sur la distance entre les échantillons, peut être utilisée pour évaluer si des différences statistiques existent dans la composition des échantillons selon les différentes conditions étudiées (groupes à l'étude), en utilisant par exemple les tests statistiques ANOVA ou perMANOVA.

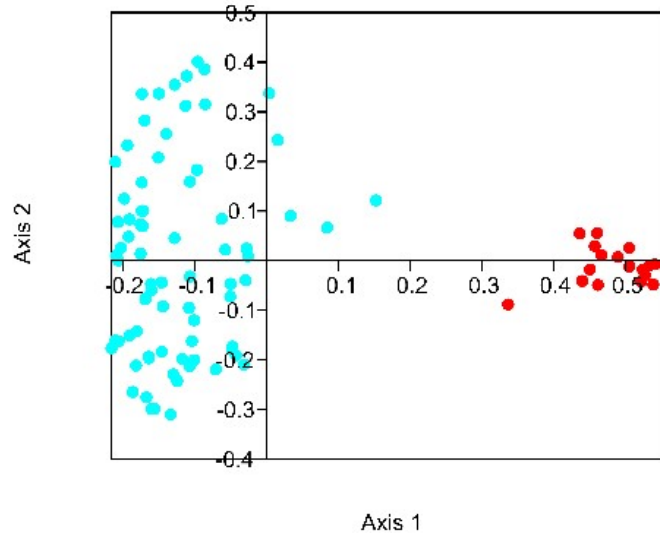


Figure 10. – Exemple de graphique PCoA représentant deux groupes d’animaux ayant des microbiotes significativement différents.

Comparaison du microbiote des truies (rouge) et des porcelets (bleu), chaque point représente un animal différent et plus les points sont éloignés, plus la composition du microbiote est différente. Les axes 1 et 2 n’ont pas de signification biologique, mais représentent le plan qui exprime la plus grande distance entre les projections des échantillons.

Finalement, il est possible d’identifier les espèces (OTUs ou ASVs) qui sont responsables des variations de composition entre les échantillons. Pour ce faire, des tests statistiques tels que le Multivariate Association with Linear Models (MaAsLin) ou metamicrobiomeR sont utilisés (Morgan *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2019). Une fois ces espèces identifiées, leur classification taxonomique peut être utilisée pour donner de l’information sur le possible impact de ces variations, par exemple au niveau du système digestif de l’animal.

En conclusion, le séquençage à haut débit est une technologie qui s’est développée extrêmement rapidement dans les dernières années. Plusieurs technologies de séquençage et méthodes d’analyse ont été mises au point, ayant toutes leurs avantages et leurs inconvénients. Ainsi, le choix de la technique de séquençage, mais aussi du logiciel de traitement et sa manipulation par l’utilisateur, le choix des bases de données utilisées et les analyses statistiques choisies peuvent affecter significativement les résultats obtenus. Ainsi, il est actuellement très difficile de

comparer directement les résultats de différentes études. Cet outil reste malgré tout le meilleur moyen d'étudier le microbiote et d'en évaluer les effets.

Microbiote intestinal

Le concept du microbiote a été suggéré pour la première fois par Joshua Lederberg en 2001 (Lederberg et McCray, 2001). Il a défini ce terme comme étant : la communauté écologique des micro-organismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui partagent notre espace corporel. Presque tous les organismes multicellulaires tels que les plantes et les animaux possèdent un microbiote. Celui-ci est composé de bactéries, d'archaea, de protistes, de fungi et de virus. Chez l'Homme il a été estimé que le microbiote comptait environ autant de bactéries qu'il y a de cellules dans le corps soit environ 10^{13} (Sender *et al.*, 2016). Il est variable d'un organisme à l'autre, mais aussi d'une niche à l'autre chez un même organisme (*e.g.* le microbiote de la bouche est différent du microbiote fécal) (Ursell *et al.*, 2012). Il a même été démontré que des variations géographiques dans sa composition peuvent être détectées à l'intérieur d'un même organe. Par exemple, des différences de composition ont été mesurées dans les différents segments de l'intestin (Looft *et al.*, 2014). Chez le porc, ce microbiote est principalement composé des phylums Firmicutes, Bacteroides et Proteobacteria, mais varie tout au long de la vie de l'animal (Holman et Chénier, 2014; Gao *et al.*, 2019). Les nouvelles méthodes de séquençage à haut débit nous ont permis d'avoir un nouveau regard sur la composition de celui-ci et de réaliser toute son importance, tant au niveau du développement des systèmes immunitaires et digestifs, de la digestion des aliments, qu'au niveau de la protection contre les micro-organismes pathogènes et même du comportement (Ubeda *et al.*, 2017; Valdes *et al.*, 2018; Rabhi *et al.*, 2020). Dans cette revue de littérature, nous nous intéresserons à tout ce qui a trait au microbiote intestinal du porc (implantation, impact sur le développement, évolution et facteurs pouvant l'affecter) et à son implication dans la pathogenèse et dans la résistance à *Salmonella*.

Implantation du microbiote :

Intra-utero

Depuis le début du siècle dernier, les scientifiques ont cru que lors de la grossesse normale le fœtus était stérile et que le premier contact avec le microbiote se déroulait lors de la naissance. En effet, à ce moment le nouveau-né entre alors en contact avec le microbiote vaginal et fécal de la mère (Tissier, 1900; Funkhouser et Bordenstein, 2013).

À cause de ce dogme, il a longtemps été considéré que la présence de bactéries dans l'utérus était toujours dangereuse pour l'enfant. La présence de bactéries du tractus uro-génital dans le liquide amniotique a été décrite et est considérée comme un facteur important dans les accouchements prématurés chez les femmes ayant des ruptures de membranes ou non. Les espèces bactériennes qui sont le plus souvent retrouvées au niveau du liquide amniotique chez les femmes ayant eu des naissances prématurées et qui n'était pas associées à une rupture prématurée des membranes sont les *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, les *Peptostreptococcus* et certaines espèces de *Bacteroides*. Ces bactéries sont retrouvées au niveau du microbiote vaginal et sont normalement faiblement virulentes (Goldenberg *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2002; Funkhouser et Bordenstein, 2013). La voie d'infection la plus reconnue de la cavité amniotique et du fœtus est donc l'ascension de ces bactéries à partir du vagin et du col de l'utérus (Gonçalves *et al.*, 2002).

Dans les dernières années, de multiples études ont cependant pu décrire une potentielle transmission bactérienne verticale véritable entre la mère et le fœtus. En effet, il a été possible de détecter des bactéries au niveau du sang du cordon ombilical (Jiménez *et al.*, 2008), du liquide amniotique (Rautava *et al.*, 2012) et des membranes fœtales (Steel *et al.*, 2005), et ce, chez des femmes ayant des grossesses saines et chez des enfants ne montrant pas de signe d'inflammation (Chen et Gur, 2019). Une étude, utilisant une méthode de détection indépendante de la culture, a pu démontrer la présence d'un microbiote de faible abondance mais ayant des fonctions métaboliques diversifiées au niveau du placenta. Ce microbiote serait largement composé de bactéries, des phylums Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes et Fusobacteria, et partage des similarités avec le microbiote oral (Aagaard *et al.*, 2014). D'autres études ont plutôt démontré des similarités avec le microbiote vaginal (Doyle *et al.*, 2017). D'autres recherches ont aussi utilisé le méconium (premières matières fécales du nouveau-né résultant de l'ingestion de liquide amniotique) comme représentation des communautés bactériennes présentes *in utero*. Certaines des bactéries qui y ont été détectées sont normalement retrouvées au niveau du tractus digestif telles que *Enterococcus* et *Escherichia* (Jiménez *et al.*, 2008; Funkhouser et Bordenstein, 2013; Gosalbes *et al.*, 2013). Par exemple, en récoltant le méconium de 21 enfants nés à terme sans problème de santé et avant d'être nourris, des communautés de bactéries Gram positif et

négatif ont pu être détectées avec une majorité d'*Enterococcus* et *Staphylococcus* (Jiménez *et al.*, 2008). Alors que dans une autre étude, on a pu retrouver majoritairement des *Escherichia/Shigella*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Lactococcus* chez 20 nouveau-nés (Gosalbes *et al.*, 2013). Les résultats obtenus suggèrent une transmission de certaines bactéries du microbiote maternel au fœtus à partir de la bouche ou du système digestif. Pour confirmer cette hypothèse, une expérience a aussi été effectuée sur des souris qui ont été inoculées à l'aide d'*Enterococcus* marqués génétiquement et provenant du lait d'une femme enceinte. Dans cette expérience, la bactérie a pu être retrouvée chez les souriceaux mis au monde par césarienne et provenant des mères inoculées (Jiménez *et al.*, 2008). La majorité des études présentées sont basées sur la détection d'ADN bactérien au niveau de ces sites. Cependant, chez la souris, il a aussi été possible d'isoler des bactéries viables au niveau du fœtus dans au moins une étude. Ceci renforce l'idée que ces résultats ne sont pas la conséquence d'une contamination lors des manipulations (Younge *et al.*, 2019). Il est déjà connu que la translocation bactérienne des intestins vers le sang maternel est augmentée lors de la gestation. Il a été démontré qu'il y a une augmentation de 60 % des chances de colonisation des nœuds lymphatiques mésentériques chez les souris gestantes (Perez *et al.*, 2007). Ainsi, lors de cette période, les bactéries pourraient migrer hors de la lumière intestinale par plusieurs voies telles que les cellules M, cellules caliciformes ou cellules dendritiques et ainsi être transportées dans l'organisme possiblement jusqu'au placenta sans toutefois expliquer leur transfert vers le fœtus (Funkhouser et Bordenstein, 2013). Les résultats obtenus dans les diverses études démontrent aussi des variations dans les différentes populations qui ont été détectées et qui pourraient composer ce microbiote. Ceci pourrait être expliqué par des variations temporelles de celui-ci pendant de la gestation. Ces variations pourraient être liées à des changements dans la source de ces bactéries tout au long de la gestation (Younge *et al.*, 2019)

Ainsi, les bactéries retrouvées dans le méconium pourraient constituer les traces de la première inoculation du microbiote intestinal chez le nouveau-né et pourraient jouer un rôle important dans les premières étapes de formation/maturation du système digestif.

Si le mécanisme complet du transfert de microbiote entre la mère et le fœtus, ainsi que sa source, ne sont pas encore complètement résolus, il apparaît globalement que le tractus gastro-intestinal

de la mère en est la source la plus importante et que ce transfert influence massivement la constitution du microbiote intestinal du nouveau-né.

Comme ces recherches ont été majoritairement effectuées sur des nouveau-nés humains et des souris, pour ce qui est de l'application à la constitution du microbiote digestif des porcelets, il faut être prudent, particulièrement parce que ces espèces ont d'importantes différences au niveau du placenta. En effet, les humains et les souris ont un placenta hémochorial, c'est-à-dire que le sang maternel est en contact direct avec le chorion fœtal, alors que les porcs possèdent un placenta endothéliochorial où les villi chorioniques sont en contact avec l'endothélium des vaisseaux sanguins maternels (Bertasoli *et al.*, 2015; Mach *et al.*, 2015). Ainsi, il est connu que chez le porc il n'y a aucun transfert d'anticorps maternels lors de la gestation à cause du type de placenta. Ce même phénomène pourrait aussi être vrai pour le transfert bactérien chez le porc. Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a encore été effectuée chez cette espèce.

Microbiote vaginal

Le passage dans le canal vaginal pourrait avoir un effet important sur la colonisation du microbiote. Au moment de la naissance, les nouveau-nés entrent en effet en contact direct avec le microbiote vaginal de la mère, causant un apport important en nouvelles bactéries, et ce sur tous les sites tels que la peau, la cavité orale, la cavité naso-pharyngienne et le système digestif (Funkhouser et Bordenstein, 2013; Dobbler *et al.*, 2019). Des études menées sur des enfants nés par césarienne ont démontré l'importance de ce premier contact. En effet, ces enfants avaient un microbiote fécal significativement différent de celui d'enfants nés par voie naturelle (Shao *et al.*, 2019). Les différences mesurées dans l'étude précédente diminuaient avec l'âge mais restaient significatives jusqu'au dernier point d'échantillonnage, soit 12 mois après la naissance. Ainsi, les enfants nés par voie naturelle auraient un microbiote fortement apparenté au microbiote vaginal de leur mère alors que les enfants nés par césarienne auraient plutôt un microbiote associé à celui de la peau. De plus, ce microbiote associé à la peau n'était pas plus associé à celui de la mère qu'à celui des étrangers, démontrant que le microbiote qui colonise le tube digestif des enfants nés par césarienne provient principalement des gens qui les manipulent à la naissance (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). De façon intéressante, il a aussi été démontré que ces différents modes de naissance peuvent avoir des effets à long terme sur la santé des enfants.

En effet, les enfants nés par césarienne ont significativement plus de chance de souffrir de rhinites allergiques (Renz-Polster *et al.*, 2005), d'asthme (Renz-Polster *et al.*, 2005), de maladie céliaque (Decker *et al.*, 2010), de diabète de type 1 (Cardwell *et al.*, 2008) et de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Bager *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Le niveau plus élevé de maladies associées au système immunitaire chez les enfants nés par césarienne pourrait démontrer que le microbiote transféré lors de la naissance a un effet sur le développement et la maturation du système immunitaire. Pour ce qui est de la truie, le microbiote vaginal a peu été décrit. Une étude a cependant montré qu'il était principalement composé de Firmicutes (60,88 %) suivi des Proteobacteria (20,45 %) et des Bacteroides (9,19 %). Les genres les plus retrouvés étaient quant à eux : *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Alkaliphilus* et *Cronobacter* (Wang *et al.*, 2017). Le transfert de ce microbiote de la truie au porcelet n'a pour le moment pas été étudié. Cependant, dans une étude les auteurs ont mesuré la possibilité d'un lien entre le microbiote vaginal de la truie et la mortalité avant le sevrage ainsi que le nombre de porcelets sevrés (Sanglard *et al.*, 2020). Ceci suggère donc que ce microbiote peut avoir un effet sur la santé du porcelet, et ce, jusqu'au sevrage.

Certaines études semblent cependant démontrer que cet apport bactérien est minime et que l'apport de bactéries au niveau du microbiote serait plutôt lié au lait maternel (Matsumiya *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2007).

Lait maternel

Dans les premiers jours après la naissance, le lait de la truie est le facteur externe qui exerce le plus grand impact sur le microbiote du porcelet (Liu *et al.*, 2019). Ceci est également illustré chez l'Homme où des différences importantes ont été observées entre les enfants nourris au lait maternel et ceux nourris au lait maternisé.

Ces différences peuvent, entre autres, être expliquées par les nutriments contenus dans le lait qui ont un impact important sur le développement du microbiote. En effet, les résultats de plusieurs études suggèrent que le lactose, les protéines et le gras contenus dans le lait affectent tous significativement le profil bactérien du microbiote intestinal des porcelets (Poroyko *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Bian *et al.*, 2016). De ces composantes, ce sont les variations de concentration en lactose qui semblent avoir le plus grand impact. En effet, d'après l'étude de Bian

et al. cette concentration expliquerait 74,5 % de la variation observée au niveau du microbiote digestif des porcelets. Dans cette même étude, la concentration de lactose était positivement associée à la représentation des *Lactobacillus*, *Ruminococcus* et *Faecalibacterium* dans l'écosystème. Ces bactéries sont toutes considérées comme des membres bénéfiques du microbiote intestinal. Les protéines, quant à elles, étaient liées à la présence des *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus* et *Staphylococcus* qui sont plutôt considérés comme défavorables (Bian *et al.*, 2016). Le lait maternel contient aussi des oligosaccharides qui sont des glucides complexes composés normalement de 3 à 10 monosaccharides. Ces molécules ont plusieurs effets bénéfiques sur le microbiote intestinal. Comme ces sucres complexes sont très difficilement digestibles, ils ont un effet prébiotique important (Tao *et al.*, 2010; Moossavi *et al.*, 2018). En effet, il a été démontré que les bactéries du microbiote intestinal des nourrissons sont capables de fermenter ces molécules *in vitro* (LoCascio *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré qu'il est possible de modifier le microbiote fécal des enfants nourris au lait maternisé en ajoutant des oligosaccharides de lait humain à leur alimentation (Rao *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2010). Celui-ci contient aussi une variété de molécules antibactériennes telles que les lactoferrines. Elles ont une haute affinité pour le fer, rendant cette composante essentielle de la croissance bactérienne inaccessible, inhibant leur croissance et réduisant l'expression des facteurs de virulence (Gopalakrishna et Hand, 2020). Les lactoferrines peuvent aussi endommager la paroi cellulaire des bactéries gram négative par leur interaction avec les LPS et réduire la formation de biofilms qui nécessitent dans certains cas un apport important de fer (Appelmelk *et al.*, 1994). En plus de ces effets inhibiteurs, la lactoferrine pourrait aussi avoir un effet positif sur la croissance de certaines populations du microbiote. Il a été démontré qu'une protéine constituée de la lactoferrampine et la lactoferricine (deux molécules dérivées de la lactoferrine) avait un effet positif sur la croissance des *Bifidobacteria* et des lactobacilles dans l'entièreté du système digestif de porcelets sevrés (Tang *et al.*, 2012). Un autre facteur important contenu dans le lait maternel et pouvant affecter le microbiote intestinal des nouveau-nés est la présence d'immunoglobulines. En effet, on y retrouve une quantité importante d'immunoglobulines A sécrétaires (SIgA) ayant un effet protecteur contre les pathogènes, au moment où le système immunitaire du porcelet n'est pas encore complètement développé, qui peuvent aussi être responsables de modification

au niveau du microbiote commensal (Dunne-Castagna *et al.*, 2020). Il a par exemple été démontré que chez des souriceaux nourris de lait ne contenant pas d'SIgA, leur microbiote était enrichi de *Pasteurellaceae* (phylum *Proteobacteria*) et de *Lachnospiraceae* (phylum *Firmicutes*) qui sont souvent observés chez les patients pédiatriques souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (Rogier *et al.*, 2014). De plus les SIgA pourraient promouvoir la colonisation du mucus intestinal par certaines populations commensales en aidant leur adhésion à cette structure et leur utilisation des nutriments qui s'y trouvent (*e.g. Bacteroides thetaiotaomicron*) (Nakajima *et al.*, 2018). Ainsi, la présence de ces molécules dans le lait maternel pourrait stimuler certaines populations bactériennes particulières et expliquer une partie des différences de microbiote entre les enfants nourris au lait maternisé et ceux nourris au lait maternel. De plus, certaines de ces molécules auraient aussi la capacité de réduire les infections bactériennes en se liant à la paroi de certaines bactéries et empêchant ainsi leur attachement aux cellules épithéliales de l'intestin (Nakano *et al.*, 2001). Finalement, il a aussi été démontré que le lait maternel peut directement contenir des acides gras à courte chaîne (SCFA) tel que le butyrate (Dai *et al.*, 2020). Ces molécules sont une source importante d'énergie pour les entérocytes et minimisent la perméabilité de la muqueuse en plus d'avoir un effet anti-inflammatoire (Liu *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2020). Ces effets sur la santé du système digestif pourraient donc avoir un effet sur le microbiote lui-même.

Le lait maternel est aussi une source directe de bactéries. En effet, même s'il a longtemps été considéré comme stérile, il a maintenant été démontré que celui-ci contient des bactéries qui sont importantes pour l'implantation d'un microbiote sain chez les nouveau-nés. Le séquençage à haut débit du lait de 16 femmes a permis d'identifier neuf genres présents chez tous les individus, qui représentaient 50 % du microbiote total : *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* et *Bradyrhizobiaceae* (Hunt *et al.*, 2011). Toutefois, dans une étude effectuée chez la truie, les genres bactériens les plus retrouvés étaient *Lactobacillus*, deux genres non identifiés de la famille des *Ruminococcaceae* et des *Lachnospiraceae*, auxquels s'ajoute un genre non classifié de l'ordre des *Clostridiales* (Chen *et al.*, 2018). Dans cette même étude, les auteurs ont noté des différences significatives entre le microbiote du colostrum et celui du lait. Comme le colostrum est le premier aliment consommé par les porcelets, il pourrait être particulièrement important pour

l'implantation initiale du microbiote intestinal. Cependant, à notre connaissance, pour le moment aucune étude ne s'est penchée sur ce phénomène. De façon semblable, une autre étude a démontré une évolution du microbiote du lait tout au long de la lactation avec une transition de bactéries principalement lactiques à un microbiote plus proche du microbiote buccal (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). Cette transition pourrait permettre de commencer l'adaptation du nourrisson à la nourriture solide.

La source de ces bactéries au niveau du lait maternel n'est pas encore bien connue (Ruiz *et al.*, 2019). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que celles-ci proviennent en fait de la bouche du nourrisson. En effet, Ramsay *et al.* ont démontré un haut niveau d'écoulement rétrograde de la bouche du nouveau-né vers les canaux lactifères, ce qui permettrait un échange bactérien entre la bouche et la glande mammaire (Ramsay *et al.*, 2004). Ceci pourrait expliquer la forte présence de *Streptococcus* dans le lait puisque cette bactérie est fortement représentée dans la bouche (Funkhouser et Bordenstein, 2013; McGuire et McGuire, 2017). Une autre source du microbiote du lait pourrait être le microbiote de la peau. En effet, plusieurs taxons bactériens normalement associés au microbiote cutané adulte tels que *Staphylococcus*, *Corynebacteria* et *Propionibacteria* y ont été retrouvés. Ces bactéries y étaient cependant représentées dans des proportions très différentes de celles retrouvées sur la peau, écartant donc d'après les auteurs de cette étude la simple contamination des échantillons lors de la collecte (Hunt *et al.*, 2011). Dans les dernières années, plusieurs ont émis l'hypothèse que certaines des bactéries retrouvées dans le lait pourraient aussi provenir du microbiote intestinal maternel. Dans ce modèle, les bactéries pourraient traverser la barrière épithéliale, être phagocytées par des cellules dendritiques ou des macrophages et migrer à l'intérieur de ces cellules vers les glandes mammaires avant d'être transférées aux nouveau-nés lors de la lactation (Funkhouser et Bordenstein, 2013; McGuire et McGuire, 2017; Moossavi et Azad, 2019). Pour soutenir cette hypothèse, l'utilisation de méthodes de séquençage à haut débit a, par exemple, permis l'identification d'un ensemble de bactéries anaérobies obligatoires retrouvées à la fois au niveau du microbiote intestinal de la mère et du nouveau-né, mais aussi dans le lait maternel (Jost *et al.*, 2014). De plus, en utilisant des méthodes de culture et de typage moléculaire, il a été possible de retrouver une même souche de *Bifidobacterium breve* dans les fèces de la mère, son lait et son nouveau-né, à partir de quatre

jours après l'accouchement (Jost *et al.*, 2014). Les auteurs de cette étude ne tiennent cependant pas compte de la possibilité d'un transfert par contamination fécale. Des résultats semblables ont aussi été obtenus dans une étude chez les souris avec des souches de *Lactococcus* marquées (de Andres *et al.*, 2017). La preuve complète de cette hypothèse de transfert du microbiote intestinal vers le lait n'est toutefois pas encore faite puisqu'il n'a pas été possible de retrouver ces bactéries intestinales dans le sang des femmes enceintes. Ces résultats démontrent cependant l'importance du lait maternel dans l'apport et la stimulation de certaines populations bactériennes au tout début de la vie des mammifères.

Effet de la génétique

En plus de ces facteurs externes, il semble que la génétique même des porcelets puisse affecter la transmission et l'implantation de certaines populations microbiennes. Par exemple, dans une étude de 2016, Bian *et coll.* ont décrit le développement du microbiote intestinal de porcelets de races différentes, élevés dans les mêmes conditions et nourris par la même truie. Dans cette expérience les porcelets de race Meishan avaient une plus haute concentration de *Lactobacillus* et une plus faible concentration d'*Escherichia - Shigella* que les porcelets de race Yorkshire nourris par la même truie. Ces différences pourraient en partie expliquer la plus grande résistance des porcs Meishan à certaines maladies (Bian *et al.*, 2016). Chez les humains, il a aussi été démontré que les microbiotes de jumeaux homozygotes sont plus semblables que ceux de jumeaux hétérozygotes, et que ceux des jumeaux hétérozygotes sont plus similaires entre eux que comparés à ceux d'individus sans relations génétiques (Goodrich *et al.*, 2014). Dans cette étude, certains taxons bactériens tels que les *Christensenellaceae* (famille) ont été identifiés comme étant particulièrement liés à ces facteurs génétiques. La présence de cette famille était aussi positivement associée à la présence de la famille des *Methanobacteriaceae* (Archaea) qui contient *Methanobrevibacter smithii*, un méthanogène important du microbiote intestinal humain, qui est associé à la minceur (Goodrich *et al.*, 2014; Goodrich *et al.*, 2016). Il semble donc que la génétique des porcs puisse affecter leur microbiote et possiblement leur santé et leur performance.

Évolution du microbiote

Évolution géographique

À l'intérieur même du système digestif, il a été démontré que le microbiote est variable. Ceci peut être expliqué par le fait que les différentes régions de l'intestin du porc ont des fonctions différentes. Le petit intestin est par exemple responsable des digestions chimiques et mécaniques et de l'absorption des nutriments, alors que c'est au niveau du gros intestin que se déroule l'absorption de l'eau et la fermentation bactérienne. Les populations bactériennes retrouvées dans ces différentes niches sont donc le reflet des caractéristiques de cet environnement (Looft *et al.*, 2014). Il a été démontré que dans les premiers segments de l'intestin soit le duodénum, le jéjunum et l'iléum, ce sont les *Proteobacteria* qui sont représentées en moyenne en plus grande quantité (47 %), suivies de très près par les *Firmicutes* (45 %). Au niveau du caecum, du côlon et des fèces, les *Firmicutes* dominent (67 %) et sont suivies des *Bacteroidetes* (23 %), alors que les *Proteobacteria* ne sont présentes qu'à 7 % (Zhao *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2019). Ces différences peuvent être expliquées entre autres par la disponibilité des nutriments dans le milieu. En effet, au niveau du petit intestin, la disponibilité des sucres simples qui peuvent être utilisés par les *Proteobacteria* et les *Firmicutes* est élevée et les bactéries de ces phylums peuvent croître facilement. Au niveau du gros intestin se retrouvent plutôt des sucres complexes tels que les fibres végétales qui peuvent être dégradées par les *Bacteroidetes* et dont les produits de dégradation pourront être utilisés par les *Firmicutes* (Looft *et al.*, 2014). Ceci explique la forte présence du genre *Prevotella*, spécifiquement dans le caecum, puisque cette bactérie est reconnue pour sa capacité à dégrader les fibres végétales. Les différences pourraient aussi être expliquées en partie par la plus forte présence d'oxygène dans les premiers segments de l'intestin. En effet, les *Proteobacteria* et les *Firmicutes* sont deux phylums contenant des bactéries aérotolérantes alors que les *Bacteroidetes* sont toutes anaérobiques (Looft *et al.*, 2014). De façon similaire, la présence de sels biliaires dans les premiers segments de l'intestin peut aussi influencer la composition du microbiote. Ainsi, il a été démontré que *Prevotella* était hautement sensible à ces molécules, ce qui pourrait expliquer sa faible présence dans le petit intestin (Zhang *et al.*, 2018). La présence de molécules antibactériennes produites par le système immunitaire inné est aussi plus grande au niveau proximal du petit intestin que dans la partie distale. Ceci est

en partie responsable de la création d'un gradient bactérien avec une plus grande concentration et une plus grande diversité bactérienne dans la partie distale (Donaldson *et al.*, 2016). Par exemple, par l'action des REGIIIy qui agissent sur les bactéries gram-positives mais aussi celle des α -defensines produites par les cellules de Paneth et des β -defensines des neutrophiles (Gallo et Hooper, 2012). La structure du mucus retrouvé dans les différents segments de l'intestin peut aussi affecter le microbiote qui s'y retrouve, par la capacité de certaines bactéries à s'y attacher (Donaldson *et al.*, 2016). En effet, au niveau du petit intestin, la couche de mucus est dense et est colonisée par certaines bactéries particulières telles que les *Lactobacillaceae* (Sengupta *et al.*, 2013). Au niveau du côlon, on retrouve plutôt deux couches de mucus avec une couche externe plus relâchée où se retrouvent des bactéries pouvant dégrader la mucine et une couche interne plus dense qui ne peut être pénétrée qu'en faible quantité bactérienne (Donaldson *et al.*, 2016).

En plus des différences longitudinales, tout au long du tube digestif, il existe aussi des différences transversales au niveau du microbiote. En effet, il a été démontré que les bactéries retrouvées au niveau de la lumière intestinale sont significativement différentes de celles associées à la muqueuse (Burrough *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Adhikari *et al.*, 2019). Une autre étude a démontré qu'au niveau du caecum et du côlon, les genres *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* et *Lawsonia* étaient présents en plus grand nombre au niveau de la muqueuse que dans le lumen, alors que le genre *Prevotella* était présent en plus faible quantité (Zhang *et al.*, 2018). Ces différences pourraient être associées à une plus grande présence d'oxygène à proximité de la muqueuse. En effet, l'oxygène qui diffuse des réseaux de capillaires épithéliaux crée un environnement microaérophile favorable à certaines bactéries. Il a aussi été suggéré que des différences au niveau des nutriments disponibles, du pH, de la concentration de molécules antimicrobiennes et de la capacité des bactéries à pénétrer le mucus pourraient être responsables de certaines de ces variations, (Adhikari *et al.*, 2019).

Ces variations géographiques dans la composition du microbiote sont à garder en tête lors d'études sur le microbiote. En effet, pour des raisons pratiques, la majorité de ces expériences observent les variations au niveau fécal. Comme il a été démontré que ce microbiote est plutôt associé au microbiote du caecum et du côlon chez le porc, des variations au niveau du petit intestin ou même au niveau du microbiote mucosal peuvent être difficilement mesurables.

Malgré cela, l'utilisation de ce type d'échantillon comme mesure approximative des variations du microbiote est toujours la meilleure façon de l'étudier lorsque le sacrifice des sujets n'est pas possible.

Évolution temporelle

Depuis la naissance des porcelets et jusqu'à l'âge adulte, on assiste à un remplacement de plusieurs populations bactériennes au niveau intestinal et à une évolution du microbiote vers une forme stable et mature. En effet, plusieurs études ont démontré des différences importantes de structures du microbiote à différents âges des porcs tout au long de la production. Ainsi, dans les premières semaines de vie, la diversité microbienne retrouvée au niveau du système digestif des porcelets est au plus faible. Par exemple, avant le sevrage il a été démontré que le nombre d'OTUs et leur diversité phylogénétique étaient plus faibles que ceux observés lors de la croissance (neuf semaines) et de la finition (douze semaines) (Holman et Chénier, 2014). Ces résultats sont confirmés par l'étude de différents indices de diversité alpha qui relèvent une plus faible diversité et une plus faible uniformité des populations microbiennes digestives en début de vie, avec une augmentation tout au long de la croissance (Bian *et al.*, 2016). Ces modifications accompagnent la maturation physiologique du porcelet, avec des étapes de changements majeurs (sevrage), et sont affectées par des paramètres extérieurs (par exemple des régimes alimentaires et possiblement des maladies/traitements).

Après la naissance

En plus des bactéries transférées par la truie in-utéro, les premières bactéries à s'implanter au niveau du système digestif à la suite de la mise-bas sont des bactéries aérobies et anaérobies facultatives provenant de multiples sources, comme expliqué précédemment, telles le lait, le microbiote vaginal, mais aussi l'environnement. En effet, il a été démontré qu'il était possible de retrouver *Escherichia coli*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* dans le système digestif des porcelets et des enfants, et ce, dès les premiers jours après la naissance (Smith, 1965; Favier *et al.*, 2002; Konstantinov *et al.*, 2006; Tajima et Aminov, 2015). Ainsi dans une étude par culture bactérienne classique, les auteurs ont pu retrouver ces genres au niveau de l'estomac et du petit intestin 3h après la naissance et au niveau du gros intestin après 12h (Smith, 1965). Une autre étude a aussi

démonstré que 45% des séquences clonées provenant d'échantillons d'iléons correspondaient à *E. coli* et *S. flexneri* deux jours après la naissance. Dans cette même étude, les auteurs ont aussi mesuré des niveaux de *Lactobacillales* de l'ordre de 10^7 cellules par grammes de matière fécale (Konstantinov *et al.*, 2006). De façon similaire, dans une étude sur le développement du microbiote des porcelets qui mesurait l'influence de la race à l'aide de séquençage à haut débit, les Firmicutes étaient prédominants dans tous les échantillons avec 65,6 % des séquences, alors que les Proteobacteria constituaient le deuxième groupe le plus présent, un jour après la naissance, mais seulement chez les porcelets élevés au contact d'une truie de race Yorkshire. En effet, chez les porcelets élevés par une truie de race Meishan on mesurait plutôt une forte présence de *Fusobacteria* liée à une présence réduite de Proteobacteria. Au niveau des genres, les principaux retrouvés entre le premier et le troisième jour après la naissance étaient *Escherichia/Shigella*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Clostridium*. Au troisième jour, une réduction des *Proteobacteria* et une augmentation des *Bacteroidetes* étaient mesurées. Ces résultats sont en accord avec la théorie selon laquelle les protéobactéries produisent, dans les premières heures après la naissance grâce à leur consommation d'oxygène dans le milieu intestinal, un milieu favorable à l'établissement des bactéries anaérobies strictes (Bian *et al.*, 2016). En effet, pour ce qui est des bactéries anaérobies strictes, leur niveau augmente à partir du deuxième jour après la naissance (Swords *et al.*, 1993; Tajima et Aminov, 2015). La portée universelle de ces résultats est cependant modulée par une autre étude qui a plutôt démontré une forte présence de *Clostridiceae*, un groupe qui contient des bactéries anaérobies, tout de suite après la naissance (3h), suivie d'une forte diminution après trois jours (Petri *et al.*, 2010). Ceci confirme, avec les résultats obtenus dans les naissances par césarienne, qu'il peut y avoir d'importantes variations dans les premières populations bactériennes à s'établir après la naissance chez le porcelet. Ces variations pourraient être liées à des différences du microbiote environnemental et maternel lors de la naissance et avoir des impacts sur le développement du porcelet.

Pendant l'allaitement

Suite à son établissement primaire et jusqu'au sevrage, le microbiote digestif reste relativement stable. Comme il a été précisé précédemment, un des facteurs qui influence de façon importante le microbiote fécal du porcelet dans les premières semaines de la vie est la consommation

exclusive de lait. En effet, pendant cette période l'apport de nutriments spécifiques du lait est responsable de la surreprésentation de certaines populations microbiennes comparativement aux porcs matures. Pendant la lactation, une étude a démontré que le microbiote des porcelets est principalement composé de bactéries des genres *Bacteroides*, *Oscillibacter*, *Escherichia/Shigella*, *Lactobacillus* et de *Ruminococcaceae* non classifiés (Mach *et al.*, 2015). La présence d'un plus haut niveau de *Bacteroides* et d'*Oscillibacter* lors de l'allaitement avait déjà été décrite chez les humains (Palmer *et al.*, 2007; Marcobal *et al.*, 2011). Ces bactéries sont connues pour utiliser les oligosaccharides présents dans le lait et les glycanes de l'hôte comme source de carbone (Palmer *et al.*, 2007; Marcobal *et al.*, 2011). De plus, des études ont mesuré à cette étape une plus grande proportion d'*Enterobacteriaceae* qu'après le sevrage. Ceci est particulièrement intéressant puisque cette famille contient plusieurs genres potentiellement pathogènes tels que *Salmonella* (Holman et Chénier, 2014). D'après Marcobal et coll., la présence de ces entérobactéries dès les premières semaines de la vie des porcelets, démontre que certaines bactéries possiblement pathogènes sont présentes dès la constitution du microbiote normal, n'attendant qu'un moment de stress tel que le sevrage pour causer la maladie (Marcobal *et al.*, 2011). En effet, il a été démontré que dans les premiers jours de vie, les porcelets peuvent être fortement colonisés par *Campylobacter* spp. (Weijtens *et al.*, 1997).

Transition au sevrage

Le sevrage, qui se déroule entre 14 et 28 jours d'âge est une période très importante dans la production porcine (Sweeney et O'Doherty, 2016). À cette étape, l'alimentation du porcelet passe du lait maternel (facilement digestible) à une alimentation basée sur les céréales dont la composition chimique est très différente. Les porcelets vivent en parallèle des stress associés à la séparation de la mère et aux changements d'environnements (locaux et mélange avec contemporains issus d'autres portées). Ces changements mènent à une réduction de la consommation de nourriture ainsi qu'à des changements au niveau de la muqueuse intestinale tels qu'une atrophie des villosités, une hyperplasie des cryptes, une réduction de l'activité des bordures en brosses, une perturbation de la couche de mucine, une augmentation de la sécrétion des cytokines inflammatoires et une modification du microbiote (Sweeney et O'Doherty, 2016; Guevarra *et al.*, 2019). De plus, le sevrage entraîne une augmentation du pH gastrique (Heo *et al.*,

2013). Ceci pourrait être dû à une réduction de la production d'acide par l'estomac mais aussi au retrait du lactose de l'alimentation. En effet, avant celui-ci, le lactose présent dans le lait est converti en acide lactique et acidifie le milieu gastrique contribuant à protéger normalement l'animal contre les pathogènes. L'une des conséquences les plus fréquentes de ces phénomènes est l'apparition d'une diarrhée post-sevrage qui touche généralement les porcelets entre trois et dix jours après le sevrage et qui est liée à une augmentation de la population d'*E. coli* entérotoxigéniques (Sweeney et O'Doherty, 2016).

L'âge au sevrage pourrait avoir un effet important sur la santé de l'animal et son microbiote. En effet, un sevrage tardif a été proposé comme stratégie pour limiter les problèmes liés à cette période puisqu'elle pourrait améliorer la santé globale, augmenter les performances et réduire la mortalité associée à cette étape (Main *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006). Il a été démontré que des animaux non sevrés à 42 jours d'âge avaient un microbiote ayant une plus grande diversité que ceux plus jeunes (14 à 28 jours). De plus les animaux, sevrés à 14 jours avaient une plus faible présence de *Faecalibacterium prausnitzii*, une bactérie qui est considérée bénéfique, et ce, même 60 jours après le sevrage (Massacci *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent qu'un sevrage tardif permet d'obtenir un microbiote plus mature qui pourrait améliorer la santé intestinale et possiblement augmenter la résistance aux pathogènes à long terme.

Comme il a été précisé, ce changement dans l'alimentation est accompagné d'un changement important du microbiote intestinal. Durant les premiers jours après le sevrage, une baisse transitoire de la biodiversité est remarquée, suivie d'une augmentation importante : cette phase est donc caractérisée par une instabilité importante pour le microbiote (Inoue *et al.*, 2005; Pajarillo *et al.*, 2014; Pollock *et al.*, 2018a). Au niveau des phylums les plus représentés, des études soulignent une transition d'une communauté dominée par les *Firmicutes* avant le sevrage et à une domination des *Bacteroidetes* après celui-ci. (Pajarillo *et al.*, 2014) Au niveau des genres, *Prevotella*, *Acetivibrio*, *Oribacterium*, *Paraprevotella*, *Roseburia* et *Succinivibrio* ont été identifiés comme populations plus présentes suite au sevrage (Mach *et al.*, 2015). L'augmentation de la présence du phylum des *Bacteroidetes* peut principalement être expliquée par une augmentation rapide de la population de *Prevotella*. Ce genre, qui n'est présent qu'en faible proportion avant sevrage, passait par exemple de 0,3 % à 15 % de la communauté bactérienne totale dans une

étude et même jusqu'à 30 % dans une autre (Matsumiya *et al.*, 2002; Pajarillo *et al.*, 2014; Frese *et al.*, 2015; Pollock *et al.*, 2018a). Cette augmentation est liée à la capacité de ces bactéries à utiliser les polysaccharides des plantes qui sont introduits lors de la transition de l'alimentation lactée vers le solide. En effet, une augmentation relative de l'activité de plusieurs enzymes associées à la dégradation de ces sucres complexes tels que les β -glucanases, cellulases, xylanases, et cellobiases a été mesurée. Ces enzymes permettent de digérer les polysaccharides présents dans les parois cellulaires des céréales (Ivarsson *et al.*, 2012; Frese *et al.*, 2015). De plus, parallèlement à cette augmentation des *Prevotella*, une réduction des *Bacteroides* et des *Oscillibacter* a été observée. Cette réduction serait également associée au retrait des oligosaccharides retrouvés dans le lait comme source de carbone (Marcobal *et al.*, 2011). Ainsi, après le sevrage, ces populations seraient désavantagées face aux *Prevotella* et seraient donc remplacées par celles-ci (Pajarillo *et al.*, 2014; Frese *et al.*, 2015). Ces modifications dans la composition du microbiote à cette étape sont très majoritairement dues au changement de composition de l'alimentation et non à l'apport de nouvelles bactéries par l'alimentation. (Frese *et al.*, 2015)

La modification du microbiote lors du sevrage, qui est souvent considéré comme une dysbiose transitoire, et la perte des anticorps du lait de la mère font de cette étape une période à risque pour la contamination par des pathogènes (Levast *et al.*, 2014; Gresse *et al.*, 2017). Il a été suggéré que l'établissement rapide d'un microbiote divers et sain pourrait réduire le risque de colonisation par *Salmonella*. En effet, il a été démontré dans une étude, qu'il y a un lien entre le statut sérologique de l'animal deux semaines après sevrage et la diversité de son microbiote. Lors de cette même période, la présence de membres de la famille des *Lachnospiraceae* est associée aux animaux non-infectés (Argüello *et al.*, 2019). Les auteurs proposent que la plus grande présence des *Lachnospiraceae*, qui sont principalement des bactéries anaérobiques strictes, indique une moins grande présence d'oxygène dans le milieu. De plus, cette famille contient plusieurs membres producteurs de butyrate. Ces deux facteurs pourraient donc prévenir la croissance de *Salmonella* chez ces animaux (Argüello *et al.*, 2019).

Post-sevrage et microbiote mature

Après le sevrage, la composition du microbiote continue d'évoluer jusqu'à atteindre une certaine maturité. En effet, il a été rapporté que la diversité alpha et la composition taxonomique du microbiote fécal du porc sont significativement altérées lors de sa croissance. Plusieurs études ont démontré qu'il y avait une association positive entre l'augmentation de l'âge et la diversité de celui-ci (Chen *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). Cette augmentation est possiblement causée par l'exposition à de nouveaux micro-organismes par l'aliment et par des modulations associées à l'introduction de nouveaux ingrédients, mais aussi possiblement par le contact avec de nouvelles bactéries dans l'environnement qui s'additionnent au réel effet de l'âge. Peu d'études sont pour le moment disponibles sur l'impact de l'introduction d'un porc mature à un nouvel environnement sur son microbiote. Cependant, au moins une étude a démontré que des animaux élevés dans des environnements différents (intérieur et extérieur) avaient aussi des microbiotes différents (Mulder *et al.*, 2009). De plus, des différences ont aussi été démontrées chez des truies ayant différents types de litière (Kubasova *et al.*, 2017). En plus de ces facteurs environnementaux, l'âge qui est un indicateur de la maturation physique de l'animal peut affecter le microbiote. En effet, la maturation cause des transformations au niveau du métabolisme, de l'immunité, de la sécrétion d'hormones, du système nerveux et du développement des muscles et des os. Il semble que tous ces changements pourraient avoir des effets sur le microbiote de l'animal (Wang *et al.*, 2019). L'effet complet de l'âge sur le microbiote du porc est difficile à déterminer puisque les porcs charcutiers n'atteignent pas leur réelle maturité physique avant d'être abattus. Cependant, il a été démontré qu'après une période de grand changement lors du sevrage, le microbiote pourrait atteindre une relative stabilité aussi tôt que dix jours après le sevrage. En effet, une étude n'a pu mesurer de différences significatives entre les porcelets 10 jours après le sevrage et 21 jours après le sevrage (Chen *et al.*, 2017). Alors qu'une autre étude a aussi démontré des différences entre les animaux âgés de six semaines et ceux de neuf semaines alors qu'une faible différence pouvait être mesurée entre ceux âgés de neuf et 12 semaines (Holman et Chénier, 2014). Finalement, une étude a démontré que la richesse du microbiote continue d'augmenter jusqu'à l'abattage pour atteindre des niveaux semblables à ceux de la truie indiquant une maturation complète du microbiote à cette étape (Wang *et al.*, 2019). Il semble

donc que le microbiote se stabilise tôt après le sevrage mais qu'il continue d'évoluer tout au long de la vie de l'animal.

Le microbiote des porcs adultes est principalement composé de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* (Holman et Chénier, 2014; Zhao *et al.*, 2015). À cette étape, au niveau du genre, un consortium composé des *Prevotella*, *Clostridium*, *Alloprevotella*, *Ruminococcus*, et de membres des *Rikenellaceae* (RC9 gut group) est retrouvé dans 99 % des échantillons de fèces de porcs d'après une méta-analyse de 12 études. Cependant en proportion ce sont les *Prevotella*, *Lactobacillus* et *Clostridia* qui prédominent avec de fortes variations d'abondance selon les différents segments de l'intestin (Holman *et al.*, 2017). Le microbiote des truies adultes a aussi été étudié et apparaît significativement différent de celui des porcs en engraissement. En effet, pour celles-ci ce sont les genres *Prevotella* et *Oscillospira* qui représentent la majorité du microbiote et 11 % des OTUs qui composent leur microbiote leur sont spécifiques en comparaison avec le microbiote des porcs en fin d'engraissement (Kubasova *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2019). Ces différences pourraient être associées à de multiples facteurs tels que le milieu où elles sont élevées, leur plus grande maturité et leur alimentation différente.

Malgré toutes les études qui ont été conduites sur le microbiote du porc et son évolution, il est encore pour le moment très difficile d'en avoir un portrait consolidé. En effet, comme il a été discuté précédemment, les techniques d'analyse du microbiote par séquençage à haut débit sont encore en constante évolution, et le choix d'une méthode peut introduire des différences importantes dans les résultats obtenus, rendant parfois difficile la comparaison entre les différentes études. De plus, comme différentes pratiques zootechniques (l'introduction d'additifs alimentaires ou le choix du type d'aliment consommé par les animaux) peuvent modifier ce microbiote. Lorsque les mêmes techniques de séquençage sont utilisées, la comparaison entre les fermes peut aussi rester complexe. En effet, en conditions réelles d'élevage est très difficile de contrôler l'ensemble des différents facteurs confondants qui peuvent affecter le microbiote de l'animal. Les informations obtenues sont tout de même importantes pour nous mener vers une réelle description du microbiote et une meilleure compréhension de sa dynamique.

Facteurs pouvant affecter le microbiote porc

Une fois implanté, le microbiote intestinal du porc peut être, tout au long de sa vie, affecté par plusieurs facteurs tels que des modifications de son alimentation, des périodes de stress, des variations au niveau du système immunitaire ou un apport d'antibiotiques.

Système immunitaire

Le microbiote intestinal a coévolué avec le système immunitaire de façon à établir une colonisation stable et à long terme.

Par exemple, au niveau de la muqueuse intestinale se retrouve une grande quantité d'IgA qui peuvent se lier avec les bactéries du microbiote. Cette liaison pourrait, dans certains cas, augmenter ou réduire la capacité de certaines populations à s'y multiplier. Différents mécanismes ont été proposés pour ces effets, comme par exemple des altérations de l'expression des gènes, de la mobilité et/ou de la localisation des micro-organismes. Ils pourraient être dûs à des mécanismes comme l'agglutination, la croissance enchaînée, la neutralisation ou l'exclusion immunitaire (Bunker *et al.*, 2017). Il a par exemple été démontré, chez des souris immunodéficientes et sans IgA, que *B. thetaiotaomicron* cause une réponse immunitaire innée plus robuste et réagit en induisant des gènes du métabolisme des produits oxydatifs. La présence d'IgA quant à elle réduisait la signalisation pro-inflammatoire et l'expression de certains épitopes chez la bactérie tout en réduisant sa compétitivité (Peterson *et al.*, 2007). La présence de ces anticorps permet donc de balancer la réponse oxydative de l'hôte et la croissance de cette bactérie au niveau du microbiote.

Certaines bactéries peuvent aussi moduler le système immunitaire de façon à s'assurer d'y être tolérées. Il a été démontré que le polysaccharide A de *B. fragilis* a un effet immunomodulateur. La présentation de cette molécule par des cellules telles que les cellules dendritiques stimule la production d'IL-10 par les cellules T régulatrices. La stimulation de ce signal anti-inflammatoire contribue à la capacité de la bactérie à pénétrer la couche de mucus du côlon (Round *et al.*, 2011). De façon similaire, il a été démontré que *Bifidobacterium breve* augmente la tolérance immunitaire en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires et en prévenant la réponse par les cellules B (Fanning *et al.*, 2012). Finalement, il a été démontré que les bactéries

filamenteuses segmentées (SFB) qui adhèrent de façon intime aux cellules épithéliales stimulent le développement des cellules T helper 17 qui sont à leur tour nécessaires pour la colonisation normale de ce micro-organisme (Ivanov *et al.*, 2009).

Plusieurs signaux non spécifiques peuvent aussi induire la tolérance envers le microbiote intestinal bénéfique. Par exemple, les acides gras à courte chaîne tels que le butyrate, le propionate et l'acétate qui sont des produits principaux de la fermentation anaérobie au niveau du côlon peuvent stimuler le développement des cellules T régulatrices (Treg) (Smith *et al.*, 2013). La production de ces molécules pourrait ainsi être un moyen par lequel le système immunitaire reconnaît et tolère les bactéries bénéfiques du microbiote. De façon similaire, la protéine MUC2, qui est une composante du mucus intestinal, lorsqu'elle est présentée par les cellules dendritiques, inhibe l'expression de signaux pro-inflammatoires. L'hypothèse est donc que des bactéries du microbiote dégradant le mucus puissent induire la tolérance de l'hôte (Shan *et al.*, 2013).

Il semble donc que les bactéries du microbiote et le système immunitaire aient évolué pour atteindre un type de trêve qui permet l'établissement d'un microbiote persistant et élaboré au niveau de la muqueuse intestinale sans déclencher de réponse inflammatoire.

Stress

Tout au long du cycle de production, les porcs sont sujets à de multiples événements pouvant leur causer du stress tel que le transport, le mélange de différentes portées, l'insémination chez la truie, mais surtout le sevrage chez le porcelet. Ces événements pourraient avoir un impact sur le microbiote de ces animaux (Nowland *et al.*, 2019).

Il a par exemple été démontré, que des rats exposés à une séparation maternelle durant plusieurs heures pendant 12 jours et ensuite exposés à de nouveaux stress, déféquaient plus fréquemment, avaient un niveau de cortisol sanguin et une sensibilité viscérale plus élevée, mais surtout un microbiote fécal altéré (O'Mahony *et al.*, 2009). De la même manière, des souris exposées à des stress sociaux avaient une abondance plus faible de *Bacteroides* au niveau du microbiote fécal alors que la présence des *Clostridium* était plus élevée. Dans cette même étude,

une augmentation d'IL-6 et MCP-1 circulant, a aussi été mesurée et corrélée à une augmentation de certains genres bactériens spécifiques (Bailey *et al.*, 2011).

Pour ce qui est du porc, le stress qui a été le plus étudié est le sevrage. Cette étape est une période de stress multifactorielle puisqu'elle combine des stress sociaux, nutritionnels, environnementaux et psychologiques (Heo *et al.*, 2013). La part de chacun de ces stress sur les modifications du microbiote est difficile à identifier. Cependant, il a été suggéré qu'une augmentation des niveaux de cortisol à cette étape peut être responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale et du passage des LPS à travers la paroi intestinale. Ceci peut causer des diarrhées et une augmentation de la susceptibilité à la colonisation par des pathogènes, et donc des modifications importantes du microbiote (Santos *et al.*, 2001; Nowland *et al.*, 2019).

Gestation

Plusieurs études ont démontré des modifications du microbiote pendant la période de gestation. En effet, lors de la gestation les mammifères subissent des changements tant au niveau hormonal et immunitaire qu'au niveau métabolique et ils peuvent tous agir sur sa composition. Ces modifications ont été mesurées entre autres chez la femme où il a été démontré que des taxons appartenant principalement aux Clostridiales étaient surreprésentés dans le premier trimestre alors que la famille des Enterobacteriaceae et le genre *Streptococcus* l'étaient dans le troisième trimestre (Koren *et al.*, 2012). De plus, la progression de la grossesse était liée à une réduction de la diversité du microbiote individuel (diversité alpha), mais à une plus grande diversité interindividuelle (diversité bêta) (Koren *et al.*, 2012). Ces variations n'ont pas encore été mesurées chez la truie. Cependant ces mêmes facteurs pourraient influencer leur microbiote intestinal lors de cette période.

Pour ce qui est des changements hormonaux chez la truie, il est par exemple connu que les niveaux de progestérone sont élevés presque tout au long de la gestation alors que les niveaux d'estrogènes connaissent des pics au moment de l'oestrus et de la mise bas (Ka *et al.*, 2018). Ces deux hormones sont connues pour affecter directement certaines populations bactériennes (García-Gómez *et al.*, 2013). Par exemple, *Prevotella intermedia* peut assimiler l'estradiol et la progestérone, ce qui stimule sa croissance (Kornman et Loesche, 1982). Chez *Neisseria*

gonorrhoeae et *N. meningitidis*, la progestérone a plutôt un effet bactériostatique ou bactéricide selon sa concentration (Morse et Fitzgerald, 1974). Il a aussi été démontré que la progestérone inhibe la germination des spores de *Clostridium difficile*. Dans ce cas cette hormone se lierait sur les mêmes récepteurs que ceux reconnaissant le taurocholate, un sel biliaire stimulant la germination (Liggins *et al.*, 2011). Finalement, il a été décrit que des souris mâles recevant un supplément de 17 β -Estradiol avaient un microbiote plus semblable à celui des souris femelles qu'aux autres souris mâles ou aux souris femelles ayant subi une ovariectomie (Kaliannan *et al.*, 2018). Il semble donc que les hormones produites lors de la gestation peuvent avoir un effet direct sur certaines bactéries précises, mais aussi sur le microbiote intestinal global.

Pour ce qui est de la réponse du système immunitaire, la gestation est accompagnée par une inflammation de faible intensité au niveau de la muqueuse intestinale (Edwards *et al.*, 2017). En effet, il a été démontré qu'à ce niveau, chez la souris, le troisième trimestre de la gestation était accompagné d'une augmentation de cytokines inflammatoires et de lymphocytes (Koren *et al.*, 2012). Les auteurs de cette étude ont proposé que cette inflammation puisse induire des modifications du microbiote en conduisant à une dysbiose intestinale qui à son tour altère la réponse de l'hôte dans une boucle de rétroaction positive.

En parallèle, la gestation est aussi accompagnée de modification au niveau du métabolisme. En effet, le début de la gestation a été décrit comme ayant un état anabolique où la mère doit engranger des réserves énergétiques alors que la fin de la gestation est plutôt décrite comme un état catabolique où ses réserves doivent être utilisées (Zeng *et al.*, 2017b). Ces changements ont entre autres été associés à une réduction de la sensibilité à l'insuline et donc à une plus grande disponibilité de glucose et d'acides gras libres. Il a été proposé qu'en association avec l'inflammation de la muqueuse, ce glucose pourrait diffuser au niveau de l'intestin et ainsi stimuler la croissance de certaines populations bactériennes modifiant ainsi le microbiote (Gosalbes *et al.*, 2019; Mesa *et al.*, 2020).

Alimentation

En plus de la transition importante du lait maternel à l'alimentation solide lors du sevrage, l'aliment donné au porc pendant toute sa croissance peut subir plusieurs changements de

formulation à différentes étapes de la production. Ces changements pourraient être responsables de variations au niveau du microbiote intestinal (Nowland *et al.*, 2019). En effet, le microbiote tire directement son énergie des aliments ingérés par l'animal et certains de ces membres consomment certaines molécules de façon spécifique. Une étude chez des porcelets en pouponnière a démontré que le niveau de protéines contenues dans l'aliment avait un effet sur le microbiote et sur les métabolites sanguins. Chez les porcelets nourris d'un aliment contenant 12 % de protéines, le microbiote contenait plus *Christensenellaceae*, *Algoriphagus* et *Algiphilus* et une plus faible abondance de *Prevotella* comparé aux animaux nourris d'un aliment en contenant 24 % (Spring *et al.*, 2020). De façon similaire, des modifications ont été mesurées au niveau du microbiote iléal de cochettes de 65 jours d'âge. Chez ces animaux une augmentation de l'abondance des *Tenericutes* a pu être mesurée alors que la présence de plusieurs genres associés au phylum des *Bacteroidetes* était réduite. Les auteurs expliquent la réduction des *Bacteroidetes* par leur activité protéolytique qui est réduite par cette formulation. De plus, ces modifications étaient associées à une augmentation de la concentration totale d'acides gras à courte chaîne (Qiu *et al.*, 2018). Le type de fibres contenues dans l'aliment peut aussi modifier le microbiote. En effet, chez des porcs en engraissement, il a été démontré qu'un apport en fibres de soya augmentait la présence caecale d'*E. coli*, alors que celle de *Lactobacillus* au niveau de l'iléon était réduite. Lorsque ceux-ci étaient nourris avec un supplément de fibre de pois les *Lactobacillus* fécaux étaient augmentés, alors qu'on mesurait une augmentation chez les *Bifidobacterium* lorsque des fibres de blé étaient utilisées (Chen *et al.*, 2014). Il n'est pas à exclure que des modifications au niveau d'autres composantes de l'aliment telles que les sucres ou les gras puissent de façon semblable agir sur le microbiote de l'animal.

Antibiotiques

Tout au long de sa vie, le porc peut être exposé à des molécules antibiotiques qui affecteront son microbiote à plus ou moins long terme. Chez l'humain il a été démontré qu'un apport d'antibiotiques dans la période périnatale à un effet néfaste sur l'implantation du microbiote et sur le métabolisme qui peuvent mener à des problèmes de santé à long terme comme l'asthme et l'entérocolite nécrosante (Esaïassen *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2019). De façon similaire, l'addition d'antibiotiques dans l'alimentation des porcs affecte leur microbiote et leur métabolisme. Ces

effets ont été mesurés chez des animaux auxquels on a administré un cocktail d'ampicilline, de gentamycine et de métronidazole, qui peut être utilisé pour la prévention des entérocolites (Gao *et al.*, 2018). Chez ceux-ci la présence des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* était réduite au niveau de l'iléum deux jours après l'administration et sept jours après au niveau des fèces. Parallèlement une augmentation des *Escherichia/Shigella* a pu être mesurée. Ces changements étaient accompagnés d'une réduction de la concentration d'acétate et d'une augmentation de la concentration de cadavérine et d'indole. Une autre étude a aussi démontré que l'addition d'antibiotiques à des doses de promoteurs de croissance avait un effet sur le microbiote, 14 jours après le début du traitement. En effet, les porcs médicamenteux avaient une plus forte présence de Proteobacteria et cette augmentation est largement due à une croissance de la population des *E. Coli* (Looft *et al.*, 2012).

Impact sur la santé et le développement du porc

Système immunitaire

À la naissance, le système immunitaire du porcelet n'est pas complètement développé et cet état pourrait être important pour la tolérance de la présence des bactéries fondatrices du microbiote et son établissement au niveau de la muqueuse intestinale. En effet, à la naissance un faible nombre de leucocytes est retrouvé au niveau de la lamina propria qui se peuplera par étape tout au long de la maturation de l'animal. Dans la première semaine, on retrouve principalement des cellules dendritiques exprimant fortement le CMH de classe 2 et coexprimant CD45 et CD16 (Stokes, 2017). De plus, lors des deux premières semaines, des cellules lymphoïdes exprimant CD2, mais pas CD4 ou CD8, viennent aussi rapidement coloniser l'intestin. À partir de la deuxième semaine et jusqu'à la quatrième semaine, la muqueuse est colonisée par les cellules T CD4+, mais les CD8+ sont toujours absentes. À partir de ce moment, un petit nombre de cellules B produisant principalement des IgM sont aussi présentes. Finalement à partir de la cinquième semaine, apparaissent les cellules T CD8+ ainsi plusieurs cellules B produisant des IgA à l'intérieur des cryptes. À partir de la septième semaine, le système immunitaire intestinal est comparable à celui de l'animal mature (Stokes *et al.*, 2004). Il a aussi été démontré, qu'à la naissance chez les mammifères, le développement des cellules immunitaires des lignées T et B est principalement

axé vers la réponse régulatrice, et s'accompagne d'une production de cytokines inflammatoires réduite. Ceci a pour effet de permettre l'établissement du microbiote sans produire de réaction inflammatoire forte (Belkaid et Hand, 2014). La surreprésentation de la population de cellules érythroïdes CD71⁺ à la naissance est responsable de maintenir cette faible réaction immunitaire (Elahi *et al.*, 2013; Belkaid et Hand, 2014; Ryan *et al.*, 2019). La réponse cellulaire aux signaux antigéniques à la naissance est aussi adaptée à l'établissement du microbiote. Par exemple, chez les nouveau-nés la réponse TLR face aux LPS produit moins de médiateurs inflammatoires et plus de cytokines régulatrices (Kollmann *et al.*, 2012; Lazar *et al.*, 2018). De plus, l'exposition des nouveau-nés aux LPS conditionne les cellules épithéliales du système digestif à devenir hyporépondantes aux stimulations qu'ils provoquent subséquemment (Lotz *et al.*, 2006; Chassin *et al.*, 2010). Tout ceci converge vers un système immunitaire du porcelet à la naissance qui est adapté vers une réponse permissive face à un afflux massif de nouvelles bactéries.

La période néonatale est aussi une période importante dans l'éducation du système immunitaire. En effet, la muqueuse intestinale est en contact constant avec une multitude d'antigènes et le système immunitaire doit apprendre à différencier les menaces réelles provenant des micro-organismes pathogènes, des signaux provenant du microbiote commensal ou des aliments. Ce phénomène est nommé tolérance orale et réfère à la capacité du système immunitaire local et systémique à ne pas répondre à des antigènes administrés par voie orale (Wambre et Jeong, 2018). Le microbiote joue un rôle important dans cette éducation. En effet, les antigènes du microbiote peuvent être capturés par les cellules dendritiques CD103⁺. Ces cellules vont ensuite migrer vers les nœuds lymphatiques mésentériques et y induire la différenciation des cellules T en cellules Treg spécifiques à ces antigènes (Schulz *et al.*, 2009; Wambre et Jeong, 2018). Les Treg se dirigeront ensuite vers la lamina propria où elles pourront se multiplier pour induire la tolérance. Les mécanismes qui ont été proposés pour cette tolérance sont la promotion de la commutation isotopique vers la production d'IgA chez les cellules B, l'induction de l'anergie des cellules T effectrices et l'inhibition de cellules pro-inflammatoires (Wambre et Jeong, 2018). Cet effet du microbiote sur la tolérance orale a été démontré chez des porcelets élevés en isolateurs (sans contact maternel et avec du lait maternisé) ayant une plus faible diversité bactérienne

mesurée au niveau digestif. Ceux-ci présentent un ratio réduit de cellules T régulatrices/cellules T effectrices et un niveau plus élevé d'IgG dirigé contre une protéine du soja (Lewis *et al.*, 2012).

Il a aussi été démontré que les micro-organismes du système digestif jouent un rôle important dans le développement et la maturation du système immunitaire (Lewis *et al.*, 2012; Schokker *et al.*, 2014). Par exemple, les micro-organismes présents dans le système digestif ont un effet stimulateur sur la division cellulaire des tissus lymphoïdes associés au système digestif, et jouent aussi un rôle dans le développement et l'intégrité de l'épithélium digestif. Il a aussi été observé que des interventions affectant la diversité microbienne au niveau du système digestif lors des premiers jours de vie du porcelet affectent le fonctionnement d'une multitude de cellules immunitaires (CD4⁺, cellules T effectrices CD4⁺CD25⁺ et cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), ainsi que la construction de la réponse anticorps IgG (Lewis *et al.*, 2012). L'exposition en bas âge à d'autres molécules produites par les bactéries peut aussi avoir un effet immunomodulateur. Par exemple, certains sphingolipides bactériens ont un effet inhibiteur sur l'activation des cellules « invariant natural killer » et l'exposition en bas âge à ces molécules a un effet protecteur à long terme contre des maladies auto-immunes telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et l'asthme (Olszak *et al.*, 2012; Egshatyan *et al.*, 2015; Heaver *et al.*, 2018). Il semble aussi que certaines populations bactériennes spécifiques aient des effets particulièrement importants sur cette maturation. Il a par exemple été démontré que *Candidatus arthromitus* (aussi appelé bactéries filamenteuses segmentées (SFB)) induit la maturation des tissus lymphoïdes, une réponse IgA forte et une réponse des cellules T helper (auxiliaires) 17. Dans cette étude de 1999, chez des souris gnotobiotiques initialement non colonisées par ce micro-organisme, le niveau d'IgA produit ne revenait à un niveau normal que suite à une inoculation avec SFB, qui ne s'implantait qu'en faible proportion (1,4 %) (Talham *et al.*, 1999). Ces résultats avec SFB sont remarquables puisque l'effet sur le système immunitaire de plusieurs autres membres importants du microbiote intestinal a été testé sans obtenir d'effet aussi concluant (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, trois différents *Clostridium* spp., et *E. coli*) (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). Finalement, un apport d'antibiotiques en bas âge, qui déséquilibre le microbiote intestinal et rend la composition de ce dernier plus diverse mais chaotique, aurait un impact sur le système immunitaire. Une étude l'a démontré : des porcelets traités à

la tulathromycine ont une plus faible expression de TLR et de cytokine au niveau des intestins, ce qui réduit la communication immunologique (Schokker *et al.*, 2014).

Ainsi, il semble qu'en plus d'être orienté vers une réaction immunitaire permissive lors de l'implantation du microbiote intestinal durant les premiers jours de leur vie, le développement normal du système immunitaire des porcelets est induit, éduqué et régulé par la présence de certains éléments du microbiote.

Développement et santé du système digestif

Plusieurs études démontrent qu'en plus de l'intervention de facteurs propres à l'hôte (génétiques), le développement intestinal est affecté par le microbiote. En effet, il a été démontré que certains membres du microbiote ont un rôle tant dans la morphogénèse, que dans la modulation de la perméabilité de la muqueuse intestinale et la promotion de l'angiogénèse.

Il a par exemple été décrit que des souris gnotobiotiques inoculées d'un microbiote intestinal humain provenant d'enfants prématurés ayant un faible poids ou pas, montraient des différences significatives au niveau du développement de leur intestin. En effet, les souris ayant été inoculées avec le microbiote provenant d'enfants au poids élevé avaient des villosités plus longues (et des cryptes plus profondes), une plus grande prolifération cellulaire, plus de cellules caliciformes et plus de cellules de Paneth, ainsi que des jonctions serrées plus étanches. Les animaux inoculés avec du microbiote d'enfant de faible poids avaient un développement plus similaire à celui des animaux gnotobiotiques. Les auteurs suggèrent que certaines populations précises du microbiote induisent la maturation du système digestif et que des différences au niveau de la colonisation initiale du microbiote peuvent avoir des effets importants sur celui-ci (Yu *et al.*, 2016). Dans une autre étude, une atrophie des chylifères (par défaut de l'activité des macrophages stimulés par les bactéries) était aussi observée chez des souris après déplétion du microbiote intestinal par des traitements antibiotiques (Suh *et al.*, 2019). Pour ce qui est de l'angiogénèse, il a été démontré que certaines bactéries peuvent stimuler le développement vasculaire par la stimulation de la différenciation des cellules de Paneth (Khandagale et Reinhardt, 2018). Ainsi, les souris adultes élevées dans des conditions stériles avaient une formation de capillaires déficients au niveau des villosités intestinales. Cette formation était cependant rétablie dix jours après

l'inoculation par microbiote normal ou par *Bacteroides thetaiotaomicron*. Ce rétablissement n'était cependant pas observé chez les souris mutantes ne possédant pas de cellules de Paneth (Stappenbeck *et al.*, 2002). De plus, il a été démontré que la colonisation bactérienne augmente l'expression des gènes liés à l'angiogenèse menant, par exemple, à une plus grande production d'angiogénin-3 au niveau des cryptes (Hooper *et al.*, 2001).

La stimulation de la prolifération de certaines cellules peut à son tour affecter le microbiote. En effet, les cellules de Paneth qui sont situées au fond des cryptes sont responsables de la production de plusieurs molécules antimicrobiennes dont les principales sont les α -défensines (Ehmann *et al.*, 2019). Comme il a été précisé précédemment, la présence de ces molécules dans le petit intestin joue un rôle important dans la composition du microbiote et est nécessaire à l'établissement d'une balance entre l'hôte et le microbiote et l'établissement d'une barrière intestinale fonctionnelle. Il a par exemple été démontré chez l'homme qu'une dysfonction des cellules de Paneth mène à une dysbiose et que ces cellules anormales ayant une production réduite des α -défensines HD-5 et HD-6 étaient associées à des maladies intestinales inflammatoires (Salzman et Bevins, 2013; Ehmann *et al.*, 2019).

La fonction première du mucus intestinal est d'éviter le contact direct entre les micro-organismes présents dans le lumen et l'épithélium intestinal. Il a cependant été démontré que cette production de mucus par les cellules caliciformes est stimulée par certaines bactéries et que ce mucus a, à son tour, un effet sur la composition du microbiote. En effet, les souris gnotobiotiques ont une couche de mucus intestinal plus mince au niveau du petit intestin que celles qui ont un microbiote normal. De plus, la couche de mucus de ces souris gnotobiotiques contient une plus faible concentration de MUC2 et laisse passer des billes de la taille d'une bactérie (Johansson *et al.*, 2015). Il semble que la présence du microbiote intestinal induit l'expression des gènes codant la mucin 2 (*muc2*) et la galactoside 2-alpha-fucosyltransferase (*fut2*), ce qui affecte la force du mucus et la structure des glycanes de la mucine (Meng *et al.*, 2007; Bergström *et al.*, 2012). Il a été démontré qu'une couche de mucus déficiente est incapable de prévenir le contact entre le microbiote intestinal et l'épithélium de l'hôte. Ceci mène à une inflammation et à une détérioration de l'épithélium (Van der Sluis *et al.*, 2006; Schroeder, 2019). À son tour, ce mucus peut affecter la composition du microbiote puisque certaines bactéries telles que *Bacteroides*

thetaitaomicron peuvent s'y accrocher et utiliser les glycanes de la mucine comme source d'énergie. La dégradation de ce mucus peut ensuite produire des métabolites qui pourront à leur tour affecter la différenciation des cellules caliciformes, mais aussi l'abondance de certaines autres bactéries (Schroeder, 2019).

En plus d'affecter la production de mucus, le microbiote peut aussi affecter directement l'intégrité de la barrière épithéliale. Cette barrière est formée des cellules épithéliales de l'intestin liées entre elles par plusieurs structures telles que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Turner, 2009). Ces structures régulent la perméabilité de cette barrière et le passage de molécules par la voie paracellulaire (Barreau et Hugot, 2014). Des perturbations dans celle-ci sont connues pour être un mécanisme important dans plusieurs maladies inflammatoires et immunitaires. En effet, une augmentation de la perméabilité pourrait permettre la translocation de micro-organismes, de produits bactériens ou de toxines à travers l'épithélium de façon incontrôlée et mener à une réponse inflammatoire (Antonini *et al.*, 2019). Comme il a été mentionné précédemment, une inflammation au niveau intestinal a des effets importants sur la composition du microbiote. Cependant, certains de ses membres peuvent contribuer à maintenir l'intégrité de cette barrière, par exemple en régulant l'expression des jonctions serrées ou la prolifération des cellules épithéliales (Antonini *et al.*, 2019). Il a été démontré que pour les souris déficientes en IL-10 le traitement à l'aide de milieu conditionné par *Bifidobacterium infantis*, réduisait l'inflammation et normalisait la perméabilité de côlon en altérant l'expression des protéines de jonctions serrées (Ewaschuk *et al.*, 2008).

Ces résultats démontrent que les bactéries qui s'établissent au niveau du système digestif participent au développement de la niche qu'ils occupent, mais que l'hôte est aussi capable de réguler leur implantation. Un bon équilibre entre ces deux phénomènes participe au maintien de l'homéostasie intestinale et donc à la bonne santé digestive et ainsi à la productivité des animaux.

Protection contre Salmonella

La littérature démontre clairement que le microbiote intestinal peut aussi conférer directement une résistance à certains pathogènes, dont *Salmonella*, sans l'intervention du système immunitaire.

Molécules inhibitrices

Plusieurs des membres bactériens du microbiote produisent des molécules antibactériennes qui leur confèrent un avantage sur les autres populations dans leur niche écologique. Ces micro-organismes ont incidemment, la capacité d'augmenter la résistance de la communauté microbienne à certains micro-organismes pathogènes, ces molécules ayant une activité bactéricide ou bactériostatique.

Tout d'abord, certaines bactéries peuvent produire des molécules dérivées de leur métabolisme et ayant une activité antibactérienne non spécifique. Par exemple, il a été proposé que le peroxyde d'hydrogène, produit lors du métabolisme de certaines bactéries telles que *Lactobacillus acidophilus*, soit important dans le maintien d'un microbiote sain dans certaines niches écologiques. Un lien entre la présence de *Lactobacillus* produisant du H₂O₂ et une réduction du risque de vaginite bactérienne a été établi dans différentes études (Eschenbach *et al.*, 1989; Hawes *et al.*, 1996; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2019). De façon semblable, les acides organiques, notamment ceux à courte chaîne (formate, acétate, propionate et butyrate), qui sont produits principalement par les bactéries des phylums *Firmicutes* et *Bacteroidetes* lors de la fermentation de sucres complexes tels que les fibres, présentent des effets antibactériens, entre autres sur des *Gammaproteobacteria* (dont *Salmonella* et *E. coli*) (Garcia-Gutierrez *et al.*, 2019). Ces molécules sont retrouvées dans leur forme non-ionisée au pH faible de l'intestin et elles peuvent, sous cette forme, traverser la membrane lipidique de cellules bactériennes. Dans le cytoplasme de la bactérie, le pH étant relativement neutre, la molécule se dissocie et mène ainsi à une accumulation de protons et d'anions de cet acide. Ceci acidifie le cytoplasme par la libération de protons et les anions altèrent la balance osmotique (Sun et O'Riordan, 2013). Cet effet antibactérien a été confirmé dans une expérience *in vitro* où plusieurs acides organiques différents à courte et moyenne chaîne ont été testés sur des bactéries associées au microbiote buccal (Huang *et al.*, 2011).

De plus, il a été démontré que des souris, chez lesquelles un traitement antibiotique causait un déséquilibre du microbiote intestinal vers une réduction de la production d'acétate, de butyrate et de propionate au niveau du caecum, étaient plus facilement colonisées par *Candida albicans* (Guinan *et al.*, 2019).

En plus de ces molécules non spécifiques, certaines bactéries produisent des peptides antimicrobiens qui ont une activité ciblée. Ces peptides sont généralement d'une taille comprise entre 10 et 50 acides aminés et ont la capacité de tuer les bactéries en visant principalement leur paroi. Leur activité sur les différentes bactéries est donc dépendante de la composition de cette paroi (Garcia-Gutierrez *et al.*, 2019). Les peptides antimicrobiens peuvent être divisés en deux catégories. Premièrement, les peptides non ribosomiques, qui sont des métabolites secondaires synthétisés par des enzymes spécifiques, indépendamment de la synthèse peptidique classique (Hancock et Chapple, 1999). Peu de molécules de ce type ont été isolées dans le microbiote normal des humains et les peptides isolés tels que la cereulide, la zwittermicine et la tilivalline sont plutôt associés à des pathogènes (Donia et Fischbach, 2015). La deuxième catégorie de peptides nommés bactériocines est synthétisée par la voie ribosomique (Hancock et Chapple, 1999). Ces molécules sont produites tant par les bactéries Gram positif que Gram négatif et un grand nombre d'entre elles sont produites par les phylums *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Drissi *et al.*, 2015). Une grande variété de bactériocines sont donc produites par les bactéries présentes au niveau du microbiote intestinal et leur spectre d'activité est variable (Garcia-Gutierrez *et al.*, 2019). Ce spectre étant parfois large, plusieurs études ont proposé l'idée que ces bactériocines ont un impact important dans la dynamique des populations microbiennes (Riley et Gordon, 1999; Gillor *et al.*, 2008). Il peut être beaucoup plus spécifique et conférer un effet protecteur contre certains pathogènes. Il a été démontré qu'une souche d'*Enterococcus faecalis* peut éliminer la présence des *Enterococcus* résistants à la vancomycine par la production d'une bactériocine (Phumisantiphong *et al.*, 2017). Autre exemple, la souche Nissle 1917 d'*E. Coli* peut réduire la colonisation de *S. Typhimurium* par la production de microcines, qui sont de très petites bactériocines (Sassone-Corsi *et al.*, 2016).

En plus de ces molécules qui peuvent inhiber directement ou indirectement la croissance des pathogènes, certaines bactéries du microbiote produisent des molécules qui interfèrent avec l'expression de gènes de virulence (Antunes *et al.*, 2014). La production de molécules du quorum sensing en est un exemple. Il a été démontré que *Ruminococcus obeum* permet une réduction de la colonisation intestinale de *Vibrio cholerae* par la production de la molécule autoinductrice-2 (AI-2) (Hsiao *et al.*, 2014). En effet, en présence de *Vibrio cholerae*, l'expression de luxS et la

production de AI-2 augmentent significativement chez *Ruminococcus obeum*. La molécule AI-2 cause la répression de plusieurs gènes de colonisation chez *V. cholerae*. De façon similaire, il a été démontré que certains SCFA produits par le microbiote peuvent eux aussi affecter l'expression de gènes de virulence. Il a aussi été décrit que le butyrate et le propionate peuvent réduire l'expression des gènes de l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* 1 (SPI-1) de *S. Typhimurium*, impliqué dans l'internalisation de la bactérie, par exemple par l'acylation du régulateur transcriptionnel HilA (Hung *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Au contraire, l'acétate augmente cette expression (Lawhon *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter qu'un mélange de SCFA correspondant aux concentrations retrouvées au niveau du côlon a un effet de réduction de la virulence plus élevé qu'un mélange correspondant à des concentrations dans l'iléon, segment intestinal qui est le site d'invasion privilégié de *Salmonella*. Les auteurs de cette étude suggèrent une orientation spatiale de la virulence par ces molécules (Lawhon *et al.*, 2002).

Un autre mécanisme de protection contre les pathogènes, qui est lié au microbiote, est la protection conférée par les acides biliaires. En effet, les acides biliaires produits par le foie, une fois relâchés dans le duodénum sont modifiés en de multiples molécules secondaires par le microbiote (Rolhion et Chassaing, 2016). Il a été démontré que la présence de ces molécules secondaires est très basse chez les souris gnotobiotiques (Chassaing *et al.*, 2015) et qu'elle est radicalement réduite après un traitement antibiotique (Theriot *et al.*, 2016). La réduction de la présence de ces molécules peut rendre l'animal plus sensible à la colonisation par les pathogènes. En effet, la déplétion des membres du microbiote qui permettent la conversion de la bile primaire en bile secondaire favorise la colonisation par *Clostridioides difficile*. Alors que l'administration *Clostridium scindens*, qui peut grâce à l'enzyme 7 α -hydroxysteroid déhydrogénase dégrader la bile primaire en bile secondaire, permet de retrouver une résistance contre ce pathogène (Rolhion et Chassaing, 2016).

Compétition passive

En plus de la compétition active par la production de molécules antibactériennes, les bactéries peuvent aussi concurrencer de façon passive la colonisation de pathogènes, par exemple en restreignant l'accès aux nutriments retrouvés dans l'environnement (Bauer *et al.*, 2018). Dans le tractus intestinal, lors de la colonisation, les pathogènes doivent entrer en compétition avec des

micro-organismes commensaux qui sont très bien adaptés à l'environnement et qui peuvent utiliser les nutriments disponibles très efficacement. Une étude a démontré que la précolonisation d'une souris par deux souches commensales d'*E. coli* (HS et Nissle 1917) empêche la colonisation par *E. coli* O157 :H7. En effet, chacune de ces souches utilise une partie des cinq sucres majoritairement utilisés par le pathogène dans l'intestin. Ainsi, lorsque les deux souches sont présentes, tous les sucres sont consommés et la souche pathogène ne peut coloniser l'intestin (Maltby *et al.*, 2013). Des résultats semblables ont aussi été obtenus pour *Citrobacter rodentium*, un pathogène de la souris. Lorsque celle-ci était inoculée d'une souche de *E. coli* commensal qui utilise les sucres simples, comme le fait *C. rodentium*, la colonisation était réduite. Par contre, l'administration de *Bacteroides thetaiotaomicron*, qui consomme des sucres complexes inutilisés par *C. rodentium* lui laissant l'accessibilité aux sucres simples, n'avait pas le même effet protecteur (Kamada *et al.*, 2012).

En plus de cette compétition pour les sources de carbone, les bactéries peuvent aussi entrer en concurrence pour les sources de métaux traces telles que le fer et le zinc. Par exemple, chez la souris, la souche Nissle 1917 d'*E. coli* a un effet protecteur contre *Salmonella*, effet directement lié à la capture du fer. Ainsi, lorsque l'intestin est inflammé, cette souche probiotique assimile le fer par des mécanismes similaires à *Salmonella* et réussit à la priver de ce nutriment essentiel réduisant la colonisation dans un modèle murin (Deriu *et al.*, 2013). De façon similaire, la présence d'un microbiote restreignant la présence de zinc libre chez le poussin réduisait la présence caecale de *Campylobacter jejuni* (Giolda et DiRita, 2012).

Mucus intestinal

La première ligne de défense physique du tractus intestinal contre les micro-organismes pathogènes est le mucus qui recouvre la muqueuse intestinale. Celui-ci est composé d'un réseau de glycoprotéines possédant des O-glycans spécifiques organisés en filet. Ces glycoprotéines sont produites par les cellules caliciformes retrouvées dans l'épithélium intestinal et peuvent être liées à la membrane des cellules de l'épithélium intestinal ou sécrétées (Forstner, 1995; Sicard *et al.*, 2017). Au niveau de l'intestin grêle comme il a été mentionné précédemment, ce mucus est formé d'une seule couche dense alors qu'au niveau du côlon on retrouve plutôt deux couches distinctes: une couche intérieure dense attachée aux cellules de l'épithélium qui limite la pénétration des

bactéries et une couche extérieure qui est plus relâchée et permissive (Johansson *et al.*, 2011; Sicard *et al.*, 2017). La MUC2 est la mucine la plus retrouvée au niveau du petit intestin et du côlon. Par sa structure en filet, l'une de ses fonctions est de retenir les bactéries présentes au niveau du tractus digestif à distance de l'épithélium. De plus, elle contient de multiples molécules de défense de l'hôte telles que des défensines produites par les cellules de Paneth, des Regenerating islet-derived proteins 3 (REG3 α/γ), mais aussi des IgA (Bevins et Salzman, 2011; Loonen *et al.*, 2014; Moor *et al.*, 2017). Une autre étude a démontré que ce mucus réduit de cinq à dix fois l'efficacité de l'infection par *Salmonella Typhimurium* chez les souris. Malgré la protection offerte par cette couche, *Salmonella* semble pouvoir se déplacer à sa surface et pourrait la pénétrer lorsque des failles dans sa structure exposent les cellules épithéliales (Furter *et al.*, 2019).

Le microbiote intestinal est donc un élément essentiel du développement du porcelet, de l'homéostasie intestinale et de la protection contre les pathogènes. En effet, les bactéries présentes au niveau de l'intestin permettent l'induction, l'éducation et la régulation du système immunitaire. De plus, pour le développement physique de l'intestin, ces bactéries sont aussi des éléments indispensables puisqu'elles affectent la structure de la muqueuse et donc sa construction physique, mais aussi son fonctionnement physiologique. Finalement, le microbiote intestinal confère une protection contre les pathogènes indépendants du système immunitaire en compétitionnant avec celles-ci pour cette niche écologique, mais aussi par la production de molécules inhibitrices spécifiques. Des actions pouvant stimuler la croissance de certaines populations pourraient donc être bénéfiques tant au niveau de la productivité en améliorant la santé intestinale, mais aussi en protégeant les animaux des pathogènes.

Microbiote et *Salmonella*

Il a été décrit que *Salmonella* active le système immunitaire inné de l'hôte et améliore ainsi sa compétitivité au niveau du système digestif par divers mécanismes (Chirullo *et al.*, 2015). En plus de favoriser la croissance de *Salmonella*, cette inflammation peut aussi causer d'importants déséquilibres dans le microbiote qui peuvent être avantageux pour celle-ci. En effet, plusieurs études ont démontré que le microbiote intestinal des animaux contaminés par *Salmonella* était

différent du microbiote des animaux naïfs, et ce, même en contexte de portage asymptomatique. Il a été démontré que chez le porcelet, après une infection par *S. Typhimurium*, les bactéries du groupe des *Lactobacillus/Lactococcus* étaient plus représentées dans les fèces (Drumo *et al.*, 2016). Cette augmentation qui a aussi été mesurée chez les poulets infectés par *S. Enteritidis* pourrait être expliquée par la capacité pour ces groupes de croître dans un milieu microaérophile, donc en présence des ROS produits lors de l'inflammation (Videnska *et al.*, 2013). L'augmentation de ces populations pourrait causer une accumulation d'acide lactique qui aurait pour effet de nuire à l'intégrité de la barrière intestinale et d'augmenter la pression osmotique dans ce milieu (Ling *et al.*, 2014). De façon similaire, chez la souris et le porcelet, une augmentation significative des *Enterobacteriaceae* fait suite à l'infection par *S. Typhimurium*, ce qui pourrait aussi être dû à l'augmentation du niveau d'oxygène dans l'intestin (Rivera-Chávez *et al.*, 2017; Bratburd *et al.*, 2018). Dans une autre étude, une réduction de plusieurs bactéries considérées comme bénéfiques telles que *Clostridium spp.*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Megaesphera* et *Lactobacillus spp.* (Argüello *et al.*, 2018) est mesurée cette fois au niveau de l'iléum plutôt qu'au niveau fécal. Ce site pourrait être plus représentatif des modifications apportées au microbiote par *Salmonella* puisque ces mêmes auteurs, ayant suivi plusieurs segments du tractus digestif, ont montré que la majorité des modifications mesurées se retrouvaient à ce niveau et s'amenuisaient dans les segments intestinaux en aval. Ici, les auteurs émettent l'hypothèse que c'est la plus grande concentration de sels biliaires causée par la présence de *Salmonella* qui pourrait être responsable de cette réduction. En effet, il a été démontré que l'infection par *Salmonella* réduit l'expression de gènes codants pour des mécanismes liés au transport de la bile, réduisant son absorption dans l'iléon (Uribe *et al.*, 2016). La plus grande présence de bile dans la lumière du petit intestin pourrait donc réduire l'abondance de certaines populations susceptibles. Dans l'étude de Drumo, les auteurs ont aussi mesuré une réduction des bactéries produisant des SCFA telles que celles de la famille des Ruminococcaceae incluant *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Butyrivibrio*, et du genre *Clostridium* (Drumo *et al.*, 2016). Ceci pourrait avantager *Salmonella* puisque les SCFA ont des propriétés anti-inflammatoires et que le butyrate réduit l'expression des gènes de virulence du SPI-1 (Malago *et al.*, 2005; Gantois *et al.*, 2006).

Certains taxons du microbiote intestinal pourraient cependant « aider » l'hôte à résister à la colonisation par *Salmonella*. Il a été démontré que la présence de *Bacteroides* qui produit du propionate permettait de réduire la colonisation de souris par *S. Typhimurium* (Jacobson *et al.*, 2018). De plus, il a été démontré que le microbiote des porcs influençait le statut de fort ou faible excréteur de *Salmonella* après l'inoculation. Les excréteurs faibles avaient un microbiote enrichi en *Ruminococcaceae* qui est une famille de bactéries productrices de SCFA (Bearson *et al.*, 2013). Ainsi il apparaît que des modifications du microbiote pourraient permettre d'augmenter la résistance des porcs à *Salmonella*.

Problématiques, hypothèses et objectifs

Le contrôle de *Salmonella* dans l'industrie porcine se déroule principalement à l'abattoir et peu d'importance est mise sur la réduction de la contamination à la ferme. Cependant, il a été démontré que l'entrée d'animaux contaminés à l'abattoir augmente le risque de contamination de la carcasse. Il semble que, comme les porcelets contaminés dans les premières étapes de production (par exemple par la truie) sont un apport constant de cette bactérie dans les systèmes de production multisite tout-plein/tout-vide, des actions visant l'altération du microbiote dès la maternité pourraient être bénéfiques pour le contrôle de ce pathogène dans toute la filière. Effectivement, il a été démontré que le microbiote intestinal pouvait avoir des effets protecteurs contre *Salmonella* et qu'une part de celui-ci est transféré de la truie aux porcelets. Pour mettre en place ces méthodes de contrôle, une meilleure compréhension de l'implantation du microbiote chez le porcelet et de son impact sur *Salmonella* est cependant nécessaire.

Nos hypothèses de recherche sont : 1) que le microbiote intestinal de la truie affecte l'excrétion de *Salmonella* lors de la gestation, 2) qu'à la mise-bas les truies transmettent un microbiote différent à leurs porcelets selon leur statut d'excrétion de *Salmonella*. 3) que la transmission directe de *Salmonella* de la truie au porcelet est possible mais modulée selon l'établissement du microbiote intestinal du porcelet, et finalement 4) que le microbiote acquis en maternité est, même partiellement, conservé jusqu'en engraissement et peut affecter la susceptibilité de colonisation des porcs par ce pathogène.

Les objectifs spécifiques de l'étude étaient : 1) d'évaluer le lien entre le statut d'excrétion de la truie et la présence de marqueurs déterminants dans son microbiote fécal, 2) d'évaluer le transfert de ces marqueurs d'excrétion de *Salmonella* chez la truie aux porcelets, 3) d'évaluer la persistance de l'impact maternel sur le microbiote digestif du porc au cours des différentes étapes de l'élevage et le possible impact sur l'excrétion de *Salmonella* en fin de production, et finalement 4) de décrire l'origine des souches du pathogène de la maternité à l'engraissement dans une pyramide de production intégrée multisite.

Chapitre 3 – Reduction of *Salmonella* shedding by sows during gestation in relation to its faecal microbiome

Guillaume Larrivière-Gauthier^{1*}; Alexandre Thibodeau¹; Ann Letellier; Étienne Yergeau²; Philippe Fravalo^{1*}.

¹ NSERC Industrial Research Chair in Meat-Safety (CRSV), University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Centre INRS-Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, Laval, QC, Canada.

Correspondence

Guillaume Larivière-Gauthier

guillaume.lariviere-gauthier@umontreal.ca

Philippe Fravalo

philippe.fravalo@umontreal.ca

Cet article a été publié le 10 novembre 2017 dans *Frontiers in Microbiology*

Abstract

Pork meat is estimated to be responsible for 10 to 20% of human salmonellosis cases in Europe. Control strategies at the farm could reduce contamination at the slaughterhouse. One of the targeted sectors of production is maternity, where sows could be *Salmonella* reservoirs. The aim of this study was to assess the dynamics of shedding of *Salmonella* in terms of variation in both shedding prevalence and strains excreted during gestation in Quebec's maternity sector. The evolution of the fecal microbiota of these sows during gestation was also assessed to detect bacterial populations associated with these variations. A total of 73 sows both at the beginning and the end of the gestation were randomly selected and their fecal matter was analysed. *Salmonella* detection was conducted using a method that includes two selective enrichment media (MSRV and TBG). Nine isolates per positive samples were collected. Among the 73 sows tested, 27 were shedding *Salmonella*. Sows in the first third of their gestation shed *Salmonella* significantly more frequently (21/27) than those in the last third (6/46) ($\chi^2 P < 0.05$). The shedding status of 19 of the sows that were previously sampled in the first third of their gestation was followed, this time in the last third of their gestation, which confirmed reduction of shedding. Using 16S rRNA gene sequencing and qPCR, significant differences between the fecal flora of sows at the beginning and the end of the gestation, shedding *Salmonella* or not and with different parity number were detected. Using MaAsLin, multiple OTUs were found to be associated with the time of gestation, the status of *Salmonella* excretion and parity number. Some of the identified taxa could be linked to the reduction of the shedding of *Salmonella* at the end of gestation. In this study, we showed that the level of *Salmonella* shedding was variable during gestation with significantly higher shedding at the beginning rather than at the end of gestation. We also observed for the first time a significant change in the microbiota during sow gestation and identified interesting taxa which could be linked to a reduced *Salmonella* shedding.

Introduction

In Canada, *Salmonella enterica* is estimated to cause 269.26 infections per 100,000 inhabitants each year, confirming this pathogen as a public health priority (Thomas *et al.*, 2013). Contamination in humans causes gastroenteritis and occurs from the consumption or mishandling of contaminated meats. The economic impact of productivity losses and medical care expenses caused by salmonellosis is estimated to reach 3.3 billion dollars in the US alone each year (Hoffmann *et al.*, 2012). In Canada, the part of salmonellosis that are caused by consumption of pork products is not known. However, in Europe, it has been estimated that between 10 to 20% of all salmonellosis cases are due to the consumption of contaminated pork meat (EFSA, 2010).

Salmonella can contaminate swine on the farm and most of the serotypes can be carried asymptotically in their intestinal tract, gut-associated lymphoid tissue and tonsils, and enter slaughterhouses with the animals where it can contaminate the meat (Boyen *et al.*, 2008). *Salmonella* can enter the farm through multiple pathways, such as contaminated feeds or employees (Funk et Gebreyes, 2004). One of the most important sources of new strains on a farm is the introduction of already contaminated animals (Funk et Gebreyes, 2004; Gotter *et al.*, 2012b). Once on the farm it can be very difficult to eliminate using regular washing and disinfection methods and residual strains can contaminate newly arrived *Salmonella* free animals (Argüello *et al.*, 2011; Dewaele *et al.*, 2012). In certain parts of Canada up to 60% of the swine farms are contaminated (Rajic *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2008) with some studies showing 25% of contaminated animals (Wilkins *et al.*, 2010). Since it has been shown that the entrance of contaminated pigs into slaughterhouses is linked with an increased risk for the contamination of carcasses, a reduction at the first stages of the production could be an important step in the reduction of the contamination of the meat (Letellier *et al.*, 2009; EFSA, 2010).

Canadian sows in the provinces of Saskatchewan and Alberta have been shown to be highly contaminated by *Salmonella*, with levels of shedding higher than swine in fattening at 38% compared to 25% respectively (Wilkins *et al.*, 2010). These contaminated sows are believed to be important reservoirs of contamination during the maternity phase where *Salmonella* could be

transmitted to the piglets, spreading contamination to later stages of production (Belœil *et al.*, 2004; EFSA, 2010; Hill *et al.*, 2016). Variation in the percentage of sows excreting *Salmonella* during the maternity production cycle has already been observed (Nollet *et al.*, 2005a; Magistrali *et al.*, 2011). However, information is still scarce on the dynamics of shedding by sows during gestation, on the real impact of contamination on the rest of production and the factors that are responsible for this variation.

Sequencing technologies have helped to show the importance of microbiota in fighting the colonization of possibly harmful bacteria by competitive exclusion, stimulation of immunity and the production of antimicrobial substances. In the case of *Salmonella*, it has been shown that short chain fatty acids (SCFA, *e.g.* butyric acid), that are by-products of the microbiota's digestion of complex sugar, can reduce virulence of *Salmonella* by lowering the activation of the *Salmonella* Pathogenicity Island-1 (SPI-1) (Gantois *et al.*, 2006). Studies have also shown that swine excreting *Salmonella* had a different microbiota than swine that were not excreting (Fravalo *et al.*, 2013; Lebel *et al.*, 2017). Similarly, it has been shown that swine with different levels of *Salmonella* shedding after an experimental infection had different microbiota compositions (Bearson *et al.*, 2013). Interestingly, in other species, fecal microbiota has been shown to vary during gestation (Collado *et al.*, 2008; Koren *et al.*, 2012). However, this variation, and its possible impact on the shedding of *Salmonella*, has not been studied in sows.

The aim of this study was to assess the dynamics of *Salmonella* shedding by sows in terms of variation in both shedding prevalence and strains excreted during gestation in an industrial setting in Quebec. The evolution of the fecal microbiota of these sows during gestation was also assessed in order to detect bacterial populations that could be associated with the observed variations.

Material and method

Sampling

All animal experimentations were approved by the ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, certificate number 14-Rech-1714. A total of 73 sows at various gestation stages and parity (between 1 and 8; Table 1) were randomly selected from a breeding farm known for its frequent *Salmonella* contamination. All sows were fed with the same feed during all the gestation. For each selected sow, 100 g of fresh fecal matter was collected and analysed. After the first sampling, 19 out of the 73 sows that were sampled at the beginning of their gestation (first 50 days) were sampled a second time at the end of this period (last 50 days). For each sampled sow, 1 g of feces was subsampled in the farm and immediately frozen in liquid nitrogen for 16S rRNA gene amplicon MiSeq sequencing.

Detection

Salmonella detection was conducted using a method adapted from the method described by De Busser *et al.* (2013). The method was optimized by collecting isolates from multiple selective enrichment media as well as from two migration distances on MSR/V to obtain the best possible description of the eventual variety of strains contained in the samples. First the samples (100 g) were pre-enriched in buffered peptone water (BPW) (1:10 w/v, 18h, 37°C) (Biokar diagnostic, Beauvais, France). Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSR/V) (24-48h, 42°C) (Lab M, Heywood, UK) and Tetrathionate Brilliant Green Bile Broth (TBG) (24h, 42°C) (BD Difco, Franklin Lakes, USA) selective enrichment media were then used in parallel and further inoculated on Brilliant Green Sulfa Agar (BGS) (BD Difco, Franklin Lakes, USA). Two BGS plates were inoculated from the MSR/V from two different regions of the migration zone (far from and near the inoculation spot) and one from the TBG. A maximum of nine (3 per BGS plate) isolates per positive samples were collected. Suspect colonies on BGS were confirmed as *Salmonella* using triple sugar iron agar slants (Lab M, Heywood, UK) and urea agar slants (Lab M, Heywood, UK) followed by seroagglutination using *Salmonella* O antiserum Poly A-I + Vi (Statens Serum Institute, Denmark).

After isolation, the motility of the isolates originating from samples that were only positive for TBG and from samples where isolates from multiple genotypes were detected with MRSV was confirmed. Each isolate was grown individually for 24h at 37°C in 10 ml of BPW. Then 100 µl of the enrichment broth was inoculated on the middle of an MSR plate and incubated for 24h at 42°C before the migration zone was observed. Each of the isolate was tested in triplicate.

Percentages of *Salmonella* positive animals at the beginning and the end of gestation were compared using Fisher's exact test for the first random sampling and McNemar's test for the second sampling where each sow was sampled twice (GraphPad v6, Prism, LaJolla, USA). The link between shedding and the parity of sows was also assessed using a logistic regression (R 3.4.1).

Genotypic characterisation

Each isolate was genotyped using a high resolution melt (HRM) technique adapted from the method described by Bratchikov and Mauricas (2011). The precise melting curves of three genomic regions, two CRISPRs (*cr1* and *cr2*) and one VNTR (*yohm*), were analysed after PCR amplification using a LightCycler 96 real time PCR (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). The combined analysis of these three curves was associated with an HRM type. A variation in the melting curve profile from one of these three regions was considered to reveal a new HRM type. Representative isolates of each of the different types were serotyped by the veterinary epidemiosurveillance laboratory of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

16S rRNA gene sequencing

Total bacterial DNA was extracted using mechanical and chemical lysis followed by a phenol/chloroform purification. Five hundred µg of the frozen faecal content was added to 500 µl of lysis buffer (Tris-HCl 500 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, NaCl 100mM, SDS 1% (w/v)) with 500 mg of 0.1mm glass beads. Cells in the samples were mechanically lysed two times using MP Fastprep (Santa Ana, MP Biomedicals) for 40 sec at 6 m/s. Samples were kept 5 min on ice between runs. Lysates were centrifuged 15 min at 18,000 g to remove beads and cell debris. DNA was extracted from the supernatant using a standard phenol/chloroform purification protocol (Thibodeau *et al.*, 2015). Final DNA concentration was measured using the Qubit 3.0 broad range

assay (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Purified DNA samples were stored at -20°C for further analysis. The extraction was also conducted on negative controls without faecal matter.

16S rRNA gene amplicon sequencing libraries were prepared following the Illumina MiSeq protocol (Illumina, 2013). A 292 bp segment of the v4 region of the 16S rRNA gene was amplified using primers targeting the total bacterial and archaeal population (515F_III and 806R_III) (Caporaso *et al.*, 2012). 12.5 ng of DNA was pre-amplified in a final 25 μl reaction using KAPA HiFi HotSart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, USA). The amplification was carried out for 25 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 s, an annealing step at 55°C for 30 s, and an elongation step at 72°C for 45 s ending with a final elongation of 10 mins at 72°C . Each sample was then indexed using the Nextera XT index kit (Illumina). Five μl of the PCR product was amplified in a 20 μl reaction containing 12.5 μl of KAPA HiFi HotSart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, USA), 2.5 μl of each index primer (10 nM) and 2.5 μl of purified water. This second amplification was carried out for 8 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 s, an annealing step at 55°C for 30 s, and an elongation step at 72°C for 30 s ending with a final elongation of 5 min at 72°C . After each PCR step, PCR product purification was conducted using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, USA). The purified PCR products were diluted to 5 nM. Fifty-one samples were pooled (5 μl of each product) and sequenced by the Illumina MiSeq sequencing system using the MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles).

All sequences were cleaned and analyzed using Mothur v.1.39.5 following an adapted version of the MiSeq standard operation procedure available online (https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP, accessed August 2015) (Kozich *et al.*, 2013). First, the two complementary sets of reads were combined for each sample after removal of the primers. Sequences that were too long or that contained ambiguity were discarded. Identical sequences were grouped to reduce the necessary processing power. These unique sequences were then aligned using a Mothur adapted version of the SILVA database (silva.seed.v119, https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files). Chimeras were removed using UCHIME (<http://drive5.com/usearch>). The sequences were clustered into operational taxonomic units (OTU) at genetic distance dissimilarity of 3% and then classified using the Mothur formatted

Ribosome database project (RDP) trainset version 14 (https://www.mothur.org/wiki/RDP_reference_files). Raw reads for each sow fecal microbiota analyzed in this study are available through the NCBI SRA database under accession SRP100939.

For alpha diversity analysis, indexes were calculated in Mothur using a subsample size consisting of the lowest number of sequences in samples with 1000 iterations. The average number of OTUs, the estimation of the portion of the diversity covered by our subsampling (coverage), the diversity of the OTUs found in the samples (inverted Simpson's index) and their evenness (Shannon evenness) was measured. Results were compared between groups using ANOVA and Student's t-test and relation with parity rank using linear regression with a significance level of 0.05. For beta diversity analysis, a distance matrix comparing all the samples was created with a subsample using the same number of sequences as previously used and using Jaccard and Bray-Curtis dissimilarity index. These results were visualised using Non-metric multidimensional scaling (NMDS) graphs and the beta diversity of the different groups were statistically compared using the AMOVA test. Furthermore, OTUs that were associated with the different sow groups were identified using the Multivariate Association with Linear Models (MaAsLin) method (Morgan *et al.*, 2012).

Real time quantitative PCR of specific bacterial populations

Real time PCR was conducted for specific populations on all samples: Enterobacteria (Castillo *et al.*, 2006), Bifidobacteria (Matsuki *et al.*, 2004) and Lactobacilli (Castillo *et al.*, 2006) – classical indicators in microbiome analysis – as well as *Lachnospiraceae* (Wilson *et al.*, 2014), which was identified as an interesting population because of its known role as a butyrate producer. Standard curves were built by PCR using known quantities of each targeted gene. All reactions were conducted using 10 ng of DNA using EvaGreen mastermix (Montréal Biotech, Montréal, Canada) for a total reaction of 20µl in a LightCycler 96 real time PCR (Roche diagnostics, Mannheim, Germany). Results were expressed in log of copies of the gene per 10 ng of total DNA. Levels of these populations were compared using the Student's t-test and ANOVA (GraphPad v6, Prism, La Jolla, USA).

Results

***Salmonella* detection**

Salmonella was detected in the feces of 37% (27 out of 73) of the sows that were sampled. Proportion of *Salmonella* excreting sows at the beginning of gestation (first 50 days of gestation) (21 out of 27, 78%) was significantly (Fisher's exact, $p < 0.05$) higher than at the end of this period (last 50 days of gestation) (6 of 46, 13%). Similar results were obtained when sampling for a second time at the end of gestation the 19 sows that had already been sampled at the beginning of their gestation, with a statistically (McNemar's, $p < 0.05$) lower proportion of positive samples at the end of the gestation (2 of 19, 11%) than at the beginning (13 of 19, 68%). Logistic regression showed no significant link between shedding and the parity of the sow ($p > 0.05$) (Table 1).

Of the 27 positive samples, 7 had discrepancies in the results when comparing enrichment by TBG and MSR/V, with 3 samples only positive on MSR/V and 4 samples only positive on TBG. All the isolates that were collected on TBG positive only samples were further tested for motility on MSR/V. All isolates were motile and produced migration zones covering the whole MSR/V after 24h of incubation.

***Salmonella* typing**

Among the isolates 3 different HRM types were detected. The most prevalent profile (HRM type 1) was present in 25 out of the 27 positive samples that were collected and was most prevalent both at the beginning and the end of gestation (19 out of 21 and 6 out of 6 respectively) (Table 2). For this HRM type, 10 out of the 11 isolates that were randomly selected for serotype confirmation belonged to the *S. Infantis* serotype and one was an autoagglutinating strain of the partial antigenic formula O:r:1,5. The second most frequent profile (HRM type 2) was present in 3 out of the 27 positive samples and belonged to the Derby serotype (3 isolates confirmed by serotyping) and was only detected in animals at the beginning of gestation. Finally, the third profile (HRM type 3) was present in 2 of the 27 positive samples, was only detected at the beginning of the gestation and was found to belong to the Typhimurium serotype (2 isolate confirmed by serotyping). Three samples contained isolates of two different profiles. Two

samples contained *Salmonella* from profiles 1 and 2 and one sample contained *Salmonella* from profiles 1 and 3. For all the samples that contained strains of multiple profiles, all the isolates from a single BGS (TBG, MSRV near the site of inoculation and MSRV at the edge of the migration front) were of the same type. However, for these three samples, HRM type of the isolates collected from the edge of the migration zone differed from those collected near the MSRV inoculation site. The motility of these isolates was assessed. All the tested isolates were motile and covered the MSRV plate after 24h of incubation.

16S rRNA gene amplicon sequencing

From this section onward, samples collected from sows that were sampled once and those from sows sampled twice were analysed together to get the highest statistical power possible. Forty-seven samples were sequenced and 45 were retained after data analysis, containing a total of 4,770,924 sequences. Most of the sequences were bacterial sequences with 4,711,793 sequences (98.8%) followed by archaeal sequences with 59,129 sequences (1.3%) and 2 unclassifiable sequences (0.00004%).

A total of 3,377 OTUs were detected, with an average of 106,020 sequences per sample. The lowest values observed for a sample were 18,037 sequences and 490 OTUs and the highest were 560,410 sequences and 1,333 OTUs.

Rarefaction was conducted and showed that after subsampling each sample at 18,037 a good coverage was obtained for all the samples (Figure 1 supplementary).

For the Alpha diversity, a significant although small difference in coverage was measured when comparing samples based on their *Salmonella* shedding status while no differences were found when comparing the animals based on their time of gestation. When the sows were classified both on their *Salmonella* shedding status and time of gestation, no significant variation in alpha diversity was measured. (Table 3) Finally, no relationship was measured between the parity number and the different alpha diversity indices (data not shown).

Bacterial beta-diversity was compared between groups. The similarity of the composition of communities at the OTU level was compared using the Jaccard and Bray-Curtis indexes and these

distance matrices were plotted using NMDS on 2 axes when relevant (Figure 1A, B, C). Statistical variations in the composition of the microflora between the different groups were assessed using analysis of molecular variance (AMOVA) (Table 4). When splitting the sows into two groups, the time of gestation was revealed to have a significant effect on the beta-diversity in fecal content when using the Jaccard index. When the beta-diversity was compared based on the status of *Salmonella* shedding a significant difference was measured when using Bray-Curtis' index. Analysis were also conducted by splitting the sows into four groups combining both their *Salmonella* shedding status and time of gestation. Significant differences were found for at least one test when comparing the group of sows shedding *Salmonella* at the beginning of gestation with the group composed of non-shedding sows at the end of gestation. Finally, the beta-diversity significantly varied in the samples collected from sows with a different number of parity when comparing sows with low (1 to 3) and high levels of parity (6 to 8) when using the Jaccard index.

Stacked bar graphs of the taxa found at the phylum level showed that for all the groups, the *Firmicutes* represented 56.9% of the sequences in the samples followed by the *Bacteroidetes* at 31.5% while 3.5% of the sequences could not be classified at the phylum level (Figure 2A). For the RDP family level taxa (taxon level 5), 12 taxa were classified and present at a level of more than 1% of the sequences and represented 53.6% of the total sequences in all the groups while 42.3% of the sequences could not be classified at the family level (Figure 2B).

Variation in individual clades was assessed using MaAsLin with status of shedding (positive or negative), time of gestation (beginning or end) and parity number (1 to 8) as metadata. For the parity, 13 OTUs classified to 10 taxa were found to be negatively associated with this value, while 13 OTUs classified to 5 taxa were positively associated. For the *Salmonella* shedding status, 11 OTUs classified to 6 taxa were positively associated with shedding animals, while 3 OTUs classified to 2 taxa were associated with non-shedding animal. Finally, for the gestation time, 58 OTUs classified to 22 taxa were positively associated with animals at the beginning of the gestation, while 20 OTUs classified to 10 taxa were positively associated with animals at the end of the gestation. (Table 1 supplementary)

Real time quantitative PCR for specific populations

A difference between the sows at the beginning of gestation and the end of gestation was detected for the Enterobacteria group with a mean of 0.61 log of copies more at the beginning of gestation (Student's t-test $p < 0.05$) (Figure 4A). Furthermore, a significant difference of 0.44 log more copies at the beginning of gestation than at the end was detected for the *Lachnospiraceae* family (Figure 4B). No differences were detected for the Lactobacilli or Bifidobacteria quantifications. When comparing the sows by *Salmonella* status or in groups that combine both shedding status and time of gestation, no significant differences were measured for the four tested populations.

Discussion

In this study, we investigated the dynamics of shedding of *Salmonella* by sows in terms of variation of both shedding prevalence and type of strains excreted during gestation in an industrial setting in Quebec. We also evaluated the modification of the fecal microbiota during gestation and the possible link with the shedding of *Salmonella*.

High percentages of *Salmonella* shedding animals were detected on the farm with a total of 37% of sampled sows positive for the bacteria. These results are similar to what had already been measured in other provinces of Canada, with 38% of the individual samples found to be positive in Saskatchewan and Alberta (Wilkins *et al.*, 2010). However, Wilkins' study used samples of 10 g of feces and since it is known that fecal sample weight affects sensitivity, the real prevalence could have been underestimated (Funk *et al.*, 2000; Wilkins *et al.*, 2010). Our results confirm that sows are reservoirs of *Salmonella*.

When separating sows at the beginning and the end of gestation, we measured a significant variation of shedding, with higher number of animals shedding (78%) at the beginning when compared to the end (13%). Description of variations of *Salmonella* shedding during the production cycle of sows is scarce. Some research has been done in an Italian study conducted in a farrow-to-finish farm that showed a low shedding of 0.6% in late gestation (two weeks before parturition) and a high shedding of 26.5% in postweaning (one week after parturition) (Magistrali *et al.*, 2011). Similar results were also found in Belgian herds where the prevalence of *Salmonella*

shedding by sows was less than 10% during late gestation, around farrowing and during lactation and raised significantly 7 days after weaning (Nollet *et al.*, 2005a). Hence it seems that the number of sows shedding *Salmonella* is at its highest when the sows are not in contact with the piglets.

The majority of positive samples (25 of the 27) from this farm contained isolates of HRM type that belong to the Infantis serovar. The isolates from this serovar could represent a major resident strain present on the farm. A possible association between this serotype and the maternity phase of the production has been described in Canadian farrow-to-finish farms (Wilkins *et al.*, 2010). However, this serotype was not one of the 5 most frequently found in the samples submitted to the Public Health Agency of Canada for antimicrobial susceptibility testing, showing that this serotype is somewhat rare in human cases in Canada (Agence de Santé Publique du Canada, 2016). Also, detected at lower levels, were isolates of two other HRM types that belong to strains of the Derby and Typhimurium serovars. The low diversity of serotypes in the farm is similar to what was found in other studies in maternity and fattening units. In studies conducted in Europe, similar strains were found at different stages of production in farrow to finish farms (Nollet *et al.*, 2005b), however in studies carried out on multi-site production systems, like in the present study, the link between strains found in maternity and fattening units has not been clearly established. In these production systems, changes in the major strains present at different stages of production and appearance of new serotypes at the nursery and fattening stages were detected (Funk *et al.*, 2001). This lack of a detected link in this type of production could be the result of the low sensitivity of the method to detect minor strains in samples containing many strains.

In this study, to get the highest sensitivity and the best snapshot of the different serotypes that were excreted by the sows, a modified *Salmonella* detection method was used. Since it is known that different serovars of *Salmonella* have different growth rates in selective enrichment media, using multiple media could help get better representativeness of the excreted strains by the sows (Gorski, 2012; De Busser *et al.*, 2013). For seven samples, only one of the two selective enrichment media was positive. For four of these samples, only the TBG was positive. Since *Salmonella* detection on MSR/V is based on the motility of the bacteria, these results could show that these isolates are non-motile. The motility of the isolates that were not detected on MSR/V was tested, and all the isolates formed migration zones on the media covering the whole surface. Therefore,

the lack of detection could not be explained by strains that are non-motile. It is possible that the lack of detection on either TBG or MRSV could be a result of the competitive flora present in the media after the first enrichment in BPW. The method used in this study also proved to be useful in three samples where strains of different serotypes were recovered at different distances of migration on the MSR/V media. Interestingly, in two of these samples, because the isolate recovered from the MSR/V at the inoculation site was different from those recovered on TBG and at the edge of the migration zone on MRSV, using the standard method would have resulted in a loss of information. The motility of these strains was also tested as previously described and with identical results. These results confirm the importance of using multiple enrichment methods and possibly multiple migration distances on MSR/V when trying to get an accurate account of the different strains of *Salmonella* present on a farm.

In this study, to explain the mechanisms that are at play in the variation of shedding between the beginning and end of gestation, the microbiota of sows was studied. We described for the first time the beta diversity of the fecal microbiota of *Salmonella* excreting and non-excreting sows at the beginning and end of gestation.

The AMOVA statistical test showed that the gestation time, the *Salmonella* shedding status and the parity number significantly affected the populations found in the fecal flora. However, the gestation time and parity number variations were only significant using the Jaccard index which only considers the presence or absence of the OTUs while the status of *Salmonella* shedding variations were only significant when using the Bray-Curtis index which also considers the number of times the OTUs are found in the samples (Legendre et Legendre, 2012). This shows that while these factors all have significant impact on the flora they have different impacts on the microflora composition. Variation in the microbiota during gestation has already been described in other studies, mostly in human, with non-convergent conclusions. Two studies showed significant differences between the beginning and end of gestation in humans (first to third trimester) (Collado *et al.*, 2008; Koren *et al.*, 2012). However, another study showed no significant variation in the microbiota during gestation (DiGiulio *et al.*, 2015). Similarly, *Salmonella* has been shown to be associated with variations in the flora of both challenged and naturally infected animals

(Bearson *et al.*, 2013; Borewicz *et al.*, 2015). However, it is the first time that these modifications are measured in sows.

MaAsLin was used to identify biomarkers linked with the time of gestation, status of excretion and number of parity while considering confounding factors. Three OTUs negatively associated with the number of parity were classified to the genus level to *Succinnivibrio* (1 OTU), *Coprococcus* (1 OTU), *Blautia* (1 OTU). While only one OTU positively associated with the number of parity was classified to the genus level at 63% to the *Clostridium* cluster IV. Most of the statistically significant taxa were associated with the time of gestation. Five OTUs that were positively associated with the end of the gestation, when *Salmonella* shedding is at its lowest, were classified at the genus level to *Alloprevotella* (2 OTUs), *Prevotella* (2 OTUs) and *Clostridium* cluster IV (1 OTU). All those genera are known short chain fatty acid producers and could affect the virulence of *Salmonella*. Indeed, it has been shown that butyrate, regulates the expression of SPI-1, reducing the invasiveness of *Salmonella* (Gantois *et al.*, 2006). However, supplementing finishing pigs with butyric acid was tested with variable level of success. A study showing significant reduction of *Salmonella* levels in feces after sodium butyrate supplementation (Lynch *et al.*, 2017) while another showed no effect in reducing *Salmonella* carriage under farm conditions (Walia *et al.*, 2016). Ten OTUs that were negatively associated with the time of gestation, hence higher at the beginning of the gestation when *Salmonella* shedding is at its highest, were classified at the genus level. Most interestingly *Bacteroides* (1 OTU), *Blautia* (1 OTU), *Coprococcus* (1 OTU) and *Ruminococcus* (OTU 1) which are all known short chain fatty acid producers (Pryde *et al.*, 2002; den Besten *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Rivière *et al.*, 2016). Another study already showed a reduction of health-associated species such as butyrate producers, like *Coprococcus* and *Ruminococcus* in the current study, in the last trimester of human gestation, coupled with an augmentation of the Proteobacteria which is frequently found in inflammation-associated dysbiosis (Koren *et al.*, 2012). These results may seem unexpected in the context of the higher level of shedding of *Salmonella* at the beginning of the gestation, since as previously mentioned short chain fatty acids, such as butyric acid, are known to reduce *Salmonella's* virulence and invasiveness. However, the *Bacteroides* and *Blautia* genus are acetate producers. This short chain fatty acid has been shown *in vitro* to activate virulence genes in *Salmonella* (Lawhon *et al.*, 2002).

Hence, the higher presence of the genus at the beginning of gestation could be linked with the higher excretion. The only significantly varying archaeal taxon in the study, the genus *Methanomassiliicoccus*, which is a methane producing microorganism, was also associated with the beginning of the gestation. These results show that the reduction of *Salmonella* shedding at the end of the gestation could be linked with specific taxa of short-chain fatty acid producers or that other factors such as hormonal and immunological changes are also in play. No OTUs positively associated with the excretion of *Salmonella* could be classified at the genus level. However, one interesting OTU was classified to the *Enterobacteriaceae* family. This result is coherent with the higher number of excreting animals and show that the conditions that are favorable for *Salmonella* shedding could also be favorable for other *Enterobacteriaceae*. Only one OTU associated with animals not shedding *Salmonella* was classified to the genus level to the *Clostridium* cluster XI. More research will be necessary to confirm causal relationships between the abovementioned taxa and *Salmonella* shedding.

We observed a higher abundance of Enterobacteria and of *Lachnospiraceae* in sows at the beginning of the gestation using qPCR. The Enterobacteria results are consistent with our results showing that this time point was also associated with a higher level of *Salmonella* shedding but also with the association between shedding animals and the *Enterobacteriaceae* family found with MaAsLin. However, since *Salmonella* is only found in low levels compared to other Enterobacteria this significant reduction must be the results of the reduction of multiple genus contained in this group. The *Lachnospiraceae* results also seem to be consistent with the sequencing results which showed that 3 OTUs classified to the *Lachnospiraceae* family and 1 *Coprococcus* OTU which is part of this family were enriched at the beginning of the gestation.

The cause and effect of these changes in the microbiota during gestation and *Salmonella* shedding are not well known. However, similarly to the important change in the microbiota between the beginning and the end of gestation observed here, it has been shown that the fecal microbiota varies greatly between the first and the third semester in pregnant women (Collado *et al.*, 2008; Koren *et al.*, 2012). These changes were shown to contribute to modification in the metabolism and immunity of the host, playing a role, for example, in weight gain associated with pregnancy (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). Similar modifications could be at play during sow gestation, resulting

in lower *Salmonella* carriage later in gestation. As for the mechanisms that are responsible for these changes, it has been hypothesised that changes in the mucosal immune system or at the hormonal level could be responsible for the variation of certain bacterial populations (Koren *et al.*, 2012). For the changes associated with *Salmonella* shedding, another studies have found that a natural infection by this bacteria can alter the microflora in swine (Borewicz *et al.*, 2015). It is known that *Salmonella* possess multiple strategies to compete with the intestinal microflora (Thiennimitr *et al.*, 2012). However, in swine, the mechanisms that are in cause are still not well known. Since *Salmonella* infection in swine is mostly asymptomatic, authors have hypothesised that in swine mechanisms other than inflammation could be responsible for this variation (Kim et Isaacson, 2017).

Conclusions

In the present study, we showed that gestating sows are a possible reservoir of *Salmonella* with high levels of contamination and that standard detection methods are not sensitive enough to describe the entire diversity of the *Salmonella* strains present on the farm. We also showed that the level of shedding was variable during gestation with significantly higher shedding at the beginning rather than at the end of gestation. We also observed for the first time a significant change in the microbiota during sow gestation and identified interesting taxa such as *Alloprevotella*, *Prevotella* and the cluster IV *Clostridium*, which could be linked to the reduction of *Salmonella* shedding.

Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), financial partners in the Industrial Research Chair in Meat Safety and the bourse de la Cité de la biotechnologie agroalimentaire, vétérinaire et agroenvironnementale. The authors would also like to thank F. Ménard Inc. and more particularly Benoît Laplante for their collaboration and their participation. Computations were made on the supercomputer Briarée from Université de Montréal, managed by Calcul Québec and Compute Canada. The operation of this supercomputer is funded by the Canada Foundation for Innovation (CFI), the ministère de

l'Économie, de la science et de l'innovation du Québec (MESI) and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQ-NT).

Tables

Tableau 1. – Number of sows sampled in each parity and their *Salmonella* shedding status

Parity	1	2	3	4	5	6	7	8
Number of sows	21	8	11	8	10	7	5	3
% of excreting sows	29	50	36	25	40	57	20	67

Tableau 2. – HRM types of *Salmonella* isolated from sows at the beginning and the end of gestation.

HRM genes profiles			HRM types	Serotype	Beginning of gestation	End of gestation
CRISPR 1	CRISPR 2	Yohm			(Samples)	(Samples)
1	1	1	1	Infantis	20 / 21	6 / 6
2	2	2	2	Derby	3 / 21	0 / 6
3	3	3	3	Typhimurium	2 / 21	0 / 6

Tableau 3. – Comparison of alpha-diversity indices across sow groups and according to *Salmonella* shedding status and time of gestation.

The means were based on 1000 subsampling of 18,037 sequences. On the same row ^a is significantly different from ^b. Significant p values of 0.05.

	Sow group				<i>Salmonella</i> status		Time of gestation	
	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Positive	Negative	Beginning	End
	Negative / Beginning	Negative / End	Positive / Beginning	Positive / End				
Coverage	0.990	0.991	0.990	0.990	0.991 ^a	0.990 ^b	0.990	0.990
OTUs	688	637	682	676	680	642	679	647
Inverted Simpson's	49	46	58	47	54	47	56	46
Shannon evenness	0.73	0.73	0.75	0.74	0.75	0.73	0.74	0.73

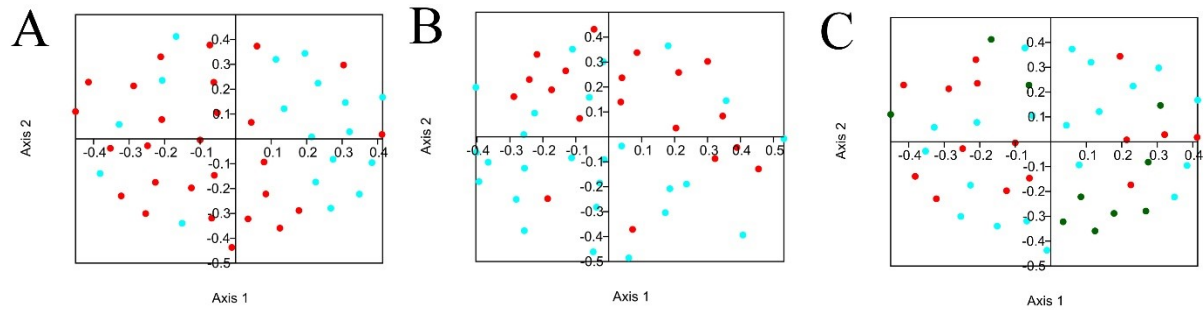
Tableau 4. – Beta-diversity analysis across sow groups and according to *Salmonella* shedding or time of gestation.

Based on a subsample of 18,037 sequences, there is a significant p value of 0.0083 with Bonferroni correction when comparing 4 groups, 0.0166 when comparing three groups and 0.05 when comparing 2 groups. P values under significant levels are in bold.

Compared Groups		AMOVA (p value)	
		Jaccard	Bray-Curtis
Beginning/Salmo+	Beginning/Salmo-	0.554	
	End/Salmo+	0.014	0.044
	End/Salmo-	<0.001	
Beginning/Salmo-	End/Salmo+	0.162	
	End/Salmo-	0.047	0.018
End/Salmo+	End/Salmo-	0.289	
Beginning	End	<0.001	0.077
Salmo+	Salmo-	0.05	0.012
Low parity (1 to 3)	High parity (6 to 8)	0.012	
Low parity (1 to 3)	Medium parity (4 to 5)	0.071	0.141
High parity (6 to 8)	Medium parity (4 to 5)	0.191	

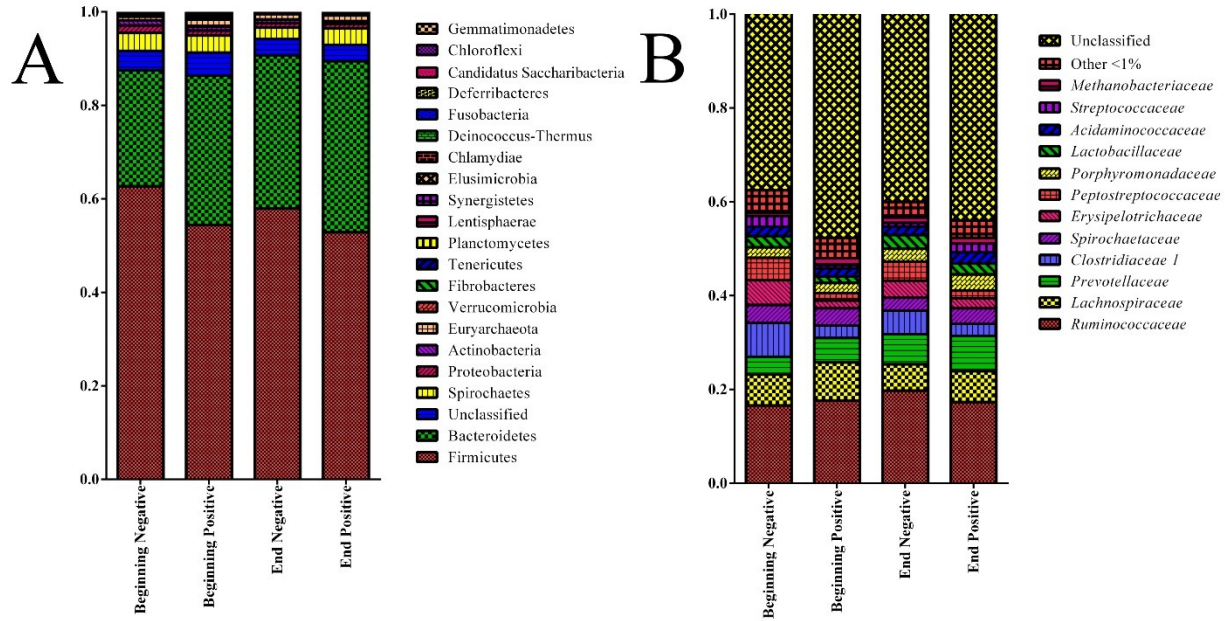
Figures

Figure 1. – NMDS plot illustrating sow fecal microbiome beta-diversity according to the time of gestation, *Salmonella* shedding status and number of gestation.



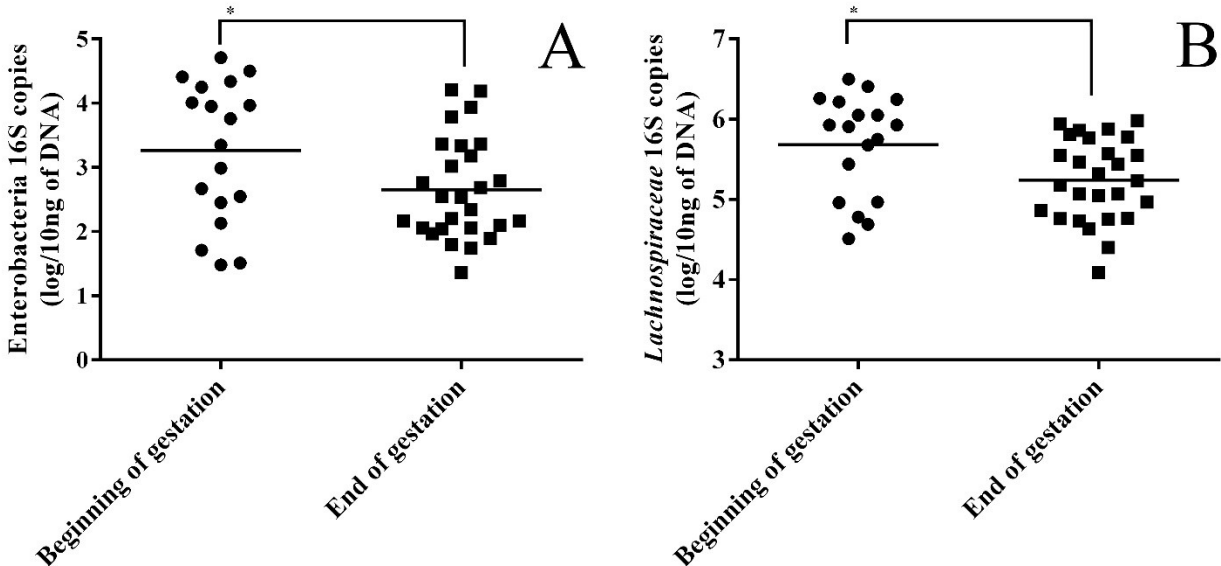
A) Blue = beginning of gestation; Red = end of gestation B) Red = shedding; Blue = no shedding C) Blue = low number of gestation (1 to 3); Green = medium number of gestation (4 to 5) Red = high number of gestation (6 to 8).

Figure 2. – Stacked bar graphs showing the relative abundance at the phylum (A) and “genus” (B) levels using RDP classification (only taxa representing more than 1% of the sequences) for the four groups of sows.



Beginning: Sows in the 50 first days of gestation, End: Sows in the 50 last days of gestation, Negative: Sows not shedding *Salmonella*, Positive: Sows shedding *Salmonella*.

Figure 3. – Enterobacteria (A) and *Lachnospiraceae* (B) 16S rRNA gene copies in sow fecal content at beginning and end of gestation.



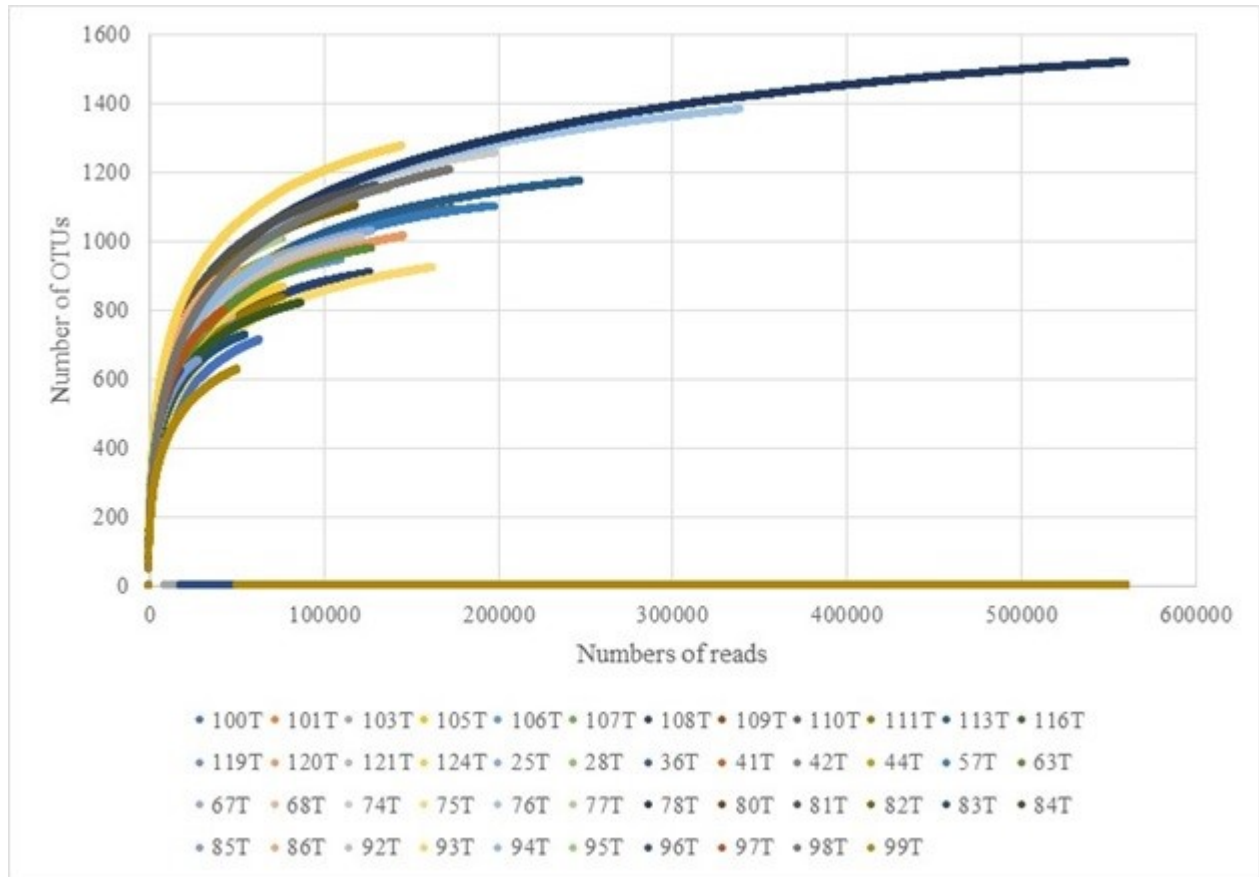
Horizontal bars represent the mean of each group, each point represent the fecal content of a single sow. * indicates $p < 0.05$

Supplementary material

Tableau 1. – (supplementary) Complete list of features associated with gestation time, parity number and *Salmonella* shedding status.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02219/full#supplementary-material>

Figure 1. – (supplementary) Rarefaction curve comparing the number reads with the average number of OTUs found in all sequenced samples of sows' feces for 1000 iterations



References

- Agence De Santé Publique Du Canada (2016). *Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System Report 2016*.
- Argüello, H., Rubio, P., Jaramillo, A., Barrios, V., García, M. et Carvajal, A. (2011). Evaluation of cleaning and disinfection procedures against *Salmonella enterica* at swine farms, transport and lairage facilities. *SafePork 2011 proceedings*.
- Bearson, S.M., Allen, H.K., Bearson, B.L., Looft, T., Brunelle, B.W., Kich, J.D., Tuggle, C.K., Bayles, D.O., Alt, D. et Levine, U.Y. (2013). Profiling the gastrointestinal microbiota in response to *Salmonella*: low versus high *Salmonella* shedding in the natural porcine host. *Infection, Genetics and Evolution* 16, 330-340.
- Belœil, P.A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J.P., Eveno, E., Hascoet, Y., Chauvin, C., Salvat, G. et Madec, F. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine* 63, 103-120.
- Borewicz, K.A., Kim, H.B., Singer, R.S., Gebhart, C.J., Sreevatsan, S., Johnson, T. et Isaacson, R.E. (2015). Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PLOS One* 10, e0139106.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. et Pasmans, F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130, 1-19.
- Bratchikov, M. et Mauricas, M. (2011). Development of a multiple-run high-resolution melting assay for *Salmonella* spp. genotyping HRM application for *Salmonella* spp. subtyping. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71, 192-200.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. et Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621-1624.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martin, M. et Gasa, J. (2006). Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 114, 165-170.

- Collado, M.C., Isolauri, E., Laitinen, K. et Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 894-899.
- De Busser, E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J. et De Zutter, L. (2013). Effect of the enrichment medium on the detection and diversity of Salmonella from porcine duodenal content. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 182-188.
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J. et Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* 54, 2325-2340.
- Dewaele, I., Van Meirhaeghe, H., Rasschaert, G., Vanrobaeys, M., De Graef, E., Herman, L., Ducatelle, R., Heyndrickx, M. et De Reu, K. (2012). Persistent Salmonella Enteritidis environmental contamination on layer farms in the context of an implemented national control program with obligatory vaccination. *Poultry Science* 91, 282-291.
- Digiulio, D.B., Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Costello, E.K., Lyell, D.J., Robaczewska, A., Sun, C.L., Goltsman, D.S.A., Wong, R.J., Shaw, G., Stevenson, D.K., Holmes, S.P. et Relman, D.A. (2015). Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11060-11065.
- Efsa (2010). Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs. *EFSA Journal* 8, 1547.
- Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Muckle, A.C., Gray, J.T. et Funk, J. (2008). Distribution of Salmonella serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. *Canadian Journal of Veterinary Research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 72, 1-6.
- Fravalo, P., Lebel, P., Longpré, J., Laplante, B., Yergeau, É., Massé, D. et Letellier, A. (2013). Salmonella associated taxonomic and functional changes in the pig digestive tract during application of feed associated mitigation option in production *International Symposium Salmonella and Salmonellosis 2013*.
- Funk, J. et Gebreyes, W. (2004). Risk factors associated with Salmonella on swine farms. *Journal of Swine Health and Production* 12, 247-251.

- Funk, J.A., Davies, P.R. et Nichols, M.A. (2000). The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 412-418.
- Funk, J.A., Davies, P.R. et Nichols, M.A. (2001). Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology* 83, 45-60.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C. et Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 946-949.
- Gorski, L. (2012). Selective Enrichment Media Bias the Types of *Salmonella enterica* Strains Isolated from Mixed Strain Cultures and Complex Enrichment Broths. *PLOS One* 7, e34722.
- Gotter, V., Klein, G., Koesters, S., Kreienbrock, L., Blaha, T. et Campe, A. (2012b). Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 301-307.
- Hill, A.A., Simons, R.R.L., Kelly, L. et Snary, E.L. (2016). A Farm Transmission Model for *Salmonella* in Pigs, Applicable to E.U. Member States. *Risk Analysis* 36, 461-481.
- Hoffmann, S., Batz, M.B. et Morris, J.G., Jr. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of food protection* 75, 1292-1302.
- Illumina (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* [Online]. Illumina. Available: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf [Accessed February 2017].
- Kim, H.B. et Isaacson, R.E. (2017). *Salmonella* in Swine: Microbiota Interactions. *Annual Review of Animal Biosciences* 5, 43-63.
- Koren, O., Goodrich, J.K., Cullender, T.C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H.K., Gonzalez, A., Werner, J.J., Angenent, L.T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S. et Ley, R.E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150, 470-480.

- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. et Schloss, P.D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5112-5120.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. et Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology* 46, 1451-1464.
- Lebel, P., Letellier, A., Longpré, J., Laplante, B., Yergeau, E. et Fravallo, P. (2017). Feed Presentation Options in Swine Early Fattening Mitigates *Salmonella* Shedding and Specifically Modulates the Faecal Microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 122, 30-39.
- Legendre, P. et Legendre, L.F. (2012). *Numerical ecology*. Elsevier.
- Letellier, A., Beauchamp, G., Guévremont, E., D'allaire, S., Hurnik, D. et Quessy, S. (2009). Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. *Journal of food protection* 72, 2326-2331.
- Lynch, H., Leonard, F.C., Walia, K., Lawlor, P.G., Duffy, G., Fanning, S., Markey, B.K., Brady, C., Gardiner, G.E. et Argüello, H. (2017). Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 139, 50-57.
- Magistrali, C.F., D'avino, N., Ciuti, F., Cucco, L., Maresca, C., Panicià, M., Scoccia, E., Tentellini, M. et Pezzotti, G. (2011). Longitudinal study of fecal *Salmonella* shedding by sows. *Journal of Swine Health and Production* 19, 326-330.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. et Tanaka, R. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 167-173.
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., Leleiko, N., Snapper, S.B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B.E., Xavier, R.J. et Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology* 13, R79.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L. et Maes, D. (2005a). *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research* 36, 645-656.

- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., Duchateau, L., De Zutter, L., De Kruif, A. et Maes, D. (2005b). Distribution of Salmonella Strains in Farrow-to-Finish Pig Herds: A Longitudinal Study. *Journal of food protection* 68, 2012-2021.
- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H. et Koren, O. (2016). Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in Microbiology* 7, 1031.
- Park, S.-K., Kim, M.-S. et Bae, J.-W. (2013). *Blautia faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 599-603.
- Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S. et Flint, H.J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 217, 133-139.
- Rajic, A., Keenliside, J., Mcfall, M.E., Deckert, A.E., Muckle, A.C., O'connor, B.P., Manninen, K., Dewey, C.E. et Mcewen, S.A. (2005). Longitudinal study of Salmonella species in 90 Alberta swine finishing farms. *Veterinary Microbiology* 105, 47-56.
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F. et De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology* 7, 979.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, É., Arsenault, J., Lahaye, L. et Letellier, A. (2015). Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLOS One* 10, e0131978.
- Thiennimitr, P., Winter, S.E. et Bäumlér, A.J. (2012). Salmonella, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology* 15, 108-114.
- Thomas, M.K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., Nesbitt, A. et Marshall, B. (2013). Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 639-648.
- Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Leonard, F.C., Grant, J., Yearsley, D., Kelly, S., Duffy, G., Gardiner, G.E. et Lawlor, P.G. (2016). Effect of feeding sodium butyrate in the late finishing period on Salmonella carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 131, 79-86.
- Wilkins, W., Rajić, A., Waldner, C., Mcfall, M., Chow, E., Muckle, A. et Rosengren, L. (2010). Distribution of Salmonella serovars in breeding, nursery, and grow-to-finish pigs, and risk

factors for shedding in ten farrow-to-finish swine farms in Alberta and Saskatchewan. *Canadian Journal of Veterinary Research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 74, 81-90.

Wilson, C.M., Loach, D., Lawley, B., Bell, T., Sims, I.M., O'toole, P.W., Zomer, A. et Tannock, G.W. (2014). *Lactobacillus reuteri* 100-23 Modulates Urea Hydrolysis in the Murine Stomach. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 6104-6113.

Chapitre 4 – *Salmonella* shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning

Guillaume Larrivière-Gauthier^{1*}; Alexandre Thibodeau¹; Ann Letellier¹; Étienne Yergeau²; Philippe Fravalo^{1*}.

¹ NSERC Industrial Research Chair in Meat-Safety (CRSV), University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Centre INRS-Institut Armand-Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, Laval, QC, Canada.

Running title: Sows' *Salmo.* shedding affects piglets microbiota

Correspondence

Guillaume Larivière-Gauthier

guillaume.lariviere-gauthier@umontreal.ca

Philippe Fravalo

philippe.fravalo@umontreal.ca

Cet article a été publié le 26 octobre 2018 dans le Journal of Applied Microbiology

Abstract

Aim:

Observe the transfer of the digestive microbiota from sow to piglet, describe the impact of the sow's *Salmonella* shedding on this transfer and identify transferred populations that could be associated with the future *Salmonella* status of the piglets.

Methods and results:

Salmonella shedding status of 19 sows was determined at the beginning and end of gestation. Four piglets were randomly selected from each sow. Using MiSeq, the microbiotas of the sows at the end of gestation and of their piglets 1 day before weaning were described. Results showed that the *Salmonella* shedding of the sows, the birth mother, the lairage room, the parity and the contamination of the lairage environment were associated to the microbiota of the piglets (PerMANOVA $p < 0.05$). Several genera were associated with piglets born from negative or positive sows.

Conclusion:

There is a link between the microbiota of the sows at the end of gestation and the microbiota of their piglets at weaning, and the *Salmonella* shedding of the sow is associated with the microbiota of the piglets.

Significance:

Salmonella status of the sows affects the microbiota of their piglets and could affect the long-term *Salmonella* colonization resistance of these animals and their health.

Keywords: *Salmonella*, Food safety, Intestinal microbiology, Agriculture, Metagenomics

Introduction

Salmonella is an important foodborne pathogen and in Canada is estimated to cause 269 infections per 100,000 inhabitants each year, making this pathogen a food safety and public health priority (Thomas *et al.*, 2013). Moreover, salmonellosis has an important economic impact, with productivity losses and medical care expenses estimated to reach 3.3 billion dollars in the US each year (Hoffmann *et al.*, 2012). Humans suffer with gastroenteritis when infected by *Salmonella*, which is largely contracted through the consumption and/or mishandling of contaminated food, namely meat. Although there is little information about salmonellosis food poisoning caused by pork meat consumption in the North America, experts have attributed between 7.1% and 8.2% of salmonellosis to pork in Canada (Davidson *et al.*, 2011). While in Europe between 10% and 20% of the cases were associated with this meat (EFSA, 2010).

Swine can be colonized by *Salmonella* in the farm through multiple introduction pathways such as animals and humans entering the farm and contamination of the environment and feed (Funk et Gebreyes, 2004; Fernandes *et al.*, 2016). Most of the *Salmonella* serotypes can then be asymptotically carried in their intestinal tract, gut-associated lymphoid tissues, and tonsils (Boyen *et al.*, 2008). Because colonized animals raise the risk of meat contamination in the slaughterhouse (Letellier *et al.*, 2009; EFSA, 2010), reducing carriage by the animals in the first steps of production could result in a reduction of contaminated meat reaching the consumer, thereby reducing the risk of human salmonellosis (Argüello *et al.*, 2013).

One way to reduce colonization of swine at the different steps of production could be to influence swine intestinal microbiota. Indeed, high throughput sequencing technologies through metagenomics studies have helped better understand the intestinal microbiology and to show that the microbiota is of great importance in the fight against the colonization by pathogens through competitive exclusion, immunity stimulation, and short-chain fatty acid production (Ubeda *et al.*, 2017). In the case of *Salmonella*, it has been shown that some short-chain fatty acids (SCFA, *e.g.* butyric acid) – by-products of the microbiota's digestion of complex sugar – can reduce virulence of *Salmonella* by lowering the activation of *Salmonella* Pathogenicity Island-1 (SPI-1) (Gantois *et al.*, 2006). Furthermore, several studies have also shown that swine with

different *Salmonella* shedding status or shedding at different levels have different fecal microbiota compositions (Fravalo *et al.*, 2013; Kim et Isaacson, 2017; Lebel *et al.*, 2017). Hence, animals with specific microbiota could be less sensitive than others to colonization by this pathogen.

It has also been shown that a fraction of the fecal microbiota can be transferred from the mother to the piglets at the time of birth and that this is responsible, in part, for the implantation of the normal microbiota. For example, studies have shown that piglets born from mothers fed with probiotics had modified microbiota and, in some cases, had better growth performance (Baker *et al.*, 2013; Starke *et al.*, 2013). It has been shown that human infants born from C-section, where early contact with the vaginal microbiota is eliminated, have a significantly different microbiota than those born via the birth canal (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). These differences can affect the long-term health of these kids, who have higher chances of suffering allergic rhinitis (Renz-Polster *et al.*, 2005), asthma (Renz-Polster *et al.*, 2005), celiac sickness (Decker *et al.*, 2010), type 1 diabetes (Cardwell *et al.*, 2008), and chronic inflammatory intestine diseases (Bager *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). In a precedent study, we showed that sows with different *Salmonella* shedding status had significantly different microbiota during gestation (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017). Hence, we postulate that the microbiota transmitted to the piglets by sows with different *Salmonella* shedding status can vary and could affect the future susceptibility of these animals to *Salmonella* colonization.

In this context, the aim of this study was to observe the transfer of the digestive microbiota from the sow to the piglet in an industrial setting in the province of Quebec, Canada and to describe how the sow *Salmonella* shedding status affect this transfer.

Material and methods:

Sampling

All animal experimentations were approved by the ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, certificate number 14-Rech-1714. A total of 19 sows at the beginning of gestation (first 50 days) were randomly sampled in a commercial maternity in

the province of Quebec. All sows were Yorkshire-Landrace, fed the same regimen (standard formulation and presentation in Quebec), had standard reproductive performances, had no reported diseases and their parity was distributed between 2 and 8. These same sows were sampled a second time at the end of gestation (last 50 days). For each sampled sow, 100 g of fresh feces were collected for *Salmonella* detection. At the end of gestation, 500 mg of feces were subsampled in the farm and immediately frozen in liquid nitrogen for 16S rRNA gene amplicon MiSeq sequencing.

After farrowing, 4 piglets were selected per sow (2 males and 2 females) for a total of 76 piglets. For each farrowing cage, three samples were collected to assess environmental *Salmonella* contamination: two 30 cm² swabs, one on the door on the inside of the farrowing cage and one on the floor of the cage and perianal swabs or 25 g composite feces sample when possible. These piglets were sampled one day before weaning at 20 days of life. For each individual piglet, fecal swabs were collected using synthetic cotton swabs, the tip was cut and put in a cryotube that was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until DNA extraction.

***Salmonella* detection:**

Salmonella detection was conducted following a modified version of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Annex D method as described in Larivière-Gauthier et al. 2017. First, the samples were added at 1:10 ratio in buffered peptone water, 25 ml for the swabs, and pre-enriched at 37°C for 18h (Biokar diagnostic, Beauvais, France). Pre-enrichment was followed by selective enrichment using Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar (MSRV) (Lab M, Heywood, UK) and Tetrathionate Brilliant Green Bile Broth (TBG) (BD Difco, Franklin Lakes, USA). The TBG and positive MSRV were inoculated on Brilliant green sulfa agar (BD Difco, Franklin Lakes, USA). Suspect colonies were confirmed using triple sugar iron agar slants (Lab M, Heywood, UK) and urea agar slants (Lab M, Heywood, UK), followed by seroagglutination using *Salmonella* O antiserum Poly A-I + Vi (Statens Serum Institute, Denmark), and a three gene high resolution melt PCR (HRM) designed for *Salmonella* subtyping (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017). Representative isolates of each HRM subtype were serotyped at the veterinary epidemiology surveillance laboratory of the Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

16S rRNA Gene Amplicon Sequencing

For the sows' fecal samples, total DNA was extracted and purified using a modified version of a phenol/chloroform protocol as described in Larivière-Gauthier et al. (2017). For the piglets' fecal swab extraction, 500 μL of lysis buffer (Tris-HCl 500 mmol l^{-1} pH 8, EDTA 100 mmol l^{-1} pH 8, NaCl 100 mmol l^{-1} , SDS 1% (w/v)) was added to the swab and vortexed for 60 s. The swab was then reversed in the tube using sterile tweezers and centrifuged 15 min at 18,000 g, thus recuperating the major part of the lysis buffer, the fecal matter, and bacteria. The swab was then discarded, and the lysis buffer transferred into a cryotube containing 500 mg of 0.1 mm glass beads. The cells were mechanically lysed twice using MP Fastprep (Santa Ana, MP Biomedicals) for 40 s at 6 m/s. Samples were kept 5 min on ice between each lysis run. DNA purification was conducted using a standard phenol/chloroform protocol. Final DNA concentration was measured using the Qubit 3.0 broad range assay (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Purified DNA samples were stored at -20°C until sequenced.

Sequencing libraries were prepared following the Illumina MiSeq protocol (Illumina, 2013). First a 292 bp of the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using the 515F_III and 806R_III primers (Caporaso *et al.*, 2012). DNA (12.5 ng) was pre-amplified in a final 25 μL reaction using KAPA HiFi HotSart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, USA). The amplification was carried out for 25 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 s, an annealing step at 55°C for 30 s, an elongation step at 72°C for 45 s, and a final elongation of 10 min at 72°C . Each sample was then indexed using the Nextera XT index kit (Illumina). Five μL of the PCR product was amplified in a 20 μL reaction containing 12.5 μL of KAPA HiFi HotSart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, USA), 2.5 μL of each index primer (10 nmol l^{-1}), and 2.5 μL of purified water. This second amplification was carried out for 8 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 s, an annealing step at 55°C for 30 s, an elongation step at 72°C for 30 s, and a final elongation of 5 min at 72°C . After each PCR step, PCR product purification was conducted using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, USA).

The sequences were cleaned and analyzed using Mothur v.(Schloss *et al.*, 2009; Le Hello *et al.*, 2012) following an adapted version of Mothur's MiSeq standard operation procedure, as described in Larivière-Gauthier et al. 2017. The unique sequences were then aligned using a

Mothur adapted version of the SILVA database (silva.seed.v128, https://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files). Sequences were attributed a taxonomic classification using the Mothur formatted Ribosome database project (RDP) trainset version 16 (https://www.mothur.org/wiki/RDP_reference_files). Raw reads for each sow fecal microbiota analyzed in this study are available through the NCBI SRA database under accessions SUB4061997 and SRP100939.

For alpha-diversity comparisons, subsampling was conducted and the indices were calculated in Mothur with 1000 iterations. The average number of observed OTUs at 97% identity (Obs. OTUs), the estimation of the portion of the diversity covered by our subsampling (coverage), the diversity of the OTUs found in the samples (inverted Simpson's index), and their evenness (Shannon evenness) were measured. The results obtained for each group were compared using ANOVA and Student's t-test with a significance level of 0.05. In the case of the beta-diversity analysis, after subsampling, the Jaccard and Bray-Curtis indices were used to produce distance matrices comparing all the samples. Visualisation of the distance matrices was conducted using Principal Coordinates Analysis (PCoA) graphs and the beta-diversity of the different groups were statistically compared using perMANOVA using the lairage room as strata (Oksanen *et al.*, 2018), followed by pairwise perMANOVA comparisons (Hervé, 2018) with false discovery rate p-value corrections for multiple comparisons in R 3.5.0 and HOMOVA in Mothur. The command `get.sharedseqs`, using the `sharedgroups` option, was used in Mothur to identify OTUs that were present in all samples (both sows and piglets). The average number of OTUs shared between the piglets and their birth mother was also compared with the average number of shared OTUs of 10 iteration of randomly generated sows/piglets groups using Student's t-test. Furthermore, bacterial taxa that were associated with the different groups were identified using Multivariate Association with Linear Models (MaAsLin) (Morgan *et al.*, 2012).

Results

***Salmonella* shedding**

Of the 19 sows sampled, 6 sows were negative at both sampling times, 11 sows were shedding *Salmonella* at the first sampling but not at the second sampling, and finally 2 sows were shedding *Salmonella* at both sampling times. No sow was shedding *Salmonella* only at the end of gestation. For the subsequent analysis, piglets were grouped based on these results: 24 piglets born from sows that were negative at both sampling times, 44 piglets born from sows positive at the beginning of gestation but negative at the end, and 8 piglets born from sows positive for both sampling times.`

At the beginning of the gestation 9 sows were shedding *Salmonella* Infantis of the same HRM type, 2 sows were shedding *Salmonella* Derby of two different HRM type and 2 sows were shedding both serotypes. At the end of gestation 1 sow was shedding *Salmonella* Infantis while the other was shedding *Salmonella* Derby.

Contamination of the farrowing environment

No farrowing cage door, 5 farrowing cage floor swabs and 2 feces sample were positive out of the 19 collected for each sample type. Of the 19 sampled cages 7 had at least one positive sample. Four of the positive farrowing cage floor samples were contaminated by *Salmonella* Derby and one by *Salmonella* Infantis. For the feces samples one contained *Salmonella* Derby and the other one *Salmonella* Infantis.

Link between sows shedding and farrowing environment contamination

The farrowing floor was found to be contaminated for the cages of 3 sows that never shed *Salmonella* while no feces sample was positive. For the sows that shed only at the beginning of the gestation farrowing floor was found to be positive twice while the feces were positive once. However, the serotypes found at the beginning of the gestation and in the farrowing environment were different. Finally, for the sows that shed both at the beginning and the end of gestation only the feces were found to be positive once and the samples from the gestation and the farrowing both contained *Salmonella* of the same serotype and HRM-type.

Sequencing results

A total of 19 sows' fecal samples and 75 piglets swab samples were sequenced in two different runs (raw results were pooled prior to analysis for all runs) for a total of 7,069,509 sequences. Most of the sequences (99%, 6,999,402 sequences) were classified as bacterial sequences followed by archaeal sequences (1%, 70,107 sequences).

For the sows' samples, an average of 84,827 sequences corresponding to 854 OTUs were sequenced. The lowest values observed for the sows' samples were 17,941 sequences and 619 OTUs and the highest were 246,297 sequences and 1,229 OTUs. For the piglets' samples, an average of 72,771 sequences corresponding to 480 OTUs per sample were sequenced. The lowest values observed for the piglets' samples were 16,924 sequences and 278 OTUs and the highest were 181,207 sequences and 867 OTUs.

Stacked bar graphs of the taxa found at the phylum level show that for all the groups the Firmicutes represented more than 50% of the sequences in the samples followed by the Bacteroidetes (Figure 1A). For the RDP order level taxa (taxon level 5), 10 taxa were present at a level of more than 1% of the sequences and represented 85% of the total sequences in all the groups (Figure 1B).

Differences in the microbiota between sows and piglets

Alpha-diversity analysis was conducted after a subsampling of 26,729 sequences (removing 2 piglet and 2 sow samples with the lowest number of sequences) and showed a good coverage for both sow and piglet samples. However, in the piglet samples, coverage was significantly higher than the coverage of the sows. These analyses also showed a significantly higher number of OTUs in sow samples after subsampling and similarly a higher inverted Simpson's index and Shannon evenness (Student's t-test $p < 0.05$).

Bacterial beta-diversities were compared between the different groups of animals. The similarity of the composition of communities at the OTU level was compared using the perMANOVA and HOMOVA test when relevant with the Jaccard (based on the presence/absence of OTUs) and

Bray-Curtis (based on relative abundance of OTUs) indices and the distance matrices were plotted using PCoA on 2 axes when relevant.

Using once again a subsampling of 26,729 sequences (removing 2 piglet and 2 sow samples with the lowest number of sequences), the fecal microbiome of the sows was shown to be significantly different from the fecal microbiome of the piglets with both the Jaccard and Bray-Curtis indices (perMANOVA $p < 0.05$) (Figure 2). Furthermore, the variance of the piglet samples was higher than the variance of the sow samples (HOMOVA $p < 0.05$), showing that the composition of the fecal microbiota of the piglets is more varied than the microbiota of the sows (Figure 2). Sixteen OTUs were found in all the samples. Ten of these OTUs were classified at the genus level (Table 1).

MaAsLin analysis was conducted to identify OTUs that were significantly associated with the different groups. This analysis revealed a total of 653 taxa that were significantly associated with either the piglet (254 individual OTUs) or the sows (399 individual OTUs) (Table S1).

Differences in the microbiota according to sows shedding status

No significant differences in alpha diversity were measured when comparing the sows and piglets based on the sows' *Salmonella* status (ANOVA $p > 0.05$) (Table 2).

Variations in the beta-diversities of the different sow groups were assessed and compared based on their shedding status at both sampling times and gestation rooms. The animals were separated in three groups, the animals (6) that never shed *Salmonella* at the two sampling times, the sows (11) that shed at the beginning of gestation (first 50 days) and sows (2) that shed both at the beginning and the end of gestation (last 50 days). PerMANOVA analysis with a subsampling of 30,649 sequences (removing 2 sow samples with the lowest number of sequences) showed no significant differences between of sows based on their *Salmonella* shedding status, the room where they were kept or the parity with both the Jaccard and Bray-Curtis indices (PerMANOVA $p > 0.05$). The analysis was also conducted by distributing the animals into two groups (shedding *Salmonella* on at least one sampling vs. not shedding) with the same results (PerMANOVA $p > 0.05$).

The variations of the beta-diversities of the piglets were assessed and compared based on the shedding status of their mothers (split into three groups: piglets (23) born from sows that did not shed *Salmonella* at the two sampling times (6), piglets (42) born from sows that only shed at the beginning of gestation (first 50 days) (11), and piglets (8) born from sows that shed both at the beginning and the end of gestation (last 50 days) (2)), lairage rooms, birth mother, parity of the mother and *Salmonella* contamination of the environment of the farrowing cage. Using a subsampling of 26,729 sequences (removing 2 piglet samples with the lowest number of sequences) and the lairage room as strata, the composition of the microbiota of the piglets was significantly affected by the status of the mother, lairage room where they were kept, the parity, the *Salmonella* contamination of the environment and the birth mother (Figure 3). Pairwise analysis showed that piglets born from sows that were not shedding at both sampling times were significantly different from those born from mothers shedding at the beginning of gestation or at both sampling times, both with the Jaccard and Bray-Curtis indices (pairwise PerMANOVA $p < 0.05$). However, no significant differences were found when comparing the microbiota of the piglets born from a mother positive at the beginning of gestation or positive at both sampling times (pairwise PerMANOVA $p > 0.05$). Since there were no measured differences, in the rest of the analyses the two groups of piglets born from sows that had shed *Salmonella* will be considered as one group in the analysis.

Piglets did not share significantly more OTUs with their birth mother (with an average of 99 shared OTUs) than when they were randomly grouped and compared with a random sow (with an average of 85 OTUs) (Student's t-test $p > 0.05$).

Identification of taxa associated with the different conditions

MaAsLin analysis conducted on sows samples using the *Salmonella* shedding status, gestation room and parity as metadata revealed that only 4 OTU associated to a gestation room, and 1 OTU associated with lower parity varied significantly (Table S2).

MaAsLin analysis was also conducted on piglet samples using the *Salmonella* shedding status of the mother, the lairage room, parity, *Salmonella* contamination of the environment and the birth mother as metadata revealing that 3 OTUs varied significantly and were associated with a specific

birthing mother (Table S3). However, when using the lairage room, the status of the mother, the parity of the mother and *Salmonella* contamination of the environment as metadata, the same analysis showed 63 OTUs to be associated with a specific lairage room (Table S4), 3 OTUs to be associated with *Salmonella* contaminated environment and 3 OTUs associated with *Salmonella* free environment (Table S5), 7 OTUs associated with lower parity, 4 OTUs associated with higher parity (Table S6) and finally 9 OTUs to be associated with piglets born from mothers that never shed *Salmonella* and 18 from mothers that shed at least once during our experiment. Of these 27 OTUs, 17 were classified at the genus level. (Table 3)

Discussion

In this study, we investigated the transfer of fecal microbiota from sows at the end of the farrowing period to piglets in an industrial maternity setting in Quebec, given the context of differential sow *Salmonella* excretion. We also evaluated the impact of *Salmonella* shedding status of the sows on the microbiota of the piglet just before weaning.

First, we compared the microbiota of the sows at the end of gestation and the microbiota of the piglets just before weaning. Significant differences were measured when the fecal microbiota of the sows was compared with the fecal microbiota of their piglets. The differences in the microbiota composition are not surprising since the age and the feed regimen of the piglets and the sows is vastly different. These results confirmed that even if there is a possible transfer of the microbiota between the sows and piglets, the structure of the microbiota of these two animal populations is clearly different (Bian *et al.*, 2016).

The fecal microbiota of the sows was then compared based on their *Salmonella* shedding status at both sampling times (beginning and end of gestation). Multiple studies have shown that there is a link between the excretion of *Salmonella* and the fecal microbiota of the swine (Bearson *et al.*, 2013; Larivière-Gauthier *et al.*, 2017; Lebel *et al.*, 2017). However, in the context of our study no differences were observed, possibly because of the low number of sows. Even if the number of sows per group used in this experiment can be considered as low, it is similar to the number of individuals in other studies that have been conducted in the last years (Borewicz *et al.*, 2015;

Thibodeau *et al.*, 2017; Argüello *et al.*, 2018). Whatever the case for sows, it did not affect the ability to obtain results for the piglets, which was the primary focus of this study.

Salmonella shedding is known to be intermittent (Gautam *et al.*, 2013) and taking a higher number or diversity of samples could have resulted in a higher precision of the *Salmonella* status of the sows. However, as this trial was conducted in industrial conditions, which the authors consider as a strength of the paper, it was impossible to sacrifice the animals and collect samples other than the fecal matter. Moreover, a previous study that we conducted showed on a larger number of sows that *Salmonella* shedding in the last 50 days of gestation is rare hence we are confident that the obtained results are representative of the real shedding of the sows at the end of the gestation (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017). By adding an initial sampling at the beginning of the gestation when shedding is higher, and increasing the quantity of fecal matter analysed (25 g in the ISO 6579 protocol vs. 100 g in our study), we consider that the evaluation of the *Salmonella* status sows in these conventional breeding conditions is optimal.

The impact of the shedding status of the sows on the microbiota of the piglets was then assessed. When splitting the piglets based on the shedding status of their mothers, we showed significant differences of microbiota composition between the animals born from sows that were either shedding *Salmonella* only at the beginning of gestation or at both sampling points and sows that were not *Salmonella* shedders. However, no differences were measured when comparing the groups of piglets born from sows shedding *Salmonella* at the beginning of gestation and at both sampling times. The results show that even without measured modification of the microbiota of the sows based on their *Salmonella* shedding status in the context of this experiment, this status could affect the composition of the microbiome of their piglets. This could be explained by differences in minor bacterial populations (under the technical threshold of the sequencing method) in the sows' microbiota that could not be measured here, leading to different seeding and maturation of the piglets' microbiota. Other studies had already shown variations of the microbiome based on *Salmonella* shedding status (Fravalo *et al.*, 2013; Lebel *et al.*, 2017) or level (Bearson *et al.*, 2013). However, this is the first time that an impact of the *Salmonella* shedding status of the sows on the microbiota of the piglets has been measured.

Since we showed a link between the *Salmonella* shedding status of the sows and the microbiota of the piglets, we tried to identify specific taxa associated with *Salmonella* that could have been transferred to the piglets. For this, we first identified bacterial taxa associated with the fecal microbiota of the piglets born from sows shedding *Salmonella* or not using MaAsLin. We also tried to identify taxa that were associated with the sows' *Salmonella* shedding status. However, regarding the sow microbiota analysis, no differences were observed in the beta-diversity analysis or MaAsLin analysis. Hence, no shared taxa associated with *Salmonella* shedding status was detected when comparing the piglets and the sows in this study and we could not identify any populations that could have been directly transferred from the sow to the piglet based on this status. This lack of direct influent taxa transfer between sows and piglets could be caused by the low number of sow in this study as it has already been shown that the *Salmonella* shedding status is linking to microbiota modifications in these animals (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017). In this case the *Salmonella* status of the sow could also have an indirect effect on the microbiota of the piglet. A similar effect has been shown with some probiotics where the microbiota modification of the sows was not directly translated to the piglets. In these studies, inoculation of sows with probiotic strains modified the microbiota of both the sow and its piglets but in different ways (Baker *et al.*, 2013; Starke *et al.*, 2013). A similar mechanism could be in action in our study.

We also showed that the environmental contamination by *Salmonella* in the farrowing pens affects the piglets microbiota. It is possible that this effect is caused by the *Salmonella* contamination and excretion of the piglets. However, in this experiment because of the low volume of fecal matter shed by the piglets it was impossible to determine the real *Salmonella* status of the piglets, so the environment contamination could act as a proxy. Only one sow shed at gestation (beginning and end) *Salmonella* of the same serotype and HRM type than those found its environment. Hence, it seems that this environmental contamination is mostly due to residual contamination from previous production cycles, as these environments are not thoroughly cleaned and disinfected since animals are always present in the room, and not sow shedding. Other studies have shown that *Salmonella* shedding of piglets at farrowing is rarely detected even when using pooled samples to obtain a better sensitivity (Kranker *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2018). It has been hypothesized that piglets are protected against vertical transmission of *Salmonella*

colonization by the antibodies transferred by the sows (Matiasovic *et al.*, 2013). Hence, in this study it is not clear if the modification of the microbiota associated to the *Salmonella* contamination of the environment is caused by the colonization of the piglets or other factors.

During the sampling period, these piglets were kept in multiple different rooms in the maternity area and the impact of housing on their microbiome was also assessed. The perMANOVA test showed that the rooms had a significant effect on the composition of the microbiota of the piglets. Similar results have recently been described in experiments conducted with chicken and swine. Indeed, in one experiment it was shown that the rearing unit affected the non-dominant caecal microbiota of chickens (Ludvigsen *et al.*, 2016), while in another study, variations in the housing environment was shown to effect on the microbiota of the sows but not of the piglets (Kubasova *et al.*, 2017). Furthermore, the impact of the housing environment on the microbiota of mice has been described and recommendations have been made on how to control this factor in studies using these animals (Laukens *et al.*, 2016). It is, however, the first time to our knowledge that this effect has been reported on piglet microbiota in different rooms of the same production site. This shows the importance of limiting possible confounding factors in microbiome studies and that the immature microbiome of the piglet is sensitive to multiple factors such as the farrowing environment.

The birth mother was also shown to significantly affect the composition of the microbiota of the piglets. This shows a possible transfer of a part of the microbiota or at least an influence of the sows' on it during the perinatal time even if the microbiota of the piglets is largely different, as shown previously. This possible transfer of microbiota has already been described in multiple studies and occurs by multiple pathways. The seeding of the microbiota in mammals could possibly occur trans-placentally before the animal is born (Jiménez *et al.*, 2008; Gosalbes *et al.*, 2013) at birth by the vaginal-oral pathway (Dominguez-Bello *et al.*, 2010), after birth by the fecal-oral pathway (Funkhouser et Bordenstein, 2013; Browne *et al.*, 2017) through the milk and direct contact with the teats during lactation (Martin *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2011; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). The importance of this transfer in the establishment of the microbiota has been shown in experiments by comparing the microbiota of babies born naturally from the microbiota of babies born from C-sections. In these studies, the microbiota of the latter showed significantly

less resemblance to the microbiota of their mother than the kids born naturally because of the reduced contact with the mother's microbiota at birth (Johansson *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2017).

Despite the high number of comparisons resulting in loss of statistical power when including the birth mother in the MaAslin analysis, the lairage room, the parity of the mother, the contamination of the lairage environment and *Salmonella* status of the mother could be considered. Interestingly, one of the OTUs that was associated with the piglets born from sows that were not shedding *Salmonella* was classified as a member of the genus *Bacteroides*. This genus is known to produce large quantities of propionate (Rios-Covian *et al.*, 2017). This SCFA has been shown to reduce the expression of SPI-1, which is linked to the invasion by *Salmonella* (Hung *et al.*, 2013; Yoo *et al.*, 2017). Furthermore, a study has shown that the propionate produced by *Bacteroidetes* mediates *Salmonella* colonization resistance in mice by limiting its growth through the disruption of its intracellular pH homeostasis (Jacobson *et al.*, 2018). Multiple OTUs that were associated with piglets born from sows that were shedding *Salmonella* were also classified to genus that are SCFA producers such as *Alloprevotella* (1 OTU) *Megasphaera* (2 OTU), *Blautia* (1 OTU), *Victivallis* (2 OTUs) and *Collinsella* (1 OTU) (Zoetendal *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2010; Downes *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Jeon *et al.*, 2017). However, all of these genera except *Megasphaera* are known to contain species that produce mostly acetate, a SCFA that induces *Salmonella* invasion (Lawhon *et al.*, 2002). Hence, in this study some of the identified populations associated with piglets born from sows not shedding *Salmonella* could have a protective effect against *Salmonella* colonization while those associated with piglets born from sows shedding *Salmonella* could have the opposite effect. Further studies are needed to validate these results.

The causes and the impacts of the measured variations of the fecal microbiota of the piglets associated with the excretion status of the sows have yet to be elucidated. Indeed, in the context of this study no population has been identified as a candidate for a direct transfer from the sows to the piglets associated with *Salmonella* shedding or not. Furthermore, no significant differences could be measured between the microbiota of the sows shedding *Salmonella* or not. Hence, it seems that the measured variations in the piglets' microbiome are not caused by a direct transfer

of specific populations but rather by some more global, subtle, and possibly indirect effect on the microbiota. It is also possible that these modifications are caused by rare microorganisms that are not detectable by our method in the feces of sows but important in the early microbiota of the piglets (Benjamino *et al.*, 2018). Finally, since it is known that the microbiota of the piglet becomes a more stable and mature microbiota after weaning due to the change of feed and environment (Bian *et al.*, 2016), it would be interesting to assess if these differences persist for the whole life of the animal or if they are erased after these transitions. It would also be interesting to assess the influence of these modifications on the future *Salmonella* status of these animals based on the persistence or not of the microbiota and since we showed that the contamination of the environment affect the microbiota, to evaluate the consequence of *Salmonella* contamination on the microbiota of the piglet itself (Arnal *et al.*, 2014).

Conclusion

In conclusion, this study showed that the *Salmonella* shedding status of the sow has an impact on the microbiota of the piglets when comparing animals born from sows that were shedding *Salmonella* at least once during gestation with those from sows that didn't shed during samplings. These results are important as they show that the presence specific bacterial populations such as *Salmonella* in the microbiota of the mother can influence the microbiota of the piglets at least until weaning. However, in the context of this study, no *Salmonella* associated taxa seemed directly transferred from the sows to the piglets, showing that this effect is possibly indirect or supported by underrepresented components of the microbiota. We also showed that the microbiota of the piglets born from the same sow is more similar than the microbiota from the piglets of other litters and that parity of the sow affects the microbiota of its piglets, confirming the influence of the mother on the piglet microbiota. *Salmonella* contamination of the farrowing environment was also shown to affect the piglet microbiota. Finally, we highlighted the importance of the housing room as a confounding factor in a swine microbiota study.

Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), financial partners in the Industrial Research Chair in Meat Safety and the Bourse de la

Cité de la biotechnologie agroalimentaire, vétérinaire et agroenvironnementale. The authors would also like to thank F. Ménard Inc., in particular Benoît Laplante for their collaboration and participation. Computations were made on the supercomputer Briarée from Université de Montréal, managed by Calcul Québec and Compute Canada. The operation of this supercomputer is funded by the Canada Foundation for Innovation (CFI), the Ministère de l'Économie, de la Science et de l'Innovation du Québec (MESI) and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQ-NT).

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

Tables

Tableau 1. – OTUs shared by all piglets and sows samples. Results observed for OTUs clustered at 97% identity.

OTU number	OTU classification
Otu0001	Firmicutes, <i>Lactobacillaceae</i>, <i>Lactobacillus</i>
Otu0002	Firmicutes, <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae_un</i>
Otu0003	Proteobacteria, <i>Enterobacteriaceae</i>, <i>Escherichia/Shigella</i>
Otu0006	Firmicutes, <i>Acidaminococcaceae</i>, <i>Phascolarctobacterium</i>
Otu0013	Firmicutes, <i>Clostridiaceae_1</i>, <i>Clostridium_s_s</i>
Otu0014	Firmicutes, <i>Streptococcaceae</i>, <i>Streptococcus</i>
Otu0019	Firmicutes, <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae_un</i>
Otu0027	Euryarchaeota, <i>Methanobacteriaceae</i>, <i>Methanobrevibacter</i>
Otu0028	Proteobacteria, <i>Desulfovibrionaceae</i>, <i>Desulfovibrio</i>
Otu0043	Firmicutes, <i>Clostridiales_I_S_XIII</i> , <i>Clostridiales_I_S_XIII_un</i>
Otu0048	Firmicutes, <i>Peptostreptococcaceae</i>, <i>Terrisporobacter</i>
Otu0055	Firmicutes, <i>Clostridiaceae_1</i>, <i>Clostridium_s_s</i>
Otu0062	Firmicutes, <i>Peptostreptococcaceae</i>, <i>Romboutsia</i>
Otu0087	Firmicutes, <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae_un</i>
Otu0155	Actinobacteria, <i>Coriobacteriaceae</i> , <i>Coriobacteriaceae_un</i>
Otu0204	Firmicutes, <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Clostridium_XIVa</i>

Phylum.Family,Genus. Unclassified = un, *Clostridiales incertae sedis XIII* = *Clostridiales_I_S_XIII*, *Clostridium sensu stricto* = *Clostridium_s_s*. OTU numbers represent relative abundance (ex. OTU0001 is more present than OTU0002). Bold taxa are classified to the genus.

Tableau 2. – Comparison of alpha-diversity indices across sow groups and according to *Salmonella* shedding status of the piglets' mothers.

The means were based on 1000 subsampling of 26,729 sequences. On the same column ^a is significantly different from ^b. Significant p values of 0.05. Obs. OTUs = Observed OTUs at 97% identity.

	Coverage	Obs. OTUs	Inverted Simpson's index	Shannon Evenness
Sows	0.994 ^a	698 ^a	44 ^a	0.72 ^a
Negative beginning/negative end	0.993	687	50	0.72
Positive beginning/negative end	0.994	698	42	0.71
Positive beginning/positive end	0.994	719	45	0.72
Piglets	0.996 ^b	374 ^b	26 ^b	0.67 ^b
From sows negative beginning/negative end	0.996	387	24	0.65
From sows positive beginning/negative end	0.996	370	26	0.67
From sows positive beginning/positive end	0.996	361	34	0.70

Tableau 3. – Features of piglets’ microbiota significantly associated with *Salmonella* shedding status of the mother using MaAsLin. Results observed for OTUs clustered at 97% identity.

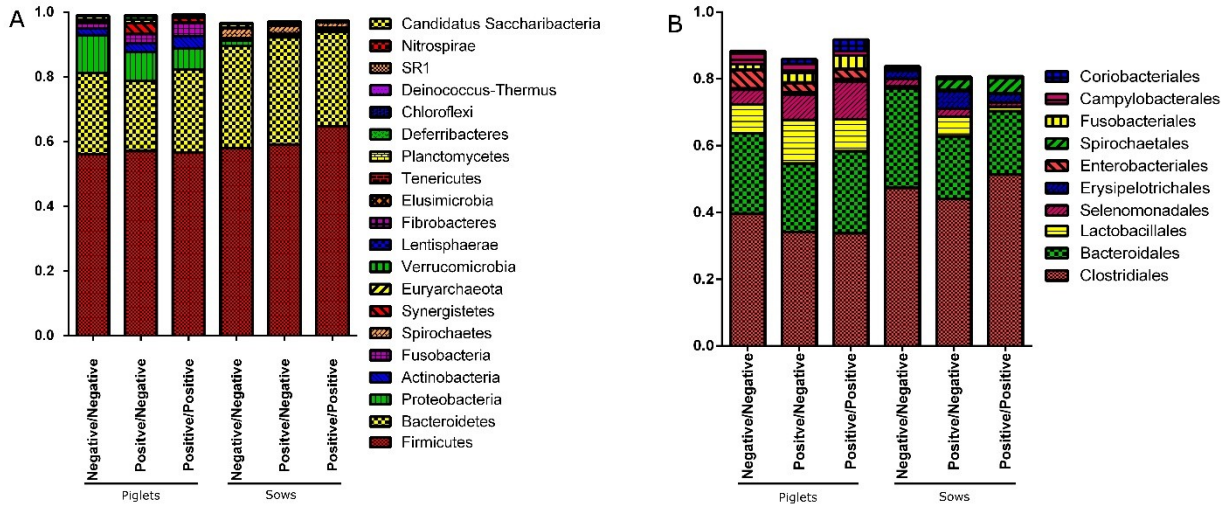
Status	Coeff.	P	Features
Salm-	0.0360	0.0011	Firmicutes, <i>Firmicutes_un</i> , <i>Firmicutes_un</i> , Otu0071
	0.0252	0.0026	Planctomycetes, <i>Planctomycetes_un</i> , <i>Planctomycetes_un</i> , Otu0101
	0.0212	0.0025	Firmicutes, <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae_un</i> , Otu0121
	0.0090	0.0008	Bacteroidetes, <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bacteroides</i> , Otu0048
	0.0089	0.0045	Firmicutes, <i>Clostridiales_un</i> , <i>Clostridiales_un</i> , Otu0366
	0.0088	0.0060	Actinobacteria, <i>Coriobacteriaceae</i> , <i>Atopobium</i> , Otu0291
	0.0085	0.0028	Actinobacteria, <i>Coriobacteriaceae</i> , <i>Collinsella</i> , Otu0296
	0.0061	0.002	Firmicutes, <i>Clostridiales_un</i> , <i>Clostridiales_un</i> , Otu0241
	0.0037	0.0080	Firmicutes, <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae_un</i> , Otu0311
0.0034	0.0070	Firmicutes, <i>Clostridiales_un</i> , <i>Clostridiales_un</i> , Otu0381	
Salm+	0.0383	0.0049	Firmicutes, <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Blautia</i> , Otu0046
	0.0371	0.0033	Actinobacteria, <i>Coriobacteriaceae</i> , <i>Collinsella</i> , Otu0041
	0.0341	0.0004	Bacteroidetes, <i>Porphyromonadaceae</i> , <i>Parabacteroides</i> , Otu0069
	0.0288	0.0022	Proteobacteria, <i>Sutterellaceae</i> , <i>Sutterella</i> , Otu0084
	0.0196	0.0045	Firmicutes, <i>Erysipelotrichaceae</i> , <i>Holdemanella</i> , Otu0096
	0.0173	0.0000	Lentisphaerae, <i>Victivallaceae</i> , <i>Victivallis</i> , Otu0199
	0.0133	0.0011	Lentisphaerae, <i>Victivallaceae</i> , <i>Victivallis</i> , Otu0225
	0.0129	0.0013	Proteobacteria, <i>Helicobacteraceae</i> , <i>Helicobacter</i> , Otu0089
0.0127	0.0006	Firmicutes, <i>Veillonellaceae</i> , <i>Megasphaera</i> , Otu0176	

0.0733	0.0004	Firmicutes, Veillonellaceae, Megasphaera, Otu0015
0.055	0.0024	Firmicutes, Ruminococcaceae, Subdoligranulum, Otu0040
0.0044	0.0017	Fusobacteria, Fusobacteriia, Fusobacteriales, Fusobacteriaceae, Fusobacterium, Otu0029
0.003941	0.0031	Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Clostridiales_un, Clostridiales_un, Otu0475
0.0040	0.0070	Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Ruminococcaceae, Flavonifractor, Otu0376
0.0034	0.0042	Bacteroidetes, Bacteroidia, Bacteroidales, Porphyromonadaceae, Porphyromonadaceae_un, Otu0440
0.0030	0.0059	Actinobacteria, Actinobacteria, Coriobacteriales, Coriobacteriaceae, Olsenella, Otu0111
0.0027	0.0087	Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Lachnospiraceae, Lachnospiraceae_un, Otu0196
0.0022	0.0050	Bacteroidetes, Prevotellaceae, Alloprevotella, Otu0181

Features: Phylum, Family, Genus. Unclassified = un. OTU numbers represent relative abundance (ex. OTU0001 is more present than OTU0002)

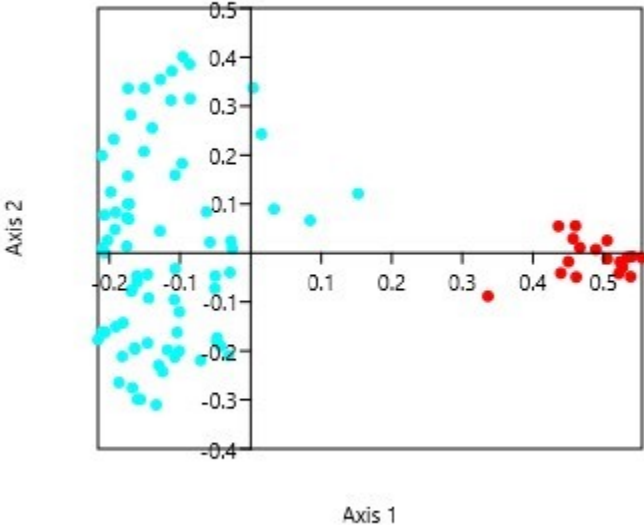
Figures

Figure 1. – Stacked bar graphs showing the relative abundance at the phylum (A) and order (B) levels using RDP classification (only taxa representing more than 1% of the sequences) for the three groups of piglets and three groups of sows.



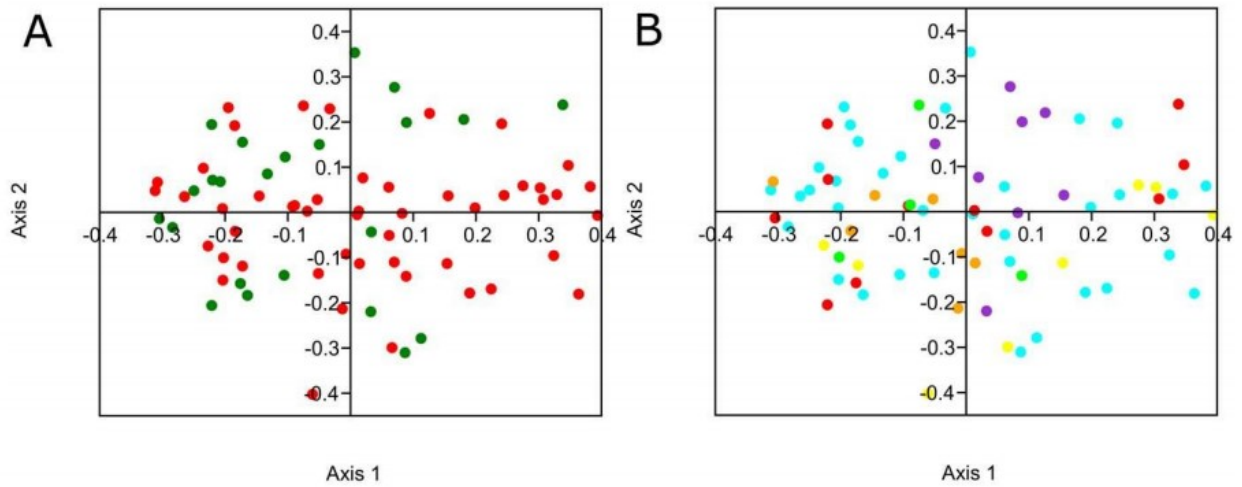
Negative/Negative: sows not shedding *Salmonella* at both sampling times and their piglets, Positive/Negative: sows shedding *Salmonella* at the beginning of gestation (50 first days) but not at the end (50 last days) and their piglets, Positive/Positive: sows shedding *Salmonella* at both sampling times and their piglets.

Figure 2. – PCoA plot using Bray-Curtis index illustrating sows' and piglets' fecal microbiome beta-diversity.



Blue = Piglets; Red = Sows; R²: 0.67

Figure 3. – Figure 3. PCoA plots using Bray-Curtis index illustrating piglets' fecal microbiome beta-diversity according to A) their mothers' *Salmonella* shedding status and B) their mother.



A) Green = Negative at both samplings; Red = Positive for at least one sample B) Each color corresponds to a sow. $R^2: 0.51$

Supplementary material

Tableau 1. – (supplementary) Features of piglets' or sows' microbiota significantly associated with the animal type using MaAsLin.

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fjam.14139&file=jam14139-sup-0001-TableS1.xlsx>

Tableau 2. – (supplementary) Features of sows' microbiota significantly associated with the gestation room and parity using MaAsLin.

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fjam.14139&file=jam14139-sup-0002-TableS2.xlsx>

Tableau 3. – (supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the birth mother using MaAsLin.

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fjam.14139&file=jam14139-sup-0003-TableS3.xlsx>

Tableau 4. – (supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the lairage room using MaAsLin.

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fjam.14139&file=jam14139-sup-0004-TableS4.xlsx>

Tableau 5. – (supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the *Salmonella* contamination of the farrowing environment using MaAsLin.

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fjam.14139&file=jam14139-sup-0005-TableS5.xlsx>

Tableau 6. – (supplementary) Features of piglets' microbiota significantly associated with the parity using MaAsLin.

<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111%2Fjam.14139&file=jam14139-sup-0006-TableS6.xlsx>

References

- Argüello, H., Alvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A., Rubio, P. et Prieto, M. (2013). Role of slaughtering in Salmonella spreading and control in pork production. *Journal of food protection* 76, 899-911.
- Argüello, H., Estellé, J., Zaldívar-López, S., Jiménez-Marín, Á., Carvajal, A., López-Bascón, M.A., Crispie, F., O'sullivan, O., Cotter, P.D., Priego-Capote, F., Morera, L. et Garrido, J.J. (2018). Early Salmonella Typhimurium infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Scientific Reports* 8, 7788.
- Arnal, M.E., Zhang, J., Messori, S., Bosi, P., Smidt, H. et Lalles, J.P. (2014). Early changes in microbial colonization selectively modulate intestinal enzymes, but not inducible heat shock proteins in young adult Swine. *PLOS One* 9, e87967.
- Bager, P., Simonsen, J., Nielsen, N.M. et Frisch, M. (2012). Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: a national cohort study. *Inflammatory Bowel Diseases* 18, 857-862.
- Baker, A.A., Davis, E., Spencer, J.D., Moser, R. et Rehberger, T. (2013). The effect of a Bacillus-based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *Journal of Animal Science* 91, 3390-3399.
- Bearson, S.M., Allen, H.K., Bearson, B.L., Looft, T., Brunelle, B.W., Kich, J.D., Tuggle, C.K., Bayles, D.O., Alt, D. et Levine, U.Y. (2013). Profiling the gastrointestinal microbiota in response to Salmonella: low versus high Salmonella shedding in the natural porcine host. *Infection, Genetics and Evolution* 16, 330-340.
- Benjamino, J., Lincoln, S., Srivastava, R. et Graf, J. (2018). Low-abundant bacteria drive compositional changes in the gut microbiota after dietary alteration. *Microbiome* 6, 86.
- Bian, G., Ma, S., Zhu, Z., Su, Y., Zoetendal, E.G., Mackie, R., Liu, J., Mu, C., Huang, R., Smidt, H. et Zhu, W. (2016). Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environmental Microbiology* 18, 1566-1577.

- Borewicz, K.A., Kim, H.B., Singer, R.S., Gebhart, C.J., Sreevatsan, S., Johnson, T. et Isaacson, R.E. (2015). Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PLOS One* 10, e0139106.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. et Pasmans, F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130, 1-19.
- Browne, H.P., Neville, B.A., Forster, S.C. et Lawley, T.D. (2017). Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nature Reviews Microbiology* 15, 531.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. et Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* 96, 544-551.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. et Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621-1624.
- Cardwell, C.R., Stene, L.C., Joner, G., Cinek, O., Svensson, J., Goldacre, M.J., Parslow, R.C., Pozzilli, P., Brigis, G., Stoyanov, D., Urbonaite, B., Sipetic, S., Schober, E., Ionescu-Tirgoviste, C., Devoti, G., De Beaufort, C.E., Buschard, K. et Patterson, C.C. (2008). Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 51, 726-735.
- Davidson, V.J., Ravel, A., Nguyen, T.N., Fazil, A. et Ruzante, J.M. (2011). Food-specific attribution of selected gastrointestinal illnesses: estimates from a Canadian expert elicitation survey. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 983-995.
- Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laaß, M., Ney, D., Posovszky, C., Hoy, L. et Hornef, M.W. (2010). Cesarean Delivery Is Associated With Celiac Disease but Not Inflammatory Bowel Disease in Children. *Pediatrics* 125, e1433-e1440.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. et Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota

- across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11971-11975.
- Downes, J., Dewhurst, F.E., Tanner, A.C.R. et Wade, W.G. (2013). Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneriae* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneriae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 1214-1218.
- Efsa (2010). Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs. *EFSA Journal* 8, 1547.
- Fernandes, L., Centeno, M.M., Couto, N., Nunes, T., Almeida, V., Alban, L. et Pomba, C. (2016). Longitudinal characterization of monophasic Salmonella Typhimurium throughout the pig's life cycle. *Veterinary Microbiology* 192, 231-237.
- Fravallo, P., Lebel, P., Longpré, J., Laplante, B., Yergeau, É., Massé, D. et Letellier, A. (2013). Salmonella associated taxonomic and functional changes in the pig digestive tract during application of feed associated mitigation option in production *International Symposium Salmonella and Salmonellosis 2013*.
- Funk, J. et Gebreyes, W. (2004). Risk factors associated with Salmonella on swine farms. *Journal of Swine Health and Production* 12, 247-251.
- Funkhouser, L.J. et Bordenstein, S.R. (2013). Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLOS Biology* 11, e1001631.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C. et Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 946-949.
- Gautam, R., Lahodny, G., Bani-Yaghoub, M., Morley, P.S. et Ivanek, R. (2013). Understanding the role of cleaning in the control of Salmonella Typhimurium in grower-finisher pigs: a modelling approach. *Epidemiology and Infection* 142, 1034-1049.
- Gosalbes, M.J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F. et Francino, M.P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical & Experimental Allergy* 43, 198-211.

- Hervé, M. (2018). *RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics* [Online]. Available: <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire> [Accessed Mai 2018].
- Hoffmann, S., Batz, M.B. et Morris, J.G., Jr. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of food protection* 75, 1292-1302.
- Hung, C.C., Garner, C.D., Slauch, J.M., Dwyer, Z.W., Lawhon, S.D., Frye, J.G., McClelland, M., Ahmer, B.M. et Altier, C. (2013). The intestinal fatty acid propionate inhibits Salmonella invasion through the post-translational control of HilD. *Molecular Microbiology* 87, 1045-1060.
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M.E., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., Mcguire, M.K. et Mcguire, M.A. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS One* 6, e21313.
- Illumina (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* [Online]. Illumina. Available: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf [Accessed February 2017].
- Jacobson, A., Lam, L., Rajendram, M., Tamburini, F., Honeycutt, J., Pham, T., Van Treuren, W., Pruss, K., Stabler, S.R., Lugo, K., Bouley, D.M., Vilches-Moure, J.G., Smith, M., Sonnenburg, J.L., Bhatt, A.S., Huang, K.C. et Monack, D. (2018). A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host Microbe* 24, 296-307 e297.
- Jeon, B.S., Kim, S. et Sang, B.I. (2017). *Megasphaera hexanoica* sp. nov., a medium-chain carboxylic acid-producing bacterium isolated from a cow rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 2114-2120.
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L. et Rodríguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* 159, 187-193.
- Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F. et Hansson, G.C. (2015).

- Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell host & microbe* 18, 582-592.
- Kim, H.B. et Isaacson, R.E. (2017). Salmonella in Swine: Microbiota Interactions. *Annual Review of Animal Biosciences* 5, 43-63.
- Kranker, S., Alban, L., Boes, J. et Dahl, J. (2003). Longitudinal Study of Salmonella enterica Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds. *Journal of clinical microbiology* 41, 2282-2288.
- Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Merlot, E., Medvecky, M., Polansky, O., Gardan-Salmon, D., Quesnel, H. et Rychlik, I. (2017). Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. *PLOS One* 12, e0170051.
- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É. et Fravalo, P. (2017). Reduction of Salmonella Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 8, 2219.
- Laukens, D., Brinkman, B.M., Raes, J., De Vos, M. et Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 117-132.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. et Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter Salmonella typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology* 46, 1451-1464.
- Le Hello, S., Brisabois, A., Accou-Demartin, M., Josse, A., Marault, M., Francart, S., Da Silva, N.J. et Weill, F.-X. (2012). Foodborne outbreak and nonmotile Salmonella enterica variant, France. *Emerging infectious diseases* 18, 132-134.
- Lebel, P., Letellier, A., Longpré, J., Laplante, B., Yergeau, E. et Fravalo, P. (2017). Feed Presentation Options in Swine Early Fattening Mitigates Salmonella Shedding and Specifically Modulates the Faecal Microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 122, 30-39.
- Letellier, A., Beauchamp, G., Guévremont, E., D'allaire, S., Hurnik, D. et Quesy, S. (2009). Risk factors at slaughter associated with presence of Salmonella on hog carcasses in Canada. *Journal of food protection* 72, 2326-2331.

- Li, X., Jensen, R.L., Højberg, O., Canibe, N. et Jensen, B.B. (2015). *Olsenella scatoligenes* sp. nov., a 3-methylindole- (skatole) and 4-methylphenol- (p-cresol) producing bacterium isolated from pig faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 1227-1233.
- Li, Y., Tian, Y., Zhu, W., Gong, J., Gu, L., Zhang, W., Guo, Z., Li, N. et Li, J. (2014). Cesarean delivery and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 834-844.
- Ludvigsen, J., Svihus, B. et Rudi, K. (2016). Rearing Room Affects the Non-dominant Chicken Cecum Microbiota, While Diet Affects the Dominant Microbiota. *Frontiers in Veterinary Science* 3, 16.
- Lynch, H., Walia, K., Leonard, F.C., Lawlor, P.G., Manzanilla, E.G., Grant, J., Duffy, G., Gardiner, G.E., Cormican, M., King, J., Markey, B.K., Fanning, S. et Argüello, H. (2018). Salmonella in breeding pigs: Shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to-finish herds. *Zoonoses and Public Health* 65, e196-e206.
- Martin, R., Heilig, G.H., Zoetendal, E.G., Smidt, H. et Rodriguez, J.M. (2007). Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2638-2644.
- Martinez, K.A., Devlin, J.C., Lacher, C.R., Yin, Y., Cai, Y., Wang, J. et Dominguez-Bello, M.G. (2017). Increased weight gain by C-section: Functional significance of the primordial microbiome. *Science Advances* 3, eaao1874.
- Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., Babak, V. et Faldyna, M. (2013). Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *The Veterinary Journal* 196, 114-115.
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., Leleiko, N., Snapper, S.B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B.E., Xavier, R.J. et Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology* 13, R79.

- Nagai, F., Watanabe, Y. et Morotomi, M. (2010). *Slackia piriformis* sp. nov. and *Collinsella tanakaei* sp. nov., new members of the family Coriobacteriaceae, isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2639-2646.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E. et Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package* [Online]. Available: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> [Accessed 2018].
- Park, S.-K., Kim, M.-S. et Bae, J.-W. (2013). *Blautia faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 599-603.
- Renz-Polster, H., David, M.R., Buist, A.S., Vollmer, W.M., O'connor, E.A., Frazier, E.A. et Wall, M.A. (2005). Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clinical & Experimental Allergy* 35, 1466-1472.
- Rios-Covian, D., Salazar, N., Gueimonde, M. et De Los Reyes-Gavilan, C.G. (2017). Shaping the Metabolism of Intestinal Bacteroides Population through Diet to Improve Human Health. *Frontiers in Microbiology* 8, 376.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. et Weber, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.
- Starke, I.C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J. et Vahjen, W. (2013). Individual responses of mother sows to a probiotic *Enterococcus faecium* strain lead to different microbiota composition in their offspring. *Beneficial Microbes* 4, 345-356.
- Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É., Larrivière-Gauthier, G. et Fravallo, P. (2017). Lack of Evidence That Selenium-Yeast Improves Chicken Health and Modulates the Caecal Microbiota in the Context of Colonization by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology* 8, 451.

- Thomas, M.K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., Nesbitt, A. et Marshall, B. (2013). Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 639-648.
- Ubeda, C., Djukovic, A. et Isaac, S. (2017). Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & Translational Immunology* 6, e128.
- Yoo, W., Kim, D., Yoon, H. et Ryu, S. (2017). Enzyme IIA(Ntr) Regulates Salmonella Invasion Via 1,2-Propanediol And Propionate Catabolism. *Scientific Reports* 7, 44827.
- Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Akkermans, A.D. et De Vos, W.M. (2003). *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 211-215.

Chapitre 5 – *Salmonella* à la pouponnière

Les 76 porcelets préalablement sélectionnés dans Lariviere-Gauthier *et al.* (2019) ont été transportés sur deux fermes dont l'une était séparée en deux bâtiments (Figure 1 page 206). Une première visite a été effectuée à l'entrée des porcelets pour évaluer la contamination des bâtiments. Des échantillons environnementaux ont alors été récoltés par chiffonnage de 30 cm² à l'aide de lingettes humidifiées de saline. Dans chaque bâtiment des chiffonnages sur les murs de tous les parcs contenant nos porcelets et sur quatre zones en hauteur et sur quatre ventilateurs par salles ont été effectués. La détection de *Salmonella* a été effectuée comme décrit dans Lariviere-Gauthier *et al.* (2019).

Seuls deux échantillons sur les 28 collectés sur les murs des parcs se sont avérés positifs, et ce dans la ferme ne possédant qu'un seul bâtiment. Dans cette même ferme, les autres surfaces n'étaient cependant pas contaminées (Tableau 1).

Un deuxième échantillonnage a ensuite été effectué cinq semaines après l'entrée des porcelets dans les pouponnières. Comme décrit précédemment, des échantillons environnementaux ont été récoltés sur les surfaces en hauteur et les ventilateurs. Par ailleurs, à cette étape 10 g de matières fécales individuelles ont été récoltés chez les porcelets faisant partie de l'expérience lorsque possible et des échantillons composites de 10 g de matières fécales de chacun des parcs où se trouvaient nos animaux ont été récoltés.

Des échantillons positifs n'ont pu être détectés que dans la ferme préalablement contaminée lors de l'entrée des porcelets, et ce, même si ces animaux provenaient tous d'une maternité où l'environnement de la mise bas était contaminé. En effet, dans cette ferme on a pu détecter la présence de *Salmonella* dans deux des quatre échantillons récoltés en hauteur et deux des quatre échantillons récoltés sur les ventilateurs. Pour ce qui est des échantillons de fèces dans cette, nous avons aussi détecté la présence de *Salmonella* dans quatre des cinq échantillons de fèces individuelles qui ont pu être collectés et trois des neuf échantillons composites de fèces collectés dans les parcs (Tableau 2).

Pour déterminer s'il y avait bien un lien entre les souches retrouvées chez la truie et celles retrouvées chez les porcelets, les isolats obtenus ont été typés par HRM comme décrit dans Larivière-Gauthier *et al.* 2017.

Lors du premier échantillonnage de la pouponnière, les échantillons positifs contenaient une souche de *Salmonella* d'un type HRM différent de ceux retrouvés dans la maternité (Tableau 1). Au moment du deuxième échantillonnage, deux types HRM différents ont été retrouvés (Tableau 2). L'un correspond à celui retrouvé lors de la première visite de la pouponnière et l'autre n'a jamais été détecté précédemment. Après les cinq semaines de la phase de pouponnière, la souche qui avait déjà été détectée à l'entrée en pouponnière et qui a été nommée type HRM 4, était retrouvée tant au niveau des échantillons de l'environnement que dans les matières fécales.

Tableau 1. – Types d'échantillons positifs à *Salmonella* et profils de courbes de fusion à haute résolution des isolats retrouvés dans ceux-ci les trois bâtiments de pouponnières lors de l'entrée des porcelets.

Profils des gènes HRM			Types HRM	Sérotype	Murs des parcs (Échantillons)	Surfaces en hauteur (Échantillons)	Ventilateurs (Échantillons)
CRISPR1	CRISPR2	Yohm					
Échantillons positifs					2/28	0/16	0/16
1	1	1	1	Infantis/O:r:1,5	0/2	-	-
2	2	2	2	Derby	0/2	-	-
3	3	3	3	Typhimurium	0/2	-	-
4	4	4	4	-	2/2	-	-

Tous les échantillons positifs provenaient du même bâtiment de pouponnière.

Tableau 2. – Types d'échantillons positifs à *Salmonella* et les profils de courbes de fusion à haute résolution retrouvés dans ceux-ci dans les trois bâtiments de pouponnières cinq semaines après l'entrée des porcelets.

Profils des gènes HRM			Types HRM	Sérotype	Fèces individuelles (Échantillons)	Échantillons composite de fèces (Échantillons)	Surfaces en hauteur (Échantillons)	Ventilateurs (Échantillons)
CRISPR1	CRISPR2	Yohm						
Échantillons positifs					4/26	3/26	2/14	2/14
1	1	1	1	Infantis/O:r:1,5	0/4	0/3	0/2	0/2
2	2	2	2	Derby	0/4	0/3	0/2	0/2
3	3	3	3	Typhimurium	0/4	0/3	0/2	0/2
4	4	4	4	-	3/4	3/3	2/2	2/2
5	5	5	5	-	1/4	0/3	0/2	0/2

Tous les échantillons positifs provenaient du même bâtiment de pouponnière.

Chapitre 6 – Sows affect their piglets' faecal microbiota until fattening but not their *Salmonella* shedding status

Guillaume Larivière-Gauthier^{1*}; Alexandre Thibodeau^{1,2}; Étienne Yergeau³; Philippe Fravallo^{1*}.

¹NSERC Industrial Research Chair in Meat Safety (CRSV), University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

²Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

³ Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, Laval, QC, Canada.

Correspondence

Guillaume Larivière-Gauthier

guillaume.lariviere-gauthier@umontreal.ca

Philippe Fravallo

philippe.fravallo@umontreal.ca

Cet article est en préparation pour soumission dans Letters in Applied Microbiology

Significance and Impact of the Study:

This study confirms that, while the link between the faecal microbiota of piglets and *Salmonella* shedding status of their sows does not persist at the fattening stage and does not affect the risk of *Salmonella* shedding of the animal, the birth mother still has an effect on the piglets' digestive microbiota. These results confirm the hypothesis that sows are an interesting target for microbiota modifications that could potentially be transferred to their progeny.

Abstract

Recent studies have shown that *Salmonella* shedding status is associated with modification of the sows' microbiota during gestation and that these modifications are reflected in the faecal microbiota of their piglets at weaning. The aims of this study were: 1) to evaluate the persistence, up to the fattening period, of the link between the microbiota of piglets and their mothers' *Salmonella* shedding status; and 2) measure the impact of microbiota variations on their *Salmonella* excretion at this stage. To achieve this, 76 piglets born from 19 sows for which the faecal microbiota was previously documented, were selected in a multisite production system. The faecal matter of these swine was sampled after four weeks, at the fattening stage. The *Salmonella* shedding status and faecal microbiota of these animals were described using bacteriological and 16S rRNA gene amplicon sequencing, respectively. The piglet digestive microbiota association with the *Salmonella* shedding status of their sows, did not persist after weaning and did not affect the risk of *Salmonella* excretion during fattening, while the birth mother still affected the microbiota of the swine at fattening. This supports the interest in sows as a target for potentially transferrable microbiota modifications.

Introduction

Salmonella is an important foodborne pathogen and is in part associated with consumption of pork products. Indeed, in Canada salmonellosis is estimated to cause 269 infections per 100,000 inhabitants each year, confirming this pathogen as a public health priority (Thomas *et al.*, 2013). The extent of salmonellosis, caused by consumption of pork products, is not known in Canada. However, in Europe, it has been estimated that between 10% and 20% of all salmonellosis cases are due to the consumption of contaminated pork meat (EFSA, 2010).

In Canadian production, a large proportion of slaughtered pigs are issued from multisite production structures (farrowing, nursery, growing/finishing are operated in different farms) in contrast to farrow-to-finish production systems. In certain parts of Canada up to 60% of the finishing swine farms are contaminated by *Salmonella* (Rajic *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2008) with some studies showing 25% of contaminated animals (Wilkins *et al.*, 2010). Since it has been shown that the entrance of contaminated animals to slaughterhouses is linked with an increased risk of meat contamination (Letellier *et al.*, 2009), actions to reduce *Salmonella* contamination of swine on farms could lead to a reduction of contamination of meat products and ultimately, the associated human salmonellosis.

It has been hypothesized that *Salmonella* contamination on farms could be reduced by acting on the digestive microbiome of the animal. Indeed, recent metagenomic studies have shown that the microbiome is an important part of the resistance against pathogenic microorganisms by multiple mechanisms such as competitive exclusion, stimulation of the immune system or production of antimicrobial substances (Ubeda *et al.*, 2017). In the case of *Salmonella*, it has been shown that the propionate produced by the *Bacteroides* present in mice microbiota inhibits colonization and also that butyrate reduces its virulence by the inhibition of SPI-1 (Gantois *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2018).

Our recent studies have shown that *Salmonella* shedding status affects the microbiota of sows at gestation and that these modifications are reflected in the microbiota of the piglets at weaning (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017; 2019). This transfer at birth of a part of the microbiota from the mother to the offspring has been observed in multiple species (Baker *et al.*, 2013; Starke *et al.*,

2013; Ferretti *et al.*, 2018) and in humans it has been shown to affect general long-term health (Decker *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Such a mechanism could be exploited in swine production to enhance the health of pigs and, in our context, reduce the risks of colonization by *Salmonella* on farms.

Therefore, the aims of this study were: 1) to evaluate the persistence, up to the fattening period, of the previously measured link between the microbiota of piglets and the *Salmonella* shedding status of their mothers; and 2) measure the impact of the measured microbiota variations on their *Salmonella* excretion at this stage.

Material and Methods

All animal experimentations were approved by the ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, certificate number 14-Rech-1714. In a Québec industrial maternity unit, 19 sows were randomly selected. The *Salmonella* shedding status of these sows was assessed at the beginning and end of gestation as described in a previous study (Larivière-Gauthier *et al.*, 2017). After farrowing, four piglets (two males and two females) per sow were identified and tagged, giving a total of 76 piglets of which 68 survived to fattening. These piglets were grouped based on the shedding status of the mother: 22 swine born from sows that were negative at both sampling times; 46 swine born from sows positive for at least one sampling (Figure 2). Environmental contamination of the farrowing cages was also assessed as described in a previous study (Larivière-Gauthier *et al.*, 2019). No farrowing cage door, five farrowing cage floor swabs and two faeces samples were positive out of the 19 collected for each sample type. Of the 19 sampled cages, seven had at least one positive sample. At 21 days of age, the piglets were transferred in two nursery sites (three different buildings) and after six weeks in the nursery were moved to three fattening sites (four different buildings). At 8 weeks of age, the piglets, selected for the experiment in one of the nursery building, were split and moved to two different fattening buildings while the piglets of the two other buildings were kept together and transferred to two different fattening buildings (Figure 1). Piglets from the same litter were sent in the same farm and in all the farms the swine were randomly assigned to a pen. All the pens were filled with other animals that were not part of the experiment and the animal density followed normal

commercial standards. *Salmonella* contamination of the fattening pens where the piglets were housed was evaluated after the washing and disinfection protocol and before the entrance of the animals. The floor of each pen was swabbed on a surface of 30 cm². For the pen floors samples *Salmonella* detection was conducted on pools of 5 samples all representing different pens in the same farm. After 28 days in the fattening units, 10 g of faecal matter was collected from each swine for *Salmonella* detection and 500 mg was subsampled and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C for 16S rRNA gene amplicon MiSeq sequencing.

Salmonella detection was conducted following a modified version of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Annex D method as described in Larivière-Gauthier *et al.* (2017).

Mixed effect logistic regression was conducted to evaluate which factors among *Salmonella* shedding status of the mothers, their parity, contamination of the farrowing environment and the combination of the nursery/fattening farm where the piglets were raised, contributed to an increase in the risk of *Salmonella* shedding at fattening, using the glmer function under R 3.5.0. Some of the swine used in this study were linked by their birth mother and hence were not completely independent. The sow from which each of them was born was added as a random effect in the model to correct for this non-independence.

16S rRNA Gene Amplicon Sequencing

The swine faecal sample total DNA was extracted and purified using a modified version of a phenol/chloroform protocol and sequencing libraries were prepared following the Illumina MiSeq protocol (Illumina, 2013) as explained in Larivière-Gauthier *et al.* (2017).

The sequences were cleaned and analysed using the DADA2 package version 1.8 under R version 3.5.0 (Callahan *et al.*, 2019). Primers were removed from sequences by truncating 20 base pairs. Forward sequences were also truncated to 225 bp and reverse to 240 bp. Sequences were further truncated at the first instance of a quality score lower or equal to 10. All sequences containing ambiguous bases or more than three expected errors were discarded. Default dada2 parameters were used to model and correct amplicon errors. Forward and reverse reads were merged, discarding sequences with two or more mismatches. Chimeras were removed with the removeBimeraDenovo command using the per-sample method. Taxonomy was assigned to

amplicon sequence variant (ASV) using the dada2 formatted rdp train set 16. An ASV corresponds to a unique sequence obtained after removal of amplification and sequencing errors by dada2. Two ASVs can differ by as little as one nucleotide. The R script used is available at this address: <https://github.com/CRSV/>.

For alpha diversity comparisons, the indices were calculated using the `estimate_richness` function of the `phyloseq` package version 1.24.2 (McMurdie et Holmes, 2013). The number of ASVs after subsampling to the lowest number of sequences in a sample, the diversity of the ASVs found in the samples (inverted Simpson's index) and their evenness (Shannon evenness) were measured. The results obtained for each group were compared using ANOVA followed by Tukey's HSD for individual comparisons and the Student's t-test with a significance level of 0.05. In the case of the beta-diversity analysis, after subsampling, visualization of the distance produced by the Jaccard or Bray–Curtis indices was conducted using non-metric multidimensional scaling (NMDS) graphs using the `ordinate` function of the `phyloseq` package and the beta-diversity of the different groups were statistically compared by perMANOVA, with the fattening farm as strata using the `ADONIS` function of the `vegan` package (Oksanen *et al.*, 2018). The samples were compared considering factors that were found to significantly affect piglet microbiota in a previous study: the farrowing room in which they were raised and the shedding status and parity of their mothers. To these factors were added the nursery and the farm where the animals were raised and the *Salmonella* shedding status at fattening.

Results and Discussion

Fattening pen environmental contamination and swine shedding status

Salmonella was found in the four sampled farms after washing and disinfection with 18 of the 24 pooled sample positive. These results show that residual contamination is important in these farms and highlight the fact that *Salmonella* is hard to eliminate in the farm environment using classical washing and disinfection techniques (Argüello *et al.*, 2011; Gotter *et al.*, 2012a). Indeed, it has been shown that *Salmonella* can persist for multiple months in the farm and form disinfectant resistant biofilms when protected by residual fecal matters or in cracks and irregularities found on the surfaces of the environment (Marin *et al.*, 2009; Argüello *et al.*, 2012).

After 28 days in the fattening units, 26 out of the 68 sampled swine were shedding *Salmonella*. Multivariate logistic regression showed that only the nursery/fattening farm affected the risk of excretion ($p < 0.05$), while the factors associated with maternity such as the *Salmonella* excretion of sows during gestation, contamination of farrowing environment or parity of the sow did not.

These results are consistent with other studies demonstrating that the main source of *Salmonella* in fattening swine appears linked to contact with environmental contamination in the nursery and fattening stages, and overcomes the microbial transmission observed around farrowing (Funk *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2018). Indeed, it seems that in our study, even if the mother is shedding *Salmonella* during gestation and the farrowing pen environment is contaminated, the risk of excretion at fattening is not significantly increased. In fact, only the nursery and fattening farm where they were raised affected this risk, showing that contamination was most likely acquired in these environments after weaning. This could be explained by a transfer of *Salmonella* specific antibodies through the colostrum during lactation which confers a passive immunity to the piglets (Matiasovic *et al.*, 2013). It has been shown that this immunity is lost after weaning; hence, the piglets could go through a period of higher vulnerability (Merialdi *et al.*, 2008). Weaning is also associated with a period inflammation at the intestinal level and dysbiosis which affects the epithelial barrier and increases the risk of contamination by pathogens. However, in this study we cannot confirm that the piglets were really contaminated during the weaning period and could have acquired *Salmonella* in latter steps. As we have shown that *Salmonella* contamination was still frequent in the environment of the fattening farms after washing and disinfection procedures, it is also possible that the contamination was acquired at this step of the production. Unlike the results obtained here, other studies have shown a link between a higher contamination in the breeding units and the fattening pigs (EFSA, 2011) and similarity between the strains found in sows and those found in the nursery and fattening units (Nollet *et al.*, 2005b). These differences could be explained by the type of production represented in most of these studies. Indeed, European production consists mostly of farrow-to-finish production where *Salmonella* could circulate more easily between sows and the other production steps. While in North American production (and the farms sampled in this study), multisite production is more frequent and the

transfer of *Salmonella* between production steps could be reduced by the geographical separation of the different buildings (farrowing, nursery and fattening).

Microbiota analysis

A total of 68 swine faecal DNA samples were amplified and sequenced. After sequence denoising, one sample was removed because of the low abundance of sequences; hence, 67 samples were used for subsequent analysis. A total of 6,368,735 sequences were retrieved and 3,225 ASVs were generated. Most of the sequences (99.7%; 6,352,546 sequences) were classified as bacterial sequences followed by archaeal sequences (0.3%; 16189 sequences). The average number of sequences in a sample was 95,055 with 305 ASVs. The highest number of sequences observed in a sample was 162,469 for 584 ASVs and the lowest number observed was 46,743 sequences for 137 ASVs.

Stacked bar graphs of the taxa found at the phylum level show that for all the groups *Bacteroidetes* represented 49.5% of the sequences in the samples followed by *Firmicutes* at 41.8% (Figure 3A). At the family level, eight families were present at a proportion of more than 1% of the sequences and represented 78.8% of the total sequences in all groups. The *Prevotellaceae* family was the most abundant with 35.3% of the sequences (Figure 3B). These results are similar to what has been previously obtained in other studies conducted on swine feces. In a meta-analysis of 20 studies, it was similarly showed that the Bacteroidetes and Firmicutes phylum were the most important population. The same study also showed a high level of *Prevotella* at the genus level which is consistent with the high abundance of *Prevotellaceae* in our samples (Holman *et al.*, 2017).

For alpha diversity, the number of observed ASVs, the inverted Simpson's index and the Shannon evenness index were compared based on the *Salmonella* shedding status of the mother, the contamination of the farrowing environment, the *Salmonella* shedding status of the swine at fattening and the nursery–fattening farm combination. When comparing based on the nursery–fattening farm combination, significant differences were measured for the observed number ASV (farm 4: 351 ASVs vs farm 2: 266 ASVs and farm 3: 283 ASVs, Tukey HSD $p < 0.05$). Similarly, when comparing the number of observed ASVs based on the lairage room where the piglets were

raised, significant differences were also measured (ANOVA $p < 0.05$); however, no significant differences were measured using Tukey HSD as a post hoc test. No significant differences were measured when comparing the other alpha diversity indices and the animals based on their birth mother and its *Salmonella* shedding status, *Salmonella* contamination of the farrowing environment and *Salmonella* shedding of the swine itself at fattening. Hence, it seems that the environment where the animals were raised, or the production practices of these farms are associated with variations in the number of bacterial 'species' present in the faecal microbiota of the swine while the factors linked with the mother or *Salmonella* had no effect. A study comparing the microbiota of chicken in 2 different farms with the same production practices has already shown the impact of the environmental microbiota on the microbiota of the animals with significant differences in richness and in composition between the animals of the different sampled farms (Rothrock et Locatelli, 2019). In the swine production it has also been shown that production practices such as outdoor access or differences in bedding which are linked to variation in the access to the environmental microbiota can affect the fecal microbiota (Zheng *et al.*, 2007; Kubasova *et al.*, 2017). However, to the knowledge of the authors, no studies have been conducted comparing the impact of the environment of farm with similar production practices on this microbiota.

Beta-diversity was compared between the different abovementioned groups. Using a subsample of 46,763 (lowest number of sequences in a sample) for each sample, only the birth mother (Figure 4a), the nursery and the fattening farm (Figure 4b) had a significant influence (perMANOVA $p < 0.05$) on the composition of the microbiota using both Jaccard and Bray–Curtis indices while the lairage room, the parity of the sow and the *Salmonella* shedding status of the sow or the swine themselves had no effect.

These results show that the environment of the farm and the possible differences in production practices have an important impact on the faecal microbiota of swine, but also, and most interestingly, that there are significant differences between swine from the same litter and their congeners born from other mothers and raised on the same farm. This shows that even if the differences of microbiota linked to the *Salmonella* shedding of the sows that were previously measured at weaning (Larivière-Gauthier *et al.*, 2019) are not conserved at the fattening stage,

the microbiota of the mother still has a long-term influence on the mature microbiota of the swine. Multiple studies have shown that the mother has an important impact on the composition and establishment of the intestinal microbiota. The seeding of the microbiota in mammals could possibly occur trans-placentally before the animal is born (Jiménez *et al.*, 2008; Gosalbes *et al.*, 2013) at birth by the vaginal-oral pathway (Dominguez-Bello *et al.*, 2010), after birth by the fecal-oral pathway (Funkhouser et Bordenstein, 2013; Browne *et al.*, 2017) through the milk and direct contact with the teats during lactation (Martin *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2011; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). For example, it has been shown that the microbiota of mammals born naturally was different from the microbiota of those born from C-sections. The subjects born from C-sections had a microbiota significantly less similar to the microbiota of their mother and had higher risks of developing inflammatory diseases (Johansson *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2017). In a similar fashion, sow-reared piglets had significantly different microbiota than those fed formula (Wang *et al.*, 2013). However, in the studies that followed the microbiota after weaning the initial differences in the microbiota disappeared (Stinson *et al.*, 2018). Hence, we report, to the knowledge of the author, for the first a persistence of the impact of the sow on the microbiota up until the fattening stage. It can be hypothesized that targeted modifications of the sows' microbiota could have an impact on the microbiota of their offspring and be exploited to improve swine resistance to pathogens and general health.

Conclusion

In conclusion, even if the differences in the piglet digestive microbiota associated with the *Salmonella* shedding status of the sows measured in a previous study did not persist after weaning and did not affect the risk of excretion of *Salmonella* during fattening, the birth mother still affects the microbiota of the swine at fattening. This makes the sows an interesting target for microbiota modifications that could potentially be transferred durably to their progeny to improve the piglets' gut health by participating for example in a better development of the immune system. The results also show that, *Salmonella* shedding at fattening was associated with the environment where the animal was raised after weaning. This suggests that in a multisite production system, in a public health perspective, efforts should be focused on limiting the risks of contact between swine and bacteria at the nursery and fattening stages.

Acknowledgement

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC RDCPJ 520873-17 and PCIPJ 412247-15), financial partners of the Research Chair in Meat Safety, the Consortium de Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels au Québec (CRIBIQ) and the Bourse de la Cité de la Biotechnologie Agroalimentaire, Vétérinaire et Agroenvironnementale. The authors would also like to thank F. Ménard Inc., in particular Benoît Laplante for their collaboration and participation. *This research was enabled in part by support provided by WestGrid (www.westgrid.ca) and Compute Canada/Calcul Canada (www.computecanada.ca).*

Figures

Figure 1. – Distribution of sampled animals at different farms and buildings from gestation to fattening.

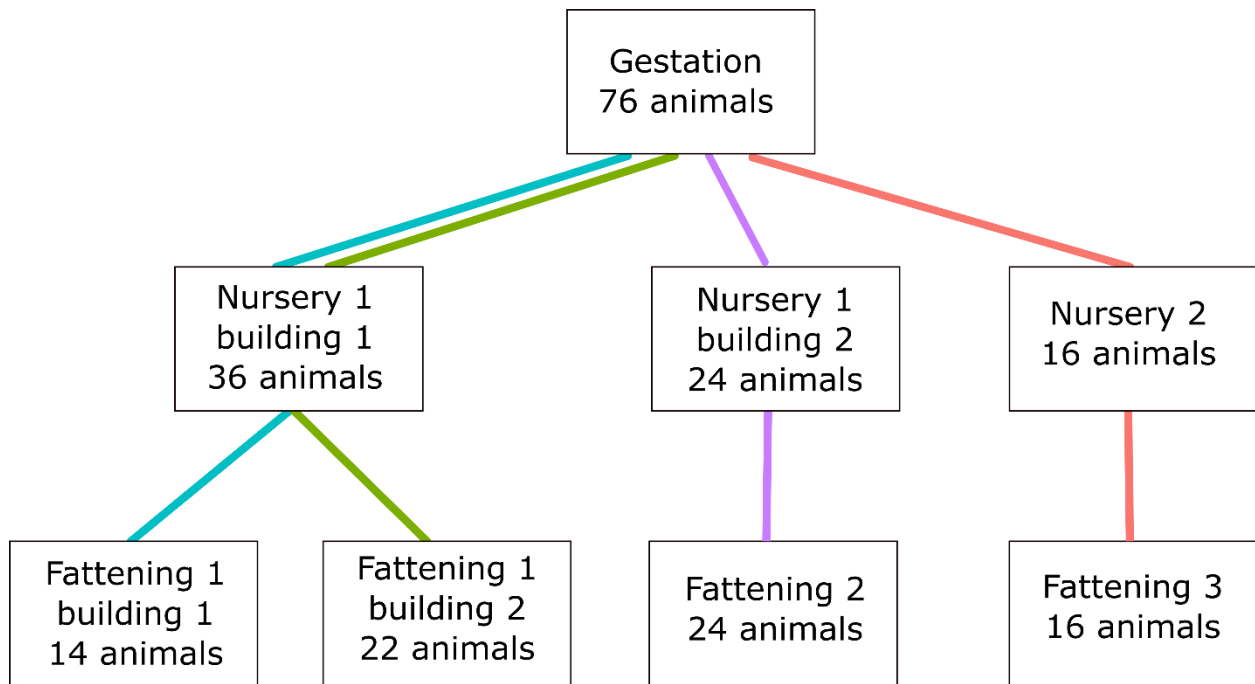


Figure 2. – Distribution of piglets based on their mothers' *Salmonella* status.

The green square indicates that the sow was negative at this sampling point. The red square indicates that the sow was positive at this sampling point.

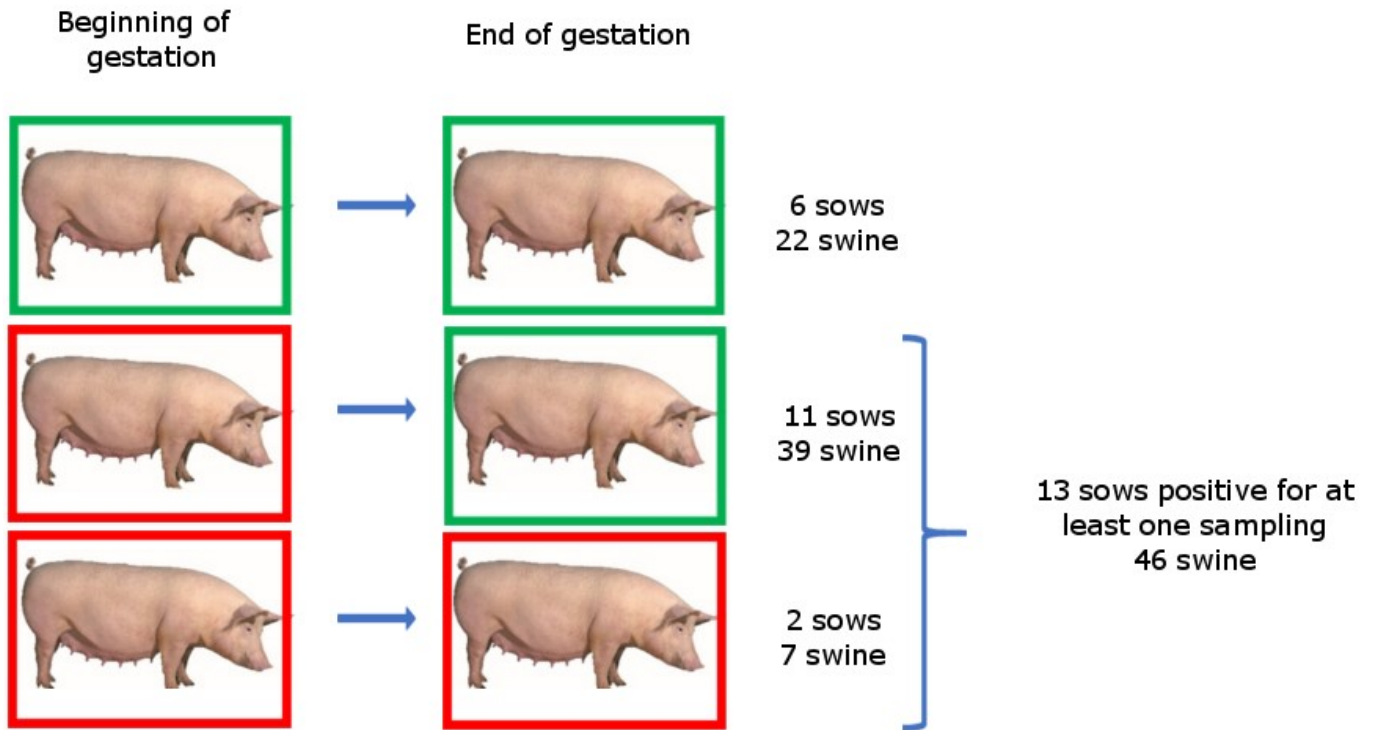
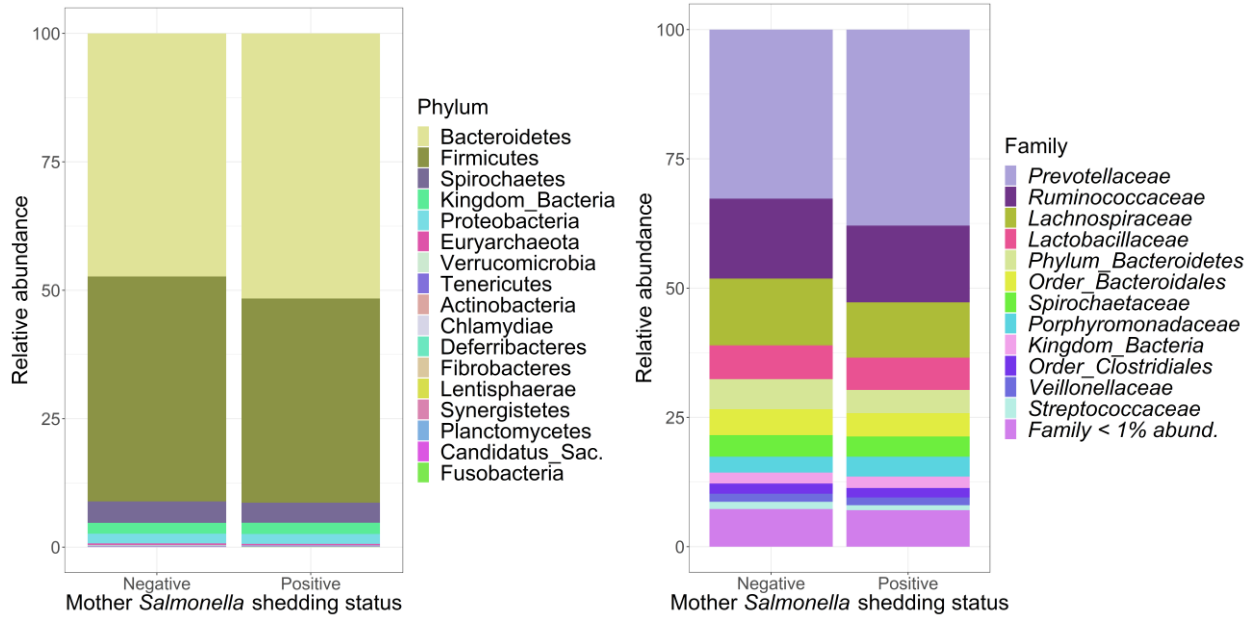
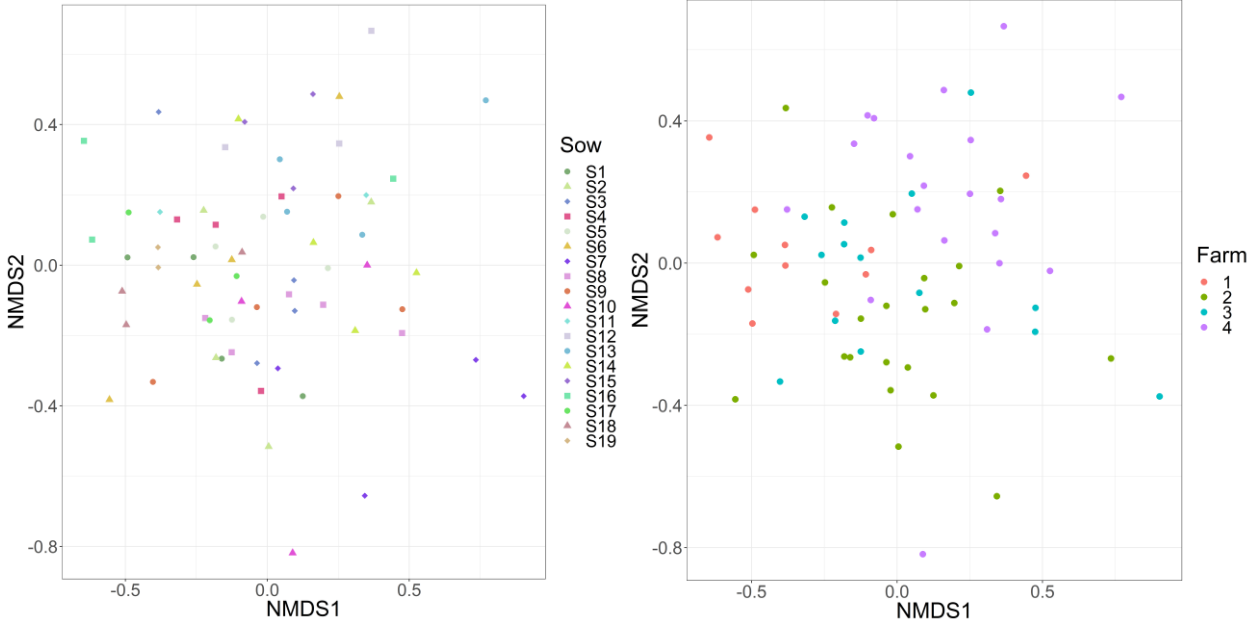


Figure 3. – Stacked bar graphs showing the relative abundance at the phylum (A) and family (B) levels using RDP classification (only taxa representing more than 1% of the sequences).



Negative: swine born from sows not shedding *Salmonella* at either sampling time; Positive: swine born from sows shedding *Salmonella* at least once during sampling. Kingdom_, Phylum_, Order_ = last possible classification for this ASV

Figure 4. – NMDS plots using the Bray–Curtis index illustrating swine faecal microbiome beta-diversity according to: A) the birth mother; B) the fattening farm.



A) Each colour and shape combination corresponds to a sow. B) Each colour corresponds to a fattening farm.

References

- Argüello, H., Rubio, P. et Carvajal, A. (2012). "Salmonella control measures at farm in swine production," in *Salmonella-Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. IntechOpen.
- Argüello, H., Rubio, P., Jaramillo, A., Barrios, V., García, M. et Carvajal, A. (2011). Evaluation of cleaning and disinfection procedures against Samonella enterica at swine farms, transport and lairage facilities. *SafePork 2011 proceedings*.
- Baker, A.A., Davis, E., Spencer, J.D., Moser, R. et Rehberger, T. (2013). The effect of a Bacillus-based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *Journal of Animal Science* 91, 3390-3399.
- Browne, H.P., Neville, B.A., Forster, S.C. et Lawley, T.D. (2017). Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nature Reviews Microbiology* 15, 531.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. et Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* 96, 544-551.
- Callahan, B.J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C.M., Gulati, A.S., Mcgill, S.K. et Dougherty, M.K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *bioRxiv*, 392332.
- Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laaß, M., Ney, D., Posovszky, C., Hoy, L. et Hornef, M.W. (2010). Cesarean Delivery Is Associated With Celiac Disease but Not Inflammatory Bowel Disease in Children. *Pediatrics* 125, e1433-e1440.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. et Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11971-11975.
- Efsa (2010). Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs. *EFSA Journal* 8, 1547.

- Efsa (2011). Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part B: factors associated with Salmonella pen positivity *EFSA Journal* 9, 2329.
- Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Muckle, A.C., Gray, J.T. et Funk, J. (2008). Distribution of Salmonella serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. *Canadian Journal of Veterinary Research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 72, 1-6.
- Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., Armanini, F., Truong, D.T., Manara, S., Zolfo, M., Beghini, F., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Bariletti, I., Canto, R., Clementi, R., Cologna, M., Crifo, T., Cusumano, G., Gottardi, S., Innamorati, C., Mase, C., Postai, D., Savoia, D., Duranti, S., Lugli, G.A., Mancabelli, L., Turrone, F., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Anzalone, R., Viappiani, A., Yassour, M., Vlamakis, H., Xavier, R., Collado, C.M., Koren, O., Tateo, S., Soffiati, M., Pedrotti, A., Ventura, M., Huttenhower, C., Bork, P. et Segata, N. (2018). Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 24, 133-145 e135.
- Funk, J.A., Davies, P.R. et Nichols, M.A. (2001). Longitudinal study of Salmonella enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology* 83, 45-60.
- Funkhouser, L.J. et Bordenstein, S.R. (2013). Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLOS Biology* 11, e1001631.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C. et Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 946-949.
- Gosalbes, M.J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F. et Francino, M.P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical & Experimental Allergy* 43, 198-211.
- Gotter, V., Blaha, T. et Klein, G. (2012a). A case-control study on the occurrence of Salmonella spp. in the environment of pigs. *Epidemiology and Infection* 140, 150-156.

- Holman, D.B., Brunelle, B.W., Trachsel, J. et Allen, H.K. (2017). Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems* 2, e00004-00017.
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M.E., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., Mcguire, M.K. et Mcguire, M.A. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS One* 6, e21313.
- Illumina (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* [Online]. Illumina. Available: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf [Accessed February 2017].
- Jacobson, A., Lam, L., Rajendram, M., Tamburini, F., Honeycutt, J., Pham, T., Van Treuren, W., Pruss, K., Stabler, S.R., Lugo, K., Bouley, D.M., Vilches-Moure, J.G., Smith, M., Sonnenburg, J.L., Bhatt, A.S., Huang, K.C. et Monack, D. (2018). A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host Microbe* 24, 296-307 e297.
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L. et Rodríguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* 159, 187-193.
- Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F. et Hansson, G.C. (2015). Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell host & microbe* 18, 582-592.
- Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Merlot, E., Medvecky, M., Polansky, O., Gardan-Salmon, D., Quesnel, H. et Rychlik, I. (2017). Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. *PLOS One* 12, e0170051.
- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É. et Fravallo, P. (2017). Reduction of Salmonella Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 8, 2219.

- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É. et Fravallo, P. (2019). Salmonella shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning. *Journal of Applied Microbiology* 0.
- Letellier, A., Beauchamp, G., Guévremont, E., D'allaire, S., Hurnik, D. et Quesy, S. (2009). Risk factors at slaughter associated with presence of Salmonella on hog carcasses in Canada. *Journal of food protection* 72, 2326-2331.
- Li, Y., Tian, Y., Zhu, W., Gong, J., Gu, L., Zhang, W., Guo, Z., Li, N. et Li, J. (2014). Cesarean delivery and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 834-844.
- Lynch, H., Walia, K., Leonard, F.C., Lawlor, P.G., Manzanilla, E.G., Grant, J., Duffy, G., Gardiner, G.E., Cormican, M., King, J., Markey, B.K., Fanning, S. et Argüello, H. (2018). Salmonella in breeding pigs: Shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to-finish herds. *Zoonoses and Public Health* 65, e196-e206.
- Marin, C., Hernandez, A. et Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science* 88, 424-431.
- Martin, R., Heilig, G.H., Zoetendal, E.G., Smidt, H. et Rodriguez, J.M. (2007). Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2638-2644.
- Martinez, K.A., Devlin, J.C., Lacher, C.R., Yin, Y., Cai, Y., Wang, J. et Dominguez-Bello, M.G. (2017). Increased weight gain by C-section: Functional significance of the primordial microbiome. *Science Advances* 3, eaao1874.
- Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., Babak, V. et Faldyna, M. (2013). Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *The Veterinary Journal* 196, 114-115.
- Mcmurdie, P.J. et Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS One* 8, e61217.

- Merialdi, G., Barigazzi, G., Bonilauri, P., Tittarelli, C., Bonci, M., D'incau, M. et Dottori, M. (2008). Longitudinal Study of Salmonella Infection in Italian Farrow-To-Finish Swine Herds. *Zoonoses and Public Health* 55, 222-226.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., Duchateau, L., De Zutter, L., De Kruif, A. et Maes, D. (2005b). Distribution of Salmonella Strains in Farrow-to-Finish Pig Herds: A Longitudinal Study. *Journal of food protection* 68, 2012-2021.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E. et Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package* [Online]. Available: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> [Accessed 2018].
- Rajic, A., Keenlside, J., Mcfall, M.E., Deckert, A.E., Muckle, A.C., O'connor, B.P., Manninen, K., Dewey, C.E. et Mcewen, S.A. (2005). Longitudinal study of Salmonella species in 90 Alberta swine finishing farms. *Veterinary Microbiology* 105, 47-56.
- Rothrock, M.J. et Locatelli, A. (2019). Importance of Farm Environment to Shape Poultry-Related Microbiomes Throughout the Farm-to-Fork Continuum of Pasture-Raised Broiler Flocks. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3.
- Starke, I.C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J. et Vahjen, W. (2013). Individual responses of mother sows to a probiotic Enterococcus faecium strain lead to different microbiota composition in their offspring. *Beneficial Microbes* 4, 345-356.
- Stinson, L.F., Payne, M.S. et Keelan, J.A. (2018). A Critical Review of the Bacterial Baptism Hypothesis and the Impact of Cesarean Delivery on the Infant Microbiome. *Frontiers in medicine* 5, 135-135.
- Thomas, M.K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., Nesbitt, A. et Marshall, B. (2013). Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 639-648.
- Ubeda, C., Djukovic, A. et Isaac, S. (2017). Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & Translational Immunology* 6, e128.

- Wang, M., Radlowski, E.C., Monaco, M.H., Fahey, G.C., Jr, Gaskins, H.R. et Donovan, S.M. (2013). Mode of Delivery and Early Nutrition Modulate Microbial Colonization and Fermentation Products in Neonatal Piglets. *The Journal of Nutrition* 143, 795-803.
- Wilkins, W., Rajić, A., Waldner, C., Mcfall, M., Chow, E., Muckle, A. et Rosengren, L. (2010). Distribution of Salmonella serovars in breeding, nursery, and grow-to-finish pigs, and risk factors for shedding in ten farrow-to-finish swine farms in Alberta and Saskatchewan. *Canadian Journal of Veterinary Research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 74, 81-90.
- Zheng, D.M., Bonde, M. et Sørensen, J.T. (2007). Associations between the proportion of Salmonella seropositive slaughter pigs and the presence of herd level risk factors for introduction and transmission of Salmonella in 34 Danish organic, outdoor (non-organic) and indoor finishing-pig farms. *Livestock Science* 106, 189-199.

Chapitre 7 – Discussion

Contribution à une meilleure compréhension de la circulation de *Salmonella* dans la filière porcine québécoise

Le premier objectif de cette thèse était d'illustrer l'impact possible de la truie dans la contamination d'une pyramide de production de porcs intégrée au Québec. En effet, plusieurs études ont démontré que les truies pourraient être des réservoirs importants de *Salmonella* (EFSA, 2009; Wilkins *et al.*, 2010). Ces truies peuvent ensuite contaminer l'environnement de la mise-bas où les porcelets peuvent entrer en contact avec *Salmonella* et se contaminer. Le lien entre les *Salmonella* retrouvées chez les truies et celles retrouvées chez les porcelets était cependant encore peu décrit au début de ce projet. De plus, les études qui ont pu tracer ce lien sont des études européennes qui ont principalement été conduites dans des fermes de type naisseur-finiisseur. Ce type de production implique la présence sur un même site de production de l'ensemble des catégories d'âge de porcs, donc de sensibilités différentes face au risque infectieux. De son côté, la production québécoise est à majorité composée de production multisite, séparant rapidement lors du sevrage précoce les porcelets de leur mère, puis assurant l'engraissement sur des sites encore différents. (Nollet *et al.*, 2005b; Casanova-Higes *et al.*, 2019). Il a été démontré que ce sevrage précoce peut avoir des effets sur le microbiote et le système immunitaire du porcelet en pouponnière. En effet, chez les porcelets sevrés de façon hâtive (à 14 jours d'âge), l'implantation du microbiote est altéré, il est moins diversifié, donc moins mature et plus propice à la colonisation par les pathogènes que chez les porcelets ayant un sevrage tardif (42 jours d'âge) (Massacci *et al.*, 2020). De plus, le retrait hâtif du lait maternel, qui contient chez le porc une grande quantité d'SIgA mais aussi de molécules antibactériennes telles que les lactoferrines alors que le système immunitaire est encore en développement, augmente aussi les risques d'infection juste après le sevrage (Rhouma *et al.*, 2017). En effet, à cet âge chez les porcelets, les cellules T CD8 sont largement absentes et ne possèdent qu'un nombre limité de cellules B produisant principalement des IgM (Stokes *et al.*, 2004). Ces facteurs dans le système

multisite québécois pourrait augmenter le risque de colonisation par *Salmonella* à cette étape, comparativement à la production européenne où le sevrage se déroule plus tard.

Méthode de détection

Un des objectifs de cette étude était de tracer les souches de *Salmonella* retrouvées aux diverses étapes de la pyramide de production. Une méthode de détection modifiée a été utilisée de façon à augmenter la sensibilité analytique pour des animaux porteurs asymptomatiques et qui peuvent excréter à de faibles niveaux (Scherer *et al.*, 2008; Gopinath *et al.*, 2012). En effet, comme cela a été présenté précédemment dans la revue de la littérature, l'augmentation de la masse de l'échantillon est directement liée à une augmentation de la sensibilité de la méthode de détection (Funk *et al.*, 2000; Champagne *et al.*, 2005). Ainsi, comme les truies sont souvent très faiblement excrétrices malgré leur contamination par *Salmonella*, une masse de 100 g de matières fécales a constitué la prise d'essai analytique pour la détection du pathogène chez ces animaux. De plus, la méthode a aussi été modifiée de façon à récolter un nombre maximum de souches potentiellement différentes dans les échantillons positifs. En effet, malgré le grand nombre de méthodes standard pour la détection de *Salmonella* dans diverses matrices, il a été démontré que certaines souches ou sérotypes sont favorisés dans certains milieux d'enrichissement sélectif (Gorski, 2012; Cox *et al.*, 2020). Ainsi, il peut être difficile d'apprécier la diversité complète présente dans les échantillons collectés. Dans ce projet, nous avons émis l'hypothèse que ces limitations méthodologiques pourraient contribuer à la difficulté de tracer le lien entre les *Salmonella* retrouvées chez les truies et celles portées par les porcelets, voire les porcs charcutiers. En effet, dans des échantillons contenant une population mixte de *Salmonella*, des souches minoritaires ou « moins performantes » dans les étapes de culture au laboratoire pourraient passer inaperçues lors des protocoles de détection normalisés, les populations majoritaires restant surreprésentées lors de l'étape d'isolement.

Pour ce qui est de l'augmentation de la taille d'échantillons au moment de la collecte chez les truies, il n'est pas possible dans le contexte de l'étude de savoir si cette méthode a vraiment eu des bénéfices puisque nous n'avons pas pu comparer les résultats avec la méthode standard. Le niveau d'excrétion mesuré, de 37% chez les truies en gestation, est cependant semblable à celui

de 38% qui avait déjà été décrit par Wilkins et al. en 2010 en utilisant la méthode standard avec seulement 10 g de matières fécales (Wilkins *et al.*, 2010). Cependant, dans l'étude de Funk et al., une sensibilité relative de seulement 52% a été mesurée lorsque 10g de matières fécales étaient utilisées (Funk *et al.*, 2000). On peut donc émettre l'hypothèse que les résultats obtenus par Wilkins et al. sont fortement sous-estimés et qu'ils pourraient plutôt être de l'ordre de 70 % (Wilkins *et al.*, 2010). Malgré tout il est impossible de savoir si dans notre cas l'utilisation d'un autre volume de fèces aurait permis d'obtenir ce même portrait.

Dans le cas des modifications de la méthode pour mieux décrire la diversité des souches retrouvées dans les échantillons, la stratégie a été de multiplier les conditions d'enrichissement plus que le nombre de colonies repiquées par gélose. Ainsi, trois isolats ont été collectés sur trois géloses sélectives différentes pour un total de neuf isolats par échantillons positifs. L'une ayant été inoculée à partir du bouillon TBG et les deux autres à partir de la gélose MSRV, au front de migration comme il est normalement recommandé, mais aussi dans la zone en périphérie du point d'inoculation. En effet, la sélection de *Salmonella* sur gélose MRSV est basée notamment sur la mobilité. En récupérant des bactéries plus près du point d'inoculation, des isolats qui sont moins motiles ou moins bien adaptés au milieu pourraient être captés. Pour l'ensemble des échantillons, sur chacune des géloses considérées isolément, les trois colonies récupérées étaient toutes du même sérotype. Cependant, de façon intéressante, dans le cas de trois truies échantillonnées dans les 50 premiers jours de leur gestation, la présence concomitante dans l'échantillon de deux sérotypes a pu être montrée. En effet, dans ces échantillons les colonies provenant des deux distances de migration différentes sur MSRV étaient de sérotypes différents (sérotype *S. Infantis* et *S. Typhimurium* dans un cas et *S. Infantis* et *S. Derby* dans deux cas). Les différences de sérotypes retrouvés aux deux points d'inoculation de la MSRV pourraient être liées à la vitesse de migration des différentes souches. En effet, il a par exemple été démontré que certaines *Salmonella* ont des mutations les rendant non motiles, ce qui rend leur migration sur MRSV impossible (Yim *et al.*, 2011; Le Hello *et al.*, 2012). C'est une limite connue de ce milieu mais le rapport performance/perte du faible pourcentage de souches immobiles reste favorable à l'utilisation du milieu MSRV. De plus, dans cette étude nous avons utilisé ce milieu en combinaison avec le milieu TBG dans lequel la motilité des souches n'est pas un facteur,

augmentant ainsi la capacité de cette méthode à décrire la diversité des souches retrouvées dans les échantillons. Ces résultats sont intéressants puisque, sans la modification effectuée dans le protocole, il aurait été impossible de déterminer que certaines truies étaient en fait excrétrices de multiples sérotypes simultanément, donc colonisées par différentes *Salmonella*. Il avait déjà été décrit dans une étude qu'effectivement les porcs peuvent être porteurs de plusieurs sérotypes de *Salmonella* au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques, et suggéré par les auteurs que les sérotypes minoritaires pourraient être sous-estimés dans les enquêtes épidémiologiques (Garrido *et al.*, 2014). Ceci confirme aussi l'hypothèse émise par Love *et al.* que la multiplication des milieux d'enrichissement lors de la détection de *Salmonella* permet une meilleure détection de certains sérotypes (Love et Rostagno, 2008). Dans tous les cas, les colonies retrouvées sur chacune des géloses n'étant que d'un seul sérotype, la multiplication des isolats pour récupérer les souches de sérotypes mineurs proposée par Cox *et al.* n'apparaît pas la méthode la plus efficace dans notre contexte (Cox *et al.*, 2020). Ces résultats confirment qu'effectivement les méthodes classiques de détection de *Salmonella* ne permettent pas de décrire la diversité réelle des souches présentes dans des échantillons complexes. Donc, dans notre contexte d'étude du transfert entre la truie et le porcelet, cette contrainte méthodologique, même limitée par nos choix expérimentaux, reste une limite à garder en tête dans l'appréciation d'un transfert direct.

Méthode de typage

Dans ce projet, pour typer *Salmonella*, la méthode qui a été utilisée est le typage HRM mis au point par Bratchikov en 2011 (Bratchikov et Mauricas, 2011). Cette méthode de typage a des avantages importants puisqu'elle permet un typage rapide de multiples isolats en parallèle, et ce, à l'aide de matériel qui est largement disponible dans les laboratoires de recherche (Saeidabadi *et al.*, 2017). De plus, elle permet d'identifier des sous-types à l'intérieur d'un même sérotype (Bratchikov et Mauricas, 2011). La méthode a été implantée au laboratoire lors de ce projet et a depuis été adoptée comme méthode de typage de *Salmonella* sur une base régulière. Comme les gènes visés ne sont présents que chez *Salmonella*, cette méthode permet aussi de lever les ambiguïtés de confirmation biochimique dans l'identification bactérienne, qui restent un enjeu au laboratoire malgré les développements de géloses chromogènes.

***Salmonella* à la maternité**

Excrétion des truies

Comme il a été indiqué précédemment, nous avons pu, dans la maternité échantillonnée, isoler *Salmonella* chez 27 des 73 truies (37%). Ces résultats sont semblables à ceux déjà décrits dans une précédente étude canadienne (Wilkins *et al.*, 2010). Nous avons aussi décrit que ces truies excrétaient significativement plus *Salmonella* en début de gestation et confirmé ce phénomène en échantillonnant de façon pairée 19 truies en début et en fin de gestation. Nous pouvons donc conclure que ces truies excrètent *Salmonella* effectivement plus en début de gestation qu'à la fin.

Ces résultats sont en partie compatibles avec ceux d'autres études qui avaient montré une excrétion de moins de 10% en fin de gestation et de plus de 30% après le sevrage (Nollet *et al.*, 2005a; Magistrali *et al.*, 2011). D'autre part, dans l'une de ces études les auteurs n'avaient pas mesuré l'excrétion au cours de la gestation, mais seulement dans les 14 derniers jours de celle-ci et ensuite dans les 60 jours suivant la mise-bas (Magistrali *et al.*, 2011). D'autre part, l'autre étude n'a pas mesuré de hausse d'excrétion en début de gestation (Nollet *et al.*, 2005a). Les différences entre les résultats obtenus dans les différentes études pourraient être expliquées par des variations dans le type de production étudié (multisite dans notre étude et naisseur-finiisseur dans les deux autres) et dans les méthodes de gestion générale de ces fermes par exemple les protocoles de lavage et de désinfection et les changements d'aliments. Finalement, une autre étude a aussi démontré qu'il pourrait y avoir un pic de cette excrétion autour de l'insémination, période qui correspond au tout début de la gestation (Lynch *et al.*, 2018). Les causes de cette variation dans l'excrétion ne sont pas connues. Il a par exemple été émis comme hypothèse que des variations hormonales, les modifications dans le régime alimentaire ou le stress lié à la saillie pourraient être responsables de cette augmentation. Dans notre étude l'augmentation de l'excrétion chez les animaux a été observée dans les 50 premiers jours après le début de la mise-bas. La persistance des effets du stress causé par la saillie et du changement d'aliments sur l'excrétion est donc peu probable. L'hypothèse d'un impact de changements hormonaux qui sont connus pour avoir des effets sur le système immunitaire et le microbiote intestinal reste donc la plus plausible (Koren *et al.*, 2012; Mesa *et al.*, 2020). Il pourrait être

intéressant d'effectuer une étude dans un contexte d'infection expérimentale contrôlée où les effets de ces différents facteurs pourraient être mesurés de façon à déterminer le part de chacun sur la variation de l'excrétion. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes plutôt intéressés au lien entre ces variations et les modifications du microbiote.

Après la mise-bas, l'environnement de la cage de mise-bas contenant la truie et les porcelets a aussi été échantillonné. Le protocole mis en place permettait de documenter l'excrétion des truies et de leurs porcelets et aussi d'apprécier une contamination environnementale, donc d'établir un éventuel lien entre la contamination maternelle et celle de la portée. Cependant, cette contamination était faible puisque seulement sept échantillons sur les 57 récoltés étaient positifs. Des niveaux similaires de contamination ont été obtenus par une étude conduite en Irlande qui a montré une contamination par *Salmonella* de 8% des échantillons récoltés au niveau des parcs de mise-bas. Dans cette étude la contamination était cependant variable entre les fermes et pouvait aller jusqu'à 23% des échantillons (Lynch *et al.*, 2018). Dans notre étude, cette faible contamination semble renforcer l'idée que l'excrétion des truies est plus faible dans la période entre la fin de la gestation et le sevrage et donc dans la période où les truies sont en contact avec les porcelets. Il est intéressant de noter que la situation est différente chez les bovins où il a été démontré que l'excrétion est la plus élevée dans la période péri-partum et pourrait être associée à des modifications du microbiote (Morisse et Cotte, 1994; Muñoz-Vargas *et al.*, 2018).

Circulation des souches à la maternité

Dans cette maternité, la majorité des truies excrétaient des *Salmonella* de sérotype Infantis et de façon mineure de *Salmonella* Derby et Typhimurium, alors que dans l'environnement de la cage de mise-bas, la majorité des souches retrouvées étaient plutôt du sérotype Derby. Un possible lien direct a pu être tracé une seule fois entre ces souches retrouvées chez la truie et celles retrouvées dans l'environnement de la cage de mise-bas. Dans cette cage, l'échantillon récolté était positif pour le sérotype S. Infantis, même sérotype que celui excrété en début et en fin de gestation par la truie qui s'y trouvait. Dans les autres cages positives, les truies qui y étaient hébergées étaient soit non-excrétrices, ou avaient excrété au cours de la gestation un autre sérotype que celui retrouvé dans l'environnement. Il semblerait donc que la contamination à

cette étape et dans les conditions testées ne soit pas majoritairement causée par une excrétion directe des truies, mais plutôt par une contamination résiduelle, et possiblement persistante, dans l'environnement de la maternité. Comme nous avons mis en évidence la présence de truies excréant deux sérotypes différents de *Salmonella*, il est aussi possible que l'impossibilité de lier les souches de l'environnement à celles excrétées par les truies soit aussi due à une excrétion intermittente d'une souche d'un de ces sérotypes qui n'aurait pas été détecté lors de nos échantillonnages.

Les résultats obtenus dans cette maternité démontrent que les truies qui ont été échantillonnées sont colonisées par une souche majoritaire de sérotype Infantis, et qu'elles excrètent *Salmonella* plus en début qu'en fin de gestation. Cependant, ce sont des souches de sérotype S. Derby qui ont été le plus retrouvées dans l'environnement de la cage de mise-bas, où les porcelets seront cantonnés. Une des hypothèse possible est que cette contamination ne vienne donc pas majoritairement de la truie, mais plutôt d'une contamination résiduelle qui pourrait circuler à l'intérieur de la maternité. L'étude de Lynch *et al.* suggère que cette contamination résiduelle est due à une faible efficacité du protocole de lavage et de désinfection dans cet environnement (Lynch *et al.*, 2018). La plus grande présence du sérotype S. Derby dans l'environnement pourrait être expliquée par une meilleure adaptation des souches à la persistance dans l'environnement de la ferme, en comparaison avec les souches de sérotype S. Infantis. Celles-ci pourraient par exemple être plus résistantes aux désinfectants. Par exemple, il a été démontré que certains sérotypes particuliers tel que S. Derby possèdent plus souvent des gènes de résistance aux ammoniums quaternaires dans la filière avicole (Long *et al.*, 2016).

À la pouponnière

Nous avons ensuite voulu déterminer si les *Salmonella* retrouvées dans l'environnement de la mise-bas ou excrétées par la truie lors de la gestation pouvaient contaminer les porcelets. Il a été démontré que l'excrétion des porcelets en bas âge est faible, qu'il est très difficile de récolter une quantité suffisante de matière fécale pour la détection de *Salmonella* sur des porcelets à la maternité et aussi il a été démontré qu'un écouvillonnage rectal avait une très faible sensibilité (Funk *et al.*, 2000; Kranker *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2018). Donc leur excrétion a tout d'abord été

évaluée de façon indirecte en mesurant la contamination environnementale et fécale dans la cage de mise-bas comme discuté précédemment, démontrant une faible présence de *Salmonella* principalement du sérotype *Derby*. L'excrétion directe de ces porcelets a ensuite été mesurée après leur transport à la pouponnière.

À l'entrée des porcelets, l'environnement d'une seule des pouponnières échantillonnées était contaminé par *Salmonella* avec un faible proportion d'échantillons positifs et nous avons pu constater une augmentation de cette contamination, lors du deuxième échantillonnage, cinq semaines après leur arrivée. Le deuxième échantillonnage a été effectué cinq semaines après l'entrée des porcelets, puisqu'à ce moment ils sont assez matures pour fournir des échantillons de matières fécales de volume suffisant, mais ils ont aussi traversé la période du sevrage qui est particulièrement propice à l'infection par *Salmonella*. En effet, ce n'est qu'à partir de la cinquième semaine de vie qu'un grand nombre de cellules B produisant des IgA se développent (Stokes *et al.*, 2004). Ainsi, entre le sevrage où l'apport des IgA maternels est coupé et la maturation complète du système immunitaire, s'écoule une période où le porcelet est plus susceptible aux infections (Hanson *et al.*, 2003). De plus, le sevrage est accompagné d'une d'inflammation et d'une dysbiose au niveau de muqueuse intestinale qui peut affecter la barrière épithéliale et augmenter le risque d'infection par différents pathogènes (Campbell *et al.*, 2013). Comme certains de ces environnements n'étaient pas positifs lors de la première visite, il semble que *Salmonella* puisse circuler à l'intérieur de la pouponnière lors de la production. En effet, dans le contexte où les porcelets excrètent *Salmonella*, des poussières contaminées peuvent par exemple être générées. Ces particules en suspension dans l'air pourront aller contaminer les animaux des parcs qui ne sont pas adjacents ou même ceux de salles différentes, en plus de contaminer différentes surfaces où *Salmonella* pourra persister (Proux *et al.*, 2001). De façon similaire, la circulation des employés, d'insectes ou de vermine dans la ferme peut aussi être responsable de cette augmentation de la contamination (Funk et Gebreyes, 2004; Rajić *et al.*, 2007). Dans cette même ferme nous avons aussi pu détecter la présence de *Salmonella* dans les échantillons individuels et composites de fèces après l'entrée des animaux. Ceci démontre qu'il y a effectivement excrétion de *Salmonella* par les porcelets dans cette ferme cinq semaines après leur entrée dans le bâtiment.

Pour déterminer s'il y avait bien un lien entre les souches retrouvées chez la truie et celles retrouvées chez les porcelets, les isolats obtenus ont été typés par HRM. Les souches retrouvées à la pouponnière lors de la première visite étaient d'un type HRM différent de celles retrouvées en maternité. Cependant, ces souches étaient retrouvées tant au niveau des matières fécales que de l'environnement lors du deuxième échantillonnage en pouponnière. Il semble donc qu'elles aient efficacement circulé dans la pouponnière lors de la production pour contaminer les porcelets qui s'y retrouvent et enfin une grande part de l'environnement. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils montrent que malgré la possible excrétion des truies en gestation et la présence de *Salmonella* dans certaines cages de mise-bas, ces porcs ont plutôt été contaminés par les souches retrouvées dans l'environnement après le sevrage. Ces résultats, différents de certains obtenus d'autres études effectuées en Europe dans des systèmes de production naisseur-finisser, où des liens directs ont pu être tracés entre les souches excrétées par les truies et celles retrouvées chez les porcelets (Nollet *et al.*, 2005b; Casanova-Higes *et al.*, 2019). Ces disparités pourraient en effet être expliquées par les différences de structures dans la production, celle québécoise est plutôt de type multisite. Dans un système naisseur-finisser, les porcelets et les porcs en engraissement restent sur la même ferme tout au long de la production. Ainsi, si une souche particulière de *Salmonella* colonise l'environnement de la ferme et persiste, les occasions de contact des animaux avec celle-ci tout au long de leur vie sont plus nombreuses. Au Québec, comme les animaux sont transportés sur des sites de production différents lors du passage en pouponnière et en engraissement, les occasions de contacts répétés avec le microbiote du secteur maternité sont limitées. Mais les animaux sont exposés à de nouvelles souches de *Salmonella* tant lors des transports que dans l'environnement des nouvelles fermes. La non-transmission des souches excrétées par les truies pourrait être expliquée par deux facteurs. Tout d'abord, nous avons décrit que les truies excrètent principalement à des moments où elles ne sont pas en contact avec les porcelets et que la contamination dans l'environnement de mise-bas est faible. De plus, il est connu que les truies transmettent aux porcelets, lors de la lactation, une grande quantité d'anticorps qui peuvent avoir un effet protecteur (Bandrick *et al.*, 2014). En effet, il a par exemple été démontré que les porcelets, nés de truies séropositives durant la lactation, un risque significativement plus faible d'être positifs pour *Salmonella* en pouponnière (Kranker *et*

al., 2003; Nollet *et al.*, 2005b; Matiasovic *et al.*, 2013). Cependant, comme après le sevrage cette immunité maternelle se perd graduellement au profit du développement d'un système immunitaire du porcelet qui est encore naïf par rapport à *Salmonella*, les porcelets sont plus susceptibles à la contamination par de nouvelles souches (Belœil *et al.*, 2003). De plus, la période de sevrage est critique puisqu'elle affecte l'homéostasie intestinale en déclenchant une inflammation au niveau de la muqueuse intestinale et une dysbiose. Ceci a entre autres pour effet de déstabiliser la barrière épithéliale de l'intestin et ainsi d'augmenter le risque d'infections par les pathogènes (McCracken *et al.*, 1999; Gresse *et al.*, 2017; Rhouma *et al.*, 2017).

Dans cette étude, comme les véhicules de transport n'ont pas été échantillonnés, il est impossible d'affirmer que la contamination des porcelets ne provient pas de cette étape. Cependant, il est possible de conclure que, chez les porcelets échantillonnés dans cette étude, la contamination se déroule majoritairement après le sevrage et que dans le cas présent nous n'avons pas pu démontrer de transmission directe par la truie.

En engraissement

La contamination des porcelets devenant des porcs en engraissement a aussi été évaluée. Les résultats obtenus avant l'entrée des animaux démontrent clairement que malgré l'application d'un protocole de lavage et de désinfection, l'environnement de ces fermes d'engraissement reste fréquemment contaminé. Ces résultats ne sont pas étonnants puisqu'il a déjà été démontré qu'il est très difficile d'éliminer la contamination par *Salmonella* dans l'environnement d'une ferme, et ce, même dans une production tout-plein/tout-vidé où la ferme peut être complètement vidée et une désinfection complète effectuée (Argüello *et al.*, 2011; Gotter *et al.*, 2012a). En effet, on sait que *Salmonella* a la capacité de persister pendant plusieurs mois et même des années dans la ferme, et ce, particulièrement lorsqu'elle est protégée par des matières fécales résiduelles ou de la poussière (Argüello *et al.*, 2012). De plus, même lorsque la matière organique peut être complètement lavée, les trous et interstices dans le béton retrouvé au niveau du sol et des murs peuvent rendre difficile la pénétration des désinfectants et donc faciliter la survie de *Salmonella* dans ces niches. *Salmonella* peut alors produire des biofilms dans ces environnements ce qui lui permet une meilleure résistance aux désinfectants (Marin *et al.*, 2009).

Il apparait donc que dans le cas de la pyramide de production étudiée ici, les animaux entrent dans un environnement d'engraissement fréquemment contaminé par *Salmonella*.

Dans toutes les fermes échantillonnées, un mois après l'entrée des animaux, *Salmonella* a pu être retrouvée dans les fèces des porcs, et ce, même dans les troupeaux où la contamination n'avait pu être détectée en pouponnière. De plus, l'excrétion des porcs n'a pu être associée significativement qu'à la combinaison de la pouponnière et de l'engraissement où ceux-ci étaient élevés. Ces résultats concordent avec ceux d'autres études qui ont démontré que l'excrétion de *Salmonella* par les porcs en engraissement est principalement liée à la contamination environnementale à la pouponnière et à l'engraissement (Funk *et al.*, 2001; Lynch *et al.*, 2018).

Pour déterminer si un lien direct de contamination pouvait être tracé entre ces deux environnements, un typage HRM a été effectué comme précédemment sur des isolats provenant tous de la ferme 3. Tous les isolats étaient du type HRM 4 c'est-à-dire du même type que les souches retrouvées dans la seule pouponnière contaminée. Il semble donc qu'ici la forte contamination des porcs dans la ferme d'engraissement pourrait provenir de la contamination de la pouponnière et que cette souche de *Salmonella* s'est implantée et propagée chez un plus grand nombre d'animaux, par exemple lors du transport et à l'entrée à l'engraissement. En effet, à ce moment le stress causé par le transport peut augmenter l'excrétion, et le mélange des porcs dans les parcs de la nouvelle ferme facilite la transmission de *Salmonella* à des animaux qui étaient préalablement naïfs (Verbrugghe *et al.*, 2016).

Pour faire suite à cette étude, il pourra être intéressant de faire le typage HRM des souches retrouvées dans l'environnement de cette ferme avant l'entrée des animaux de façon à savoir si les souches présentes après lavage et désinfection correspondent elles aussi à la souche de type HRM 4 ou si ces souches sont différentes et n'ont cependant pas réussi à coloniser les animaux. Finalement, il pourra aussi être pertinent de voir si les souches retrouvées dans les deux autres fermes d'engraissement sont du même type et ainsi si les animaux se sont contaminés au contact de l'environnement ou encore, si la contamination vient d'une autre source comme les camions de transport. En effet, ces camions, si le protocole de lavage et de désinfection n'est pas efficace, peuvent être une source importante de contamination (Hurd *et al.*, 2002; Mannion *et al.*, 2012).

En conclusion, dans la structure de production échantillonnée ici le type de *Salmonella* qui est abondamment excrété en engraissement était déjà retrouvé en pouponnière, malgré une présence résiduelle de la bactérie très faible à ce stade. Nous illustrons la possibilité d'une origine pouponnière pour les *Salmonella* excrétées par les porcs charcutiers dans cette pyramide multisite. Il est cependant important de garder en tête le nombre limité de bâtiments échantillonnés dans ce projet. Ainsi, il sera important d'élargir l'échantillonnage à d'autres pyramides de production dans de futures études de façon à confirmer les résultats.

La contribution du microbiote intestinal de la truie sur celui du porcelet

Collecte des échantillons et traitement

Dans ce projet, les échantillons qui ont été récoltés pour l'analyse du microbiote des animaux provenaient de matières fécales fraîches, récoltées directement au moment de la défécation de l'animal. Pour les échantillons de matières fécales de truies et de porcs adultes, comme la quantité de fèces était plus grande, un sous-échantillon d'environ 500 mg était récolté à partir de l'échantillon complet utilisé pour la détection de *Salmonella*. Pour les échantillons de porcelets, des écouvillons rectaux ont été utilisés puisqu'il était impossible de récolter les matières fécales nécessaires chez tous les animaux. Une plus faible quantité de matière fécale récoltée pour ces animaux était soupçonnée de réduire la sensibilité de l'analyse si le nombre d'espèces présentes dans l'échantillon était réduit. Mais les résultats obtenus semblent démontrer que, même si une faible quantité de matériel a été récoltée, la forte concentration en bactéries a permis d'obtenir des résultats représentatifs.

Pour conserver la structure (composition et proportions) de la communauté bactérienne la plus intacte possible, ces échantillons ont tous été congelés dans l'azote liquide directement à la ferme, immédiatement après la collecte de l'échantillon. Cette méthode est considérée comme la meilleure pratique pour éviter des modifications du microbiote après la récolte des échantillons. Il a été démontré dans plusieurs études que des modifications de la structure du microbiote peuvent être observées lors de la conservation des échantillons à la température de la pièce (Fouhy *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2016). Cette variation semble être faible sous les deux heures après la récolte, mais des changements dans l'abondance relative de certains taxons ont tout de même pu être mesurés (Guo *et al.*, 2016). En effet, certaines populations pourraient alors être avantagées par le changement d'environnement, comme les bactéries anaérobies facultatives à cause du contact avec un milieu plus concentré en oxygène hors de l'intestin. Ces variations, surtout dans les cas où les échantillons ne sont pas traités de façon équivalente, pourraient causer des biais importants dans les résultats d'analyses futures. Ainsi, en plongeant les échantillons dans l'azote liquide dès la récolte, les variations de la structure du microbiote sont minimales.

Comme dans plusieurs études, les échantillons de matière fécale ont été utilisés comme proxy pour décrire le microbiote intestinal des animaux. En effet, ce type d'échantillon est le plus fréquemment utilisé puisqu'il est relativement facile à récolter et ne nécessite pas d'opération invasive sur les animaux. Cependant, il faut rester conscient que ces échantillons ne peuvent pas mesurer l'ensemble des variations qui pourraient être observées dans les différents segments de l'intestin tant au niveau de la lumière que du microbiote retrouvé au niveau du mucus. En effet, il a été démontré qu'une variation géographique de celui-ci existe (Looft *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2019). Aussi, il a été démontré que *Salmonella* affecte le microbiote différemment selon le site de l'intestin. Une autre étude a décrit que dès deux jours après l'infection, des modifications du microbiote peuvent être mesurées tant au niveau de l'iléon que des fèces, mais que c'est au niveau de la muqueuse iléale que les changements du microbiote sont les plus importants (Argüello *et al.*, 2018). Les auteurs émettent ici l'hypothèse que ces plus grandes différences au niveau de ce site sont liées au fait que l'iléon est le site d'invasion privilégié de *Salmonella* et donc que la muqueuse y sera particulièrement affectée. Ainsi, des variations de microbiote à ce niveau, et qui pourraient avoir des impacts sur l'infection, pourraient passer inaperçues dans les études ne prenant que le microbiote fécal en considération. Bien que ces échantillons ne représentent pas parfaitement toutes les niches retrouvées dans le système digestif, dans une étude conduite chez les poulets, la démonstration a été faite que ce type d'échantillon avait une bonne capacité à identifier les taxons présents dans son entièreté et ceci même s'il montrait une capacité modérée à représenter la structure du microbiote (Yan *et al.*, 2019). On considère donc malgré tout que les échantillons fécaux sont, pour le moment, un moyen satisfaisant de détecter des variations au niveau du microbiote intestinal des animaux lorsque des méthodes invasives ne peuvent être appliquées (Thomas *et al.*, 2015b).

Un des facteurs qui peut affecter les résultats obtenus par séquençage d'amplicons 16S est la méthode d'extraction utilisée (Fiedorová *et al.*, 2019). Pour le moment, aucune méthode standard n'a été mise au point et de multiples kits sont disponibles. Cependant dans notre cas, la méthode qui a été sélectionnée est une extraction classique par phénol/chloroforme. En effet, malgré l'existence de plusieurs kits commerciaux pour l'extraction d'ADN dans les fèces, cette méthode s'est avérée être la plus efficace pour obtenir de fortes concentrations (plus de 100

ng/ μ l) d'ADN faiblement contaminé; ceci lors de tests dans notre laboratoire, mais aussi dans la littérature (Wagner Mackenzie *et al.*, 2015; Chapagain *et al.*, 2019). Dans les environnements contenant des microbiotes complexes tels que les fèces, la récupération d'une plus grande concentration d'ADN dès le départ pourrait permettre une meilleure description de la totalité du microbiote. Cette méthode permet d'éviter l'utilisation de colonnes de purification qui sont souvent au cœur des kits commerciaux. Dans les tests effectués au laboratoire, ces colonnes semblent souvent être responsables de la perte d'une grande quantité d'ADN. En effet, il a été démontré que de fortes concentrations d'ADN saturent ces colonnes de silice. Tout l'ADN contenu dans l'échantillon ne peut donc pas s'y fixer, ce qui cause son élution (Katevatis *et al.*, 2017). Cependant, même si cette méthode d'extraction au phénol/chloroforme est la plus efficace, elle reste longue à effectuer et nécessite une manipulation de substances toxiques. De plus, les multiples manipulations nécessaires augmentent le risque de contamination croisée entre les échantillons. Comme les méthodes de séquençage sont très sensibles, même de faibles contaminations de ce type peuvent être détectées et pourraient possiblement causer des biais dans les résultats, surtout lorsque des échantillons faiblement contaminés sont traités (Glassing *et al.*, 2016). Dans le cas de nos expériences, des contrôles négatifs ont été effectués et ont permis de confirmer que cette contamination était en proportion mineure, comparativement à la forte concentration initiale de nos échantillons. Ainsi, dans une situation semblable, elle n'influçait donc pas nos résultats.

Méthode de séquençage et d'analyse

Dans ce projet, la méthode de séquençage sélectionnée, le MiSeq de Illumina, vient remplacer la technologie Ion Torrent jusqu'alors réalisée au laboratoire pour les expériences de séquençage à haut débit. Une des raisons de ce changement est qu'elle permet d'obtenir un séquençage de type « paired-end ». Comme il a été mentionné dans la revue de littérature, cette méthode permet une meilleure correction des erreurs de séquençage par les différents logiciels de bio-informatique.

Au cours de ce projet, les méthodes de traitement et d'analyse des séquences ont aussi évolué. En effet, pour deux des trois articles qui ont été produits, le logiciel Mothur, qui peut être

considéré comme un des « gold standard » dans le traitement et l'analyse des données de séquençage à haut débit, a été utilisé. Pour le troisième c'est plutôt DADA2 qui a été utilisé. En effet, l'algorithme utilisé par DADA2 retire notamment toutes les séquences uniques, ce qui a pour effet de réduire fortement la présence de séquences erronées. Il faut cependant garder en tête que, dans nos échantillons d'une extrême richesse en bactéries, il est possible que certaines de ces séquences ne soient pas des erreurs. Cependant, leur présence étant extrêmement faible, leur retrait n'aura pas d'effet significatif sur la structure du microbiote lors des analyses subséquentes. Aussi, en plus d'éliminer ces séquences, il a été démontré que le traitement par DADA2 permet généralement une meilleure spécificité et sensibilité comparativement à Mothur (Prodan *et al.*, 2020). L'adoption généralisée de la méthode par DADA2 pourrait donc être avantageuse pour les prochaines analyses au laboratoire.

Microbiote des truies

Comme il a été mentionné précédemment, l'excrétion de *Salmonella* était variable tout au long de la gestation des truies avec une diminution significative lors des 50 derniers jours. Comme il est connu que le microbiote intestinal des animaux peut affecter l'excrétion et la résistance à *Salmonella*, nous avons voulu déterminer s'il était possible tout d'abord de mesurer des différences au niveau de la structure de ce microbiote entre les truies qui excrètent ou n'excrètent pas *Salmonella*. La perspective était alors, le cas échéant, d'identifier de possibles taxons protecteurs.

Les résultats obtenus chez les truies échantillonnées dans cette étude nous ont montré qu'effectivement leurs différents statuts d'excrétion de *Salmonella* étaient bien associés à des différences de structure et de composition du microbiote intestinal. Cependant, dans le cas de notre étude il est impossible de déterminer si ces particularités de microbiotes sont causées par la présence de *Salmonella* ou si ce sont ces différences elles-mêmes qui affectent l'excrétion. Comme il a été expliqué dans la revue de la littérature, *Salmonella* est responsable d'une inflammation au niveau intestinal qui peut causer des modifications du microbiote (Drumo *et al.*, 2016). Même si les truies échantillonnées ici ne montrent pas de signes d'infection, nous émettons l'hypothèse qu'une faible inflammation directement imputable à la présence de

Salmonella pourrait induire ces différences. En effet, une inflammation faible mais persistante au niveau de la vésicule biliaire a été mesurée chez les humains porteurs chroniques/asymptomatiques de *Salmonella* Typhi (Gunn *et al.*, 2014). Cependant, l'effet de ce portage chronique sur le microbiote intestinal n'a pas été décrit. De plus, ce phénomène n'a pas encore été décrit chez le porc. Cette théorie pourrait aussi expliquer l'augmentation mesurée de la présence de la famille des *Enterobacteriaceae* puisqu'il a été démontré que l'inflammation est bénéfique pour certains de ses membres (Zeng *et al.*, 2017a). D'autre part, il a aussi été démontré que le microbiote intestinal peut avoir un effet protecteur contre la colonisation de *Salmonella* et certains éléments de composition et de métabolisme de cet écosystème expliquent de façon cohérente la raison pour laquelle un animal devient fort ou faible excréteur (Bearson *et al.*, 2013; Jacobson *et al.*, 2018). Donc, il se pourrait que les différences mesurées ici soient responsables d'une certaine protection contre l'excrétion de *Salmonella*.

Pour ce qui est de la variation du microbiote tout au long de la gestation, nous avons aussi pu mesurer pour la première fois des différences significatives entre celui de ces truies en début et en fin de gestation. De façon intéressante, chez les truies en fin de gestation nous avons pu mettre en évidence la plus forte présence de certains taxons qui sont connus pour être producteurs de SCFA. Comme il est connu que certaines de ces molécules ont un effet de réduction de la virulence chez *Salmonella*, il se pourrait que le microbiote de la truie à la fin de la gestation soit moins propice à la multiplication du pathogène au niveau intestinal et permette donc une réduction de l'excrétion (Gantois *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2018). Des variations du microbiote avaient déjà été mesurées chez la femme pendant la grossesse et il a été proposé que ces modifications permettent des ajustements aux fonctions métaboliques pendant cette période particulière. Ces modifications permettraient une meilleure croissance du fœtus, par exemple en réduisant la sensibilité à l'insuline et en facilitant l'absorption des nutriments (Gohir *et al.*, 2015; Ferrocino *et al.*, 2018). Cependant, les modifications du microbiote mesurées chez la femme semblent différentes de celles mesurées ici. En effet, il a été démontré que dans le troisième trimestre de la gestation, les femmes ont une plus grande proportion des Proteobactéria (qui contient entre autres les *Enterobacteriaceae*) et d'Actinobacteria, alors que les bactéries productrices de butyrates sont réduites, ce qui n'a pas pu être mesuré chez les truies étudiées (Koren *et al.*, 2012).

Il a été proposé que ces variations chez la femme soient liées à des changements du système immunitaire de la muqueuse intestinale et à des changements hormonaux. En effet, à la fin de gestation, l'augmentation de la résistance à l'insuline maintient la femme en état d'hyperglycémie alors qu'un statut pro-inflammatoire de faible intensité s'installe au niveau de la muqueuse, ce qui augmente la perméabilité intestinale et donc la diffusion du glucose de l'épithélium vers le lumen (Koren *et al.*, 2012; Mesa *et al.*, 2020). L'accès à une plus grande concentration de glucose au niveau de l'intestin pourraient donc stimuler certaines populations du microbiote (Gosalbes *et al.*, 2019; Mesa *et al.*, 2020). Une plus grande variabilité interindividuelle a aussi été mesurée au niveau du microbiote intestinal des femmes enceintes (Koren *et al.*, 2012). Ce phénomène reste à explorer chez les truies mais pourrait possiblement expliquer les apparentes différences entre les résultats obtenus chez les femmes et celles-ci. De plus, les causes de ces changements chez la truie n'ont pas encore été étudiées, mais des modifications au niveau hormonal, du système immunitaire ou des activités d'alimentation pourraient être en cause et pourraient avoir des effets différents de ceux mesurés chez la femme. Il semble donc qu'il pourrait, chez les truies étudiées dans le présent système, y avoir un effet combiné d'un microbiote spécifique permettant une plus grande résistance à *Salmonella* dès le début de leur gestation, mais aussi une transformation de celui-ci chez toutes ces truies vers un microbiote offrant un environnement moins propice à son excrétion en fin de gestation.

Microbiote des porcelets

Sans surprise, le microbiote intestinal des porcelets avant sevrage était significativement différent de celui des truies. Ces différences sont bien sûr en partie associées aux différences de régimes alimentaires, mais aussi à l'immaturation du système immunitaire et digestif des porcelets (Bian *et al.*, 2016). De plus, nous avons observé par les indices de diversité bêta que le microbiote des porcelets était plus variable entre ces animaux. Les OTUs retrouvés dans les différents échantillons et leur quantité étaient donc plus variable entre les porcelets qu'entre les truies. En revanche, les indices de diversité alpha ont démontré que la composition du microbiote de ces porcelets était moins diverse que celui de la truie avec entre autres un plus grand nombre d'OTUs différents détectés chez cette dernière. Ces différences démontrent bien le phénomène de maturation du microbiote qui se déroule tout au long de la vie du porc pendant laquelle le

microbiote se diversifie et se stabilise avec l'âge et qui a déjà été décrit dans d'autres études (Chen *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019).

Pour ce qui est de la comparaison de ces porcelets entre eux, nous avons démontré, dans le système étudié, pour la première fois que le statut d'excrétion de *Salmonella* de la mère a un impact significatif sur leur microbiote. En effet, les porcelets nés de truies ayant excrété *Salmonella* lors d'au moins un des points d'échantillonnage avaient un microbiote significativement différent de celui des porcelets nés de truies n'ayant jamais excrété *Salmonella* et qui étaient donc considérées comme négatives. Cependant, aucun des taxons identifiés comme associés au statut d'excrétion de *Salmonella* n'a pu être retrouvé par la suite chez les porcelets. Ainsi, il apparaît que l'impact de ce statut maternel sur le microbiote fécal des porcelets sélectionnés dans notre étude ne résulte pas d'un transfert direct d'une ou de plusieurs populations plus représentées chez certains groupes, mais d'un effet indirect qui affecte la structure complète de l'écosystème microbien digestif du porcelet. Il a par exemple été démontré, dans des essais sur des probiotiques, que même si la bactérie administrée chez la truie n'est pas directement transférée aux porcelets, des différences de microbiote intestinal peuvent être mesurées chez ces derniers (Baker *et al.*, 2013; Starke *et al.*, 2013). Une hypothèse est que ces modifications du microbiote fécal chez la truie sont aussi associées à des différences au niveau du microbiote vaginal, de la glande mammaire mais aussi d'autres facteurs tels que les anticorps transférés au niveau du lait et qu'ils pourraient affecter le microbiote du porcelet. En effet, il a par exemple été démontré que les SigA retrouvées au niveau du lait sont affectées par le microbiote intestinal de la mère et que celles-ci peuvent avoir un impact sur le microbiote de l'enfant (Gopalakrishna et Hand, 2020). Cependant, ces facteurs n'ont pas été étudiés ici. Il est aussi possible que certaines populations, cruciales dans le mécanisme, soient effectivement transférées. Ces populations pourraient être présentes en quantité inférieure au seuil de détection chez la truie (environ 10^3 - 10^4 par g de fèces) alors qu'elles sont présentes en plus grande nombre ou proportion chez les porcelets, par exemple à cause de leur régime alimentaire basé sur le lait (Benjamino *et al.*, 2018). Malgré tout, certains taxons qui pourraient avoir des effets sur l'excrétion ont été identifiés chez ces porcelets. Par exemple, les *Bacteroides* qui sont associées aux porcelets nés de mères négatives ont été identifiées, dans une étude chez la souris,

comme ayant un effet protecteur contre la colonisation par *Salmonella*, grâce à la production de propionate (Jacobson *et al.*, 2018). Les populations associées aux porcelets nés de mères excrétrices de *Salmonella* comportaient elles aussi plusieurs bactéries productrices de SCFA, mais cette fois d'acétate, qui est plutôt décrit pour stimuler la virulence de *Salmonella* (Lawhon *et al.*, 2002). Il se pourrait donc qu'effectivement les truies puissent transmettre un microbiote plus au moins propice à la colonisation par *Salmonella* à leurs porcelets. Le réel effet de ces variations de taxons producteurs de SCFA reste à vérifier. Cependant, il a démontré dans une étude précédente au laboratoire, que des variations au niveau du microbiote pouvaient être associées à des augmentations de la production de SCFA et à une réduction des *E. Coli* au niveau de fèces (Longpré *et al.*, 2016; Lebel *et al.*, 2017). Nous avons aussi démontré que les microbiotes des porcelets nés d'une même mère étaient significativement plus similaires que ceux de leurs congénères. Ceci démontre que, chez les animaux étudiés ici, il y a possiblement un transfert ou au moins un effet, du microbiote digestif de la truie sur celui de sa progéniture, et ce, même si les compositions mesurables de ces microbiotes apparaissent très différentes. Il est de plus en plus évoqué que l'implantation du microbiote des porcelets puisse s'effectuer en partie avant la naissance, par voie transplacentaire (Jiménez *et al.*, 2008; Gosalbes *et al.*, 2013), par la voie vaginale orale à la naissance (Dominguez-Bello *et al.*, 2010), puis par la voie fécale orale après la naissance (Funkhouser et Bordenstein, 2013; Browne *et al.*, 2017) et enfin par le lait ou le contact direct avec les mamelles durant la lactation (Martin *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2011; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). L'établissement de ce microbiote est crucial dans la maturation du système digestif, du système immunitaire et du maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale. Il a par exemple été démontré, chez les enfants nés par césarienne, que l'établissement du microbiote est perturbé et que celui-ci affecte le développement du système immunitaire à long terme (Bäckhed *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2017). Par exemple, ces enfants ont de plus grandes chances de souffrir de maladies inflammatoires et d'allergies. Ces réactions incontrôlées du système immunitaire pourraient être expliquées par une moins bonne éducation par le microbiote du système immunitaire à la tolérance des antigènes oraux (Plunkett et Nagler, 2017). L'implantation de ce microbiote est aussi importante dans le maintien de la barrière épithéliale par son interaction avec les cellules du système immunitaire. Il a été démontré que des dysbioses peuvent

perturber ces interactions en augmentant la perméabilité de cette barrière et donc la sensibilité aux infections (Iacob et Iacob, 2019).

Les résultats obtenus, chez les animaux étudiés ici, continuent d'apporter des informations démontrant que la truie peut effectivement être une bonne cible pour des interventions permettant la modification du microbiote intestinal des porcs. En effet, il semble qu'en le modifiant, des effets peuvent être transférés aux porcelets et pourraient possiblement avoir des effets bénéfiques. Plus d'études sont cependant nécessaires pour déterminer les meilleures méthodes et les taxons à cibler.

Microbiote des porcs en engraissement

Finalement, nous avons voulu déterminer si les différences au niveau du microbiote associées au statut *Salmonella* de la mère étaient conservées jusqu'en engraissement, et si celles-ci pouvaient être liées à une meilleure résistance à *Salmonella*. Cependant, à cette étape nous n'avons pas pu mesurer de différences au niveau du microbiote fécal des animaux selon le statut d'excrétion de la mère. Ainsi, il semble que même si des différences liées à cette variable peuvent être mesurées à la maternité chez les porcelets sous la mère, ces différences ne peuvent plus être détectées en engraissement. Il est possible les profonds bouleversements subis par les porcelets lors du sevrage soient responsables de la disparition de ces différences. En effet, comme il a été discuté précédemment, lors du changement abrupt d'une alimentation composée de lait à une alimentation solide, le microbiote subit de profondes transformations et évolue vers une composition plus mature et adaptée au nouvel aliment (Gresse *et al.*, 2017; Pollock *et al.*, 2018a). Ceci pourrait avoir comme effet de réduire l'importance relative des taxons responsables de ces différences à la maternité, par exemple le groupe des lactobacilles, au profit d'autres taxons associés à l'alimentation solide et plus représentatifs d'un microbiote mature tel que *Clorstridium* et les *Prevotella*. À cette étape d'engraissement, nous n'avons pas pu détecter non plus de différences entre les animaux excréteurs ou non de *Salmonella*. Ceci est étonnant puisque plusieurs articles semblent démontrer que ce pathogène peut effectivement avoir un impact sur le microbiote des animaux (Drumo *et al.*, 2016; Argüello *et al.*, 2018). Cependant, plusieurs de ces études ont été réalisées dans des conditions expérimentales où les animaux étaient contaminés

artificiellement à l'aide de fortes doses, causant même parfois des signes cliniques de diarrhée. Ainsi, le grand nombre de *Salmonella* pourrait alors être responsable d'un déséquilibre du microbiote, entre autres par l'activation du système immunitaire et donc de l'inflammation au niveau intestinal. Dans notre cas, puisque les animaux ont été contaminés naturellement, la dose ingérée par l'animal pourrait être plus faible, réduisant ainsi l'activation du système immunitaire et évitant les signes cliniques. De plus, dans les études précédentes les modifications du microbiote des animaux ont été mesurées dans les jours suivant l'infection (Drumo *et al.*, 2016; Argüello *et al.*, 2018). Comme les animaux échantillonnés avaient pu être contaminés depuis plusieurs semaines, ils pouvaient être devenus porteurs asymptomatiques avec une présence réduite de *Salmonella* au niveau de l'intestin permettant un rétablissement du microbiote (Gopinath *et al.*, 2012). Le fait que ces expériences aient été réalisées dans un contexte industriel à la ferme, même s'il peut être vu comme un meilleur reflet de la réalité, peut aussi avoir eu un impact sur la possibilité de mesurer des différences. En effet, dans ce contexte, de multiples facteurs confondants liés à la production pourraient avoir occulté les différences du microbiote associées à l'excrétion de *Salmonella*. De plus, dans le cadre de notre étude, les animaux ont été échantillonnés dans un nombre limité d'unités de production. Il se pourrait donc que l'impossibilité de mesurer des différences significatives soit liée aux pratiques spécifiques de ces fermes. Malgré la disparition des différences associées au statut excréteur de la truie, nous avons démontré, à notre connaissance pour la première fois, que dans notre étude les porcs nés de la même mère conservaient des microbiotes plus similaires que ceux de leurs autres congénères en engraissement. Ces résultats sont très intéressants puisque la majorité des études qui ont démontré des différences de microbiote à la naissance ont vu ces différences s'estomper avec le sevrage et la maturation du microbiote (Stinson *et al.*, 2018). Nos résultats laissent cependant penser que des interventions ayant des effets sur le microbiote de la truie pourraient persister tout au long de la vie de l'animal, que ce soit par des modifications directement au niveau de son microbiote ou au niveau de l'homéostasie de la muqueuse intestinale. Le type d'intervention reste à déterminer, mais on peut supposer que l'ajout de probiotiques ou de prébiotiques dans l'alimentation de la truie pourraient permettre d'avoir des impacts sur le microbiote des porcs en

engraissement et que ces modifications pourraient avoir des effets bénéfiques sur leurs performances ou leur résistance aux pathogènes.

En conclusion, nous avons démontré que l'excrétion de *Salmonella* par les truies échantillonnées ici est associée à des différences au niveau de leur microbiote fécal, mais aussi niveau de leurs porcelets. Ces différences n'ont pas pu être mesurées en engraissement et pourraient possiblement être effacées à la suite du sevrage. Le microbiote des truies n'ayant pas excrété *Salmonella* lors de notre expérience n'a donc pas d'effet protecteur sur la contamination des porcs après cette étape. Malgré cela, dans les conditions de l'étude, les porcelets nés d'une même truie ont des microbiotes plus similaires que ceux de leurs congénères, et ces similarités sont conservées jusqu'en engraissement. Ceci suggère que des interventions au niveau du microbiote de la truie pourraient avoir des effets bénéfiques sur sa progéniture tout au long de la production. Puisque les animaux étudiés ici proviennent tous d'un même système commercial et sont nés dans une même maternité, d'un nombre limité de truies et distribués dans un nombre limité de fermes, plus d'études sont cependant nécessaires pour permettre de généraliser ces résultats à la production porcine québécoise.

Chapitre 8 – Conclusion

Le premier objectif de cette thèse était de décrire la présence de *Salmonella* dans une pyramide de production de type multisite tout-plein/tout-vide avec un accent plus particulier sur la transmission de ce pathogène entre la truie et les porcelets. Nous avons pu démontrer ici que, dans la maternité échantillonnée, les truies en gestation étaient fréquemment excrétrices et que cette excrétion était variable et réduite à la fin de la gestation. Ceci suggère que ces animaux peuvent introduire des *Salmonella* au stade maternité. Des variations du microbiote fécal de ces truies entre le début et la fin de la gestation ont été mesurées pour la première fois, et des représentants de cet écosystème sont associés à la réduction de l'excrétion. Malgré la contamination des truies et la présence de *Salmonella* dans l'environnement de mise bas, les souches (type HRM) retrouvées chez les porcelets à l'étape suivante de la production correspondaient plutôt à celles retrouvées dans l'environnement de la pouponnière. Ces souches de même type ont aussi été retrouvées en engraissement. À l'engraissement, nous avons aussi pu montrer par un modèle de régression logistique mixte, que l'excrétion de ces porcs n'était pas associée au statut des truies, mais bien à l'environnement dans lequel ceux-ci avait été élevés. Ces résultats nous permettent de conclure que, dans le système étudié, la contamination par *Salmonella* des animaux ne semble pas se dérouler à la maternité, mais plutôt dans les étapes suivant le sevrage. Ces résultats suggèrent que des efforts devraient être portés à la pouponnière et à l'engraissement pour limiter le contact entre les animaux et la bactérie, et l'implantation de mesures de contrôle devrait y être encouragée.

Pour ce qui est du transfert du microbiote intestinal de la truie au porcelet et son impact sur l'excrétion de *Salmonella*, nous avons tout d'abord décrit pour la première fois, chez les truies étudiées dans cette étude, des différences significatives au niveau du microbiote fécal entre celles excréteur *Salmonella* et celles n'excrétant pas le pathogène. Chez les truies n'excrétant pas, ces différences étaient associées à certains taxons tels qu'*Alloprevotella*, *Prevotella* et les *Clostridium* du groupe IV qui sont des producteurs de SCFA et pourraient donc avoir un effet protecteur. De façon très intéressante, nous avons aussi pu décrire pour la première fois une association entre

le statut d'excrétion de truies et le microbiote fécal de leurs porcelets avant le sevrage. Nous n'avons cependant pas pu mesurer de transfert direct de taxon entre la mère et sa portée, suggérant un effet indirect ou porté par des composantes mineures de ce microbiote. À cette étape, nous avons aussi pu démontrer que, chez les porcelets échantillonnés dans l'étude, ceux nés d'une même mère avaient des microbiotes fécaux significativement plus semblables que ceux de porcelets d'autres portées, renforçant l'idée que la truie a une importance sur la constitution du microbiote du porcelet. Cette relation à l'excrétion chez la truie n'a cependant pas été conservée à l'étape de l'engraissement, et a possiblement été éliminée lors de la transition du microbiote au sevrage. Ceci conforte l'idée que l'excrétion des truies n'affecte pas l'excrétion des porcs en engraissement. Cependant, et de façon remarquable, il était encore possible à cette étape de mesurer un effet maternel sur sa portée. Ces résultats semblent démontrer l'intérêt d'étudier des actions ciblant le microbiote intestinal de la truie dans la perspective d'affecter sa progéniture jusqu'en fin de production.

Références bibliographiques

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J. et Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* 6, 237ra265.
- Abe, K., Saito, N., Kasuga, F. et Yamamoto, S. (2004). Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses. *Journal of food protection* 67, 2735-2740.
- Adhikari, B., Kim, S.W. et Kwon, Y.M. (2019). Characterization of Microbiota Associated with Digesta and Mucosa in Different Regions of Gastrointestinal Tract of Nursery Pigs. *International journal of molecular sciences* 20, 1630.
- Agence De Santé Publique Du Canada (2016). *Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System Report 2016*.
- Ainslie-Garcia, M.H., Farzan, A., Newman, J.E., Friendship, R.M. et Lillie, B.N. (2018). Salmonella fecal shedding in pigs from birth to market and its association with the presence of Salmonella in palatine tonsils and submandibular lymph nodes at slaughter. *Canadian journal of veterinary research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 82, 249-255.
- Alali, W.Q. et Ricke, S.C. (2012). "The ecology and control of bacterial pathogens in animal feed," in *Animal Feed Contamination*. Woodhead Publishing, 35-55.
- Andino, A. et Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal* 2015, 520179.
- Anses (2018). *Salmonella spp.en alimentation animale* [Online]. Available: <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lances-relatif-au-danger-salmonella-spp-en-alimentation-animale> [Accessed 2020].
- Antonini, M., Lo Conte, M., Sorini, C. et Falcone, M. (2019). How the Interplay Between the Commensal Microbiota, Gut Barrier Integrity, and Mucosal Immunity Regulates Brain Autoimmunity. *Frontiers in immunology* 10, 1937-1937.
- Antunes, L.C.M., Mcdonald, J.a.K., Schroeter, K., Carlucci, C., Ferreira, R.B.R., Wang, M., Yurist-Doutsch, S., Hira, G., Jacobson, K., Davies, J., Allen-Vercoe, E. et Finlay, B.B. (2014). Antivirulence Activity of the Human Gut Metabolome. *mBio* 5, e01183-01114.

- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J. et Peixe, L. (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection* 22, 110-121.
- Appelmelk, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., De Boer, H.A., Maclaren, D.M., De Graaff, J. et Nuijens, J.H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity* 62, 2628-2632.
- Argüello, H., Alvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A., Rubio, P. et Prieto, M. (2013). Role of slaughtering in Salmonella spreading and control in pork production. *Journal of food protection* 76, 899-911.
- Argüello, H., Estellé, J., Leonard, F.C., Crispie, F., Cotter, P.D., O'sullivan, O., Lynch, H., Walia, K., Duffy, G., Lawlor, P.G. et Gardiner, G.E. (2019). Influence of the Intestinal Microbiota on Colonization Resistance to Salmonella and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs. *mSystems* 4, e00021-00019.
- Argüello, H., Estellé, J., Zaldívar-López, S., Jiménez-Marín, Á., Carvajal, A., López-Bascón, M.A., Crispie, F., O'sullivan, O., Cotter, P.D., Priego-Capote, F., Morera, L. et Garrido, J.J. (2018). Early Salmonella Typhimurium infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Scientific Reports* 8, 7788.
- Argüello, H., Rubio, P. et Carvajal, A. (2012). "Salmonella control measures at farm in swine production," in *Salmonella-Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. IntechOpen.
- Argüello, H., Rubio, P., Jaramillo, A., Barrios, V., García, M. et Carvajal, A. (2011). Evaluation of cleaning and disinfection procedures against Samonella enterica at swine farms, transport and lairage facilities. *SafePork 2011 proceedings*.
- Arnal, M.E., Zhang, J., Messori, S., Bosi, P., Smidt, H. et Lalles, J.P. (2014). Early changes in microbial colonization selectively modulate intestinal enzymes, but not inducible heat shock proteins in young adult Swine. *PLOS One* 9, e87967.
- Atlas, R.M. (2010). *Handbook of microbiological media*. CRC press.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, Muhammad t., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Ying s., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen,

- K., Dahlgren, J. et Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* 17, 690-703.
- Bager, P., Simonsen, J., Nielsen, N.M. et Frisch, M. (2012). Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: a national cohort study. *Inflammatory Bowel Diseases* 18, 857-862.
- Bailey, M.T., Dowd, S.E., Galley, J.D., Hufnagle, A.R., Allen, R.G. et Lyte, M. (2011). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 397-407.
- Baker, A.A., Davis, E., Spencer, J.D., Moser, R. et Rehberger, T. (2013). The effect of a Bacillus-based direct-fed microbial supplemented to sows on the gastrointestinal microbiota of their neonatal piglets. *Journal of Animal Science* 91, 3390-3399.
- Bandrick, M., Ariza-Nieto, C., Baidoo, S.K. et Molitor, T.W. (2014). Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Developmental and comparative immunology* 43, 114-120.
- Barber, D.A., Bahnson, P.B., Isaacson, R., Jones, C.J. et Weigel, R.M. (2002). Distribution of Salmonella in swine production ecosystems. *Journal of food protection* 65, 1861-1868.
- Barreau, F. et Hugot, J.P. (2014). Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 17, 91-98.
- Bauer, M.A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D. et Madeo, F. (2018). Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microbial cell* 5, 215-219.
- Bäumler, A. et Fang, F.C. (2013). Host specificity of bacterial pathogens. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3, a010041-a010041.
- Bearson, S.M., Allen, H.K., Bearson, B.L., Looft, T., Brunelle, B.W., Kich, J.D., Tuggle, C.K., Bayles, D.O., Alt, D. et Levine, U.Y. (2013). Profiling the gastrointestinal microbiota in response to Salmonella: low versus high Salmonella shedding in the natural porcine host. *Infection, Genetics and Evolution* 16, 330-340.
- Belkaid, Y. et Hand, T. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell* 157, 121-141.

- Belœil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Rose, N., Queguiner, S., Eveno, E., Houdayer, C., Rose, V., Fravallo, P. et Madec, F. (2003). Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Preventive Veterinary Medicine* 60, 207-226.
- Belœil, P.A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J.P., Eveno, E., Hascoet, Y., Chauvin, C., Salvat, G. et Madec, F. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine* 63, 103-120.
- Benjamino, J., Lincoln, S., Srivastava, R. et Graf, J. (2018). Low-abundant bacteria drive compositional changes in the gut microbiota after dietary alteration. *Microbiome* 6, 86.
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Keira Cheetham, R., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M.J., Reed, M.T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S.V., Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M.D., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Chiara E Catenazzi, M., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C., Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fuentes Fajardo, K.V., Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53-59.
- Bergeron, N., Corriveau, J., Letellier, A., Daigle, F. et Quessy, S. (2010). Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. *Canadian journal of veterinary research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 74, 11-17.

- Bergström, A., Kristensen, M.B., Bahl, M.I., Metzdorff, S.B., Fink, L.N., Frøkiaer, H. et Licht, T.R. (2012). Nature of bacterial colonization influences transcription of mucin genes in mice during the first week of life. *BMC research notes* 5, 402-402.
- Bertasoli, B., Santos, A., Paula, R., Barbosa, A., Silva, G. et Jorge, E. (2015). Swine placenta and placentation. *Brazilian Journal of Biological Sciences* 2, 199-207.
- Bevins, C.L. et Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9, 356-368.
- Bian, G., Ma, S., Zhu, Z., Su, Y., Zoetendal, E.G., Mackie, R., Liu, J., Mu, C., Huang, R., Smidt, H. et Zhu, W. (2016). Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environmental Microbiology* 18, 1566-1577.
- Borewicz, K.A., Kim, H.B., Singer, R.S., Gebhart, C.J., Sreevatsan, S., Johnson, T. et Isaacson, R.E. (2015). Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PLOS One* 10, e0139106.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. et Pasmans, F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130, 1-19.
- Brands, D.A. (2006). *Deadly diseases and epidemics Salmonella*. Chelsea House Publishers.
- Bratburd, J.R., Keller, C., Vivas, E., Gemperline, E., Li, L., Rey, F.E. et Currie, C.R. (2018). Gut Microbial and Metabolic Responses to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Candida albicans*. *mBio* 9, e02032-02018.
- Bratchikov, M. et Mauricas, M. (2011). Development of a multiple-run high-resolution melting assay for *Salmonella* spp. genotyping HRM application for *Salmonella* spp. subtyping. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71, 192-200.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. et Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2465-2467.
- Browne, H.P., Neville, B.A., Forster, S.C. et Lawley, T.D. (2017). Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nature Reviews Microbiology* 15, 531.

- Brunsgaard, G. (1998). Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. *Journal of Animal Science* 76, 2787-2798.
- Bunker, J.J., Erickson, S.A., Flynn, T.M., Henry, C., Koval, J.C., Meisel, M., Jabri, B., Antonopoulos, D.A., Wilson, P.C. et Bendelac, A. (2017). Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science* 358, eaan6619.
- Burrough, E.R., Arruda, B.L. et Plummer, P.J. (2017). Comparison of the Luminal and Mucosa-Associated Microbiota in the Colon of Pigs with and without Swine Dysentery. *Frontiers in veterinary science* 4, 139.
- Butler, A.J., Pintar, K.D. et Thomas, M.K. (2016). Estimating the Relative Role of Various Subcategories of Food, Water, and Animal Contact Transmission of 28 Enteric Diseases in Canada. *Foodborne Pathogens and Disease* 13, 57-64.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. et Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* 96, 544-551.
- Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J. et Holmes, S.P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11, 2639-2643.
- Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. et Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581-583.
- Callahan, B.J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C.M., Gulati, A.S., McGill, S.K. et Dougherty, M.K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *bioRxiv*, 392332.
- Campbell, J.M., Crenshaw, J.D. et Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of animal science and biotechnology* 4, 19-19.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. et Knight, R. (2012).

- Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6, 1621-1624.
- Cardwell, C.R., Stene, L.C., Joner, G., Cinek, O., Svensson, J., Goldacre, M.J., Parslow, R.C., Pozzilli, P., Brigis, G., Stoyanov, D., Urbonaite, B., Sipetic, S., Schober, E., Ionescu-Tirgoviste, C., Devoti, G., De Beaufort, C.E., Buschard, K. et Patterson, C.C. (2008). Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* 51, 726-735.
- Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C.M., Andrés-Barranco, S., Cebollada-Solanas, A., Alvarez, J. et Mainar-Jaime, R.C. (2019). Weaned piglets: another factor to be considered for the control of Salmonella infection in breeding pig farms. *Veterinary Research* 50, 45.
- Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martin, M. et Gasa, J. (2006). Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 114, 165-170.
- Champagne, M.J., Ravel, A. et Daignault, D. (2005). A comparison of sample weight and culture methods for the detection of Salmonella in pig feces. *Journal of food protection* 68, 1073-1076.
- Chapagain, P., Arivett, B., Cleveland, B.M., Walker, D.M. et Salem, M. (2019). Analysis of the fecal microbiota of fast- and slow-growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 20, 788.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E. et Gewirtz, A.T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92-96.
- Chassin, C., Kocur, M., Pott, J., Duerr, C.U., Gütle, D., Lotz, M. et Hornef, M.W. (2010). miR-146a Mediates Protective Innate Immune Tolerance in the Neonate Intestine. *Cell Host & Microbe* 8, 358-368.
- Chen, H.-M., Wang, Y., Su, L.-H. et Chiu, C.-H. (2013). Nontyphoid Salmonella Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. *Pediatrics & Neonatology* 54, 147-152.

- Chen, H., Mao, X.B., Che, L.Q., Yu, B., He, J., Yu, J., Han, G.Q., Huang, Z.Q., Zheng, P. et Chen, D.W. (2014). Impact of fiber types on gut microbiota, gut environment and gut function in fattening pigs. *Animal Feed Science and Technology* 195, 101-111.
- Chen, H.J. et Gur, T.L. (2019). Intrauterine Microbiota: Missing, or the Missing Link? *Trends in Neurosciences* 42, 402-413.
- Chen, L., Xu, Y., Chen, X., Fang, C., Zhao, L. et Chen, F. (2017). The Maturing Development of Gut Microbiota in Commercial Piglets during the Weaning Transition. *Frontiers in microbiology* 8, 1688-1688.
- Chen, W., Mi, J., Lv, N., Gao, J., Cheng, J., Wu, R., Ma, J., Lan, T. et Liao, X. (2018). Lactation Stage-Dependency of the Sow Milk Microbiota. *Frontiers in microbiology* 9, 945.
- Chirullo, B., Pesciaroli, M., Drumo, R., Ruggeri, J., Razzuoli, E., Pistoia, C., Petrucci, P., Martinelli, N., Cucco, L., Moscati, L., Amadori, M., Magistrali, C.F., Alborali, G.L. et Pasquali, P. (2015). Salmonella Typhimurium exploits inflammation to its own advantage in piglets. *Frontiers in microbiology* 6, 985-985.
- Chlebicz, A. et Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International journal of environmental research and public health* 15, 863.
- Clark, H. (2019). *Culturing anaerobes* [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/d42859-019-00007-1> [Accessed 2020].
- Collado, M.C., Isolauri, E., Laitinen, K. et Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 894-899.
- Cox, N.A., Berrang, M.E., House, S.L., Hinton Jr, A., Eric Line, J. et Wiggins, L.T. (2020). Detection of multiple naturally occurring Salmonella serotypes from commercial broiler carcasses with conventional methods. *Journal of food safety*, e12761.
- Dai, X., Yuan, T., Zhang, X., Zhou, Q., Bi, H., Yu, R., Wei, W. et Wang, X. (2020). Short-chain fatty acid (SCFA) and medium-chain fatty acid (MCFA) concentrations in human milk consumed by infants born at different gestational ages and the variations in concentration during lactation stages. *Food & Function* 11, 1869-1880.

- Davidson, V.J., Ravel, A., Nguyen, T.N., Fazil, A. et Ruzante, J.M. (2011). Food-specific attribution of selected gastrointestinal illnesses: estimates from a Canadian expert elicitation survey. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 983-995.
- Davies, R.H. et Wales, A.D. (2010). Investigations into Salmonella contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1430-1440.
- Davis, M.E., Sears, S.C., Apple, J.K., Maxwell, C.V. et Johnson, Z.B. (2006). Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being^{1,2}. *Journal of Animal Science* 84, 743-756.
- De Andres, J., Jimenez, E., Chico-Calero, I., Fresno, M., Fernandez, L. et Rodriguez, J.M. (2017). Physiological Translocation of Lactic Acid Bacteria during Pregnancy Contributes to the Composition of the Milk Microbiota in Mice. *Nutrients* 10.
- De Busser, E.V., Maes, D., Houf, K., Dewulf, J. et De Zutter, L. (2013). Effect of the enrichment medium on the detection and diversity of Salmonella from porcine duodenal content. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 182-188.
- Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laaß, M., Ney, D., Posovszky, C., Hoy, L. et Hornef, M.W. (2010). Cesarean Delivery Is Associated With Celiac Disease but Not Inflammatory Bowel Disease in Children. *Pediatrics* 125, e1433-e1440.
- Dejong, T.M. (1975). A comparison of three diversity indices based on their components of richness and evenness. *Oikos*, 222-227.
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J. et Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* 54, 2325-2340.
- Deriu, E., Liu, J.Z., Pezeshki, M., Edwards, R.A., Ochoa, R.J., Contreras, H., Libby, S.J., Fang, F.C. et Raffatellu, M. (2013). Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell host & microbe* 14, 26-37.
- Dewaele, I., Van Meirhaeghe, H., Rasschaert, G., Vanrobaeys, M., De Graef, E., Herman, L., Ducatelle, R., Heyndrickx, M. et De Reu, K. (2012). Persistent Salmonella Enteritidis

- environmental contamination on layer farms in the context of an implemented national control program with obligatory vaccination. *Poultry Science* 91, 282-291.
- Digiulio, D.B., Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Costello, E.K., Lyell, D.J., Robaczewska, A., Sun, C.L., Goltsman, D.S.A., Wong, R.J., Shaw, G., Stevenson, D.K., Holmes, S.P. et Relman, D.A. (2015). Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11060-11065.
- Dobbler, P., Mai, V., Procianoy, R.S., Silveira, R.C., Corso, A.L. et Roesch, L.F.W. (2019). The vaginal microbial communities of healthy expectant Brazilian mothers and its correlation with the newborn's gut colonization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35, 159.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. et Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11971-11975.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M. et Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 14, 20-32.
- Donia, M.S. et Fischbach, M.A. (2015). HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota. *Science* 349, 1254766.
- Downes, J., Dewhirst, F.E., Tanner, A.C.R. et Wade, W.G. (2013). Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneriae* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneriae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 1214-1218.
- Doyle, R.M., Harris, K., Kamiza, S., Harjunmaa, U., Ashorn, U., Nkhoma, M., Dewey, K.G., Maleta, K., Ashorn, P. et Klein, N. (2017). Bacterial communities found in placental tissues are associated with severe chorioamnionitis and adverse birth outcomes. *PLOS One* 12.
- Drissi, F., Buffet, S., Raoult, D. et Merhej, V. (2015). Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota. *Frontiers in Microbiology* 6, 441.
- Drumo, R., Pesciaroli, M., Ruggeri, J., Tarantino, M., Chirullo, B., Pistoia, C., Petrucci, P., Martinelli, N., Moscati, L., Manuali, E., Pavone, S., Picciolini, M., Ammendola, S., Gabai, G., Battistoni, A., Pezzotti, G., Alborali, G.L., Napolioni, V., Pasquali, P. et Magistrali, C.F. (2016).

- Salmonella enterica Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Modify Swine Intestinal Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5, 106.
- Dunne-Castagna, V.P., Mills, D.A. et Lönnerdal, B. (2020). Effects of Milk Secretory Immunoglobulin A on the Commensal Microbiota. *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series* 94, 158-168.
- Earl, J.P., Adappa, N.D., Krol, J., Bhat, A.S., Balashov, S., Ehrlich, R.L., Palmer, J.N., Workman, A.D., Blasetti, M., Sen, B., Hammond, J., Cohen, N.A., Ehrlich, G.D. et Mell, J.C. (2018). Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome* 6, 190.
- Eberth, C.J. (1880). Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 81, 58-74.
- Edwards, S.M., Cunningham, S.A., Dunlop, A.L. et Corwin, E.J. (2017). The Maternal Gut Microbiome During Pregnancy. *MCN. The American journal of maternal child nursing* 42, 310-317.
- Efsa (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs in the EU, 2008 - Part A: Salmonella prevalence estimates. *EFSA Journal* 7, 1377.
- Efsa (2010). Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs. *EFSA Journal* 8, 1547.
- Efsa (2011). Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part B: factors associated with Salmonella pen positivity *EFSA Journal* 9, 2329.
- Efsa (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16, e05500.
- Egshatyan, L., Kashtanova, D., Popenko, A., Tkacheva, O., Tyakht, A. et Alexeev, D. (2015). Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance. *Endocrine Connections* 5, 1-19.
- Ehmann, D., Wendler, J., Koeninger, L., Larsen, I.S., Klag, T., Berger, J., Marette, A., Schaller, M., Stange, E.F., Malek, N.P., Jensen, B.a.H. et Wehkamp, J. (2019). Paneth cell α -defensins

- HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 3746-3751.
- Elahi, S., Ertelt, J.M., Kinder, J.M., Jiang, T.T., Zhang, X., Xin, L., Chaturvedi, V., Strong, B.S., Qualls, J.E., Steinbrecher, K.A., Kalfa, T.A., Shaaban, A.F. et Way, S.S. (2013). Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature* 504, 158-162.
- Esaiassen, E., Fjalstad, J.W., Juvet, L.K., Van Den Anker, J.N. et Klingenberg, C. (2017). Antibiotic exposure in neonates and early adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72, 1858-1870.
- Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M. et Holmes, K.K. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 251-256.
- Ewaschuk, J.B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-Van Langen, M. et Madsen, K.L. (2008). Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 295, G1025-1034.
- Ewing, B. et Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* 8, 186-194.
- Fang, S., Xiong, X., Su, Y., Huang, L. et Chen, C. (2017). 16S rRNA gene-based association study identified microbial taxa associated with pork intramuscular fat content in feces and cecum lumen. *BMC microbiology* 17, 162-162.
- Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., Macsharry, J., Goulding, D., O'connell Motherway, M., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. et Van Sinderen, D. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2108-2113.

- Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Muckle, A.C., Gray, J.T. et Funk, J. (2008). Distribution of Salmonella serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. *Canadian Journal of Veterinary Research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 72, 1-6.
- Favier, C.F., Vaughan, E.E., De Vos, W.M. et Akkermans, A.D.L. (2002). Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 219-226.
- Feng, W., Zhao, S., Xue, D., Song, F., Li, Z., Chen, D., He, B., Hao, Y., Wang, Y. et Liu, Y. (2016). Improving alignment accuracy on homopolymer regions for semiconductor-based sequencing technologies. *BMC Genomics* 17, 521.
- Fernandes, L., Centeno, M.M., Couto, N., Nunes, T., Almeida, V., Alban, L. et Pomba, C. (2016). Longitudinal characterization of monophasic Salmonella Typhimurium throughout the pig's life cycle. *Veterinary Microbiology* 192, 231-237.
- Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., Armanini, F., Truong, D.T., Manara, S., Zolfo, M., Beghini, F., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Bariletti, I., Canto, R., Clementi, R., Cologna, M., Crifo, T., Cusumano, G., Gottardi, S., Innamorati, C., Mase, C., Postai, D., Savoi, D., Duranti, S., Lugli, G.A., Mancabelli, L., Turrone, F., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Anzalone, R., Viappiani, A., Yassour, M., Vlamakis, H., Xavier, R., Collado, C.M., Koren, O., Tateo, S., Soffiati, M., Pedrotti, A., Ventura, M., Huttenhower, C., Bork, P. et Segata, N. (2018). Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 24, 133-145 e135.
- Ferrocino, I., Ponzo, V., Gambino, R., Zarovska, A., Leone, F., Monzeglio, C., Goitre, I., Rosato, R., Romano, A., Grassi, G., Broglio, F., Cassader, M., Cocolin, L. et Bo, S. (2018). Changes in the gut microbiota composition during pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus (GDM). *Scientific Reports* 8, 12216.
- Fiedorová, K., Radvanský, M., Němcová, E., Grombiříková, H., Bosák, J., Černochová, M., Lexa, M., Šmajš, D. et Freiberger, T. (2019). The Impact of DNA Extraction Methods on Stool Bacterial and Fungal Microbiota Community Recovery. *Frontiers in Microbiology* 10, 821.
- Foodnet Canada (2018). FoodNet Canada annual report 2017.

- Forstner, G. (1995). Signal transduction packaging and secretion of mucins. *Annual review of physiology* 57, 585-605.
- Fouhy, F., Deane, J., Rea, M.C., O'sullivan, Ó., Ross, R.P., O'callaghan, G., Plant, B.J. et Stanton, C. (2015). The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *PLOS One* 10, e0119355-e0119355.
- Fraser, S. (2008). *Report of the auditor general of Canada, Chapter 5—Surveillance of Infectious Diseases—Public Health Agency of Canada* May.
- Fralavo, P., Lebel, P., Longpré, J., Laplante, B., Yergeau, É., Massé, D. et Letellier, A. (2013). Salmonella associated taxonomic and functional changes in the pig digestive tract during application of feed associated mitigation option in production *International Symposium Salmonella and Salmonellosis 2013*.
- Frese, S.A., Parker, K., Calvert, C.C. et Mills, D.A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3, 28.
- Funk, J. et Gebreyes, W. (2004). Risk factors associated with Salmonella on swine farms. *Journal of Swine Health and Production* 12, 247-251.
- Funk, J.A., Davies, P.R. et Nichols, M.A. (2000). The effect of fecal sample weight on detection of Salmonella enterica in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 412-418.
- Funk, J.A., Davies, P.R. et Nichols, M.A. (2001). Longitudinal study of Salmonella enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology* 83, 45-60.
- Funkhouser, L.J. et Bordenstein, S.R. (2013). Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLOS Biology* 11, e1001631.
- Furter, M., Sellin, M.E., Hansson, G.C. et Hardt, W.-D. (2019). Mucus Architecture and Near-Surface Swimming Affect Distinct Salmonella Typhimurium Infection Patterns along the Murine Intestinal Tract. *Cell Reports* 27, 2665-2678.e2663.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D. et Cerf-Bensussan, N. (2009).

- The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* 31, 677-689.
- Gaffky, G.T.A. (1884). Zur Aetiology des Abdominaltyphus. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* 2, 372-420.
- Gal-Mor, O., Boyle, E.C. et Grassl, G.A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology* 5, 391.
- Gallo, R.L. et Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature reviews. Immunology* 12, 503-516.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C. et Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 946-949.
- Gao, K., Pi, Y., Peng, Y., Mu, C.-L. et Zhu, W.-Y. (2018). Time-course responses of ileal and fecal microbiota and metabolite profiles to antibiotics in cannulated pigs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 2289-2299.
- Gao, P., Guo, Y., Zhang, N., Zhang, W., Wang, H., Guo, X., Duan, Z., Du, M., Yang, Q., Li, B., Li, Y. et Cao, G. (2019). Characterization and comparisons of microbiota in different intestinal segments between adult Chinese Shanxi Black Pigs and Large White Pigs. *Annals of Microbiology* 69, 447-456.
- García-Gómez, E., González-Pedrajo, B. et Camacho-Arroyo, I. (2013). Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed research international* 2013, 928290-928290.
- Garcia-Gutierrez, E., Mayer, M.J., Cotter, P.D. et Narbad, A. (2019). Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut microbes* 10, 1-21.
- Garrido, V., Sánchez, S., San Román, B., Zabalza-Baranguá, A., Díaz-Tendero, Y., De Frutos, C., Mainar-Jaime, R.-C. et Grilló, M.-J. (2014). Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. *BMC veterinary research* 10, 59-59.

- Gautam, R., Lahodny, G., Bani-Yaghoub, M., Morley, P.S. et Ivanek, R. (2013). Understanding the role of cleaning in the control of Salmonella Typhimurium in grower-finisher pigs: a modelling approach. *Epidemiology and Infection* 142, 1034-1049.
- Gielda, L.M. et Dirita, V.J. (2012). Zinc competition among the intestinal microbiota. *mBio* 3, e00171.
- Gillor, O., Etzion, A. et Riley, M.A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 591-606.
- Glassing, A., Dowd, S.E., Galandiuk, S., Davis, B. et Chiodini, R.J. (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens* 8, 24.
- Gohir, W., Whelan, F.J., Surette, M.G., Moore, C., Schertzer, J.D. et Sloboda, D.M. (2015). Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptual diet. *Gut Microbes* 6, 310-320.
- Goldenberg, R.L., Hauth, J.C. et Andrews, W.W. (2000). Intrauterine infection and preterm delivery. *New England journal of medicine* 342, 1500-1507.
- Gonçalves, L.F., Chaiworapongsa, T. et Romero, R. (2002). Intrauterine infection and prematurity. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8, 3-13.
- Goodrich, J.K., Davenport, E.R., Waters, J.L., Clark, A.G. et Ley, R.E. (2016). Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. *Science* 352, 532-535.
- Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R. et Bell, J.T. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789-799.
- Goodwin, S., Mcpherson, J.D. et McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17, 333-351.
- Gopalakrishna, K.P. et Hand, T.W. (2020). Influence of Maternal Milk on the Neonatal Intestinal Microbiome. *Nutrients* 12, 823.
- Göpfrich, K. et Judge, K. (2018). *Decoding DNA with a pocket-sized sequencer* [Online]. Available: <https://www.scienceinschool.org/content/decoding-dna-pocket-sized-sequencer> [Accessed 2020].

- Gopinath, S., Carden, S. et Monack, D. (2012). Shedding light on Salmonella carriers. *Trends in Microbiology* 20, 320-327.
- Gorski, L. (2012). Selective Enrichment Media Bias the Types of Salmonella enterica Strains Isolated from Mixed Strain Cultures and Complex Enrichment Broths. *PLOS One* 7, e34722.
- Gosalbes, M.J., Compte, J., Moriano-Gutierrez, S., Vallès, Y., Jiménez-Hernández, N., Pons, X., Artacho, A. et Francino, M.P. (2019). Metabolic adaptation in the human gut microbiota during pregnancy and the first year of life. *EBioMedicine* 39, 497-509.
- Gosalbes, M.J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F. et Francino, M.P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical & Experimental Allergy* 43, 198-211.
- Gotelli, N.J. et Colwell, R.K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4, 379-391.
- Gotter, V., Blaha, T. et Klein, G. (2012a). A case-control study on the occurrence of Salmonella spp. in the environment of pigs. *Epidemiology and Infection* 140, 150-156.
- Gotter, V., Klein, G., Koesters, S., Kreienbrock, L., Blaha, T. et Campe, A. (2012b). Main risk factors for Salmonella-infections in pigs in north-western Germany. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 301-307.
- Gould, L.H., Walsh, K.A., Vieira, A.R., Herman, K., Williams, I.T., Hall, A.J. et Cole, D. (2013). Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1998–2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries* 62, 1-34.
- Gouvernement Du Canada (2008). *Définition nationale de cas : Salmonellose* [Online]. Available: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/salmonellose-salmonella/professionnels-sante/definition-nationale-cas.html> [Accessed 2020].
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., Van De Wiele, T., Forano, E. et Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology* 25, 851-873.
- Griffith, R.W., Carlson, S. A. And Krull, A. C (2019). "Salmonellosis," in *Diseases of Swine*. 912-925.

- Guevarra, R.B., Lee, J.H., Lee, S.H., Seok, M.-J., Kim, D.W., Kang, B.N., Johnson, T.J., Isaacson, R.E. et Kim, H.B. (2019). Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of animal science and biotechnology* 10, 1-1.
- Guinan, J., Wang, S., Hazbun, T.R., Yadav, H. et Thangamani, S. (2019). Antibiotic-induced decreases in the levels of microbial-derived short-chain fatty acids correlate with increased gastrointestinal colonization of *Candida albicans*. *Scientific Reports* 9, 8872.
- Gunn, J.S., Marshall, J.M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R.C. et Ryan, E.T. (2014). Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends in microbiology* 22, 648-655.
- Guo, F., Ju, F., Cai, L. et Zhang, T. (2013). Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regions of 16S rRNA Gene and Annotation Methods for Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment. *PLOS One* 8, e76185.
- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Kim, D.H., Sano Marma, M., Meng, Q., Cao, H., Li, X., Shi, S., Yu, L., Kalachikov, S., Russo, J.J., Turro, N.J. et Ju, J. (2008). Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9145-9150.
- Guo, Y., Li, S.-H., Kuang, Y.-S., He, J.-R., Lu, J.-H., Luo, B.-J., Jiang, F.-J., Liu, Y.-Z., Papasian, C.J., Xia, H.-M., Deng, H.-W. et Qiu, X. (2016). Effect of short-term room temperature storage on the microbial community in infant fecal samples. *Scientific Reports* 6, 26648.
- Hancock, R.E.W. et Chapple, D.S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 1317-1323.
- Hanson, L.A., Korotkova, M., Lundin, S., Håversen, L., Silfverdal, S.A., Mattsby-Baltzer, I., Strandvik, B. et Telemo, E. (2003). The transfer of immunity from mother to child. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987, 199-206.
- Hao, M., Corral-Rivas, J.J., González-Elizondo, M.S., Ganeshiah, K.N., Nava-Miranda, M.G., Zhang, C., Zhao, X. et Von Gadow, K. (2019). Assessing biological dissimilarities between five forest communities. *Forest Ecosystems* 6, 30.

- Harrington, C.T., Lin, E.I., Olson, M.T. et Eshleman, J.R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137, 1296-1303.
- Hawes, S.E., Hillier, S.L., Benedetti, J., Stevens, C.E., Koutsky, L.A., Wolner-Hanssen, P. et Holmes, K.K. (1996). Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *The Journal of Infectious Diseases* 174, 1058-1063.
- Heaver, S.L., Johnson, E.L. et Ley, R.E. (2018). Sphingolipids in host-microbial interactions. *Current Opinion in Microbiology* 43, 92-99.
- Hebenbrock, K., Williams, P.M. et Karger, B.L. (1995). Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 16, 1429-1436.
- Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J. et Nyachoti, C.M. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 207-237.
- Hermann-Bank, M.L., Skovgaard, K., Stockmarr, A., Larsen, N. et Mølbak, L. (2013). The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC genomics* 14, 788-788.
- Hervé, M. (2018). *RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics* [Online]. Available: <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire> [Accessed Mai 2018].
- Hill, A.A., Simons, R.R.L., Kelly, L. et Snary, E.L. (2016). A Farm Transmission Model for Salmonella in Pigs, Applicable to E.U. Member States. *Risk Analysis* 36, 461-481.
- Ho, N.T., Li, F., Wang, S. et Kuhn, L. (2019). metamicrobiomeR: an R package for analysis of microbiome relative abundance data using zero-inflated beta GAMLSS and meta-analysis across studies using random effects models. *BMC bioinformatics* 20, 188-188.
- Hoffmann, S., Batz, M.B. et Morris, J.G., Jr. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of food protection* 75, 1292-1302.

- Højberg, O., Canibe, N., Knudsen, B. et Jensen, B.B. (2003). Potential Rates of Fermentation in Digesta from the Gastrointestinal Tract of Pigs: Effect of Feeding Fermented Liquid Feed. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 408-418.
- Holman, D.B., Brunelle, B.W., Trachsel, J. et Allen, H.K. (2017). Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems* 2, e00004-00017.
- Holman, D.B. et Chénier, M.R. (2014). Temporal changes and the effect of subtherapeutic concentrations of antibiotics in the gut microbiota of swine. *FEMS Microbiology Ecology* 90, 599-608.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G. et Gordon, J.I. (2001). Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* 291, 881-884.
- Horton, R.A., Wu, G., Speed, K., Kidd, S., Davies, R., Coldham, N.G. et Duff, J.P. (2013). Wild birds carry similar Salmonella enterica serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Research in veterinary science* 95, 45-48.
- Hsiao, A., Ahmed, A.M., Subramanian, S., Griffin, N.W., Drewry, L.L., Petri, W.A., Jr., Haque, R., Ahmed, T. et Gordon, J.I. (2014). Members of the human gut microbiota involved in recovery from Vibrio cholerae infection. *Nature* 515, 423-426.
- Huang, C.B., Alimova, Y., Myers, T.M. et Ebersole, J.L. (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of oral biology* 56, 650-654.
- Hung, C.C., Garner, C.D., Slauch, J.M., Dwyer, Z.W., Lawhon, S.D., Frye, J.G., McClelland, M., Ahmer, B.M. et Altier, C. (2013). The intestinal fatty acid propionate inhibits Salmonella invasion through the post-translational control of HsdR. *Molecular Microbiology* 87, 1045-1060.
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M.E., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., Mcguire, M.K. et Mcguire, M.A. (2011). Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS One* 6, e21313.
- Hurd, H.S., Mckean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V. et Rostagno, M.H. (2002). Salmonella enterica infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and environmental microbiology* 68, 2376-2381.

- Iacob, S. et Iacob, D.G. (2019). Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Illumina (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* [Online]. Illumina. Available: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf [Accessed February 2017].
- Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N. et Ushida, K. (2005). Development of the intestinal microbiota in the piglet. *The Journal of General and Applied Microbiology* 51, 257-265.
- Iso (2017). ISO 6579-1: Microbiology of the food chain—horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella—part 1: horizontal method for the detection of Salmonella spp.
- Iványi, G., Madar, L., Dzsudzsák, E., Koczok, K., Kappelmayer, J., Krulisova, V., Macek, M., Jr., Horváth, A. et Balogh, I. (2018). Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC genomics* 19, 158-158.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K. et Littman, D.R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.
- Ivarsson, E., Liu, H.Y., Dicksved, J., Roos, S. et Lindberg, J.E. (2012). Impact of chicory inclusion in a cereal-based diet on digestibility, organ size and faecal microbiota in growing pigs. *Animal* 6, 1077-1085.
- Jacobson, A., Lam, L., Rajendram, M., Tamburini, F., Honeycutt, J., Pham, T., Van Treuren, W., Pruss, K., Stabler, S.R., Lugo, K., Bouley, D.M., Vilches-Moure, J.G., Smith, M., Sonnenburg, J.L., Bhatt, A.S., Huang, K.C. et Monack, D. (2018). A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host Microbe* 24, 296-307 e297.

- Jacobson, A.P., Wang, H., Gill, V.S., Duvall, R., Arce, G., Chirtel, S. et Hammack, T.S. (2017). Relative effectiveness of selected preenrichment media for the detection of Salmonella from leafy green produce and herbs. *Food Microbiology* 63, 123-128.
- Jeon, B.S., Kim, S. et Sang, B.I. (2017). *Megasphaera hexanoica* sp. nov., a medium-chain carboxylic acid-producing bacterium isolated from a cow rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 2114-2120.
- Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L. et Rodríguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* 159, 187-193.
- Johansson, M.E., Larsson, J.M. et Hansson, G.C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1, 4659-4665.
- Johansson, M.E.V., Jakobsson, H.E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F., Bäckhed, F. et Hansson, G.C. (2015). Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell host & microbe* 18, 582-592.
- Jones, C.K., Woodworth, J., Dritz, S.S. et Paulk, C.B. (2019). Reviewing the risk of feed as a vehicle for swine pathogen transmission. *Veterinary Medicine and Science*.
- Jones, F.T. (2011). A review of practical Salmonella control measures in animal feed. *The Journal of Applied Poultry Research* 20, 102-113.
- Jones, F.T. et Richardson, K.E. (2004). Salmonella in Commercially Manufactured Feeds. *Poultry Science* 83, 384-391.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C.P., Rochat, F. et Chassard, C. (2014). Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology* 16, 2891-2904.
- Ka, H., Seo, H., Choi, Y., Yoo, I. et Han, J. (2018). Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 β at the time of implantation in pigs. *Journal of animal science and biotechnology* 9, 44-44.

- Kaliannan, K., Robertson, R.C., Murphy, K., Stanton, C., Kang, C., Wang, B., Hao, L., Bhan, A.K. et Kang, J.X. (2018). Estrogen-mediated gut microbiome alterations influence sexual dimorphism in metabolic syndrome in mice. *Microbiome* 6, 205.
- Kamada, N., Kim, Y.G., Sham, H.P., Vallance, B.A., Puente, J.L., Martens, E.C. et Nunez, G. (2012). Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* 336, 1325-1329.
- Katevatis, C., Fan, A. et Klapperich, C.M. (2017). Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLOS One* 12, e0176848.
- Kchouk, M., Gibrat, J.-F. et Elloumi, M. (2017). Generations of sequencing technologies: from first to next generation. *Biology and Medicine* 9.
- Khandagale, A. et Reinhardt, C. (2018). Gut microbiota - architects of small intestinal capillaries. *Frontiers in Bioscience* 23, 752-766.
- Kim, H.B. et Isaacson, R.E. (2017). Salmonella in Swine: Microbiota Interactions. *Annual Review of Animal Biosciences* 5, 43-63.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. et Schmidt, T.M. (2001). rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic acids research* 29, 181-184.
- Kollmann, Tobias r., Levy, O., Montgomery, Ruth r. et Goriely, S. (2012). Innate Immune Function by Toll-like Receptors: Distinct Responses in Newborns and the Elderly. *Immunity* 37, 771-783.
- Konstantinov, S.R., Awati, A.A., Williams, B.A., Miller, B.G., Jones, P., Stokes, C.R., Akkermans, A.D.L., Smidt, H. et De Vos, W.M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology* 8, 1191-1199.
- Koren, O., Goodrich, J.K., Cullender, T.C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H.K., Gonzalez, A., Werner, J.J., Angenent, L.T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S. et Ley, R.E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150, 470-480.
- Kornman, K.S. et Loesche, W.J. (1982). Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity* 35, 256-263.

- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. et Schloss, P.D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5112-5120.
- Kranker, S., Alban, L., Boes, J. et Dahl, J. (2003). Longitudinal Study of Salmonella enterica Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds. *Journal of clinical microbiology* 41, 2282-2288.
- Kranker, S., Dahl, J. et Wingstrand, A. (2001). Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of Salmonella occurrence in sow herds, including risk factors for high Salmonella seroprevalence in receiver finishing herds. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 114, 350-352.
- Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Merlot, E., Medvecký, M., Polansky, O., Gardan-Salmon, D., Quesnel, H. et Rychlik, I. (2017). Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. *PLOS One* 12, e0170051.
- Langlais, M., Thibodeau, A. et Fravallo, P. (2019). A metagenomic analysis of the pre-enrichment step for the isolation of Salmonella spp. from pig feces. *Journal of Microbiological Methods* 157, 43-46.
- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É. et Fravallo, P. (2017). Reduction of Salmonella Shedding by Sows during Gestation in Relation to Its Fecal Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 8, 2219.
- Larivière-Gauthier, G., Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É. et Fravallo, P. (2019). Salmonella shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning. *Journal of Applied Microbiology* 0.
- Laukens, D., Brinkman, B.M., Raes, J., De Vos, M. et Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 117-132.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. et Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter Salmonella typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology* 46, 1451-1464.

- Lazar, V., Ditu, L.-M., Pircalabioru, G.G., Gheorghe, I., Curutiu, C., Holban, A.M., Picu, A., Petcu, L. et Chifiriuc, M.C. (2018). Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Frontiers in Immunology* 9, 1830.
- Le Hello, S., Brisabois, A., Accou-Demartin, M., Josse, A., Marault, M., Francart, S., Da Silva, N.J. et Weill, F.-X. (2012). Foodborne outbreak and nonmotile *Salmonella enterica* variant, France. *Emerging infectious diseases* 18, 132-134.
- Lebel, P., Letellier, A., Longpré, J., Laplante, B., Yergeau, E. et Fravalo, P. (2017). Feed Presentation Options in Swine Early Fattening Mitigates *Salmonella* Shedding and Specifically Modulates the Faecal Microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 122, 30-39.
- Lederberg, J. et Mccray, A.T. (2001). Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The Scientist* 15, 8-8.
- Legendre, P. et Legendre, L.F. (2012). *Numerical ecology*. Elsevier.
- Leong, I.U., Skinner, J.R. et Love, D.R. (2014). Application of massively parallel sequencing in the clinical diagnostic testing of inherited cardiac conditions. *Medical Sciences* 2, 98-126.
- Letellier, A., Beauchamp, G., Guévremont, E., D'allaire, S., Hurnik, D. et Quessy, S. (2009). Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. *Journal of food protection* 72, 2326-2331.
- Levast, B., Berri, M., Wilson, H.L., Meurens, F. et Salmon, H. (2014). Development of gut immunoglobulin A production in piglet in response to innate and environmental factors. *Developmental & Comparative Immunology* 44, 235-244.
- Lewis, M.C., Inman, C.F., Patel, D., Schmidt, B., Mulder, I., Miller, B., Gill, B.P., Pluske, J., Kelly, D., Stokes, C.R. et Bailey, M. (2012). Direct experimental evidence that early-life farm environment influences regulation of immune responses. *Pediatric Allergy and Immunology* 23, 265-269.
- Li, M., Bauer, L.L., Chen, X., Wang, M., Kuhlenschmidt, T.B., Kuhlenschmidt, M.S., Fahey, G.C., Jr. et Donovan, S.M. (2012). Microbial composition and in vitro fermentation patterns of human milk oligosaccharides and prebiotics differ between formula-fed and sow-reared piglets. *Journal of Nutrition* 142, 681-689.

- Li, X., Jensen, R.L., Højberg, O., Canibe, N. et Jensen, B.B. (2015). *Olsenella scatoligenes* sp. nov., a 3-methylindole- (skatole) and 4-methylphenol- (p-cresol) producing bacterium isolated from pig faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 1227-1233.
- Li, Y., Tian, Y., Zhu, W., Gong, J., Gu, L., Zhang, W., Guo, Z., Li, N. et Li, J. (2014). Cesarean delivery and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 834-844.
- Liggins, M., Ramirez, N., Magnuson, N. et Abel-Santos, E. (2011). Progesterone analogs influence germination of *Clostridium sordellii* and *Clostridium difficile* spores in vitro. *Journal of bacteriology* 193, 2776-2783.
- Ling, Z., Liu, X., Jia, X., Cheng, Y., Luo, Y., Yuan, L., Wang, Y., Zhao, C., Guo, S., Li, L., Xu, X. et Xiang, C. (2014). Impacts of infection with different toxigenic *Clostridium difficile* strains on faecal microbiota in children. *Scientific Reports* 4, 7485.
- Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D. et Ma, X. (2018). Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Advances in Nutrition* 9, 21-29.
- Liu, H., Zeng, X., Zhang, G., Hou, C., Li, N., Yu, H., Shang, L., Zhang, X., Trevisi, P., Yang, F., Liu, Z. et Qiao, S. (2019). Maternal milk and fecal microbes guide the spatiotemporal development of mucosa-associated microbiota and barrier function in the porcine neonatal gut. *BMC Biology* 17, 106.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. et Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 63, 4516-4522.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Dahl, J., Stege, H., Van Der Wolf, P.J., Leontides, L., Von Altrock, A. et Thorberg, B.M. (2004). Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Preventive veterinary medicine* 62, 253-266.
- Locascio, R.G., Ninonuevo, M.R., Freeman, S.L., Sela, D.A., Grimm, R., Lebrilla, C.B., Mills, D.A. et German, J.B. (2007). Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain

- glycans secreted in early human lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8914-8919.
- Long, M., Lai, H., Deng, W., Zhou, K., Li, B., Liu, S., Fan, L., Wang, H. et Zou, L. (2016). Disinfectant susceptibility of different Salmonella serotypes isolated from chicken and egg production chains. *Journal of Applied Microbiology* 121, 672-681.
- Longpré, J., Fairbrother, J.M., Fravallo, P., Arsenault, J., Lebel, P., Laplante, B., Surprenant, C., Massé, D. et Letellier, A. (2016). Impact of mash feeding versus pellets on propionic/butyric acid levels and on total Escherichia coli load in the gastrointestinal tract of growing pigs¹. *Journal of Animal Science* 94, 1053-1063.
- Looft, T., Allen, H.K., Cantarel, B.L., Levine, U.Y., Bayles, D.O., Alt, D.P., Henrissat, B. et Stanton, T.B. (2014). Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *The ISME Journal* 8, 1566-1576.
- Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M. et Stanton, T.B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1691-1696.
- Loonen, L.M., Stolte, E.H., Jaklofsky, M.T., Meijerink, M., Dekker, J., Van Baarlen, P. et Wells, J.M. (2014). REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunology* 7, 939-947.
- Lotz, M., Gutle, D., Walther, S., Menard, S., Bogdan, C. et Hornef, M.W. (2006). Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine* 203, 973-984.
- Louca, S., Doebeli, M. et Parfrey, L.W. (2018). Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome* 6, 41.
- Love, B.C. et Rostagno, M.H. (2008). Comparison of Five Culture Methods for Salmonella Isolation from Swine Fecal Samples of Known Infection Status. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 620-624.

- Ludvigsen, J., Svihus, B. et Rudi, K. (2016). Rearing Room Affects the Non-dominant Chicken Cecum Microbiota, While Diet Affects the Dominant Microbiota. *Frontiers in Veterinary Science* 3, 16.
- Lynch, H., Leonard, F.C., Walia, K., Lawlor, P.G., Duffy, G., Fanning, S., Markey, B.K., Brady, C., Gardiner, G.E. et Argüello, H. (2017). Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat Salmonella in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 139, 50-57.
- Lynch, H., Walia, K., Leonard, F.C., Lawlor, P.G., Manzanilla, E.G., Grant, J., Duffy, G., Gardiner, G.E., Cormican, M., King, J., Markey, B.K., Fanning, S. et Argüello, H. (2018). Salmonella in breeding pigs: Shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to-finish herds. *Zoonoses and Public Health* 65, e196-e206.
- Macdougall, L., Majowicz, S., Doré, K., Flint, J., Thomas, K., Kovacs, S. et Sockett, P. (2008). Under-reporting of infectious gastrointestinal illness in British Columbia, Canada: who is counted in provincial communicable disease statistics? *Epidemiology and Infection* 136, 248-256.
- Mach, N., Berri, M., Estellé, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., Leplat, J.-J., Chevalere, C., Billon, Y., Doré, J., Rogel-Gaillard, C. et Lepage, P. (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports* 7, 554-569.
- Madec, F., Humbert, F., Salvat, G. et Maris, P. (1999). Measurement of the Residual Contamination of Post-Weaning Facilities for Pigs and Related Risk Factors. *Journal of Veterinary Medicine* 46, 47-56.
- Magistrali, C.F., D'avino, N., Ciuti, F., Cucco, L., Maresca, C., Panicià, M., Scoccia, E., Tentellini, M. et Pezzotti, G. (2011). Longitudinal study of fecal Salmonella shedding by sows. *Journal of Swine Health and Production* 19, 326-330.
- Magossi, G., Cernicchiaro, N., Dritz, S., Houser, T., Woodworth, J., Jones, C. et Trinetta, V. (2019). Evaluation of Salmonella presence in selected United States feed mills. *MicrobiologyOpen* 8, e00711.
- Main, R.G., Dritz, S.S., Tokach, M.D., Goodband, R.D. et Nelssen, J.L. (2004). Increasing weaning age improves pig performance in a multisite production system. *J Anim Sci* 82, 1499-1507.

- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. et Hoekstra, R.M. (2010). The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 50, 882-889.
- Malago, J.J., Koninkx, J.F.J.G., Tooten, P.C.J., Van Liere, E.A. et Van Dijk, J.E. (2005). Anti-inflammatory properties of heat shock protein 70 and butyrate on Salmonella-induced interleukin-8 secretion in enterocyte-like Caco-2 cells. *Clinical & Experimental Immunology* 141, 62-71.
- Maltby, R., Leatham-Jensen, M.P., Gibson, T., Cohen, P.S. et Conway, T. (2013). Nutritional basis for colonization resistance by human commensal Escherichia coli strains HS and Nissle 1917 against E. coli O157:H7 in the mouse intestine. *PLOS One* 8, e53957-e53957.
- Mannion, C., Fanning, J., McLernon, J., Lendrum, L., Gutierrez, M., Duggan, S. et Egan, J. (2012). The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of Salmonella spp. in pigs in Ireland. *Food Research International* 45, 871-879.
- Mapaq (2017). *Bilan annuel 2014-2015 - Toxi-infections alimentaires* [Online]. Available: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/Publications/Pages/Details-Publication.aspx?guid=%7B6ce68451-595d-4e80-8259-e0384c883abc%7D> [Accessed 2020].
- Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E.D., Pudlo, N., Martens, E.C., Desai, P., Lebrilla, C.B., Weimer, B.C., Mills, D.A., German, J.B. et Sonnenburg, J.L. (2011). Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe* 10, 507-514.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., Mcdade, K.E., Mckenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A.,

- Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F. et Rothberg, J.M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.
- Marin, C., Hernandez, A. et Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science* 88, 424-431.
- Martin, R., Heilig, G.H., Zoetendal, E.G., Smidt, H. et Rodriguez, J.M. (2007). Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2638-2644.
- Martinez, K.A., Devlin, J.C., Lacher, C.R., Yin, Y., Cai, Y., Wang, J. et Dominguez-Bello, M.G. (2017). Increased weight gain by C-section: Functional significance of the primordial microbiome. *Science Advances* 3, eaao1874.
- Martiny, D., Dediste, A., Anglade, C., Vlaes, L., Moens, C., Mohamed, S. et Vandenberg, O. (2016). Performance of the chromID Salmonella Elite chromogenic agar in comparison with CHROMagar™ Salmonella, Oxoid™ Brilliance™ Salmonella and Hektoen agars for the isolation of Salmonella from stool specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 86, 128-130.
- Massacci, F.R., Berri, M., Lemonnier, G., Guettier, E., Blanc, F., Jarret, D., Rossignol, M.N., Mercat, M.-J., Doré, J., Lepage, P., Rogel-Gaillard, C. et Estellé, J. (2020). Late weaning is associated with increased microbial diversity and Faecalibacterium prausnitzii abundance in the fecal microbiota of piglets. *Animal Microbiome* 2, 2.
- Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., Babak, V. et Faldyna, M. (2013). Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *The Veterinary Journal* 196, 114-115.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. et Tanaka, R. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 167-173.
- Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K. et Kato, H. (2002). Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal Lactobacillus species from mothers to newborn infants in

- Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Infection and Chemotherapy* 8, 43-49.
- Mccracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A. et Gaskins, H.R. (1999). Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition* 129, 613-619.
- Mcguire, M.K. et Mcguire, M.A. (2017). Got bacteria? The astounding, yet not-so-surprising, microbiome of human milk. *Current Opinion in Biotechnology* 44, 63-68.
- Mcmurdie, P.J. et Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS One* 8, e61217.
- Meng, D., Newburg, D.S., Young, C., Baker, A., Tonkonogy, S.L., Sartor, R.B., Walker, W.A. et Nanthakumar, N.N. (2007). Bacterial symbionts induce a FUT2-dependent fucosylated niche on colonic epithelium via ERK and JNK signaling. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 293, G780-787.
- Merialdi, G., Barigazzi, G., Bonilauri, P., Tittarelli, C., Bonci, M., D'incal, M. et Dottori, M. (2008). Longitudinal Study of Salmonella Infection in Italian Farrow-To-Finish Swine Herds. *Zoonoses and Public Health* 55, 222-226.
- Mesa, M.D., Loureiro, B., Iglesia, I., Fernandez Gonzalez, S., Llubra Olivé, E., García Algar, O., Solana, M.J., Cabero Perez, M.J., Sainz, T., Martinez, L., Escuder-Vieco, D., Parra-Llorca, A., Sánchez-Campillo, M., Rodriguez Martinez, G., Gómez Roig, D., Perez Gruz, M., Andreu-Fernández, V., Clotet, J., Sailer, S., Iglesias-Platas, I., López-Herce, J., Aras, R., Pallás-Alonso, C., De Pipaon, M.S., Vento, M., Gormaz, M., Larqué Daza, E., Calvo, C. et Cabañas, F. (2020). The Evolving Microbiome from Pregnancy to Early Infancy: A Comprehensive Review. *Nutrients* 12, 133.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11, 31-46.
- Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S. et Jensen, B.B. (2004). Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3485-3492.

- Ministère De La Santé Et Des Services Sociaux Du Québec (2019). *Surveillance des maladies à déclaration obligatoire au Québec - Définitions nosologiques - Maladies d'origine infectieuse - 12e édition* [Online]. Available: <https://publications.msss.gouv.qc.ca/msss/document-000480/> [Accessed].
- Ministry of Health and Long-Term Care of Ontario (2019). *Appendix B: Provincial Case Definitions for Diseases of Public Health Significance, Disease: Salmonellosis* [Online]. Available: http://www.health.gov.on.ca/en/pro/programs/publichealth/oph_standards/docs/salmonellosis_cd.pdf [Accessed].
- Missotten, J.a.M., Michiels, J., Degroote, J. et De Smet, S. (2015). Fermented liquid feed for pigs: an ancient technique for the future. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6, 4.
- Mitsuoka, T. (2014). Establishment of intestinal bacteriology. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 33, 99-116.
- Molla, B., Sterman, A., Mathews, J., Artuso-Ponte, V., Abley, M., Farmer, W., Rajala-Schultz, P., Morrow, W.E.M. et Gebreyes, W.A. (2010). Salmonella enterica in commercial swine feed and subsequent isolation of phenotypically and genotypically related strains from fecal samples. *Applied and environmental microbiology* 76, 7188-7193.
- Moor, K., Diard, M., Sellin, M.E., Felmy, B., Wotzka, S.Y., Toska, A., Bakkeren, E., Arnoldini, M., Bansept, F., Co, A.D., Voller, T., Minola, A., Fernandez-Rodriguez, B., Agatic, G., Barbieri, S., Piccoli, L., Casiraghi, C., Corti, D., Lanzavecchia, A., Regoes, R.R., Loverdo, C., Stocker, R., Brumley, D.R., Hardt, W.D. et Slack, E. (2017). High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature* 544, 498-502.
- Moossavi, S. et Azad, M.B. (2019). Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes*, 1-10.
- Moossavi, S., Miliku, K., Sepehri, S., Khafipour, E. et Azad, M.B. (2018). The Prebiotic and Probiotic Properties of Human Milk: Implications for Infant Immune Development and Pediatric Asthma. *Frontiers in pediatrics* 6, 197.
- Morel, P.C.H. et Cottam, Y.H. (2007). Effects of Particle Size of Barley on Intestinal Morphology, Growth Performance and Nutrient Digestibility in Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20, 1738-1745.

- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., Leleiko, N., Snapper, S.B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B.E., Xavier, R.J. et Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology* 13, R79.
- Morisse, J.P. et Cotte, J.P. (1994). Evaluation of some risks factors in bovine salmonellosis. *Veterinary Research* 25, 185-191.
- Morse, S.A. et Fitzgerald, T.J. (1974). Effect of progesterone on Neisseria gonorrhoeae. *Infection and Immunity* 10, 1370-1377.
- Mughini-Gras, L., Kooh, P., Fravallo, P., Augustin, J.-C., Guillier, L., David, J., Thébault, A., Carlin, F., Leclercq, A., Jourdan-Da-Silva, N., Pavio, N., Villena, I., Sanaa, M. et Watier, L. (2019). Critical Orientation in the Jungle of Currently Available Methods and Types of Data for Source Attribution of Foodborne Diseases. *Frontiers in Microbiology* 10, 2578.
- Mulder, I.E., Schmidt, B., Stokes, C.R., Lewis, M., Bailey, M., Aminov, R.I., Prosser, J.I., Gill, B.P., Pluske, J.R., Mayer, C.-D., Musk, C.C. et Kelly, D. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC biology* 7, 79-79.
- Muñoz-Vargas, L., Opiyo, S.O., Digianantonio, R., Williams, M.L., Wijeratne, A. et Habing, G. (2018). Fecal microbiome of periparturient dairy cattle and associations with the onset of Salmonella shedding. *PLOS One* 13, e0196171.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. et Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Nagai, F., Watanabe, Y. et Morotomi, M. (2010). Slackia piriformis sp. nov. and Collinsella tanakaei sp. nov., new members of the family Coriobacteriaceae, isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2639-2646.
- Nakajima, A., Vogelzang, A., Maruya, M., Miyajima, M., Murata, M., Son, A., Kuwahara, T., Tsuruyama, T., Yamada, S., Matsuura, M., Nakase, H., Peterson, D.A., Fagarasan, S. et Suzuki, K. (2018). IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota

- by promoting symbiosis between bacteria. *Journal of Experimental Medicine* 215, 2019-2034.
- Nakano, T., Sugawara, M. et Kawakami, H. (2001). Sialic acid in human milk: composition and functions. *Acta Paediatrica Taiwanica* 42, 11-17.
- National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (Ncezid) (2018). *National enteric disease surveillance: Salmonella annual report, 2016* [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf> [Accessed 2020].
- Ni, J., Friedman, H., Boyd, B.C., Mcgurn, A., Babinski, P., Markossian, T. et Dugas, L.R. (2019). Early antibiotic exposure and development of asthma and allergic rhinitis in childhood. *BMC pediatrics* 19, 225-225.
- Niu, Q., Li, P., Hao, S., Kim, S.W., Du, T., Hua, J. et Huang, R. (2019). Characteristics of Gut Microbiota in Sows and Their Relationship with Apparent Nutrient Digestibility. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 870.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., De Kruif, A., De Zutter, L. et Maes, D. (2005a). Salmonella in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research* 36, 645-656.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., Duchateau, L., De Zutter, L., De Kruif, A. et Maes, D. (2005b). Distribution of Salmonella Strains in Farrow-to-Finish Pig Herds: A Longitudinal Study. *Journal of food protection* 68, 2012-2021.
- Nowland, T.L., Plush, K.J., Barton, M. et Kirkwood, R.N. (2019). Development and Function of the Intestinal Microbiome and Potential Implications for Pig Production. *Animals* 9, 76.
- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H. et Koren, O. (2016). Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in Microbiology* 7, 1031.
- O'mahony, S.M., Marchesi, J.R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.M., Quigley, E.M., Cryan, J.F. et Dinan, T.G. (2009). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological Psychiatry* 65, 263-267.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., O'hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E. et Wagner, H. (2018). *vegan*:

- Community Ecology Package* [Online]. Available: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> [Accessed 2018].
- Oliveira, C.J.B., Carvalho, L.F.O.S. et Garcia, T.B. (2006). Experimental airborne transmission of *Salmonella Agona* and *Salmonella Typhimurium* in weaned pigs. *Epidemiology and Infection* 134, 199-209.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L. et Blumberg, R.S. (2012). Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science* 336, 489-493.
- Osman, M.-A., Neoh, H.-M., Ab Mutalib, N.-S., Chin, S.-F. et Jamal, R. (2018). 16S rRNA Gene Sequencing for Deciphering the Colorectal Cancer Gut Microbiome: Current Protocols and Workflows. *Frontiers in Microbiology* 9, 767.
- Oxoid *XLT-4* *AGAR* [Online]. Available: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1061&org=124&c=UK&lang=EN [Accessed 2020].
- Oxoid *BRILLIANCE* *SALMONELLA* *AGAR* *BASE* [Online]. Available: http://www.oxid.com/CA/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1092&c=CA&lang=EN [Accessed 2020].
- Oxoid *BRILLIANT* *GREEN* *AGAR* [Online]. Available: http://www.oxid.com/CA/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0263&c=CA&lang=EN [Accessed 2020].
- Oxoid *RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) ENRICHMENT BROTH* [Online]. Available: http://www.oxid.com/CA/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0669&c=CA&lang=EN [Accessed 2020].
- Oxoid *X.L.D.* *AGAR* [Online]. Available: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN [Accessed 2020].
- Pacbio (2020). *SMRT sequencing modes* [Online]. Available: <https://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/smrt-sequencing-modes/> [Accessed 2020].

- Pajarillo, E.a.B., Chae, J.P., Balolong, M.P., Bum Kim, H. et Kang, D.K. (2014). Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *Journal of General and Applied Microbiology - J-Stage* 60, 140-146.
- Palmer, C., Bik, E.M., Digiulio, D.B., Relman, D.A. et Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLOS Biology* 5, e177.
- Park, S.-C. et Won, S. (2018). Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community. *Genomics & informatics* 16, e24-e24.
- Park, S.-K., Kim, M.-S. et Bae, J.-W. (2013). *Blautia faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 599-603.
- Pei, A.Y., Oberdorf, W.E., Nossa, C.W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E.A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L. et Poles, M. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3886-3897.
- Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J. et Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics* 119, e724-e732.
- Perry, J.D. (2017). A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews* 30, 449-479.
- Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L. et Gordon, J.I. (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2, 328-339.
- Petri, D., Hill, J.E. et Van Kessel, A.G. (2010). Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. *Livestock Science* 133, 107-109.
- Phumisantiphong, U., Siripanichgon, K., Reamtong, O. et Diraphat, P. (2017). A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. *PLOS One* 12, e0186415-e0186415.
- Pires, S.M., De Knecht, L. et Hald, T. (2011). Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. *EFSA Supporting Publications* 8, 184E.

- Pires, S.M., Vieira, A.R., Hald, T. et Cole, D. (2014). Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 667-676.
- Plunkett, C.H. et Nagler, C.R. (2017). The Influence of the Microbiome on Allergic Sensitization to Food. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198, 581-589.
- Pollock, J., Gally, D.L., Glendinning, L., Tiwari, R., Hutchings, M.R. et Houdijk, J.G.M. (2018a). Analysis of temporal fecal microbiota dynamics in weaner pigs with and without exposure to enterotoxigenic *Escherichia coli* 1,2. *Journal of Animal Science* 96, 3777-3790.
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T. et Watson, M. (2018b). The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus "Best Practice" for 16S Microbiome Studies. *Applied and Environmental Microbiology* 84.
- Poppe, C., Mann, E., Shaw, S., Warburton, D. et Sewell, A. (2004). Procedures for the isolation of *Salmonella* species by the modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) method, MFLP-75. *Compendium of analytical methods*.
- Poroyko, V., Morowitz, M., Bell, T., Ulanov, A., Wang, M., Donovan, S., Bao, N., Gu, S., Hong, L., Alverdy, J.C., Bergelson, J. et Liu, D.C. (2011). Diet creates metabolic niches in the "immature gut" that shape microbial communities. *Nutricion hospitalaria* 26, 1283-1295.
- Potapov, V. et Ong, J.L. (2017). Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. *PLOS One* 12, e0169774-e0169774.
- Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A.H., Nieuwdorp, M. et Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS One* 15, e0227434.
- Proux, K., Cariolet, R., Fravallo, P., Houdayer, C., Keranflech, A. et Madec, F. (2001). Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary Research* 32, 591-600.
- Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S. et Flint, H.J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 217, 133-139.
- Qiu, K., Zhang, X., Jiao, N., Xu, D., Huang, C., Wang, Y. et Yin, J. (2018). Dietary protein level affects nutrient digestibility and ileal microbiota structure in growing pigs. *Animal Science Journal* 89, 537-546.

- Rabhi, N., Thibodeau, A., Côté, J.-C., Devillers, N., Laplante, B., Fravallo, P., Larivière-Gauthier, G., Thériault, W., Faucitano, L., Beauchamp, G. et Quessy, S. (2020). Association between intestinal microbiota composition and tail-biting in pigs. *Research Square*.
- Rajic, A., Keenlside, J., Mcfall, M.E., Deckert, A.E., Muckle, A.C., O'connor, B.P., Manninen, K., Dewey, C.E. et Mcewen, S.A. (2005). Longitudinal study of Salmonella species in 90 Alberta swine finishing farms. *Veterinary Microbiology* 105, 47-56.
- Rajić, A., O'connor, B.P., Deckert, A.E., Keenlside, J., Mcfall, M.E., Reid-Smith, R.J., Dewey, C.E. et Mcewen, S.A. (2007). Farm-level risk factors for the presence of Salmonella in 89 Alberta swine-finishing barns. *Canadian journal of veterinary research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 71, 264-270.
- Ramsay, D.T., Kent, J.C., Owens, R.A. et Hartmann, P.E. (2004). Ultrasound Imaging of Milk Ejection in the Breast of Lactating Women. *Pediatrics* 113, 361-367.
- Rao, S., Srinivasjois, R. et Patole, S. (2009). Prebiotic Supplementation in Full-term Neonates: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 163, 755-764.
- Rautava, S., Collado, M.C., Salminen, S. et Isolauri, E. (2012). Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology* 102, 178-184.
- Ravel, A., Greig, J., Tinga, C., Todd, E., Campbell, G., Cassidy, M., Marshall, B. et Pollari, F. (2009). Exploring Historical Canadian Foodborne Outbreak Data Sets for Human Illness Attribution. *Journal of food protection* 72, 1963-1976.
- Reid, A. (2009). MFHPB-20: isolation and identification of Salmonella from food and environmental samples. *Compendium of analytical methods*.
- Renz-Polster, H., David, M.R., Buist, A.S., Vollmer, W.M., O'connor, E.A., Frazier, E.A. et Wall, M.A. (2005). Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clinical & Experimental Allergy* 35, 1466-1472.
- Reuter, J.A., Spacek, D.V. et Snyder, M.P. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Molecular cell* 58, 586-597.

- Rhoads, A. et Au, K.F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13, 278-289.
- Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F. et Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica* 59, 31.
- Riley, M.A. et Gordon, D.M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology* 7, 129-133.
- Rios-Covian, D., Salazar, N., Gueimonde, M. et De Los Reyes-Gavilan, C.G. (2017). Shaping the Metabolism of Intestinal Bacteroides Population through Diet to Improve Human Health. *Frontiers in Microbiology* 8, 376.
- Rivera-Chávez, F., Lopez, C.A. et Bäumlér, A.J. (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radical Biology and Medicine* 105, 93-101.
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F. et De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology* 7, 979.
- Rodriguez-R, L.M. et Konstantinidis, K.T. (2014). Estimating coverage in metagenomic data sets and why it matters. *The ISME Journal* 8, 2349-2351.
- Rogier, E.W., Frantz, A.L., Bruno, M.E., Wedlund, L., Cohen, D.A., Stromberg, A.J. et Kaetzel, C.S. (2014). Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 3074-3079.
- Rolhion, N. et Chassaing, B. (2016). When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 371, 20150504.
- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J.F., Marran, D., Myers, J.W., Davidson, J.F., Branting, A., Nobile, J.R., Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., Branciforte, J.T., Stoner, I.B., Cawley, S.E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas,

- R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., Mckernan, K.J., Williams, A., Roth, G.T. et Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348-352.
- Rothrock, M.J. et Locatelli, A. (2019). Importance of Farm Environment to Shape Poultry-Related Microbiomes Throughout the Farm-to-Fork Continuum of Pasture-Raised Broiler Flocks. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 3.
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A. et Mazmanian, S.K. (2011). The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 332, 974-977.
- Ruiz, L., García-Carral, C. et Rodriguez, J.M. (2019). Unfolding the Human Milk Microbiome Landscape in the Omics Era. *Frontiers in Microbiology* 10, 1378.
- Ryan, F.J., Drew, D.P., Douglas, C., Leong, L.E.X., Moldovan, M., Lynn, M., Fink, N., Sribnaia, A., Penttila, I., Mcphee, A.J., Collins, C.T., Makrides, M., Gibson, R.A., Rogers, G.B. et Lynn, D.J. (2019). Changes in the Composition of the Gut Microbiota and the Blood Transcriptome in Preterm Infants at Less than 29 Weeks Gestation Diagnosed with Bronchopulmonary Dysplasia. *mSystems* 4, e00484-00419.
- Saeidabadi, M.S., Nili, H., Dadras, H., Sharifiyazdi, H., Connolly, J., Valcanis, M., Raidal, S. et Ghorashi, S.A. (2017). Evaluation of PCR and high-resolution melt curve analysis for differentiation of Salmonella isolates. *Avian Pathology* 46, 319-331.
- Salzman, N.H. et Bevins, C.L. (2013). Dysbiosis—A consequence of Paneth cell dysfunction. *Seminars in Immunology* 25, 334-341.
- Sanglard, L.P., Schmitz-Esser, S., Gray, K.A., Linhares, D.C.L., Yeoman, C.J., Dekkers, J.C.M., Niederwerder, M.C. et Serão, N.V.L. (2020). Investigating the relationship between vaginal microbiota and host genetics and their impact on immune response and farrowing traits in commercial gilts. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 137, 84-102.
- Santos, J., Yang, P.-C., Söderholm, J.D., Benjamin, M. et Perdue, M.H. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 48, 630-636.

- Sara, A.-B., P., V.J., Victoria, G., Sofía, S., Silvia, H.-L., Cristina, D.F. et C., M.-J.R. (2014). Role of Wild Bird and Rodents in the Epidemiology of Subclinical Salmonellosis in Finishing Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 689-697.
- Sassone-Corsi, M., Nuccio, S.-P., Liu, H., Hernandez, D., Vu, C.T., Takahashi, A.A., Edwards, R.A. et Raffatellu, M. (2016). Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature* 540, 280-283.
- Scharff, R. (2020). Food Attribution and Economic Cost Estimates for Meat and Poultry Related Illnesses. *Journal of food protection*.
- Scherer, K., Szabo, I., Rosler, U., Appel, B., Hensel, A. et Nockler, K. (2008). Time course of infection with *Salmonella typhimurium* and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *Journal of food protection* 71, 699-705.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. et Weber, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.
- Schokker, D., Zhang, J., Zhang, L.-L., Vastenhouw, S.A., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., Rebel, J.M.J. et Smits, M.A. (2014). Early-Life Environmental Variation Affects Intestinal Microbiota and Immune Development in New-Born Piglets. *PLOS One* 9, e100040.
- Schroeder, B.O. (2019). Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology report* 7, 3-12.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W. et Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of experimental medicine* 206, 3101-3114.
- Sender, R., Fuchs, S. et Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164, 337-340.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J. et Roy, N.C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of inflammation* 2013, 237921-237921.

- Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J.R., Walland, A.C., Bornstein, V.U., Chen, K., He, B., Cassis, L., Bigas, A., Cols, M., Comerma, L., Huang, B., Blander, J.M., Xiong, H., Mayer, L., Berin, C., Augenlicht, L.H., Velcich, A. et Cerutti, A. (2013). Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science* 342, 447-453.
- Shao, Y., Forster, S.C., Tsaliki, E., Vervier, K., Strang, A., Simpson, N., Kumar, N., Stares, M.D., Rodger, A., Brocklehurst, P., Field, N. et Lawley, T.D. (2019). Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* 574, 117-121.
- Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeeler, P., Jacques, M. et Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 387.
- Silva (2019). Available: <https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/> [Accessed 2020].
- Smith, H.W. (1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 90, 495-513.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N. et Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 569-573.
- Song, S.J., Amir, A., Metcalf, J.L., Amato, K.R., Xu, Z.Z., Humphrey, G. et Knight, R. (2016). Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies. *mSystems* 1, e00021-00016.
- Sperling, J.L., Silva-Brandão, K.L., Brandão, M.M., Lloyd, V.K., Dang, S., Davis, C.S., Sperling, F.a.H. et Magor, K.E. (2017). Comparison of bacterial 16S rRNA variable regions for microbiome surveys of ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* 8, 453-461.
- Spring, S., Premathilake, H., Desilva, U., Shili, C., Carter, S. et Pezeshki, A. (2020). Low Protein-High Carbohydrate Diets Alter Energy Balance, Gut Microbiota Composition and Blood Metabolomics Profile in Young Pigs. *Scientific Reports* 10, 3318.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V. et Gordon, J.I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15451-15455.

- Starke, I.C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J. et Vahjen, W. (2013). Individual responses of mother sows to a probiotic *Enterococcus faecium* strain lead to different microbiota composition in their offspring. *Beneficial Microbes* 4, 345-356.
- Steel, J.H., Malatos, S., Kennea, N., Edwards, A.D., Miles, L., Duggan, P., Reynolds, P.R., Feldman, R.G. et Sullivan, M.H. (2005). Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric research* 57, 404-411.
- Stinson, L.F., Payne, M.S. et Keelan, J.A. (2018). A Critical Review of the Bacterial Baptism Hypothesis and the Impact of Cesarean Delivery on the Infant Microbiome. *Frontiers in medicine* 5, 135-135.
- Stokes, C.R. (2017). The development and role of microbial-host interactions in gut mucosal immune development. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8, 12.
- Stokes, C.R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., Pié, S., Oswald, I.P., Williams, B.A., Akkermans, A.D.L., Sowa, E., Rothkötter, H.-J. et Miller, B.G. (2004). Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Animal Research* 53, 325-334.
- Suh, S.H., Choe, K., Hong, S.P., Jeong, S.-H., Mäkinen, T., Kim, K.S., Alitalo, K., Surh, C.D., Koh, G.Y. et Song, J.-H. (2019). Gut microbiota regulates lacteal integrity by inducing VEGF-C in intestinal villus macrophages. *EMBO reports* 20, e46927.
- Sun, Y. et O'riordan, M.X.D. (2013). Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain Fatty acids. *Advances in applied microbiology* 85, 93-118.
- Sweeney, T. et O'doherty, J.V. (2016). Marine macroalgal extracts to maintain gut homeostasis in the weaning piglet. *Domestic Animal Endocrinology* 56, Supplement, S84-S89.
- Swords, W., Wu, C.-C., Champlin, F. et Buddington, R. (1993). Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Neonatology* 63, 191-200.
- Tajima, K. et Aminov, R. (2015). "Structure and Function of a Nonruminant Gut: A Porcine Model," in *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India, 47-75.
- Talham, G.L., Jiang, H.-Q., Bos, N.A. et Cebra, J.J. (1999). Segmented Filamentous Bacteria Are Potent Stimuli of a Physiologically Normal State of the Murine Gut Mucosal Immune System. *Infection and Immunity* 67, 1992-2000.

- Tang, X.-S., Shao, H., Li, T.-J., Tang, Z.-R., Huang, R.-L., Wang, S.-P., Kong, X.-F., Wu, X. et Yin, Y.-L. (2012). Dietary Supplementation with Bovine Lactoferrampin–Lactoferricin Produced by *Pichia pastoris* Fed-batch Fermentation Affects Intestinal Microflora in Weaned Piglets. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168, 887-898.
- Tao, N., Ochonicky, K.L., German, J.B., Donovan, S.M. et Lebrilla, C.B. (2010). Structural Determination and Daily Variations of Porcine Milk Oligosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 4653-4659.
- Theriot, C.M., Bowman, A.A. et Young, V.B. (2016). Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere* 1, e00045-00015.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, É., Arsenault, J., Lahaye, L. et Letellier, A. (2015). Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *Campylobacter jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLOS One* 10, e0131978.
- Thibodeau, A., Letellier, A., Yergeau, É., Larrivière-Gauthier, G. et Fravallo, P. (2017). Lack of Evidence That Selenium-Yeast Improves Chicken Health and Modulates the Caecal Microbiota in the Context of Colonization by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology* 8, 451.
- Thiennimitr, P., Winter, S.E. et Bäumler, A.J. (2012). Salmonella, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology* 15, 108-114.
- Thomas, M.K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Fazil, A., Nesbitt, A., Marshall, B., Tataryn, J. et Pollari, F. (2015a). Estimates of foodborne illness-related hospitalizations and deaths in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents. *Foodborne pathogens and disease* 12, 820-827.
- Thomas, M.K., Murray, R., Flockhart, L., Pintar, K., Pollari, F., Fazil, A., Nesbitt, A. et Marshall, B. (2013). Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 639-648.
- Thomas, V., Clark, J. et Doré, J. (2015b). Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiology* 10, 1485-1504.

- Tissier, H. (1900). *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons:(état normal et pathologique)*.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 799-809.
- U.S. Food and Drug Administration (2012). *FDA's bacteriological analytical manual (BAM) chapter 5: Salmonella* [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-chapter-5-salmonella> [Accessed].
- Ubeda, C., Djukovic, A. et Isaac, S. (2017). Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & Translational Immunology* 6, e128.
- Uribe, J.H., Collado-Romero, M., Zaldivar-Lopez, S., Arce, C., Bautista, R., Carvajal, A., Cirera, S., Claros, M.G. et Garrido, J.J. (2016). Transcriptional analysis of porcine intestinal mucosa infected with Salmonella Typhimurium revealed a massive inflammatory response and disruption of bile acid absorption in ileum. *Veterinary Research* 47, 11.
- Ursell, L.K., Metcalf, J.L., Parfrey, L.W. et Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition reviews* 70 Suppl 1, S38-S44.
- Us Department of Agriculture (2014). Cost Estimates of Foodborne Illnesses estimates for Salmonella (non-typhoidal).
- Us Department of Agriculture (2017). Isolation and identification of Salmonella from meat, poultry, pasteurized egg, and Siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. *Microbiological laboratory guidebook*.
- Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E. et Spector, T.D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 361, k2179.
- Van Der Sluis, M., De Koning, B.a.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B. et Einerhand, A.W.C. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* 131, 117-129.
- Van Winsen, R.L., Urlings, B.A., Lipman, L.J., Snijders, J.M., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H. et Van Knapen, F. (2001). Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Applied and environmental microbiology* 67, 3071-3076.

- Veldman, A., Vahl, H.A., Borggreve, G.J. et Fuller, D.C. (1995). A survey of the incidence of Salmonella species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Veterinary Record* 136, 169-172.
- Verbrugghe, E., Dhaenens, M., Leyman, B., Boyen, F., Shearer, N., Van Parys, A., Haesendonck, R., Bert, W., Favoreel, H., Deforce, D., Thompson, A., Haesebrouck, F. et Pasmans, F. (2016). Host Stress Drives Salmonella Recrudescence. *Scientific Reports* 6, 20849.
- Větrovský, T. et Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS One* 8, e57923.
- Videnska, P., Sisak, F., Havlickova, H., Faldynova, M. et Rychlik, I. (2013). Influence of Salmonella enterica serovar Enteritidis infection on the composition of chicken cecal microbiota. *BMC veterinary research* 9, 140.
- Vigo, G.B., Cappuccio, J.A., Piñeyro, P.E., Salve, A., Machuca, M.A., Quiroga, M.A., Moredo, F., Giacoboni, G., Cancer, J.L., Caffer, I.G., Binsztein, N., Pichel, M. et Perfumo, C.J. (2009). Salmonella enterica Subclinical Infection: Bacteriological, Serological, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Antimicrobial Resistance Profiles—Longitudinal Study in a Three-Site Farrow-to-Finish Farm. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 965-972.
- Vukmirović, Đ., Čolović, R., Rakita, S., Brlek, T., Đuragić, O. et Solà-Oriol, D. (2017). Importance of feed structure (particle size) and feed form (mash vs. pellets) in pig nutrition – A review. *Animal Feed Science and Technology* 233, 133-144.
- Wagner Mackenzie, B., Waite, D.W. et Taylor, M.W. (2015). Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Frontiers in microbiology* 6, 130.
- Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Grant, J., Leonard, F.C., Lawlor, P.G., Gardiner, G.E. et Duffy, G. (2017). The efficacy of different cleaning and disinfection procedures to reduce Salmonella and Enterobacteriaceae in the lairage environment of a pig abattoir. *International Journal of Food Microbiology* 246, 64-71.
- Walia, K., Argüello, H., Lynch, H., Leonard, F.C., Grant, J., Yearsley, D., Kelly, S., Duffy, G., Gardiner, G.E. et Lawlor, P.G. (2016). Effect of feeding sodium butyrate in the late finishing period

- on Salmonella carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 131, 79-86.
- Wambre, E. et Jeong, D. (2018). Oral Tolerance Development and Maintenance. *Immunology and allergy clinics of North America* 38, 27-37.
- Wang, C., Shi, C., Zhang, Y., Song, D., Lu, Z. et Wang, Y. (2018). Microbiota in fermented feed and swine gut. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 2941-2948.
- Wang, J., Li, C., Nesengani, L.T., Gong, Y., Zhang, S. et Lu, W. (2017). Characterization of vaginal microbiota of endometritis and healthy sows using high-throughput pyrosequencing of 16S rRNA gene. *Microbial Pathogenesis* 111, 325-330.
- Wang, M., Radlowski, E.C., Monaco, M.H., Fahey, G.C., Jr, Gaskins, H.R. et Donovan, S.M. (2013). Mode of Delivery and Early Nutrition Modulate Microbial Colonization and Fermentation Products in Neonatal Piglets. *The Journal of Nutrition* 143, 795-803.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. et Cole, J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5261-5267.
- Wang, X., Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., Apple, J., Maxwell, C.V., Lee, J.A., Li, Y. et Zhao, J. (2019). Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* 7, 109.
- Wang, Y.C., Chang, Y.C., Chuang, H.L., Chiu, C.C., Yeh, K.S., Chang, C.C., Hsuan, S.L., Lin, W.H. et Chen, T.H. (2011). Transmission of Salmonella between swine farms by the housefly (*Musca domestica*). *Journal of food protection* 74, 1012-1016.
- Weijtens, M.J., Van Der Plas, J., Bijker, P.G., Urlings, H.A., Koster, D., Van Logtestijn, J.G. et Huis In't Veld, J.H. (1997). The transmission of campylobacter in piggeries; an epidemiological study. *Journal of Applied Microbiology* 83, 693-698.
- Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E.R. et Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 27.

- Whittaker, R.J., Willis, K.J. et Field, R. (2001). Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography* 28, 453-470.
- Wierup, M. et Häggblom, P. (2010). An assessment of soybeans and other vegetable proteins as source of salmonella contamination in pig production. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52, 15.
- Wilhelm, B., Rajic, A., Parker, S., Waddell, L., Sanchez, J., Fazil, A., Wilkins, W. et Mcewen, S.A. (2012). Assessment of the efficacy and quality of evidence for five on-farm interventions for Salmonella reduction in grow-finish swine: a systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 107, 1-20.
- Wilkins, W., Rajić, A., Waldner, C., Mcfall, M., Chow, E., Muckle, A. et Rosengren, L. (2010). Distribution of Salmonella serovars in breeding, nursery, and grow-to-finish pigs, and risk factors for shedding in ten farrow-to-finish swine farms in Alberta and Saskatchewan. *Canadian Journal of Veterinary Research / Revue canadienne de recherche veterinaire* 74, 81-90.
- Wilson, C.M., Loach, D., Lawley, B., Bell, T., Sims, I.M., O'toole, P.W., Zomer, A. et Tannock, G.W. (2014). Lactobacillus reuteri 100-23 Modulates Urea Hydrolysis in the Murine Stomach. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 6104-6113.
- Winter, S.E., Thiennimitr, P., Winter, M.G., Butler, B.P., Huseby, D.L., Crawford, R.W., Russell, J.M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tsolis, R.M., Roth, J.R. et Bäumlner, A.J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. *Nature* 467, 426-429.
- Worcman-Barninka, D., Destro, M.T., Fernandes, S.A. et Landgraf, M. (2001). Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport–Vassiladis medium (MSRV) for the detection of Salmonella in foods. *International Journal of Food Microbiology* 64, 387-393.
- World Health Organization (2015). Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. *WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases*.
- Yan, W., Sun, C., Zheng, J., Wen, C., Ji, C., Zhang, D., Chen, Y., Hou, Z. et Yang, N. (2019). Efficacy of Fecal Sampling as a Gut Proxy in the Study of Chicken Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2126.

- Yang, B., Wang, Y. et Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17, 135.
- Yim, L., Betancor, L., Martínez, A., Bryant, C., Maskell, D. et Chabalgoity, J.A. (2011). Naturally Occurring Motility-Defective Mutants of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolated Preferentially from Nonhuman Rather than Human Sources. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7740-7748.
- Yoo, W., Kim, D., Yoon, H. et Ryu, S. (2017). Enzyme IIA(Ntr) Regulates *Salmonella* Invasion Via 1,2-Propanediol And Propionate Catabolism. *Scientific Reports* 7, 44827.
- Younge, N., Mccann, J.R., Ballard, J., Plunkett, C., Akhtar, S., Araújo-Pérez, F., Murtha, A., Brandon, D. et Seed, P.C. (2019). Fetal exposure to the maternal microbiota in humans and mice. *JCI insight* 4, e127806.
- Yu, Y., Lu, L., Sun, J., Petrof, E.O. et Claud, E.C. (2016). Preterm infant gut microbiota affects intestinal epithelial development in a humanized microbiome gnotobiotic mouse model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 311, G521-G532.
- Zeng, M.Y., Inohara, N. et Nuñez, G. (2017a). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal immunology* 10, 18-26.
- Zeng, Z., Liu, F. et Li, S. (2017b). Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review. *Annals of Nutrition and Metabolism* 70, 59-65.
- Zhang, L., Wu, W., Lee, Y.-K., Xie, J. et Zhang, H. (2018). Spatial Heterogeneity and Co-occurrence of Mucosal and Luminal Microbiome across Swine Intestinal Tract. *Frontiers in Microbiology* 9, 48.
- Zhang, Z.J., Pedicord, V.A., Peng, T. et Hang, H.C. (2020). Site-specific acylation of a bacterial virulence regulator attenuates infection. *Nature Chemical Biology* 16, 95-103.
- Zhao, W., Wang, Y., Liu, S., Huang, J., Zhai, Z., He, C., Ding, J., Wang, J., Wang, H., Fan, W., Zhao, J. et Meng, H. (2015). The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. *PLOS One* 10, e0117441.
- Zheng, D.M., Bonde, M. et Sørensen, J.T. (2007). Associations between the proportion of *Salmonella* seropositive slaughter pigs and the presence of herd level risk factors for

introduction and transmission of Salmonella in 34 Danish organic, outdoor (non-organic) and indoor finishing-pig farms. *Livestock Science* 106, 189-199.

Zheng, N., Gao, Y., Zhu, W., Meng, D. et Walker, W.A. (2020). Short chain fatty acids produced by colonizing intestinal commensal bacterial interaction with expressed breast milk are anti-inflammatory in human immature enterocytes. *PLOS One* 15, e0229283.

Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Akkermans, A.D. et De Vos, W.M. (2003). *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 211-215.