



Université de Montréal

DÉTERMINATION DES EFFETS DE L'ADMINISTRATION DE PROBIOTIQUES  
SUR L'ATTACHEMENT D'*ESCHERICHIA COLI* ENTÉROTOXINOGENÈ F4 ET  
L'EXPRESSION DE CYTOKINES CHEZ LE PORCELET SEVRÉ

par

JEAN-FRANÇOIS DAUDELIN

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Avril 2009

©Jean-François Daudelin, 2009

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

DÉTERMINATION DES EFFETS DE L'ADMINISTRATION DE PROBIOTIQUES  
SUR L'ATTACHEMENT D'*ESCHERICHIA COLI* ENTÉROTOXINOGENÈ F4 ET  
L'EXPRESSION DE CYTOKINES CHEZ LE PORCELET SEVRÉ

présenté par

JEAN-FRANÇOIS DAUDELIN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mariela A. Segura, présidente-rapporteuse

John M. Fairbrother, directeur de recherche

Éric Nadeau, codirecteur

Martin Lessard, codirecteur

Frédéric Guay, membre du jury

## RÉSUMÉ

Les diarrhées post-sevrages causées par des infections à *Escherichia coli* entérotoxigène positif pour le fimbriae F4 (ETEC F4), entraînent des pertes économiques importantes chez les producteurs de porc. Depuis quelques années, l'utilisation de probiotiques, comme additif alimentaire pour prévenir ce type d'infection entérique et réduire les traitements aux antimicrobiens, suscite un intérêt grandissant en production porcine. Le but du présent travail est de déterminer l'influence de l'administration des probiotiques *Pediococcus acidilactici* (PA) et *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SCB) sur la colonisation et l'attachement des ETEC F4, l'accumulation de fluide intestinal et l'expression de cytokines dans l'iléon de porcelets sevrés. Dès la naissance, différentes portées de porcelets ont été affectées aux traitements suivants : PA, SCB, PA + SCB, témoin et témoin avec antibiotiques (ATB). Une dose quotidienne de probiotiques ( $1 \times 10^9$  UFC) a été administrée aux porcelets des groupes probiotiques durant la lactation et après le sevrage. Sept jours après le sevrage, à 28 jours d'âge, des porcelets positifs pour le récepteur intestinal spécifique pour F4 ont été infectés oralement avec une souche ETEC F4. Les porcelets ont été euthanasiés 24 heures après l'infection (jour 29) et différents échantillons intestinaux ont été prélevés. Chez les porcelets recevant des probiotiques, l'attachement des ETEC F4 à la muqueuse iléale était significativement diminué chez les groupes PA ou SCB en comparaison avec le groupe ATB. Finalement, l'expression de cytokines intestinales était plus élevée chez les porcs du groupe PA + SCB en comparaison avec les porcelets témoins. En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que l'administration de probiotiques pourrait être une alternative pour limiter les infections à ETEC F4 chez le porc.

### Mots clés

Probiotique

*Pediococcus acidilactici*

*Saccharomyces cerevisiae boulardii*

*Escherichia coli* entérotoxigène

Cytokines

Diarrhée post-sevrage

Fimbriae F4

Porc

## ABSTRACT

Postweaning diarrhea (PWD) associated with F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC F4) causes important economic losses in swine production. Since a couple of years, the use of probiotics as feed additives to prevent such enteric infections and reduce the use of antimicrobial treatments, has gained in interest. The aim of the present study is to evaluate the effects of *Pediococcus acidilactici* (PA) and *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SCB), on ETEC F4 colonization and attachment, accumulation of intestinal fluid and cytokines expression in weaned pig's ileum. At birth, different litters of pigs were allocated to the following treatments: PA, SCB, PA + SCB, control (CTRL) and control with antibiotics (ATB). Probiotics ( $1 \times 10^9$  CFU) were administered daily to probiotics group during the lactation period and after weaning. One week after weaning, at 28 days of age, all F4-receptor-positive pigs were orally challenged with an ETEC F4 strain. Pigs were slaughter 24 hours later (day 29) and different intestinal samples were collected. In pigs treated with PA or SCB, the attachment of ETEC F4 to the ileal mucosa was significantly reduced in comparison with the ATB group. Finally, intestinal cytokines were upregulated in PA + SCB group in comparison with the CTRL group. In conclusion, these results suggest that administration of probiotics could be an alternative to attenuate ETEC F4 infection in pigs.

### Key words

Probiotic

*Pediococcus acidilactici*

*Saccharomyces cerevisiae boulardii*

Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Cytokines

Postweaning diarrhea

F4 fimbriae

pig

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iv
ABSTRACT .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	ix
INTRODUCTION .....	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE .....	3
1. La flore commensale du porcelet.....	4
1.1 Développement de la flore commensale du porcelet après la naissance .....	4
1.2 Déstabilisation de la flore intestinale au sevrage.....	4
1.3 La stabilisation progressive de la flore du porcelet après le sevrage.....	6
1.4 Les effets bénéfiques des bactéries commensales chez l'hôte.....	7
1.4.1 La compétition avec les pathogènes .....	7
1.4.2 Augmentation de la fonction barrière de l'épithélium intestinal .....	9
1.4.3 Les interactions entre les bactéries commensales et le système immunitaire intestinal.....	10
2. Le système immunitaire intestinal .....	11
2.1 La complexité du système.....	12
2.2 Le développement du système immunitaire intestinal du porcelet : de la naissance au sevrage.....	13
2.3 Les voies d'entrées des antigènes dans l'intestin.....	14
2.4 La reconnaissance du pathogène.....	16
2.5 Activation des cellules T auxiliaires.....	18
2.6 Les réponses cytokinaires face aux pathogènes entériques .....	20
2.7 Les réponses cytokinaires face à <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC) .....	22
3. <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.1 Généralités .....	23
3.2 Les EPEC .....	25
3.3 Les ETEC.....	26
3.3.1 Facteurs de virulence associés aux ETEC .....	26
3.3.1.1 Entérotoxine thermolabile (LT).....	27

3.3.1.2 Entérotoxine thermorésistante (ST).....	27
3.3.1.2.1 STa.....	28
3.3.1.2.2 STb.....	28
3.3.1.2.3 La toxine thermorésistante d' <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatives 1.....	29
3.3.2 Fimbriae associés à la diarrhée post-sevrage.....	29
3.3.2.1 Le F18.....	29
3.3.2.2 Le F4.....	30
3.3.3 Moyens utilisés pour prévenir les infections à ETEC chez le porcelet.....	30
3.3.3.1 Les vaccins vivants et sous-unitaires.....	31
3.3.3.2 Les anticorps provenant de jaune d'œuf et de protéines plasmatiques.....	31
3.3.3.3 Les probiotiques.....	32
4. Les probiotiques.....	33
4.1 Définitions et caractéristiques des probiotiques.....	33
4.2.1 Effets sur la performance des porcelets.....	35
4.2.2 Effets sur la flore intestinale.....	36
4.2.3 Effets sur les propriétés fonctionnelles de la muqueuse intestinale.....	37
4.2.3.1 Effets sur les jonctions serrées et l'intégrité morphologique de la muqueuse intestinale.....	37
4.2.3.2 Effets sur la production de mucines et de défensines.....	38
4.2.3.3 Effets sur la translocation bactérienne.....	39
4.2.4 Effets sur l'immunité.....	39
4.3 <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	41
4.4 <i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i> .....	42
5. Hypothèse et objectifs.....	43
Méthodologie et résultats.....	46
Abstract.....	47
1. INTRODUCTION.....	48
2. MATERIALS AND METHODS.....	49
3. RESULTS.....	56
4. DISCUSSION.....	58
Acknowledgments.....	63
REFERENCES.....	63
Discussion et conclusion.....	82
6. DISCUSSION.....	83
7. CONCLUSION.....	90
BIBLIOGRAPHIE.....	91

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.</b>	Lignées phylogénétiques majeures dans lesquelles les phylotypes du tractus gastro-intestinal du porcelet sont représentés.....	6
<b>Tableau II.</b>	La reconnaissance immunitaire par les principaux TLRs présents dans l'intestin.....	17
<b>Tableau III.</b>	Sérogroupe O les plus fréquemment impliqués chez les <i>E. coli</i> entérotoxigènes causant la diarrhée post-sevrage chez le porcelet.....	24
<b>Article :</b>	<b><i>Administration of <i>Pediococcus acidilactici</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i> influences enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> F4 attachment and expression of intestinal cytokines in weaned pigs</i></b>	
<b>Table I.</b>	Nutrient composition of the weaning diet (day 21 to 31).....	74
<b>Table II.</b>	Oligonucleotides for real-time PCR.....	75
<b>Table III.</b>	ETEC F4 colonization of different intestinal tissues in F4-receptor-positive pigs treated with probiotics, antibiotics or without treatment at 24 h after ETEC F4 challenge.....	76
<b>Table IV.</b>	Consistency scores of ileum, cecum, and colon contents of F4-receptor-positive pigs treated with probiotics, antibiotics or without treatment at 24 h after ETEC F4 challenge.....	77
<b>Table V.</b>	Cytokines mRNA expression levels normalized to $\beta$ -actin in non-challenged (day 31) and ETEC F4 challenged pigs (day 29) treated with probiotics, antibiotics or without treatment.....	78



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Schéma des effets négatifs du sevrage sur la santé générale du porcelet.....	5
<b>Figure 2.</b>	Le système de défense de l'intestin.....	11
<b>Figure 3.</b>	Les principales voies d'entrée des antigènes dans l'intestin.....	16
<b>Figure 4.</b>	Les différentes sous-classes des cellules T auxiliaires.....	20
<b>Figure 5.</b>	Les réponses des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale face à un pathogène entérique.....	22
<b>Figure 6.</b>	Schéma représentant la pathogenèse des <i>E. coli</i> ETEC et EPEC.....	25
<b>Figure 7.</b>	Les réponses des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale face aux bactéries commensales et probiotiques.....	41
<b>Article :</b>	<b><i>Administration of <i>Pediococcus acidilactici</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i> influences enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> F4 attachment and expression of intestinal cytokines in weaned pigs</i></b>	
<b>Figure 1.</b>	Detection of adherent ETEC F4 bacteria on ileal sections of challenged F4-receptor positive pigs using the immunofluorescent assay.....	80
<b>Figure 2.</b>	Attachment of ETEC F4 bacteria to the ileal mucosa following challenge in F4-receptor positive pigs receiving no antibiotic or probiotic (CTRL), antibiotics (ATB), <i>P. acidilactici</i> (PA), <i>S. cerevisiae boulardii</i> (SCB) or both, PA + SCB.....	81

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
ATB	Antibiotic (antibiotique)
CAMP	Commensal-associated molecular pattern (motif moléculaire associé aux bactéries commensales)
CD	Cluster of differentiation (cluster de différenciation)
CFU	Colony-forming unit (unité formant colonie)
Cl	Chlore
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
DC	Dendritic cell (cellule dendritique)
EAggEC	Enteroadgregative <i>Escherichia coli</i> ( <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatif)
East1	Enteroadgregative <i>Escherichia coli</i> heat stable 1 (toxine 1 résistante à la chaleur d' <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatif)
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ( <i>Escherichia coli</i> entéropathogène)
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ( <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène)
FOXp3	Forkhead box P3
GMP	Guanosine monophosphate
PA	<i>Pediococcus acidilactici</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
I $\kappa$ B	Inhibitor of kappa B (inhibiteur de kappa B)
IL	Interleukine
LEE	Locus of enterocyte effacement (locus d'effacement des entérocytes)
LT	Heat-Labile toxin (toxine thermolabile)
MCP	Monocyte chemotactic protein (protéine chimiotactique de monocyte)

MDP	Muramyl dipeptide (dipeptide muramique)
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells
NK	Natural killer (cellule tueuse naturelle)
Nod	Nucleotide oligomerization domain (domaine d'oligomérisation de nucléotide)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP :	Pathogen-associated molecular pattern (motif moléculaire associé aux pathogènes)
pBD	Porcine $\beta$ -defensin ( $\beta$ -défensine porcine)
PEPEC	Porcine enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ( <i>Escherichia coli</i> entéropathogène porcin)
PWD	Postweaning diarrhea (diarrhée post-sevrage)
RDP	Ribosomal database project (projet d'une base de données ribosomales)
RF4	Récepteur F4
SAIF	<i>Saccharomyces</i> anti-inflammatory factor (facteur anti-inflammatoire de <i>Saccharomyces</i> )
SCB	<i>Saccharomyces cerevisiae boulardii</i>
ST	Heat stable toxin (toxine thermostable)
STaP	Heat stable toxin « a » porcine variant (toxine thermostable « a », variante porcine)
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper cell (cellule T auxiliaire)
TLR	Toll-like receptor (récepteur Toll)
TNF	Tumor necrosis factor
UFC	Unité formant colonie



## INTRODUCTION

Le sevrage est une période critique dans la croissance du porcelet. Elle est caractérisée par une importante source de stress qui entraîne une déstabilisation du système digestif et perturbe le développement du système immunitaire chez le porcelet. Ces dérèglements, au niveau de l'intestin, augmentent la susceptibilité des porcelets sevrés à développer des maladies entériques telles que la diarrhée post-sevrage. Cette maladie est caractérisée par une diarrhée aqueuse occasionnant des pertes de poids importantes, ainsi que la mortalité dans 5 - 20 % des cas. Parmi les infections entériques responsables de la diarrhée post-sevrage, celles causées par *Escherichia coli* positif pour F4 (ETEC F4) de sérotype O149 sont les plus prévalentes mondialement. Ce pathogène a la capacité de s'attacher à des récepteurs spécifiques sur l'épithélium intestinal et de sécréter diverses entérotoxines (Fairbrother et al., 2005).

Actuellement, des antimicrobiens sont fréquemment utilisés en prophylaxie et pour le traitement des infections entériques chez le porc. Cette utilisation est controversée due notamment à l'augmentation de la fréquence des bactéries résistantes aux antibiotiques et au risque de transmission de ces résistances aux bactéries pathogènes chez l'humain. Depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche se concentrent à trouver des alternatives à l'utilisation d'antimicrobiens. Parmi celles-ci, les probiotiques suscitent un intérêt marqué. L'ingestion de probiotiques dès la période néonatale aurait comme effet d'augmenter l'effet de barrière au niveau de la muqueuse et de stimuler la réponse immunitaire (Dugas et al., 1999). À cet égard, la bactérie lactique à Gram positif, PA et la levure SCB, seraient des candidats potentiels afin de prévenir les infections entériques en production porcine.

Le but de ce projet était d'évaluer l'effet de l'administration des probiotiques PA et SCB, dès la naissance, sur la colonisation et l'attachement de ETEC F4, l'accumulation de fluide et la réponse cytokinaire intestinale chez le porc sevré.

## **RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

# 1. LA FLORE COMMENSALE DU PORCELET

## 1.1 Développement de la flore commensale du porcelet après la naissance

La composition de la flore commensale du porcelet, et des mammifères en général, se complexifie avec l'âge. Dès la naissance, l'intestin du porcelet est colonisé par les bactéries des flores vaginale et fécale de la mère, ainsi que par les bactéries présentes dans l'environnement immédiat de la naissance. En effet, dans une étude effectuée chez l'humain, des différences quant à la composition de la flore intestinale ont été observées chez des enfants nés par césarienne en comparaison avec des enfants nés par la voie vaginale (Gronlund et al., 1999).

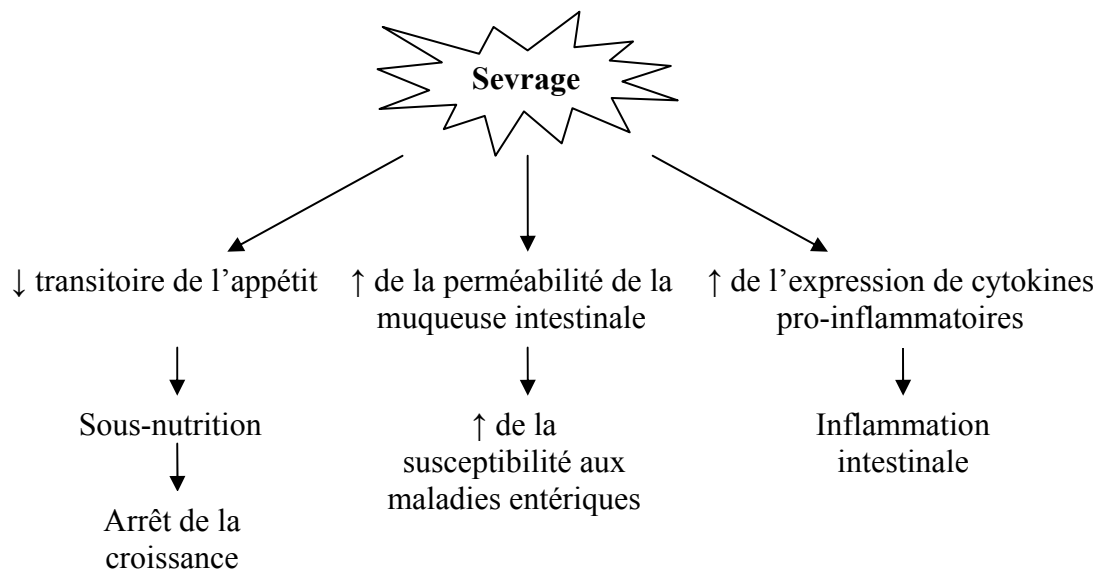
Dans les premières heures de vie, l'intestin du porcelet est colonisé principalement par des *Escherichia coli* ainsi que par des *Streptococcus* spp. (Konstantinov et al., 2006). L'environnement créé par les premiers colonisateurs favorise ensuite l'établissement d'une flore prédominée par les bactéries anaérobies strictes. En fait, 48 h après la naissance, ces bactéries constituent jusqu'à 90 % de la microflore chez le porc (Swords et al., 1993). Durant la lactation, la diversité de ces bactéries anaérobiques augmente, avec entre autres, l'apparition de nouveaux genres tels que les *Eubacterium*, les *Fusobacterium* et les *Propionibacterium* (Inoue et al., 2005). Cette flore, instaurée pendant la lactation, demeure relativement stable quant à sa composition en espèce, et ce, tant que le porcelet se nourrit du lait maternel (van der Peet-Schwering et al., 2007).

## 1.2 Déstabilisation de la flore intestinale au sevrage

Plusieurs effets négatifs sur le bien-être et la santé des porcelets sont souvent associés à la période de sevrage (figure 1). Durant cette période, une baisse transitoire



de l'appétit et un ralentissement de la croissance sont observés chez le porcelet. De plus, les populations bactériennes de l'intestin changent de façon quantitative et qualitative suite au changement d'alimentation (Christensen et al., 2002; Konstantinov et al., 2004). Par exemple, les *Bacteroides* s'établissent dans le côlon et leur nombre augmentera jusqu'à quatre mois après le sevrage (Swords et al., 1993). Du même coup, le nombre de microorganismes anaérobies facultatifs diminue considérablement (Savage, 1977). Cette déstabilisation de la flore intestinale, combinée à l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, rend le porcelet sevré plus susceptible aux maladies entériques (Spreeuwenberg et al., 2001). Ces changements dans l'intestin sont aussi responsables de réactions inflammatoires caractérisées par une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Pie et al., 2004). Pour diminuer ces effets, des antibiotiques, des vaccins oraux et des alternatives alimentaires telles que des probiotiques sont utilisées.



**Figure 1.** Schéma des effets négatifs du sevrage sur la santé générale du porcelet.

### 1.3 La stabilisation progressive de la flore du porcelet après le sevrage

Deux à trois semaines après le sevrage, la flore intestinale du porcelet devient plus stable et spécifique à chaque individu (Mackie et al., 1999). La diversité de celle-ci est modulée principalement par l'alimentation ainsi que l'environnement du porcelet. Dans l'intestin d'un porc adulte sain, de 400 à 500 espèces bactériennes sont présentes. Le nombre total de bactéries dans le tractus intestinal est d'environ  $10^{14}$  microorganismes. Ce qui constitue dix fois le nombre total des cellules de l'hôte (Savage, 1977). Cette densité bactérienne augmente considérablement de l'estomac jusqu'au gros intestin. Ce milieu dynamique possède une écologie microbienne très complexe et diversifiée qui reste à ce jour peu connue (Leser et al., 2002). Malgré cela, quelques groupes phylogénétiques de bactéries sont couramment retrouvés dans la flore du porcelet. Ceux-ci sont représentés dans le tableau I.

**Tableau I.** Lignées phylogénétiques majeures dans lesquelles les phylotypes du tractus gastro-intestinal du porcelet sont représentés

<b>Groupes phylogénétiques<sup>a</sup></b>	<b>Nombre de phylotypes détectés</b>
<i>Eubacterium</i>	125
<i>Clostridium</i>	109
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>	46
<i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i>	42
<i>Proteobacteria</i>	20
<i>Sporomusa</i>	15
<i>Mycoplasma</i>	8

<sup>a</sup>Groupes phylogénétiques du RDP (Ribosomal database project, en anglais). Adapté de Leser et al. (2002).

## 1.4 Les effets bénéfiques des bactéries commensales chez l'hôte

À ce jour, il est bien connu que les bactéries commensales ont des effets bénéfiques chez l'hôte. En fait, elles agissent en formant trois lignes principales de défense intestinale. Elles peuvent entrer en compétition avec les pathogènes, stimuler la fonction de barrière de l'épithélium et moduler l'immunité intestinale. En effet, chez le porc, il a été démontré que l'expression de plusieurs gènes associés au renouvellement de l'épithélium, à la synthèse de mucus ainsi qu'au système immunitaire est induite par les bactéries commensales (Chowdhury et al., 2007). De plus, il est bien connu que les bactéries de l'intestin participent à la fermentation où différentes molécules telles que des acides aminés et des acides gras à courte chaîne sont produites (Cummings et Macfarlane, 1991). D'autres produits libérés lors de la fermentation ont aussi le potentiel de neutraliser des carcinogènes alimentaires tels que les nitrosamines et de convertir des métabolites actifs de médicaments comme la sulphasalazine (O'Sullivan et al., 2005).

### 1.4.1 La compétition avec les pathogènes

Il a été démontré que les bactéries de l'intestin entrent en compétition avec les bactéries potentiellement pathogènes et ainsi préviennent leur surcroissance et leur colonisation dans la lumière intestinale (Lloyd et al., 1977). Par contre, les mécanismes associés à ce phénomène sont peu connus. Il y a néanmoins quelques suggestions et hypothèses qui ont été soulevées. Tout d'abord, l'exclusion compétitive, soit de l'espace pour l'adhésion à la muqueuse intestinale ou des nutriments, constitue un exemple de compétition entre les bactéries de l'intestin (Harvey et al., 2005). Il a été démontré précédemment, dans une étude *in vitro*, que *Bifidobacterium longum* et *B. catenulatum* pouvaient inhiber l'adhésion de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* et *Clostridium difficile* sur du mucus intestinal humain

(Collado et al., 2006). Ensuite, une autre hypothèse proposée est la production par les bactéries commensales de peptides antimicrobiens tels les bactériocines. Par exemple, des souches commensales d'*E. coli* produisent des colicines et des microcines qui contribuent à la défense contre des bactéries potentiellement pathogènes (Destoumieux-Garzon et al., 2002; Riley et Wertz, 2002). Plusieurs types de bactéries lactiques peuvent elles aussi sécréter des bactériocines. À titre d'exemple, *Lactobacillus salivarius*, produit la « salivaricin P » qui possède des activités antimicrobiennes contre *Listeria innocua* (Barrett et al., 2007).

En outre, les bactéries intestinales contribuent à la diminution de la translocation bactérienne. Celle-ci se définit comme étant le passage de bactéries vivantes du tractus gastro-intestinal à des sites extra-intestinaux tels que les ganglions mésentériques, la rate, le foie et le sang. Trois mécanismes majeurs favorisent la translocation bactérienne : (1) la surcroissance bactérienne dans l'intestin, (2) une déficience immunitaire de l'hôte et (3) une augmentation de la perméabilité ou des dommages à la barrière mucoale de l'intestin (Berg, 1999). Les porcelets en période de post-sevrage sont particulièrement affectés par ces trois conditions. Le degré de translocation est proportionnel à la concentration de bactéries présentes dans l'intestin. Par contre, ce n'est pas toutes les bactéries qui ont la même facilité à transloquer. Chez la souris, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, et *Proteus mirabilis* sont des exemples de bactéries indigènes démontrant une très grande facilité à passer la barrière épithéliale intestinale (Berg, 1999). À titre d'exemple, l'administration de contenu caecal à des souris gnotobiotiques a permis d'empêcher efficacement la translocation des *E. coli* C25 dans les ganglions mésentériques (Berg, 1980). Les bactéries de la flore commensale ou probiotiques limiteraient la translocation bactérienne par des interactions avec les cellules immunitaires tapissant l'épithélium intestinal, ce qui contribuerait à augmenter la fonction de barrière de celle-ci (Laudanno et al., 2008).

### 1.4.2 Augmentation de la fonction barrière de l'épithélium intestinal

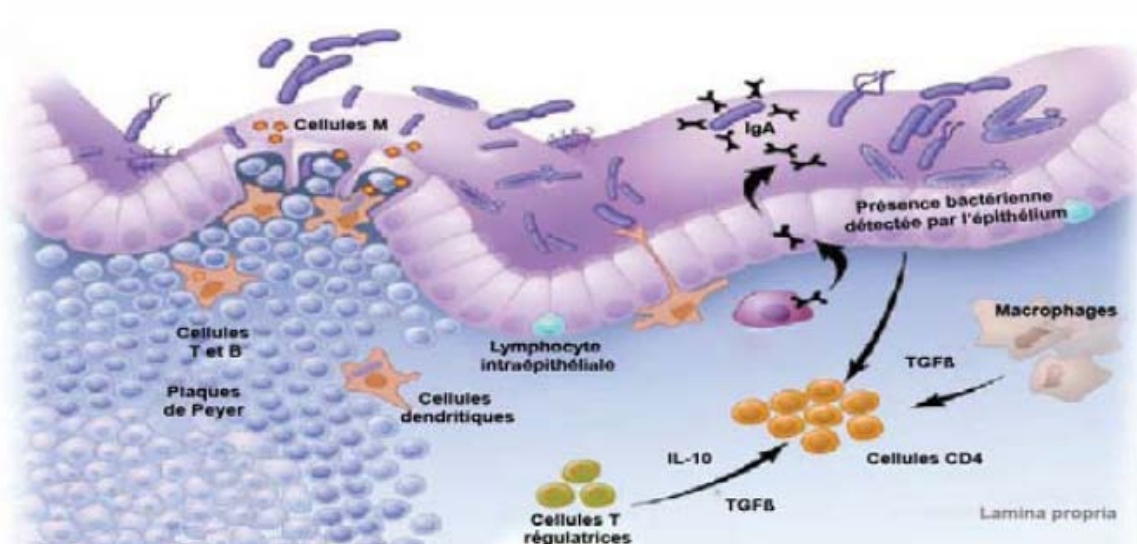
Dans le système digestif, plusieurs éléments tels que la salive, l'acide gastrique, le péristaltisme, le mucus, les protéases intestinales et les jonctions serrées intercellulaires des cellules épithéliales, assurent la protection contre les microorganismes pathogènes. Un autre élément non négligeable dans la lutte contre ces pathogènes indésirables est la présence des bactéries commensales dans la lumière intestinale. L'intégrité de cet épithélium doit donc être maintenue afin d'assurer son rôle de barrière en empêchant l'invasion bactérienne dans les organes extra-intestinaux. Les bactéries commensales participent activement au maintien de cette barrière en interagissant avec les entérocytes tapissant l'épithélium intestinal.

D'une part, les entérocytes sécrètent des peptides antimicrobiens cationiques tels que les défensines et les cathélicidines. Ceux-ci aident au contrôle la flore bactérienne intestinale tout en agissant contre les microorganismes pathogènes (Wehkamp et al., 2007). De plus, les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes de l'intestin, sécrètent aussi des peptides antimicrobiens en réponse à un signal bactérien. Parmi ceux-ci, il y a l'angiogénine 4, une protéine bactéricide dont l'expression est induite par *Bacteroides thetaiotaomicron*, une bactérie commensale (Hooper et al., 2003). Une étude portant sur des souris axéniques colonisées avec cette même bactérie, démontre que celle-ci influence l'expression de gènes importants au niveau intestinal. En effet, une augmentation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans diverses fonctions importantes de l'intestin a été constatée à l'aide d'une micropuce d'ADN. Parmi ceux-ci, nous retrouvons des gènes impliqués dans l'absorption des nutriments, le renforcement de la barrière muqueuse, l'angiogénèse et la maturation néonatale de l'intestin (Hooper et al., 2001).

D'autre part, il est possible que les bactéries résidentes de l'intestin affectent la dynamique des cellules caliciformes spécialisées dans la production de mucines au niveau intestinale. Celles-ci sont les principales protéines associées au mucus. Par exemple, il a été démontré que *L. plantarum* 299v augmentent la transcription des gènes de MUC2 et MUC3 associés à la production de mucines (Mack et al., 1999).

#### 1.4.3 Les interactions entre les bactéries commensales et le système immunitaire intestinal

Tous les individus en santé possèdent un système immunitaire intestinal très actif et bien régulé qui ne permet pas une réponse excessive aux bactéries commensales ainsi qu'aux antigènes alimentaires. La présence d'un système immunitaire intestinal aussi étendu et actif dépend en partie de la flore commensale qui est en interaction constante avec l'épithélium intestinal (figure 2). En effet, les bactéries de la microflore agiraient comme d'importants stimuli antigéniques favorisant le développement des organes lymphoïdes associés à l'intestin (Rhee et al., 2004). Ces organes sont responsables de l'immunité mucoale au niveau intestinal et de l'induction de la tolérance. Par exemple, le développement des plaques de Peyer est diminué chez des porcelets axéniques en comparaison avec des porcelets normaux (Pabst et al., 1988). De plus, l'expression de cytokines pro-inflammatoires intestinales telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 serait affectée par les bactéries colonisant l'intestin du porcelet (Shirkey et al., 2006). De plus, les bactéries commensales et probiotiques induisent la tolérance au niveau intestinal. Les diverses cellules et cytokines impliquées dans ce processus seront discutées plus en détail dans les sections 2.5 et 4.2.4.



**Figure 2.** Le système de défense de l'intestin. L'épithélium est recouvert de protéines qui empêchent certaines bactéries de s'attacher à la muqueuse. Les cellules M spécialisées de l'épithélium transportent constamment des bactéries et autres antigènes dans le tissu lymphoïde intestinal. De plus, les cellules dendritiques intestinales échantillonnent les bactéries à travers les cellules épithéliales. L'intestin contient aussi des macrophages, des lymphocytes T et B. Les lymphocytes B produisent des IgA au niveau de la muqueuse intestinale. Les leucocytes activés produisent aussi des cytokines anti-inflammatoires telles que l'interleukine 10 (IL-10) et le « transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ». Adaptée de Macdonald and Monteleone (2005).

## 2. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE INTESTINAL

Le système immunitaire intestinal fait partie de la grande famille du système immunitaire mucosal. Ce système est en quelque sorte indépendant du système immunitaire systémique, malgré des similitudes et des interactions constantes entre ces deux systèmes. Étant donné l'affluence d'antigènes de toutes sortes dans le milieu

intestinal, le système immunitaire intestinal doit discriminer efficacement les agents pathogènes de ceux qui sont inoffensifs pour la santé de l'hôte. En effet, ce système complexe a deux fonctions majeures. Tout d'abord, il doit reconnaître et éliminer les pathogènes. Ensuite, il doit établir une tolérance face aux antigènes alimentaires et aux bactéries commensales. Un contrôle hors pair de ces réponses est primordial afin de prévenir l'inflammation intestinale et les allergies alimentaires. Voici maintenant un aperçu général de ce système qui n'est pas encore tout à fait compris et dont les chercheurs ne cessent de découvrir de nouveaux éléments.

## 2.1 La complexité du système

Nous retrouvons dans l'intestin la plus grande masse de tissus lymphoïdes du corps. De plus, les tissus de la muqueuse intestinale sont la plus grande interface épithéliale entre les antigènes de l'environnement et le système immunitaire. Du point de vue physiologique, le système immunitaire intestinal peut se diviser en deux sous-systèmes qui interagissent entre eux, permettant ainsi une protection efficace contre les agents pathogènes chez les individus sains. Il y a des structures organisées telles que les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques qui agissent comme organes lymphoïdes secondaires, endroits propices à la présentation antigénique. Fait intéressant, il a été observé que nous retrouvons 11 à 26 plaques de Peyer séparées au niveau du jéjunum en comparaison avec une plaque de Peyer continue dans l'iléon du porcelet sevré (Lallès et al., 2004). La seconde organisation immunitaire dans l'intestin est la présence diffuse de cellules dans l'épithélium telles que les lymphocytes T intra-épithéliaux (majoritairement CD8<sup>+</sup>) et dans la *lamina propria*. Chez le porcelet, ce système est immature à la naissance, ce sont donc les molécules présentes dans le colostrum et dans le lait maternel qui aident le jeune porcelet à se défendre contre les agents pathogènes (Bailey et Haverson, 2006).



Dans les sections suivantes, il sera question du développement du système immunitaire du porcelet, des voies d'entrées des antigènes dans l'intestin, de la reconnaissance des pathogènes, de l'activation des cellules T auxiliaires, ainsi que des réponses immunitaires face aux pathogènes entériques.

## 2.2 Le développement du système immunitaire intestinal du porcelet : de la naissance au sevrage

À la naissance, le porcelet est totalement immunodéficient et devient entièrement dépendant de l'immunité passive transmise par la mère via le colostrum et le lait maternel qui contiennent des facteurs immunitaires spécifiques et non-spécifiques (Nguyen et al., 2007). Parmi ces facteurs, il y a plusieurs cytokines et immunoglobulines, dont les IgA et les IgG qui traversent les entérocytes des porcelets naissants. Cette immunité passive protège le porcelet contre les agents infectieux qui pourraient être présents dans l'environnement immédiat de la naissance et améliore le développement précoce du porcelet. Les réponses immunitaires sont toutefois limitées lorsque le porcelet nouveau-né est infecté par un pathogène.

L'acquisition de l'immunocompétence est donc essentielle pour assurer une croissance optimale du porcelet. L'immunocompétence peut se définir comme étant l'habileté du porcelet à générer une réponse appropriée aux divers antigènes qu'il aura à rencontrer au cours de sa vie. Le développement de celle-ci lui est nécessaire pour répondre activement aux agents pathogènes qui réussiront à adhérer ou à pénétrer la muqueuse intestinale. Elle lui permettra aussi de ne pas répondre de façon démesurée aux bactéries commensales. Chez l'humain, un dérèglement de la réponse immunitaire contre le microbiote, est entre autres, associé à certaines maladies inflammatoires chroniques intestinales (Artis, 2008).

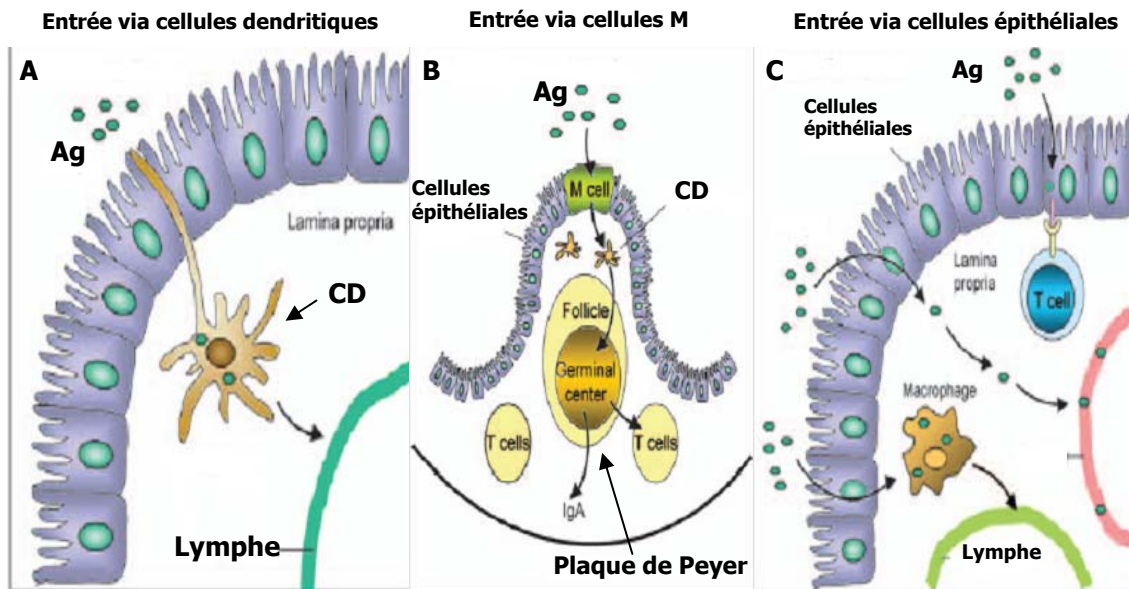
Il a été démontré au préalable que le processus de développement du système immunitaire intestinal du porcelet est séparé en quatre phases (Bailey et al., 2005) :

1. Dès la naissance, peu de lymphocytes sont présents dans l'épithélium intestinal et la *lamina propria* du porcelet. Cependant, un agglomérat non-structuré de lymphocytes est présent dans la zone où les plaques de Peyer se développeront.
2. Dans les 2 premières semaines de vie, des cellules lymphoïdes exprimant le récepteur CD2 font leur apparition dans l'intestin du porcelet. Les plaques de Peyer s'organisent durant cette période atteignant l'architecture « adulte » à 10-15 jours d'âge.
3. Dans les semaines 2 à 4, la muqueuse intestinale, particulièrement au niveau de la *lamina propria*, commence à être colonisée par des cellules T CD4<sup>+</sup>. Les cellules B de type IgM, apparaissent aussi à cet âge.
4. À l'âge de 5 semaines, les cellules T CD8<sup>+</sup> commence à apparaître dans l'épithélium intestinal et dans la *lamina propria*. Dans les cryptes intestinales, ce sont les IgA dérivés des cellules B qui apparaissent. C'est à partir de la septième semaine que l'architecture immunitaire de l'intestin est comparable à celle du porcelet mature.

### 2.3 Les voies d'entrées des antigènes dans l'intestin

Selon les connaissances actuelles, il y aurait trois voies d'entrées principales des antigènes dans l'intestin (figure 3). En premier lieu, les cellules dendritiques, à l'aide de leurs dendrites peuvent capter les antigènes dans la lumière intestinale, en modifiant la structure des jonctions serrées situées entre les cellules épithéliales (Rescigno et al., 2001). Les cellules dendritiques ayant capté les antigènes migreront, via les vaisseaux lymphatiques, vers les ganglions mésentériques, où se déroulera la présentation antigénique (figure 3A). En deuxième lieu, il y a l'entrée de certains types de bactéries tels que les *Salmonella* qui pénètrent la muqueuse intestinale par

les cellules M. Les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées situées en bordure des plaques de Peyer qui permettent l'entrée directe des antigènes par transcytose de la lumière intestinale jusqu'à la *lamina propria*. Les antigènes sont alors pris en charge par les cellules dendritiques qui migreront vers le centre germinatif des plaques de Peyer (figure 3B). En troisième lieu, lorsque la muqueuse intestinale est altérée, les jonctions serrées entre les cellules épithéliales se relâchent, ce qui permet aux antigènes de pénétrer entre les entérocytes. Dans cette situation, les cellules épithéliales produisent des cytokines et des chimiokines, telles que l'IL-8, qui attirent préférentiellement les neutrophiles et les macrophages au site d'infection, où une réaction inflammatoire locale est induite. Les macrophages agissent ainsi comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA) en migrant vers les ganglions mésentériques après avoir capté l'antigène (figure 3C).



**Figure 3.** Les principales voies d'entrée des antigènes dans l'intestin. A) Les cellules dendritiques de la *lamina propria* peuvent capter directement les antigènes de la lumière intestinale via leurs dendrites. B) Les cellules M situées en bordure des plaques de Peyer laissent passer les antigènes par transcytose. C) Lorsque la muqueuse intestinale est altérée, les antigènes passent directement à travers l'épithélium pour ensuite être captés par les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages. Ag : antigène et CD : cellule dendritique. Adaptée de Seidman (2006).

## 2.4 La reconnaissance du pathogène

À ce jour, d'énormes progrès ont été réalisés quant à l'élucidation des mécanismes permettant la reconnaissance et la réponse aux innombrables antigènes tapissant l'épithélium intestinal. Lorsqu'un microorganisme pathogène est détecté sur la muqueuse intestinale, les cellules épithéliales s'activent et libèrent plusieurs

molécules stimulatrices menant au recrutement et à l'activation de plusieurs cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les macrophages (Rimoldi et al., 2005). L'activation de ces cellules se fait via les TLRs (« Toll-like receptor », en anglais) qui sont à ce jour les récepteurs de surface prédominant dans la reconnaissance des bactéries pathogènes et commensales (Abreu et al., 2005). En effet, les TLRs reconnaissent différents motifs associés aux bactéries pathogènes et commensaux : les PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns, en anglais) et les CAMPs (Commensal-associated molecular patterns, en anglais). Il existe plusieurs types de TLR reconnaissant différents ligands (tableau II). Lorsque les PAMPs se lient aux TLRs, une induction de la production de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens, ainsi qu'une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales sont observées (Fukata et al., 2005; Vora et al., 2004). De plus, la signalisation adéquate via les TLRs est requise pour effectuer la réparation de la muqueuse endommagée et limiter la translocation de bactéries non désirables (Fukata et al., 2005). Ces récepteurs se retrouvent à la surface de plusieurs cellules telles que les cellules épithéliales intestinales, les cellules du mésenchyme, les macrophages et les cellules dendritiques.

**Tableau II.** La reconnaissance immunitaire par les principaux TLRs présents dans l'intestin

<b>TLR</b>	<b>Ligand</b>
TLR-2	Peptidoglycane
TLR-3	ARN double-brin
TLR-4	Lipopolysaccharide
TLR-5	Flagelline
TLR-9	Îlot CpG non-méthylé

D'autres types de récepteurs intracellulaires sont importants pour la reconnaissance des pathogènes invasifs : les récepteurs Nod (Nucleotide oligomerization domain, en anglais) (Kim et al., 2004). Il y a 2 types de récepteurs Nod connus à ce jour : Nod1 et Nod2. Le récepteur Nod1 est exprimé de façon ubiquitaire dans différents types cellulaires et est requis pour la reconnaissance des bactéries Gram négatif invasives comme les *E. coli* entéroinvasifs (Kim et al., 2004). Cette reconnaissance se fait via les peptidoglycanes des bactéries Gram négatif seulement. La reconnaissance des bactéries invasives Gram positif se fait via le Nod2 qui reconnaît le MDP (muramyl dipeptide, en anglais), un dérivé du peptidoglycane présent autant chez les Gram positif que les Gram négatif (Girardin et al., 2003). Il est bien connu que le récepteur Nod2 est fortement exprimé dans les cellules phagocytaires ainsi que sur les monocytes et les cellules de Paneth de l'intestin (Lala et al., 2003).

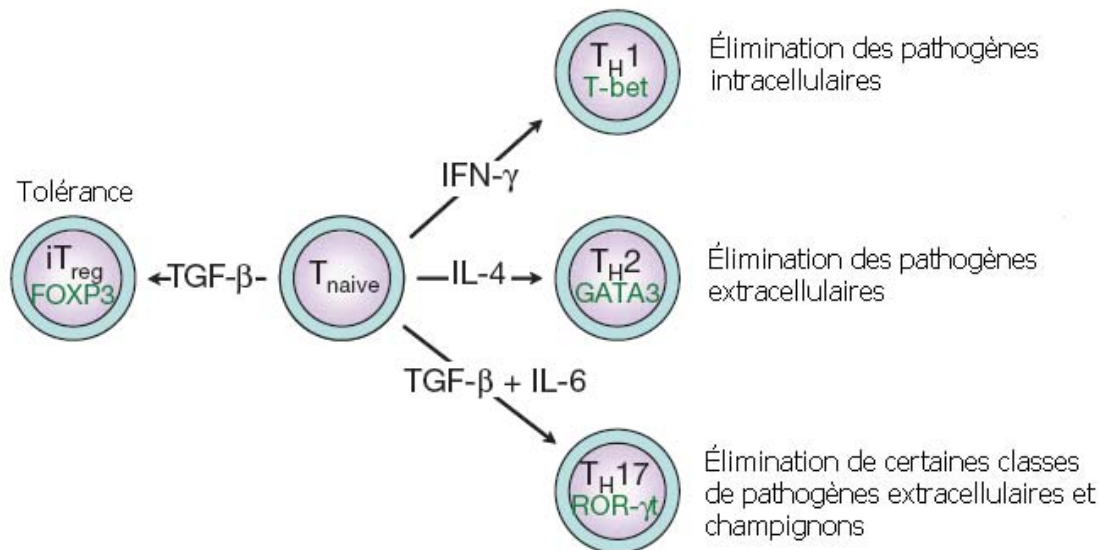
## 2.5 Activation des cellules T auxiliaires

Lorsque les lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> (Th pour T helper, en anglais) sont activés par un pathogène dans un environnement cytokinaire spécifique, ils se différencient en différentes sous-classes de cellules T auxiliaires (figure 4). Initialement, l'existence de deux sous-classes de cellules T auxiliaires a été proposée : les Th1 et les Th2 (Mosmann et Coffman, 1989). Dans un environnement inflammatoire constitué d'IL-12, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ , la réponse sera de type cellulaire (Th1). Les cellules de la voie Th1 sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 et s'attaquent principalement aux pathogènes intracellulaires. Si l'environnement est constitué d'IL-4 et d'IL-10, la réponse sera dirigée vers la voie Th2, menant à la production d'anticorps. Les cellules de la voie Th2 sécrètent plusieurs cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13 et l'IL-25, menant à l'élimination des pathogènes extracellulaires (Fort et al., 2001; Mosmann et Coffman, 1989). Cette réponse induit

principalement une immunité de type humorale, soit via les anticorps. Il est bien connu que l'équilibre entre les voies Th1 et Th2 permet de maintenir l'homéostasie au niveau de l'intestin, permettant ainsi une réponse appropriée aux antigènes.

Une troisième voie, celle-ci de type régulatrice, est aussi bien présente au niveau intestinal. En effet, en présence de TGF- $\beta$ , la différenciation des cellules T naïves se fait vers les cellules T régulatrices (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) produisant de l'IL-10 ou vers les cellules de types Th3 produisant du TGF- $\beta$ . Ces deux dernières cytokines sont dites suppressives ou anti-inflammatoires générant la tolérance aux bactéries commensales et aux antigènes alimentaires (Fort et al., 2001; Park et al., 2004). De plus, le TGF- $\beta$  induit la commutation isotypique IgM  $\rightarrow$  IgA, cette dernière étant une immunoglobuline très présente dans l'intestin et dont la fonction principale est de capter l'antigène avant que celui-ci puisse adhérer à la muqueuse intestinale (Kim et Kagnoff, 1990). Un autre type de cellule T régulatrice est présent dans l'environnement intestinal : les cellules T  $\gamma\delta$  qui sont majoritairement situées dans la *lamina propria*. Ces cellules auraient un impact sur la tolérance, car il a été démontré que le transfert de ces cellules chez des souris induit la tolérance orale (Ke et al., 1997).

Récemment, une quatrième voie a été identifiée : la voie des Th17 (Bettelli et al., 2008). Contrairement aux cellules Th1 et Th2 qui requièrent la présence de leurs cytokines effectrices respectives (IFN- $\gamma$  et IL-4) pour leur différenciation, les cellules de la voie Th17 nécessitent la présence de deux cytokines différentes afin de se différencier. En effet, l'IL-6 et le TGF- $\beta$ , deux cytokines ayant des effets opposés, induisent le développement des cellules Th17. Ces cellules sont reconnues comme une population distincte de cellules T auxiliaires, ayant des rôles cruciaux dans la réponse adaptative induite par les cellules T CD4<sup>+</sup> (Langrish et al., 2005).



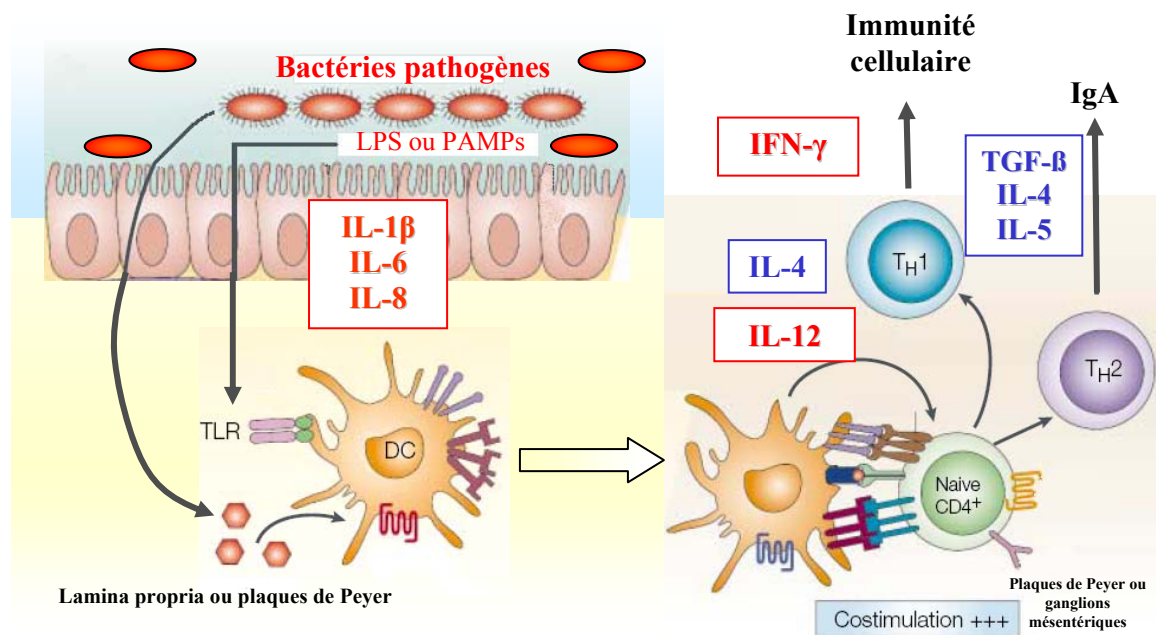
**Figure 4.** Les différentes sous-classes de cellules T auxiliaires. Les cellules T  $CD4^+$  naïves peuvent se différencier en différentes sous-classes de cellules T auxiliaires ( $Th1$ ,  $Th2$  et  $Th17$ ) selon l'environnement cytokinaire dans lequel ils se retrouvent. Cependant, en présence de  $TGF-\beta$ , les cellules T naïves se convertissent en cellules T régulatrices exprimant le facteur de transcription FOXP3. Pour chacune des voies, des facteurs de transcription majeurs ont été identifiés (Tbet, GATA3 et ROR- $\gamma$ t). Adaptée de Betelli et al. (2008).

## 2.6 Les réponses cytokinaires face aux pathogènes entériques

Les pathogènes qui pénètrent par la voie orale sont confrontés aux conditions acides de l'estomac et extrêmes de la partie proximale de l'intestin, dues notamment à la présence de bile et d'enzymes protéolytiques. Certains de ces pathogènes réussissent à s'attacher à la muqueuse intestinale et même la pénétrer. Les cellules



épithéliales intestinales peuvent agir directement comme cellules présentatrices d'antigènes, mais elles ne possèdent pas de molécules co-stimulatrices (Hershberg et Mayer, 2000). Cette dernière caractéristique signifie qu'elles peuvent présenter les antigènes aux cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> de la *lamina propria*, sans toutefois les activer. De plus, les cellules épithéliales de l'intestin possèdent des TLRs leur permettant ainsi de répondre aux pathogènes qui adhèrent à la muqueuse, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et la chimiokine IL-8. Une réponse inflammatoire locale est alors enclenchée, ce qui attire les cellules dendritiques au site d'infection. Dans des conditions inflammatoires, ces cellules captent l'antigène, se différencient et migrent vers les organes lymphatiques secondaires tels que les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer. Dépendamment de l'état d'activation et du type de pathogène rencontré, la cellule dendritique produira de l'IL-12 ou de l'IL-4. Tel que discuté dans la section précédente, les cytokines produites influenceront la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves vers la voie Th1 (IL-12) ou Th2 (IL-4) (figure 5).



**Figure 5.** Les réponses des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale face à un pathogène entérique. Lorsque des bactéries pathogènes interagissent avec la muqueuse intestinale, une inflammation locale est induite par la liaison des PAMPs aux TLRs exprimés principalement par les macrophages et les cellules épithéliales. Les cellules dendritiques (DC, pour dendritic cells, en anglais) présentes dans les plaques de Peyer ou la *lamina propria* vont rencontrer l'antigène et sécréter de l'IL-12 ou de l'IL-4. Elles vont ensuite migrer vers les ganglions mésentériques où elles vont activer les cellules de type Th1 ou Th2. Adaptée de Mowat et al. (2003).

## 2.7 Les réponses cytokinaires face à *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC)

Il a été démontré que ETEC F4 provoque une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , ainsi qu'une diminution de TGF- $\beta$ 1, lorsque les bactéries sont incubées avec des cellules intestinales humaines de type

Caco-2 (Roselli et al., 2006). Cette même équipe a utilisé des cellules intestinales porcines en culture de type IPEC-1, stimulées avec ETEC F4. Elle a observé une augmentation de l'expression de l'IL-8 et de l'IL-1 $\beta$ , accompagnée d'une diminution de l'IL-10, lorsque comparée à des cellules non-stimulées (Roselli et al., 2007). Une équipe japonaise a quant à elle stimulé des cellules épithéliales intestinales porcines avec différentes concentrations de ETEC et a observé une augmentation de l'expression de IL-8, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1, en anglais), IL-12p35, IL-1 $\alpha$  et IL-6 en comparaison avec les cellules non-stimulées (Moue et al., 2008). Pavlova et al. (2008) ont observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$ , lorsque les macrophages porcins (3D4/31) en culture ont été stimulés avec ETEC F4.

### **3. *ESCHERICHIA COLI***

#### 3.1 Généralités

*E. coli* est une bactérie Gram négatif et anaérobie facultative faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. La classification de ce genre bactérien est déterminée par leurs différents sérotypes dépendant de l'expression de l'antigène O (somatique), l'antigène H (flagellaire) et l'antigène K (capsulaire). Plusieurs sérotypes sont fréquemment impliqués dans la diarrhée post-sevrage chez le porc (tableau III). Parmi ceux-ci, le sérotype O149 est le plus fréquemment retrouvé dans cette maladie. Par exemple, dans une étude effectuée au Danemark, la prévalence des O149 était de 49,9 % (Frydendahl, 2002).

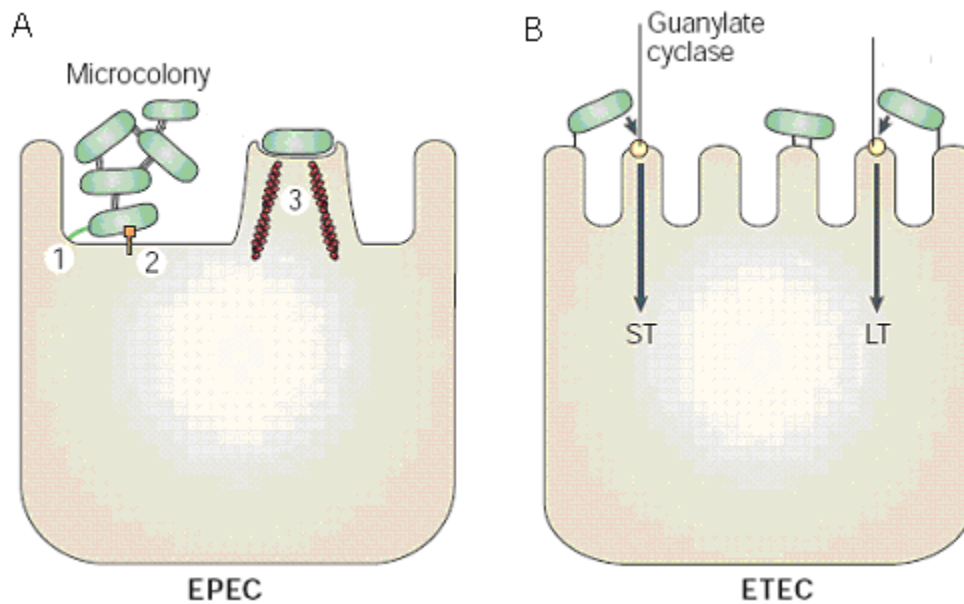
**Tableau III.** Sérogroupes O les plus fréquemment impliqués chez les *E. coli* entérotoxigènes causant la diarrhée post-sevrage chez le porcelet

Sérogroupe O	Antigènes associés aux fimbriae	Antigènes H	Commentaires
8	F4ab (K88ab), F4ac (K88ac)	H19	Moins commun qu'avant
138	F18, F4ac*	H-, H4	Occasionnellement Stx2e+
139	F18	H1	Plus fréquemment associé avec ED
141	F18, F4ab, F4ac	H4	Occasionnellement Stx2e+
147	F4ac, F18	H6, H19	Occasionnellement Stx2e+
149	F4ac, F18*	H10, H19, H43, H-	Occasionnellement Stx2e+
157	F4ac	H19, H43	Occasionnellement Stx2e+

\* Peu fréquent

Adapté de Fairbrother et al. (2005).

Les *E. coli* sont des agents infectieux majeurs en ce qui a trait aux diarrhées post-sevrages causant la mortalité chez les porcelets. Ils sont aussi fréquemment responsables des diarrhées néonatales du porcelet. Ces diarrhées peuvent causer la mort dans la première semaine de vie du porcelet, si les animaux ne sont pas traités rapidement. Les infections à *E. coli* sont la cause de pertes économiques importantes chez les producteurs de porcs. En fait, les pertes de poids, ainsi que l'utilisation d'antibiotiques souvent inefficaces pour traiter l'infection, accentuent ces pertes (Fairbrother et al., 2000). Le pathotype majeur associé à cette maladie est le ETEC. Les souches appartenant à ce pathotype possèdent des adhésines leur permettant d'adhérer à la muqueuse intestinale et libérer des entérotoxines. Un second groupe, les *E. coli* entéropathogènes porcins (PEPEC) associés aux lésions de type attachant/effaçant (A/E) dans le petit intestin sont de moindres importances avec une prévalence de 6 % (Fairbrother et al., 2000). Un schéma des mécanismes d'action de ces deux pathotypes est représenté à la figure 6.



**Figure 6.** Schéma représentant la pathogénèse des infections dues à ETEC et EPEC. (A) Les EPEC adhèrent aux entérocytes du petit intestin et détruisent les microvilli, d'où la caractéristique de lésions de type attachant/effaçant. La déstabilisation du cytosquelette est accompagnée d'une réponse inflammatoire et la diarrhée. (1) Adhésion, (2) translocation protéique via le système de sécrétion de type 3, (3) formation d'une structure en piédestal. (B) Les ETEC adhèrent aux entérocytes du petit intestin et induisent une diarrhée aqueuse par la sécrétion d'entérotoxines thermolabiles (LT) et/ou d'entérotoxines thermorésistantes (ST). Adaptée de Kaper et al (2004).

### 3.2 Les EPEC

Les EPEC utilisent le système de sécrétion de type 3, afin d'introduire des facteurs de virulence directement dans le cytoplasme de l'hôte (Jarvis et al., 1995). La sécrétion de ces facteurs de virulence entraîne la destruction des microvillosités et

une réorganisation du cytosquelette. Ces deux événements entraînent l'apparition de lésion de type A/E formant un piédestal. Les gènes de ces facteurs de virulence sont situés sur un îlot de pathogénécité appelé LEE (locus of enterocyte effacement, en anglais). Une des protéines effectrices sécrétées est la protéine Tir (translocated intimin receptor, en anglais) qui agit comme récepteur pour l'intimine de la membrane externe bactérienne (Sinclair et O'Brien, 2002). Les EPEC peuvent donc transférer leur propre récepteur à la cellule hôte. Cette série d'évènements entraîne une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées et une inflammation intestinale due à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells, en anglais). La combinaison des mécanismes précédents avec plusieurs autres mécanismes dont la sécrétion active d'ions chlore, pourrait expliquer la diarrhée causée par ce pathogène.

### 3.3 Les ETEC

ETEC est le pathotype majeur causant les diarrhées post-sevrages et néonatales chez le porc. Chez l'humain, ce microorganisme est la principale cause de la diarrhée des voyageurs. Ce type d'*E. coli* colonise tout d'abord le petit intestin et adhère à la muqueuse intestinale via des récepteurs spécifiques. Après l'adhésion, il libère deux principaux types d'entérotoxines seules ou en combinaison : l'entérotoxine thermolabile (LT) et l'entérotoxine thermorésistante (ST).

#### 3.3.1 Facteurs de virulence associés aux ETEC

Les symptômes de diarrhées associés aux infections à ETEC chez le porcelet impliquent une panoplie de facteurs de virulence, dont des entérotoxines et des fimbriae. Ces deux types de facteurs de virulence chez les ETEC seront élaborés dans les prochaines sections.

### 3.3.1.1 Entérotoxine thermolabile (LT)

Cette toxine possède une identité nucléotidique d'environ 77 % avec la toxine cholérique. Ces deux toxines se fixent au récepteur ganglioside GM1. Par contre, la toxine LT peut se fixer à d'autres récepteurs de l'épithélium intestinal ayant un galactose terminal. De plus, elle possède une structure protéique de type A:B<sub>5</sub>. La sous-unité A enzymatique, nommée l'adénosine diphosphate-ribosyl transférase (ADP-ribosyl transférase), est fixée de manière non-covalente au pentamère B qui se fixe au récepteur de la toxine (De Haan et Hirst, 2004). Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire via le système de sécrétion de type 2 (Tauschek et al., 2002). L'activité ADP-ribosyl transférase transfère un ADP-ribosyl du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) à la protéine G. Cette protéine G est une protéine de la partie basolatérale de la membrane qui régule l'adénylate cyclase. Le résultat est une activation permanente de l'adénylate cyclase, ce qui provoque une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire. Cette augmentation entraîne l'activation des canaux de chlore de l'épithélium, résultant en une diarrhée.

### 3.3.1.2 Entérotoxine thermorésistante (ST)

Comme son nom l'indique, ce type de toxine est résistant à la chaleur. Cette caractéristique est due à sa structure, c'est-à-dire la présence de plusieurs résidus cystéines permettant la formation de ponts disulfures. En fait, la plupart des toxines de ce groupe peut résister à 15 minutes d'ébullition, à la digestion protéolytique ainsi qu'à une exposition à l'acide.

#### 3.3.1.2.1 STa

La toxine STa associée aux ETEC porcins se nomme STaP et elle semble être associée avec les diarrhées néonatales et post-sevrages chez le jeune porcelet. Ce peptide de faible poids moléculaire (environ 2 kDa) possède 18 acides aminés créant 3 ponts disulfures. Au niveau structural, STa ressemble à l'hormone guanyline, une hormone paracrine contrôlant la sécrétion d'eau dans la lumière intestinale, ce qui lui permet de se lier à son récepteur : la guanylate cyclase C. L'association STa-guanylate cyclase C provoque une augmentation de GMP cyclique dans les entérocytes. Ceci provoque la stimulation de la sécrétion de Cl<sup>-</sup> menant à une diarrhée aqueuse (Fairbrother et al., 2005).

#### 3.3.1.2.2 STb

Cette toxine a un poids moléculaire de 5 kDa et possède 48 acides aminés contenant 2 ponts disulfures. Elle est principalement associée aux ETEC porcins, même si elle a déjà été retrouvée chez les ETEC humains. Le mécanisme d'action exacte associé à cette toxine n'est pas encore très bien compris, mais il serait associé à une augmentation du niveau de la prostaglandine E2 dans l'intestin ainsi qu'à la formation de pores non-spécifiques dans la membrane des vésicules de la bordure en brosse (Dubreuil, 1997; Gonçalves et al., 2007). Contrairement à STa, STb induit des changements histologiques dans l'épithélium intestinal qui consiste en une atrophie partielle des villosités (Whipp et al., 1987).



### 3.3.1.2.3 La toxine thermorésistante d'*Escherichia coli* entéroaggrégatives 1 (East 1)

La toxine East 1 est une toxine de faible poids moléculaire, récemment retrouvée chez les ETEC, appartenant à la même famille que STa. Le gène codant pour East 1 (*astA*) est aussi retrouvé chez les *E. coli* commensaux, ce qui soulève des questions à propos de son mécanisme d'action menant à la diarrhée, qui demeure à ce jour inconnu (Ménard et Dubreuil, 2002).

### 3.3.2 Fimbriae associés à la diarrhée post-sevrage

La plupart des ETEC associés aux diarrhées post-sevrages expriment des fimbriae. Ce sont des appendices agissant comme une adhésine permettant à la bactérie d'adhérer à la muqueuse intestinale. Les familles de fimbriae les plus fréquemment retrouvés chez les ETEC causant la diarrhée post-sevrage sont F4 et F18 (Frydendahl, 2002). Les F18 sont majoritairement présents en période de post-sevrage, tandis que les ETEC F4 sont retrouvés dans les diarrhées néonatales et post-sevrages. Plus de détails sur ces deux types de fimbriae sont présentés dans les prochaines sections.

#### 3.3.2.1 Le F18

Présent sous la forme de deux variantes antigéniques, F18ab et F18ac, ces fimbriae peuvent s'attacher à des récepteurs présents sur l'épithélium intestinal de porcelets de 3 semaines d'âge au minimum, âge à laquelle les récepteurs spécifiques sont exprimés sur l'épithélium intestinal du porcelet. Les *E. coli* F18 sécrètent majoritairement les entérotoxines STa et STb, mais ne sécrètent presque pas les entérotoxines de type LT (Francis, 2002; Rippinger et al., 1995). Sa prévalence diffère d'une région à l'autre, par exemple, au Québec, une très faible proportion des

souches de *E. coli* possède le fimbriae F18 (Fairbrother et al., 2000). De plus, certains porcelets sont résistants à ce type de bactérie, car ils ne possèdent pas le récepteur spécifique pour le F18.

### 3.3.2.2 Le F4

Le fimbriae F4 est composé de 3 variants antigéniques : F4ab, F4ac et F4ad. Le variant F4ac est de loin celui qui est le plus fréquemment observé mondialement. L'étape d'adhésion à la muqueuse intestinale est critique dans la pathogenèse des infections à ETEC positif pour F4. En effet, lorsque les ETEC F4 se lient aux récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, ils colonisent celui-ci et libèrent des entérotoxines. La liaison du fimbriae F4 à ses récepteurs est nécessaire pour le développement d'une réponse immunitaire contre ETEC positif pour F4 (Van den Broeck et al., 1999). Les gènes codant les protéines formant le fimbriae sont en partie régulés par la température. En fait, ils sont exprimés à 37 C, mais pas à 18 C, ce qui est en accord avec l'action de ces fimbriae dans l'intestin de l'hôte et non dans l'environnement (Fairbrother et al., 2005).

### 3.3.3 Moyens utilisés pour prévenir les infections à ETEC chez le porcelet

L'utilisation en prophylaxie des antimicrobiens afin de contrôler les diarrhées post-sevrages causées par ETEC est de plus en plus inefficace. La principale cause de cette inefficacité est l'éclosion de souches résistantes aux antimicrobiens. (Fairbrother et al., 2005). Ce phénomène a coïncidé avec un intérêt grandissant de la communauté scientifique à découvrir de nouvelles alternatives à l'utilisation d'antimicrobiens. Plusieurs méthodes sont à l'étude depuis quelques années. Parmi celles-ci : les vaccins vivants et sous-unitaires, les anticorps provenant de jaune d'œuf et de plasma porcin, ainsi que les probiotiques.

### 3.3.3.1 Les vaccins vivants et sous-unitaires

Afin de protéger le porcelet contre les infections à ETEC, les vaccins utilisés doivent activer le système immunitaire mucoale, via la sécrétion d'IgM et ensuite d'IgA dans l'intestin. Il a été démontré que le petit intestin est le site majeur de production de ces deux isotypes chez le porc (Bianchi et al., 1999). Parmi les stratégies de vaccination employées chez le porc en période de post-sevrage, il y a l'immunisation orale avec des *E. coli* vivants atténués. Il a été rapporté que seule l'immunisation orale avec *E. coli* positif pour F4, et non l'immunisation parentérale, est capable de générer une réponse secondaire à une infection subséquente avec ETEC F4 (Bianchi et al., 1996). Chez le porcelet sevré, d'autres recherches visent à tester l'administration orale de fimbriae F4 purifiés. Ce type de vaccin sous-unitaire permet une réponse immunitaire rapide provoquant la production précoce d'IgM spécifique dans l'intestin (Van den Broeck et al., 1999). Une autre équipe de recherche a utilisé une plante transgénique afin de produire l'adhésine FaeG, la principale protéine de la sous-unité F4. Dans un modèle *in vitro* d'adhésion aux villosités intestinales, les anticorps sériques de souris immunisés avec FaeG peuvent inhiber l'adhésion des ETEC aux récepteurs intestinaux porcins (Liang et al., 2006).

### 3.3.3.2 Les anticorps provenant de jaune d'œuf et de protéines plasmatiques

L'administration par voie orale d'anticorps spécifiques aux F4 est une autre méthode étudiée pour contrôler les infections causées par ETEC. Un des moyens utilisés est la production à prix modique chez la poule pondeuse d'une grande quantité d'anticorps de type IgY présents dans les jaunes d'œufs. Il a été démontré que des poules immunisées avec des fimbriae F4 purifiés produisent des anticorps

spécifiques permettant une protection contre les infections à ETEC chez des porcelets sevrés (Marquardt et al., 1999).

Dans un autre ordre d'idées, du plasma porcin séché et vaporisé dans la nourriture de sevrage protège le porcelet contre une infection à ETEC F4 en inhibant l'excrétion et en diminuant la réponse inflammatoire induite par ETEC F4 (Bosi et al., 2004).

### 3.3.3.3 Les probiotiques

L'utilisation de probiotiques pour prévenir les diarrhées post-sevrages devient de plus en plus populaire dans les porcheries commerciales. Quelques études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'efficacité de ces microorganismes à prévenir les diarrhées post-sevrages associées à ETEC F4.

Roselli et al. (2006) ont utilisé un modèle *in vitro* de cellules intestinales humaines pour étudier les effets protecteurs potentiels de différents probiotiques, ainsi que leurs mécanismes d'action sous-jacents contre une infection à ETEC F4. L'équipe a constaté que *B. animalis* MB5 et *L. casei* GG sont capable d'inhiber l'adhésion des ETEC F4 aux entérocytes et le déclenchement de l'inflammation. Cette même équipe a examiné la capacité de *L. sobrius* DSM 16698 à réduire la colonisation de l'intestin par ETEC F4 chez le porcelet. Ils ont constaté que ce probiotique diminue l'adhésion de la souche ETEC F4 sur des cellules porcines en culture (Roselli et al., 2007). Harvey et al. (2005) ont effectué une étude à grande échelle en administrant une souche de bactérie commensale porcine nommée RPCF, gardée secrète dans l'article, à des porcelets naissant provenant de 6 fermes ayant des antécédents de mortalité causée par ETEC F4. Dans 5 des 6 fermes, le taux de mortalité des porcs du groupe RPCF a diminué en moyenne de 2,6 % en comparaison avec des porcs non traités. Dans une étude effectuée précédemment avec la même

souche, un modèle d'infection chez des porcelets naissants, élevés sans leur mère, a été utilisé. Une diminution significative du taux de mortalité, de l'incidence de l'excrétion fécale et de la colonisation de l'intestin par ETEC en comparaison avec le groupe témoin a été observée (Genovese et al., 2000).

## **4. LES PROBIOTIQUES**

### **4.1 Définitions et caractéristiques des probiotiques**

Le concept de probiotique existe depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle. En fait, Metchnikoff, en 1908, fut le premier à le définir en suggérant l'ingestion de bactéries lactiques vivantes aux gens de l'époque. Malgré cela, ce n'est que depuis quelques années que les probiotiques sont ajoutés dans des aliments destinés à la consommation humaine et animale. Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), les probiotiques se définissent comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ingérés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques chez l'hôte. Certaines propriétés sont nécessaires pour qu'un microorganisme soit qualifié de probiotique. Les propriétés les plus importantes sont les suivantes (Salminen et al., 1996) :

- survie dans les conditions acides de l'estomac;
- adhésion aux cellules intestinales;
- colonisation de l'intestin;
- production de substances antimicrobiennes;
- antagonisme de bactéries pathogènes;
- aucun effet secondaire.

Cependant, afin de bénéficier pleinement de ces effets positifs sur la santé, il est important de consommer quotidiennement des bactéries probiotiques, car celles-ci ne colonisent pas l'intestin, elles y demeurent transitoirement. La majorité des probiotiques que nous retrouvons sur le marché sont des bactéries présentes naturellement dans la flore commensale des mammifères. D'autres sont des bactéries modifiées génétiquement, afin qu'elles possèdent l'une ou plusieurs des caractéristiques énumérées ci-haut (Mota et al., 2006; Steidler et al., 2003). Les probiotiques sont majoritairement des bactéries lactiques Gram positifs, comme les bactéries du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. De nombreux travaux ont mis l'accent sur ces deux genres bactériens qui représentent moins de 1 % de la flore du côlon. D'autres espèces de bactéries ont émergé comme étant des candidats potentiels à devenir probiotique. Parmi celles-ci, nous retrouvons des bactéries Gram négatifs telles que *E. coli* Nissle 1917 et également des levures telles que SCB.

De plus, les probiotiques, étant pour la plupart des bactéries commensales, entrent en compétition avec les pathogènes présents dans la lumière intestinale. Comme pour les bactéries commensales, cette compétition est majoritairement pour les nutriments et pour l'espace. Cependant, les probiotiques demeurant en transit dans l'intestin, la concentration administrée ainsi que la fréquence d'administration sont donc des éléments primordiaux.

## 4.2 Effets bénéfiques des probiotiques chez le porc

Depuis plusieurs années, la communauté scientifique est consciente du problème émergent de la résistance bactérienne aux antimicrobiens. Ceux-ci sont fréquemment utilisés autant en prophylaxie que pour le traitement des maladies infectieuses porcines. Un des défis actuels dans la recherche est de découvrir des alternatives fiables et efficaces aux antimicrobiens. Parmi les solutions envisageables,

il y a l'utilisation de probiotiques qui prend de plus en plus d'importance en production porcine. En effet, plusieurs études démontrent l'efficacité de ceux-ci sur la santé générale des porcelets et chez d'autres espèces d'animaux monogastriques (Dalloul et al., 2003; Lee et al., 2007; Taras et al., 2007). Cependant, il faut être conscient que les effets bénéfiques sur l'hôte peuvent différer d'une espèce voire d'une souche bactérienne à l'autre et selon la concentration administrée (Shanahan, 2003).

#### 4.2.1 Effets sur la performance des porcelets

De nombreux travaux ont été effectués afin de déterminer l'effet des probiotiques sur les performances des porcelets. Plusieurs études sont contradictoires en ce qui a trait aux effets des probiotiques sur la performance chez le porc. Dans l'une de ces études, il a été démontré que l'administration de *B. pseudolongum* et de *L. acidophilus* augmente de façon significative le gain de poids des porcelets, durant la lactation et après le sevrage, en comparaison avec le groupe témoin (Abe et al., 1995). Cet effet est d'autant plus marqué durant la période de lactation en comparaison avec la période de sevrage. Dans une autre étude, la levure *S. cerevisiae* SC47 a été administrée et une augmentation dans le gain de poids quotidien moyen, ainsi que dans la prise alimentaire quotidienne moyenne a été observée chez le groupe mangeant une moulée contenant des antibiotiques (auréomycine, tiamuline, tylosine et sulfaméthazine) et supplémentée avec *S. cerevisiae* SC47 en comparaison avec le groupe contrôle sans levure (van Heugten et al., 2003). Dans cette expérience, les prises alimentaires et les gains de poids ont été mesurés de façon hebdomadaire, durant 6 semaines, chez des porcelets sevrés à 17 jours d'âge. L'équipe de Li et al. (2006) a obtenu des résultats similaires dans une autre étude, où différentes concentrations de *S. cerevisiae* ont été ajoutées à une ration supplémentée d'auréomycine et de sulfate de cuivre. Les gains de poids les plus importants ont été répertoriés chez les porcelets ayant reçu quotidiennement une ration contenant 2,7 ×

$10^7$  UFC de levure/g, soit la deuxième plus grande concentration de probiotiques testée. De plus, dans une étude à double aveugle avec placebo, où *Enterococcus faecium* a été administré de la naissance jusqu'au sevrage, le gain de poids quotidien moyen est plus élevé en comparaison avec le groupe recevant le placebo (Zeyner et Boldt, 2006). Par contre, des résultats contraires ont été obtenus dans une autre étude avec la souche NCIMB 10415 de ce probiotique administrée à des truies et à leurs porcelets (Taras et al., 2006). De plus, lorsque *E. faecium* SF68 est administré au porcelet après le sevrage, aucune amélioration de la performance n'est observée (Broom et al., 2006).

#### 4.2.2 Effets sur la flore intestinale

L'un des mécanismes d'action suggérés des probiotiques est la modulation de la flore intestinale. Chez le porcelet, quelques études démontrent que les probiotiques peuvent affecter différentes populations bactériennes présentes dans l'intestin. En utilisant le probiotique PA, la diversité microbienne au niveau du côlon des porcelets en post-sevrage est diminuée en comparaison avec celle observée chez les porcelets témoins (Gagnon et al., 2007). Chez des porcelets en lactation (13 jours d'âge), provenant de truies ayant reçu une ration supplémentée avec *B. cereus* var. *toyoi*, les entérobactéries sont retrouvées en moindre quantité dans tous les segments intestinaux, en comparaison avec les porcelets témoins (Jadamus et al., 2002). Dans une autre étude chez des porcelets en lactation, les comptes d'entérocoques étaient plus élevés dans les contenus de l'iléon et du caecum chez les animaux témoins, en comparaison avec les groupes ayant reçu soit *S. faecium* M74 et *L. casei* spp. ou *S. thermophilus* spp. et *L. bulgaricus* spp. (Tortuero et al., 1995).



### 4.2.3 Effets sur les propriétés fonctionnelles de la muqueuse intestinale

En agissant sur la fonction de barrière de la muqueuse intestinale, en stimulant la production de mucines et de facteurs antimicrobiens tels que les défensines, certaines espèces de probiotiques limitent la translocation des bactéries vers les organes extra-intestinaux.

#### 4.2.3.1 Effets sur les jonctions serrées et l'intégrité morphologique de la muqueuse intestinale

En tapissant la muqueuse intestinale, les probiotiques peuvent interagir avec celle-ci et même en influencer sa structure. Il a été démontré, dans un modèle d'infection *in vitro* à EPEC, que la présence de SCB préserve la distribution des protéines structurales des jonctions serrées ZO-1 de cellules T84 (Czerucka et al., 2000). Dans le même ordre d'idées, des cellules épithéliales en culture infectées avec *E. coli* O157:H7 et traitées avec *L. rhamnosus* GG maintiennent l'expression de ZO-1 élevée en comparaison avec des cellules infectées non-traitées (Johnson-Henry et al., 2008).

Il a aussi été observé que la grandeur des villosités, ainsi que la profondeur des cryptes intestinales étaient augmentées chez des porcelets sevrés traités avec PA en comparaison avec le groupe témoin (Di Giancamillo et al., 2008). Taras et al. (2006) ont observé ces mêmes caractéristiques histologiques dans l'intestin de porcelets traités avec SCB.

#### 4.2.3.2 Effets sur la production de mucines et de défensines

Plusieurs souches de probiotiques ont la capacité d'induire l'expression de molécules ayant des activités non-spécifiques sur les pathogènes. Parmi celles-ci, les mucines font partie de ce type de molécules. Dans une étude *in vivo* chez le porc en période de post-sevrage, le groupe recevant  $2 \times 10^6$  UFC de SCB/kg de ration avait une couche de muqueuse au niveau de l'iléon moins épaisse en comparaison avec le groupe témoin (Bontempo et al., 2006). La couche de mucus plus épaisse chez les animaux témoins pourrait limiter la diffusion de nutriments à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales, réduisant ainsi l'absorption de ceux-ci. Chez les animaux traités avec SCB, la couche plus mince de mucus pourrait donc contribuer à une meilleure efficacité d'absorption des nutriments. Dans une autre étude effectuée chez des porcelets sevrés, l'administration de *L. brevis* augmente le nombre de cellules caliciformes acidiques dans les villosités du duodénum en comparaison avec les porcelets n'ayant pas reçu de probiotiques (Davis et al., 2007). Ce résultat suggère que l'ajout de probiotiques dans l'alimentation des porcelets, favorise la maturation et le développement des cellules caliciformes sécrétant du mucus dans l'intestin.

Un autre mécanisme d'action connu associé aux probiotiques est la stimulation de la production de défensines. Les défensines sont des peptides antimicrobiens de nature cationique sécrétés par l'hôte (Wehkamp et al., 2007). Les effets associés aux probiotiques sur la sécrétion de ce peptide antimicrobien naturel ont surtout été démontrés dans des modèles utilisant des cellules épithéliales humaines en culture. Wehkamp et al. (2004) ont utilisé des cellules épithéliales du côlon (Caco-2) traitées avec *E. coli* Nissle 1917. Ils ont observé une très forte augmentation de l'expression de la  $\beta$ -défensine 2 humaine et ce, de manière dose-dépendante. L'augmentation de la sécrétion de défensines intestinales par les probiotiques pourraient contribuer à augmenter les défenses des porcelets contre les différents pathogènes entériques auxquels ils sont confrontés tout au long de leur vie.

Par contre, aucune étude actuelle a démontré une augmentation de la sécrétion de défensines par les probiotiques dans un modèle porcin.

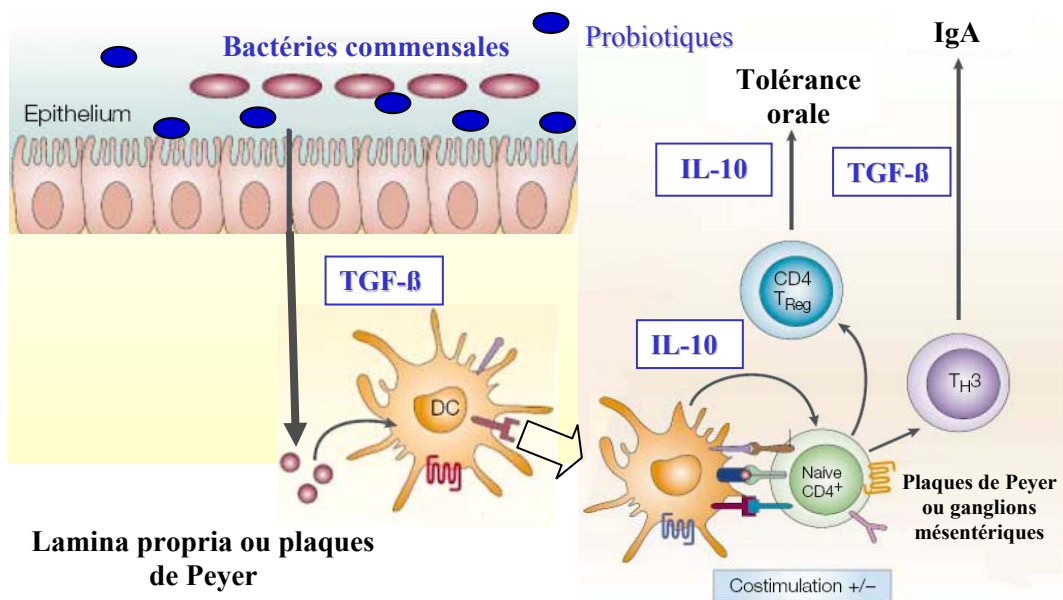
#### 4.2.3.3 Effets sur la translocation bactérienne

Une étude effectuée chez des porcelets sevrés infectés expérimentalement avec ETEC positif pour F4 a démontré que l'administration de PA et SCB, seul ou en combinaison, diminue la translocation bactérienne de bactéries entériques en comparaison avec le groupe contrôle (Lessard et al., 2009). Les bactéries probiotiques contribueraient à stimuler les cellules immunitaires présentes au niveau de la muqueuse intestinale, ce qui contribuerait à augmenter la fonction de barrière de celle-ci et ainsi diminuer la translocation bactérienne. Une autre étude *in vivo* chez le porcelet sevré a démontré les conséquences de la translocation de probiotiques dans le foie (Trevisi et al., 2007). La conclusion tirée de cette étude est que la translocation des bactéries non-pathogènes est un phénomène normal chez les jeunes animaux et que celle-ci garderait les défenses immunitaires actives dans la phase de transition du sevrage.

#### 4.2.4 Effets sur l'immunité

Plusieurs effets sur le système immunitaire ont été répertoriés lorsque des probiotiques ont été utilisés dans différents modèles animaux, ainsi que chez des sujets humains. Nous savons que certaines espèces de bactéries isolées de la flore intestinale libèrent des peptides de faible poids moléculaire qui entraînent une réponse immunitaire. Cependant, les mécanismes précis par lesquels les probiotiques modulent le système immunitaire demeurent pour la plupart inconnus. De plus, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que ces effets modulateurs du système immunitaire peuvent différer d'une bactérie probiotique à l'autre (Isolauri et al.,

2001). Des effets, sur le système immunitaire inné, tels que l'augmentation de l'activité des cellules NK spléniques (*L. casei*) et de l'activité phagocytaire des cellules de Kupffer (*L. acidophilus*) ont été observés (Matsuzaki et Chin, 2000; Neumann et al., 1998). Une étude *in vitro* a démontré que des bactéries lactiques modulent l'expression de TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 des cellules polymorphonucléaires, suggérant que les probiotiques stimulent l'immunité non-spécifique (Miettinen et al., 1996). Dans une autre étude, une augmentation de l'expression des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$ , ainsi que des diminutions de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 ont été répertoriées lorsque des souris infectées avec *Citrobacter rodentium* ont été préinoculées avec des probiotiques (Chen et al., 2005). Au niveau de la réponse acquise, plusieurs études démontrent que les probiotiques favorisent la sécrétion d'IgA, en induisant la sécrétion de l'IL-10 par les cellules T naïves, via les cellules dendritiques (figure 7). De plus, il a été démontré que les probiotiques pouvaient moduler l'expression de molécules de surface et de cytokines pro-inflammatoires des cellules dendritiques (Christensen et al., 2002; Drakes et al., 2004).



**Figure 7.** Les réponses des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale face aux bactéries commensales et probiotiques. Les bactéries commensales ou les probiotiques sont captés par les cellules dendritiques présentes dans la muqueuse intestinale. Ces cellules présentatrices d'antigènes se différencient de façon partielle en absence d'inflammation et en présence de l'IL-10. L'antigène est ensuite présenté aux cellules T naïves CD4<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques ou les plaques de Peyer. Celles-ci se différencient en cellules T régulatrices produisant de l'IL-10 ou en cellules T auxiliaires (Th3) produisant du TGF-β. Cette série d'évènements stimule la production d'IgA. DC, cellule dendritique. Adaptée de Mowat et al. (2003).

#### 4.3 *Pediococcus acidilactici* (PA)

La bactérie lactique Gram positif PA est un probiotique utilisé principalement en production porcine et aviaire. Cependant, peu d'études ont été publiées sur ses effets bénéfiques dans des modèles *in vivo* porcin. Les mécanismes d'action connus

de cette bactérie sont la production massive d'acide lactique ainsi que la sécrétion de la pédiocine PA-1, une bactériocine créant des pores sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles (Chikindas et al., 1993). En fait, la plupart des études retrouvées dans la littérature sur ce probiotique traitent de cette pédiocine qui semble être le mécanisme d'action majeur pour PA. Ces bactéries ont une forte capacité à survivre dans des conditions très acides et en fortes teneurs en sels biliaries (Erkkila et Petaja, 2000). Quelques travaux dans différents modèles animaux ont démontré que l'administration de ce microorganisme augmente la performance des porcs et accentue la résistance des poulets face à la coccidiose (Guerra et al., 2007; Lee et al., 2007). Parmi les études faites chez le porcelet avec ce probiotique, Lessard et al. (2009) ont observé que le pourcentage des cellules T CD8<sup>+</sup> dans l'iléon des porcelets allaités traités avec PA était plus élevé que le groupe témoin. Cette augmentation pourrait résulter de la stimulation du système immunitaire intestinale par les probiotiques. Di Giancamillo et al. (2008) ont démontré que l'administration de PA, chez le porcelet, sevré influence positivement le gain de poids et une augmentation de la longueur des villosités et de la profondeur des cryptes intestinales a été observée. De plus, il a été démontré que cette bactérie module l'établissement et la croissance de différents types de bactéries commensales, quelques jours après le sevrage (Gagnon et al., 2007).

#### 4.4 *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SCB)

Il a aussi été démontré dans la littérature que des levures ont des effets bénéfiques sur la santé intestinale du porcelet. À titre d'exemple, SCB est actuellement utilisé en production porcine, mais aussi chez l'humain pour le traitement des infections nosocomiales causées par *C. difficile*. Parmi les mécanismes d'actions suggérés des levures de l'espèce *cerevisiae*, il y a la sécrétion d'une protéase sérine qui aurait pour effet d'hydrolyser des toxines, telles que la toxine A

produite par *C. difficile* (Castagliuolo et al., 1999). De plus, cette levure a la capacité, via ses résidus mannoses situés sur sa membrane externe, de se lier aux fimbriae de *E. coli*. Le complexe ainsi créé sera rapidement éliminé du tractus gastro-intestinal (Gedek, 1999). Cette levure peut aussi moduler le système immunitaire. En premier lieu, il a été récemment découvert que SCB sécrète un facteur soluble anti-inflammatoire du nom de SAIF (*Saccharomyces* anti-inflammatory factor, en anglais). Ce facteur inhibe la dégradation de I $\kappa$ B, causant ainsi une séquestration accrue de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme (Sougioultzis et al., 2006). Cette protéine est un activateur de transcription pour plusieurs types de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire. En effet, NF- $\kappa$ B est responsable de la transcription de plusieurs gènes dont ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. De plus, il régule l'expression de molécules d'adhésions sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales, permettant la migration des leucocytes de la circulation jusqu'au site d'infection (Hotamisligil, 2006). En second lieu, cette levure, comme la majorité des probiotiques, augmente la sécrétion des IgA intestinales chez l'hôte (Czerucka et Rampal, 2002). Dans une étude effectuée chez le porcelet sevré, il a été observé que l'administration de SCB améliore la performance et augmente la quantité de macrophages dans la muqueuse de l'iléon en comparaison avec le groupe témoin (Bontempo et al., 2006). Enfin, ce probiotique aide à la préservation de la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales lors d'une infection à EPEC *in vitro* (Czerucka et al., 2000).

## 5. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Basée sur la revue de littérature précédemment décrite, l'hypothèse du projet était la suivante : L'administration par voie orale dès la naissance, de PA et SCB, seul ou en combinaison, limite les infections causées par ETEC F4 et module la réponse cytokinaire intestinale du porcelet sevré. Les objectifs étaient de déterminer

l'influence, chez le porcelet sevré, d'administrer dès la naissance les probiotiques PA et SCB sur : 1) La colonisation et l'attachement des ETEC F4 à la muqueuse intestinale, 2) l'accumulation de fluide intestinale et 3) l'expression de cytokines proinflammatoires intestinales.



## **MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

**Article : Administration of *Pediococcus acidilactici* and  
*Saccharomyces cerevisiae boulardii* influences enterotoxigenic  
*Escherichia coli* F4 attachment and expression of intestinal cytokines  
in weaned pigs**

Jean-François Daudelin<sup>1, 2</sup>, Martin Lessard<sup>1</sup>, Frédéric Beaudoin<sup>1</sup>, Éric Nadeau<sup>2</sup>,  
Nathalie Bissonnette<sup>1</sup>, Yvan Boutin<sup>3</sup>, Karoline Lauzon<sup>1</sup>, John Morris Fairbrother<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food  
Canada, Sherbrooke, Québec, J1M 1Z3 Canada; <sup>2</sup>Université de Montréal, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Reference laboratory for *E. coli*, St-Hyacinthe, Québec, J2S  
7C6 Canada and <sup>3</sup>Transbiotech, Lévis, Québec, G6V 9V6 Canada.

Short Title: *Prevention of ETEC F4 infection by probiotics*

Manuscrit en préparation pour soumission à Veterinary Research

**Rôle dans l'article**

J'ai effectué la grande majorité des expériences menant aux résultats présentés dans cet article et j'ai écrit et révisé l'article dans son ensemble. De plus, j'ai mis au point la majorité des tests de dosage de cytokines par PCR en temps réel.

## Abstract

In the last few years, the use of probiotics as feed additives has gained in interest, because of their potential to improve the intestinal health of the host. In this study, the influence of the probiotics *Pediococcus acidilactici* (PA) and *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SCB) on intestinal colonization of F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 (ETEC F4) and expression of ileal cytokines was evaluated in weaned pigs. At birth, different litters of pigs were allocated to the following treatments: 1) control group without antibiotic or probiotic treatment (CTRL), 2) control in which antibiotics (aureomycin + tiamulin) were added to weaning feed (ATB), 3) PA, 4) SCB, or 5) PA + SCB. Probiotics were administered daily ( $1 \times 10^9$  CFU) during the lactation period and after weaning. One week after weaning, at 28 days of age, all pigs were orally challenged with an ETEC F4 strain and a necropsy was performed 24 hours later (day 29). Different intestinal samples were collected to evaluate colonization and attachment in the small intestine and expression of cytokines in the ileum. Attachment of ETEC F4 to the intestinal mucosa was significantly reduced in pig treated with PA or SCB in comparison with the ATB group ( $P = 0.01$  and  $0.03$ , respectively). In addition, proinflammatory cytokines, such as IL-6, were upregulated in the PA + SCB group when compared to the CTRL group. In conclusion, administration of PA or SCB was effective in reducing attachment of ETEC F4 to ileal mucosa, whereas only PA + SCB modulated the expression of intestinal inflammatory cytokines in ETEC F4 challenged pigs.

**Probiotic / enterotoxigenic *Escherichia coli* / pig / postweaning diarrhea / cytokines**

## 1. INTRODUCTION

Antimicrobials are commonly used as growth promoters and to prevent or treat gastrointestinal infections of weaned pigs [38]. In North America, postweaning diarrhea (PWD) is a major health problem in swine, resulting in significant financial losses in pig production. F4 (also named K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O149 (ETEC F4) infection is one of the most important causes of postweaning diarrhea in pigs [11, 14]. Emergence of antimicrobial resistance in the microflora of pigs and the risk of resistance gene transfer to pathogenic bacteria in humans, have increased the pressure on pig producers to seek alternative strategies [25]. Among proposed strategies, the use of probiotics has become more attractive, because of their potential to stimulate the intestinal immune system, to increase the production of antimicrobial peptides and intestinal cytokines by enterocytes and immune cells [9, 28, 50, 59].

Some pig producers currently use probiotics to decrease antimicrobial use. For instance, administration of lactic acid bacteria such as PA and yeasts such as SCB has been shown to improve intestinal defenses against microbial infection and to increase performance in different species of monogastric animals [18, 20]. For example, PA has been shown to improve weight gain and reduce oocyst shedding in chickens challenged with coccidia [36]. In addition, SCB has been reported to improve postweaning daily weight gain in pigs and to increase the number of mucosal macrophages [3]. Furthermore, Di Giancamillo et al. (2008) have recently shown that administration of PA positively influenced weight gain and resulted in increased villi height and crypt depth in weaned pigs [10]. Moreover, administration of PA reduced the bacterial diversity in the intestine of pigs after weaning [15]. Interestingly, enterohaemorrhagic *E. coli* bacteria of serogroup O157 have been reported to bind to the surface of SCB [16]. Finally, our laboratory also observed a diminution in bacterial translocation to mesenteric lymph nodes (MLN) in weaned pigs treated with PA, SCB or both probiotics, following an ETEC F4 challenge [37].

The aim of this study was to determine the influence of PA, SCB or combination of both probiotics on the consistency of intestinal content, intestinal colonization and attachment of ETEC F4 bacteria, and expression of intestinal cytokines after an ETEC F4 challenge.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animals and treatments

Twenty Yorkshire-Landrace gilts obtained from the COOP fédérée (Montréal, Quebec, Canada) were housed at the Dairy and Swine Research and Development Centre (Sherbrooke, Quebec, Canada). Two groups of 10 sows were formed and sows were used for two parities. Regumate (Intervet Canada Ltd, Whitby, Ontario, Canada) was used to synchronize oestrus and all 20 sows were inseminated twice with the same tested semen provided by the Centre d'insémination porcine du Québec inc. (St-Lambert, Quebec, Canada).

Twenty-eight days before parturition (day -28), pregnant sows were allocated to one of the five treatment groups using a complete randomized block design. Three groups of sows and their litters received one of the following treatments: PA (strain MA18/5M, Lallemand, France), SCB (strain SB-CNCM I-1079, Lallemand, France) or PA + SCB. The two other groups were used as control groups: in one group, litters received at weaning a diet medicated with aureomycin and tiamulin (ATB); whereas in the other group, litters remained untreated throughout the gestation, lactation, and postweaning period (CTRL). Sows allocated to probiotic treatments received  $2.5 \times 10^9$  colony forming units (CFU) from day -28 to day -14,  $3.5 \times 10^9$  CFU from day -14 to day 0 and  $6 \times 10^9$  CFU from day 0 to day 21. In PA + SCB group, both probiotics were given at the concentration indicated before. Probiotic doses were mixed with 500 grams of feed and were given to sows before the morning meal. Daily feed ration given to sows was 2.5 kg from day -28 to day -14, 3.5 kg from day -14 to day 0 and *ad libitum* during the lactation period (day 0 to day 21). Groups of sows were housed

in different pens located in different sections of the gestation room to avoid cross-contamination between treatments. A week before farrowing, the sows were transferred to rooms allocated to different treatments in the maternity section. In the first 24 hours after parturition, 10 sows and their piglets were randomly selected (2 sows per treatment) and litter size was adjusted to 12 piglets. If necessary, adoptions were carried out from litters from the same treatment group. The experiment was repeated a total of four times in 2 years.

Twenty-four hours after birth, pigs received orally the same probiotic treatment as their mother, by means of disposable pipettes. In the probiotic groups, the daily dose of each probiotic was  $1 \times 10^9$  CFU diluted in 2 ml of peptone water. Pigs of the control groups (CTRL and ATB) received 2 ml of peptone water alone. The daily dose of probiotics or peptone water was given during lactation and until one week after weaning. All the pigs were weaned at 21 days of age (day 21) and were transferred to their respective pens to avoid cross-contamination. After weaning, all pigs in the probiotic groups were fed a basal diet enriched with  $2 \times 10^9$  CFU/kg of the respective probiotics. Pigs of the ATB group received the same diet supplemented with aureomycin (110 ppm active ingredient/kg) and tiamulin (31.2 ppm active ingredient/kg). The basal diet was provided by the COOP fédérée (Table I). It did not contain plasma proteins and was low in zinc. Feed and water were available *ad libitum* to weaned pigs.

## **2.2 DNA marker-based test for the detection of the F4 receptor genes**

Jugular blood samples were collected from pigs at 5 days of age (day 5). The test for the detection of F4 receptor genes was performed as described by Jensen et al. (2006), with minor modifications [29]. Briefly, DNA was extracted from 100  $\mu$ l of blood using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The PCR-RFLP assay was performed on 20 ng genomic DNA from each pig in a total volume of 20  $\mu$ L using  $1 \times$  Standard Taq Buffer (New England Biolab Ltd, Pickering,

Ontario, Canada), 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 5.0  $\mu\text{M}$  of each primer: 5'-GTGCCTTGGGTGAGAGGTTA/5'-CACTCTGCCGTTCTCTTTCC, and 1 unit Taq DNA polymerase (New England Biolabs Ltd, Ontario, Canada). The thermocycling condition was: 5 min initial denaturation at 95°C and subsequently 95°C for 30 s in the additional cycles. Extension was carried out at 72°C for 1 minute. Touchdown was performed lowering the annealing temperature by 1°C after each cycle in the first 10 cycles, starting at 59°C. The last 30 cycles were performed at an annealing temperature of 49°C. This test relies on a *Xba*I-polymorphism in intron 7 of the porcine Mucin 4 gene. The PCR product obtained is 367 bp and 10  $\mu\text{L}$  of the PCR product was used for *Xba*I digestion as recommended by the supplier (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). The resistant allele is indigestible by *Xba*I, whereas the susceptible allele is digested into 151 and 216 bp fragments. Only susceptible pigs (F4R<sup>+</sup>) were used for challenge experiments (eight/treatment). One entire litter of the SCB group was F4 receptor negative, hence seven pigs instead of eight were challenged for this group.

### **2.3 *Escherichia coli* strain**

The ETEC F4 strain ECL8559 (0149:LT:STa:STb:East1:paa:hem $\beta$ :F4) used in challenge studies was isolated at the Reference laboratory for *E. coli* of the Faculté de Médecine Vétérinaire of the Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) from feces of a 42-day-old sick pig. A nalidixic acid resistant (Nal<sup>r</sup>) variant of this strain was obtained by serial passage in Luria-Bertani (LB) broth containing concentrations of nalidixic acid from 0 to 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  at 37°C for 24 h. This Nal<sup>r</sup> variant was used in subsequent challenge studies.

### **2.4 ETEC F4 challenge**

At 25 days of age, one pig positive for the F4 receptor gene from each litter was transferred to level 2 containment facilities (Laboratoire de St-Hyacinthe de l'ACIA, St-Hyacinthe, Québec, Canada) and used in the ETEC challenge. The pigs

were housed in groups (1 pen per treatment group). Three days after transfer (day 28), all pigs were orally challenged with  $1 \times 10^9$  CFU of ETEC F4 strain ECL8559 in 5 mL of Trypticase Soy broth (TSB; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) following administration of 10 mL CaCO<sub>3</sub> 1.2 % to neutralize gastric acid [48]. Both inocula were administered through an intraesophageic tube. Pigs were evaluated for general appearance, attitude, dehydration, food and water intake, and presence of diarrhea, in accordance to the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Pigs were euthanized 24 hours after the challenge (day 29). A necropsy was performed and intestinal contents and various tissues were removed for further analysis. Non-infected pigs (1 per litter), receiving the same treatments except the *E.coli* challenge, were euthanized on day 31 and were used for comparison with challenged animals. Also, these pigs were not transferred to St-Hyacinthe level 2 facilities. They were euthanized at the Dairy and Swine Research and Development Centre (Sherbrooke, Quebec, Canada).

### **2.5 Microbiological analysis of intestinal content sample, ileal mucosa and mesenteric lymph nodes (MLN)**

Following slaughter, intestinal content from the ileum and proximal colon were sampled for enumeration of probiotics and the ETEC F4 challenge strain. Plates containing LAMVAB agar, prepared as previously described by Hartemink et al. (2007), were used for the detection of PA [23]. The plates were incubated for 48 h at 37°C. PA appeared as spherical white colonies. Potato dextrose agar (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) was used for the detection of the yeast SCB. The media was acidified before use by adding sterile tartaric acid (10 % solution) until a pH of 3.5 was reached to inhibit bacterial growth. The yeast plates were stored at 30°C for 48 h and white, creamy and smooth colonies were enumerated. To enumerate the ETEC F4 strain in intestinal contents, samples were serially diluted and plated on MacConkey No.#2 agar (Oxoid, Nepean, Ontario,



Canada) supplemented with 50 µg/ml of nalidixic acid (Sigma-Aldrich Canada, Ltd, Oakville, Ontario, Canada). The plates were incubated for 24 h at 37°C.

For the detection of viable ETEC F4 on the ileal mucosa, 100 mg of ileal tissue slightly washed in phosphate buffered saline (PBS) was homogenized for five seconds using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Bohemia, NY, USA) in 1 ml of sterile PBS. The same procedure was used for the detection of ETEC F4 in ileo-cecal MLN. The colonization of the ileal mucosa by ETEC F4 was expressed as an index by calculating a ratio between the ETEC F4 counts in the ileal content and ETEC F4 counts in the ileal mucosa. Translocation into MLN was determined by the ratio between ETEC F4 counts on the ileal content and in MLN.

### **2.6 Intestinal content consistency scores**

Ileum, cecum and colon contents consistency scores, representing accumulation of fluid in intestine, were assigned by the same person who was blinded to treatment modality. Consistency scores were ranked using the following scale: 0, normal, solid content; 1, soft intestinal content, and looser content than normal; 2, semi-liquid intestinal content and 3, liquid content. Intermediate scores were assigned for some pigs

### **2.7 Indirect immunofluorescence assay (IFA)**

ETEC F4 attachment to ileal mucosa was determined using an indirect immunofluorescence assay. During the necropsy, ileal segments from each pig were embedded in Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA, USA) and immediately frozen in liquid nitrogen. Frozen ileal segments were subsequently sectioned at 5 µm using a Leica CM3050 cryostat (Leica Microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canada) fixed in 100 % methanol for five min and treated with a blocking solution containing 3 % albumin bovine serum (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) for 45 min at 37°C. Sections were then incubated with a 1:100 dilution rabbit anti-F4 fimbriae antiserum (provided by the Reference laboratory for

*E. coli*, St-Hyacinthe, Quebec, Canada) for 45 min at 37°C. After several washes in PBS, sections were rinsed with PBS and incubated with goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Westgrove, PA, USA) for 45 min at 37°C. DNA of epithelial cells was counterstained with 5 µg/ml of 4', 6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI) (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Sections were mounted and examined with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canada) equipped with epifluorescence and UV excitation modules. Attachment was rated between 0 and 4: a rating of 0 indicating no observed attachment of ETEC F4 to ileal mucosa; a rating of 4 indicating that several layers of ETEC F4 were attached to the entire villous length (Figure 1). Five randomly selected fields were visualized for each ileal section.

### **2.8 RNA extraction and cDNA synthesis**

At necropsy, ileal slices were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction and cDNA synthesis. Briefly, ileal slices were homogenized in TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Bohemia, NY, USA). Total RNA was extracted following the manufacturer's recommendations. The RNA was resuspended in 50 µL of ultrapure water (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) containing 1 U/µL of SUPERSase•In<sup>™</sup> (Applied Biosystems, CA, USA). Total RNA was quantified using a Nanodrop spectrometer (Nanodrop technologies, Wilmington, DE, USA) at a wave length of 260 nm and the purity was assessed by determining the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). All samples had a ratio between 1.7 and 2.0. The quality of the RNA was confirmed by examination of the presence of the 18s and 28s ribosomal bands on agarose gels containing ethidium bromide. Samples of RNA were treated with DNase I (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and precipitated in 50 µl of ammonium acetate (7.5 M) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 3 µl of Linear Acrylamide (5 mg/ml) (Applied

Biosystems, CA, USA) and 300  $\mu$ l of anhydrous ethyl alcohol (200 HP) (Commercial alcohols inc, Ontario, Canada). One microgram of total RNA was reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) as primer in a total volume of 20  $\mu$ l, according to the supplier's instructions. The cDNA samples were diluted 1:20 in nuclease free water and stored at -20°C prior to the real-time PCR analysis.

### **2.9 Quantification of cytokine gene expression by real-time PCR**

Real-time PCR was performed with the 7500 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA) to evaluate the expression of the cytokines described in Table II. The PCR mixture was composed of: 5  $\mu$ l *POWER SYBR*<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 0.1  $\mu$ l of AmpErase<sup>®</sup> Uracil N-glycosylase (Applied Biosystems, CA, USA), each set of primers (Applied Biosystems, CA, USA) specific to molecules and housekeeping genes at the concentrations indicated in Table II, 2  $\mu$ l of 1:20 diluted cDNA, and ultrapure water added to a final volume of 10  $\mu$ l. The primers were designed using the IDT SciTools PrimerQuest software program<sup>1</sup> and selected using the following criteria: (1) forward and reverse primers were placed on two consecutive exons where possible, (2) no more than two Gs or Cs within the last five nucleotides in the 3' termini. The PCR cycling conditions used were in accordance with the manufacturer's protocol. Level of expression was determined using a standard curve of a dilution series of DNA plasmid for each gene tested [44]. These plasmid standards were created by cloning gene-specific cDNA PCR products using a TA Cloning kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). The normalized expression level of the target gene was obtained as follows: target copy number/ $\beta$ -actin copy number. Amplification specificity was checked using a melting

---

<sup>1</sup> <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>

curve following the manufacturer's instructions. Each run included a no template control to detect DNA contamination of the reagents and each reaction was performed in triplicate.

### **2.10 Statistical analysis**

Data were analyzed as a randomized complete block design with the litter as the experimental unit. The MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC) was used to perform statistical analyses on the different variables, and the model included the treatment effect (5 groups). Treatments comparisons were done by testing the probiotic treatments (3 groups) against the control groups (CTRL and ABT) using a Dunnett's test for multiple testing. Comparisons were also done between infected (day 29) and non-infected (day 31) pigs. Consistency score data were analyzed using the Kruskal Wallis test.

## **3. RESULTS**

### **3.1 The administration of PA or SCB reduced attachment of ETEC F4 to the ileal mucosa of weaned pigs**

The attachment of ETEC F4 to the ileal mucosa, as demonstrated by immunofluorescence, (Figure 1), was significantly lower in pigs receiving PA or SCB ( $P = 0.01$  and  $P = 0.03$ , respectively) than for pigs treated with ATB (Figure 2). Moreover, the ETEC F4 attachment to the ileal mucosa tended to be reduced in PA + SCB pigs in comparison with those receiving ATB ( $P = 0.06$ ). However, this result was not significant. No difference between CTRL and ATB group was observed.

In addition, no effect of the different treatments on intestinal colonization was observed. The ETEC F4 count in the ileum, colon and MLN did not differ among treatments (Table III). The ratio between the CFU numbers of ETEC F4 present in the ileal content and the CFU numbers of ETEC F4 that colonized the ileal mucosa

tended to be higher in PA + SCB group than in ATB group ( $P = 0.07$ ) However, the result were not significant.

### **3.2 Administration of PA resulted in decreased of accumulation of fluid in the ileum of weaned pigs challenged with ETEC F4**

At necropsy, thus 24 h after challenge with a ETEC F4 strain, the mean consistency score of the ileal contents tended to be lower in pigs treated with PA than in those of the CTRL and ATB groups ( $P = 0.07$  and  $P = 0.10$ , respectively) (Table IV). For the cecum scores, ATB and PA + SCB groups tended to be higher than the CTRL group ( $P = 0.06$  and  $P = 0.10$ , respectively). However, the results were not significant. No difference among treatments was observed for the consistency scores of the colon.

### **3.3 Administration of PA alone or in combination with SCB increased mRNA expression of inflammatory cytokines in the ileum of ETEC F4 challenged weaned pigs**

Results for the expression of proinflammatory cytokines involved in the innate immune response at 1 day after the ETEC F4 challenge (day 29) are summarized in Table V. The expression of IL-6 in ileal tissue was significantly higher for the PA + SCB group compared with the CTRL group ( $P = 0.04$ ) and tended to be higher than for the ATB group ( $P = 0.07$ ) (Table V). Similarly, a tendency towards an upregulation of IL-6 was also observed in the PA group in comparison with the CTRL and ATB groups ( $P = 0.06$  and  $P = 0.10$ , respectively). However, the result was not significant.

In addition, trends to increase cytokine expression in the ileum were observed for TNF- $\alpha$  (PA + SCB vs CTRL;  $P = 0.08$ ), for IL-12p35 (PA vs CTRL;  $P = 0.07$ ) and pBD-2 (PA vs CTRL group;  $P = 0.09$ ). However, the results were not significant. On the other hand, no differences between groups were observed for the IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-8 genes in the ileum of ETEC F4 challenged animals. Moreover, IL-4, IL-

12p40 and COX-2 gene expression was very low or could not be detected for some pigs in the ileum, 24 h after ETEC F4 challenge (data not shown).

### **3.4 ETEC F4 challenge up-regulated IL-8 expression in the ileum of weaned pigs**

Expression of IL-8 in the ileum was significantly greater in pigs challenged with ETEC F4 (day 29) in comparison with non-challenged animals (day 31) ( $P = 0.003$ ) (Table V). In contrast, expression of IFN- $\gamma$  tended to be lower in the ileum of challenged pigs when compared to non-challenged pigs ( $P = 0.07$ ). However, the result was not significant. No statistically significant effect of challenge with ETEC F4 on the expression of the other tested cytokines was observed.

### **3.5 Probiotic and antibiotic treatments increased IL-8 expression in the ileum of non-challenged weaned pigs**

Expression of IL-8 in the ileum of non-challenged pigs treated with SCB, PA + SCB or ATB was significantly higher than for pigs of the CTRL group ( $P = 0.04$ ). Moreover, ileal expression of pBD-2 tended to be greater in non challenged SCB pigs than in non challenged CTRL pigs ( $P = 0.09$ ). However, the result was not significant.

## **4. DISCUSSION**

The aim of this study was to evaluate the impact of the administration of the probiotics PA, SCB or both on the development of ETEC F4 infection and the resulting intestinal cytokine response in weaned pigs. Results showed that administration of PA and SCB alone, reduced ETEC F4 attachment to the ileal mucosa, the first step in the pathogenesis of diarrhea due to this pathogen [31], in comparison with ATB. The inhibition of ETEC F4 adherence may not be due to a bactericidal effect, as the ETEC F4 live bacterial count in the ileum was unaffected

by the probiotic treatments. Several *in vitro* studies have demonstrated inhibition of *E. coli* attachment by probiotics to different types of intestinal epithelial cells and mucus [2, 7, 30, 32, 51, 55]. Furthermore, in agreement with these findings, treatment of porcine intestinal epithelial cells *in vitro* with a gram positive probiotic, *Lactobacillus sobrius* DSM 16698, strongly reduced the adherence of ETEC F4 [46]. Similarly, a human isolate of *L. casei* ssp. *rhamnosus* Lcr35 was also found to inhibit the adherence of ETEC to Caco-2 cells [12]. To the best of our knowledge, the current study is the first to demonstrate an antagonistic effect of probiotics to *E. coli* adherence to the intestinal mucosa *in vivo*, when compared with antibiotic.

The reduction of attachment could be attributed in part to an increase of the barrier function induced by probiotics. Many studies in different animal models, including pigs, have clearly demonstrated a reduction of bacterial translocation due to probiotics [35, 37, 60]. In the present study, probiotic treatments had no effect on ETEC F4 translocation to the MLN. This result contrasts with previous findings of our laboratory, where administration of ATB, PA, SCB and PA + SCB to pigs, prior to challenge with the ETEC F4 strain at 52 days, reduced facultative anaerobic bacterial translocation to the MLNs, as compared to the control group [37]. The difference in results may be explained by the age proximity with weaning in the present study and the difference of medium used for enumeration of bacteria (blood agar instead of MacConkey No.#2 agar supplemented with 50 µg/ml of nalidixic acid).

Enteropathogens, such as ETEC, must colonize the intestine in order to subsequently cause diarrhea. Results showed a trend toward a reduction of ETEC F4 colonization in the ileal mucosa of PA + SCB group in comparison with ATB. A similar effect on ETEC F4 levels in the ileum was observed when pigs were fed *L. sobrius* [34]. Tendancy toward a reduction of *E. coli* colonization could be explained in part by the competition between probiotics and ETEC F4 for space and nutrients in the ileal mucosa [4, 17, 24]. However, when PA or SCB was administered alone, no differences in ileal mucosa colonization were observed, suggesting that PA and SCB

were probably not efficient individually to prevent colonization of ETEC F4 in the ileum. Additionally, the quantity of probiotic administered to pigs may be not sufficient to compete effectively with the colossal challenge dose administered to pigs.

Several studies have shown that certain probiotics could reduce severity of diarrhea caused by *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar typhimurium and rotavirus [6, 52, 61]. Our results showed that the accumulation of fluid in the intestine, an indicator of severity of infection induced by ETEC F4, tended to be affected by probiotic treatments, particularly in pigs fed with PA alone. The significant reduction of ETEC F4 attachment to the ileal mucosa observed in the PA group could in part explain the diminution of fluid secretion in this organ. In fact, attachment of ETEC to specific F4 receptors in the ileum brings bacterial enterotoxins into close proximity with specific receptors on intestinal epithelial cells, thus promoting their capacity to induce fluid secretion [11]. Moreover, Carey et al. (2008) recently showed *in vitro* that different strains of *Pediococcus* had the potential to down-regulate Shiga toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 [5]. It would be interesting, in a further study, to determine if PA could modulate ETEC F4 enterotoxin gene expression. On the other hand, when PA and SCB were combined, the PA effect on ileal content consistency was inhibited and an increased consistency score was observed in the cecum. This result suggested that SCB may have antagonistic effects on PA. Interference on PA by SCB was previously reported where an augmentation of CD8<sup>+</sup> T cells in the ileum due to PA alone in pigs was not observed when PA and SCB were administered together [37]. In addition, the slightly greater accumulation of fluid in the cecum of ATB pigs when compared with the CTRL group, may have been due to the uses of antibiotics that have no direct effect on the challenge strain. The challenge strain was resistant to antibiotics used in this study. Finally, fluid accumulation was not affected in pigs fed with SCB alone in any intestinal region.

Colonization and attachment to ileal mucosa of ETEC F4 have been shown to stimulate the host's innate immune response in previous study [26, 42, 45]. In the



present study, we observed that ETEC F4 infection stimulated cytokine expression and that probiotics could modulate the expression of cytokines implicated in innate immune defense against ETEC F4. For instance, PA + SCB significantly increased the expression of IL-6, a proinflammatory cytokine, in the ileum of ETEC F4 challenged pigs. Other studies have shown that probiotics such as *L. helveticus* R389 and *Bifidobacterium lactis* BB12 stimulates IL-6 production in primary murine intestinal epithelial cells [47, 58]. In addition, this multifunctional cytokine is required for a protective immune response to systemic *E. coli* infection in mice [8]. Also, IL-6 enhances local mucosal response of IgA, an important immunoglobulin in intestinal defense against enteric infection [19]. A tendency toward an augmentation of the expression of IL-6 was also observed in the PA group, but not in the SCB group, suggesting that the effect obtained when the two probiotics were combined is primarily due the action of PA on ileal mucosa. Similarly, TNF- $\alpha$  ileal gene expression tended to be upregulated in the PA + SCB group only, but, in this case, not when PA or SCB was administered alone. This possibly synergistic effect may have been due to the interaction of the probiotics with host immune cells in the ileal mucosa or secretion of modulins by the probiotics which could promote cytokine expression [13]. Other studies have reported that lactic acid bacteria could induce innate cytokines, such as TNF- $\alpha$ , in intestinal leucocytes and spleen cells [21, 33].

Tendency toward an increased of IL-12p35 gene expression was also observed in the PA group, following ETEC F4 challenge. IL-12 is a Th1-cytokine which has been implicated in the innate immunity against enteric pathogens [40]. Similarly, *L. rhamnosus* GG E522, a well known probiotic used in humans, was shown to stimulate IL-12 production in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [39]. Interestingly, prevention of infection by pathogenic *E. coli*, through the activation of macrophages by IL-12 and TNF  $\alpha$ , has been shown previously in rats receiving *L. casei* I-5 [27]. Furthermore, IL-12 deficiency has been associated with recurrent infections in humans [22]. A recently discovered antimicrobial peptide in the small intestinal tract of the pig, porcine  $\beta$ -defensin-2 (pBD-2) [57], tended to be

upregulated following ETEC F4 infection in the ileum of pigs supplemented with PA in this study. This antimicrobial peptide displays broad antimicrobial activity against several pathogenic intestinal bacteria in pigs and humans, as demonstrated by *in vitro* studies [56]. Taken together, these results suggest that PA alone or combine with SCB accentuated innate immune defense against ETEC F4.

A notable finding of this study was the significant increase in IL-8 mRNA expression in the ileum of pigs challenged with ETEC F4 as compared to non-challenged pigs. Similar results have been found *in vitro* following stimulation of porcine intestinal epithelial cells, Caco-2 cell or porcine macrophage cell line (3D4/31) with ETEC F4 [41, 43, 46, 45]. Upregulation of IL-8 could be associated with neutrophil and monocyte chemotaxis in response to ETEC F4 [1]. Surprisingly, IFN- $\gamma$  expression tended to be decreased in the ileum of pigs challenged with ETEC F4 as compared to non-challenged pigs. One important role of IFN- $\gamma$  is to activate phagocytosis and intracellular destruction of bacteria by macrophages, which are implicated in the innate immune defense against pathogenic bacteria like *E. coli* [53].

No effect of the different treatments on ileal cytokine expression was observed in non-challenged animals, with the exception of IL-8 and pBD-2. The increased IL-8 expression following SCB, PA + SCB and ATB treatment is in contrast with *in vitro* results in human intestinal epithelial cells, where a different strain of SCB exerted an anti-inflammatory effect by producing a low molecular weight soluble factor that blocks NF- $\kappa$ B mediated expression [54]. It could be hypothesized that SCB adhered to intestinal epithelial receptors leading to IL-8 secretion in our *in vivo* model, but further study is needed to confirm such hypothesis. An upregulation of this cytokine was not observed in PA animals, so we can conclude that the effect observed in PA + SCB pigs was primarily due to SCB action. Moreover, there was a trend (although not statistically significant) for an upregulation of pBD-2 expression in non-challenged SCB animals. Upregulation of antimicrobial peptides is a well known mechanism of action for bacterial probiotics, but a new one for yeast probiotics [50, 49, 59].

In conclusion, administration of PA or SCB, but not ATB, limits the attachment of ETEC F4 to the ileal mucosa, a key step in the pathogenesis of disease due to this bacterium. As expected, antibiotics used in this study have no direct effect on ETEC F4 attachment or colonization. In addition, PA, but not SCB, influence the expression of cytokines involved in the intestinal immune defense against ETEC F4. Taken together, these results suggest that administration of probiotics could be a promising alternative to limit enteric disease caused by ETEC F4 infection in weaned pigs.

## Acknowledgments

This work was supported by the Coopérative Fédérée du Québec, La fédération des producteurs de porc du Québec, the Institut Rosell-Lallemand, and Agriculture and Agri-Food Canada's Matching Investment Initiative (MII). The authors would like to thank Steve Methot, statistician at the Dairy and Swine R&D Centre, for performing the statistical analyses, Mireille Pilote from Transbiotech and all employees who took care of the animals and collected data during the project.

## REFERENCES

- [1] Baggiolini M., Clark-Lewis I., Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine, FEBS Lett. (1992) 307:97-101.
- [2] Blomberg L., Henriksson A., Conway P.L., Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus spp.*, Appl. Environ. Microbiol. (1993) 59:34-39.
- [3] Bontempo V., Di Giancamillo A., Savoini G., Dell'orto V., Domeneghini C., Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects

- and growth in weanling piglets, *Anim. Feed Sci. Technol.* (2006) 129:224-236.
- [4] Brashears M.M., Jaroni D., Trimble J., Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle, *J. Food Prot.* (2003) 66:355-363.
- [5] Carey C.M., Kostrzynska M., Ojha S., Thompson S., The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J. Microbiol. Methods* (2008) 73:125-132.
- [6] Casey P.G., Gardiner G.E., Casey G., Bradshaw B., Lawlor P.G., Lynch P.B., Leonard F.C., Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C., A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Appl. Environ. Microbiol.* (2007) 73:1858-1863.
- [7] Collado M.C., Grzeskowiak L., Salminen S., Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa, *Curr. Microbiol.* (2007) 55:260-265.
- [8] Dalrymple S.A., Slattery R., Aud D.M., Krishna M., Lucian L.A., Murray R., Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection, *Infect. Immun.* (1996) 64:3231-3235.
- [9] Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M., Amiot J., Boutin Y., Roy D., Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract, *Curr. Issues Mol. Biol.* (2008) 10:37-54.

- [10] Di Giancamillo A., Vitari F., Savoini G., Bontempo V., Bersani C., Dell'Orto V., Domeneghini C., Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study, *Histol. Histopathol.* (2008) 23:651-664.
- [11] Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L., *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies, *Anim. Health Res. Rev.* (2005) 6:17-39.
- [12] Forestier C., De Champs C., Vatoux C., Joly B., Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties, *Res. Microbiol.* (2001) 152:167-173.
- [13] Freitas M., Tavan E., Cayuela C., Diop L., Sapin C., Trugnan G., Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game., *Biol. Cell* (2003) 95:503-506.
- [14] Frydendahl K., Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches, *Vet. Microbiol.* (2002) 85:169-182.
- [15] Gagnon N., Talbot G., Ward P., Roy D., Dupuis M., Farnworth E., Tompkins T.A., Lessard M., Evaluation of bacterial diversity in the gut of piglets supplemented with probiotics using ribosomal intergenic spacer analysis, *Can. J. Anim. Sci.* (2007) 87:207-219.

- [16] Gedek B.R., Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella Typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*, *Mycoses* (1999) 42:261-264.
- [17] Genovese K.J., Anderson R.C., Harvey R.B., Nisbet D.J., Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs, *Can. J. Vet. Res.* (2000) 64:204-207.
- [18] Gil de los Santos J.R., Storch O.B., Gil-Turnes C., *Bacillus cereus* var. toyoi and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*, *Br. Poult. Sci.* (2005) 46:494-497.
- [19] Goodrich M.E., McGee D.W., Effect of intestinal epithelial cell cytokines on mucosal B-cell IgA secretion: enhancing effect of epithelial-derived IL-6 but not TGF- $\beta$  on IgA+ B cells, *Immunol. Lett.* (1999) 67:11-14.
- [20] Guerra N.P., Bernardez P.F., Mendez J., Cachaldora P., Castro L.P., Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets, *Anim. Feed Sci. Technol.* (2007) 134:89-107.
- [21] Haller D., Bode C., Hammes W.P., Pfeifer A.M.A., Schiffrin E.J., Blum S., Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures, *Gut* (2000) 47:79-87.
- [22] Haraguchi S., Day N.K., Nelson R.P., Emmanuel P., Duplantier J.E., Christodoulou C.S., Good R.A., Interleukin 12 deficiency associated with recurrent infections, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1998) 95:13125-13129

- [23] Hartemink R., Domenech V.R., Rombouts F.M., LAMVAB--A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces, *J. Microbiol. Methods* (1997) 29:77-84.
- [24] Harvey R.B., Anderson R.C., Genovese K.J., Callaway T.R., Nisbet D.J., Use of competitive exclusion to control enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* in weaned pigs, *J. Anim. Sci.* (2005) 83:E44-47.
- [25] Heuer O.E., Hammerum A.M., Collignon P., Wegener H.C., Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food, *Clin. Infect. Dis.* (2006) 43:911-916.
- [26] Huang D.B., DuPont H.L., Jiang Z.-D., Carlin L., Okhuysen P.C., Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2004) 11:548-551.
- [27] Ishida-Fujii K., Sato R., Goto S., Yang X.-P., Kuboki H., Hirano S.-I., Sato M., Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic *Lactobacillus casei* I-5, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2007) 71:866-873.
- [28] Isolauri E., Sutas Y., Kankaanpaa P., Arvilommi H., Salminen S., Probiotics: effects on immunity, *Am. J. Clin. Nutr.* (2001) 73:444S-450S.
- [29] Jensen G.M., Frydendahl K., Svendsen O., Jorgensen C.B., Cirera S., Fredholm M., Nielsen J.P., Moller K., Experimental infection with *Escherichia coli* O149:F4ac in weaned piglets, *Vet. Microbiol.* (2006) 115:243-249.

- [30] Jin L.Z., Marquardt R.R., Zhao X., A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus, *Appl. Environ. Microbiol.* (2000) 66:4200-4204.
- [31] Jin L.Z., Zhao X., Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine - a Review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2000) 54:311-318.
- [32] Kim Y., Kim S.H., Whang K.Y., Kim Y.J., Oh S., Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2008) 18:1278-1285.
- [33] Kim Y.G., Ohta T., Takahashi T., Kushiro A., Nomoto K., Yokokura T., Okada N., Danbara H., Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase signaling pathways, *Microbes Infect.* (2006) 8:994-1005.
- [34] Konstantinov S.R., Smidt H., Akkermans A.D.L., Casini L., Trevisi P., Mazzoni M., De Filippi S., Bosi P., De Vos W.M., Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets, *FEMS Microbiol. Ecol.* (2008) 66:599-607.
- [35] Laudanno O.M., Cesolari J.A., Godoy A., Sutich E., Sarangone S., Catalano J., San Miguel P., Bioflora probiotic in immunomodulation and prophylaxis of intestinal bacterial translocation in rats, *Dig. Dis. Sci.* (2008) 53:2667-2670.
- [36] Lee S.H., Lillehoj H.S., Dalloul R.A., Park D.W., Hong Y.H., Lin J.J., Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens, *Poult. Sci.* (2007) 86:63-66.



- [37] Lessard M., Dupuis M., Gagnon N., Nadeau E., Matte J.J., Goulet J., Fairbrother J.M., Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge, *J. Anim. Sci.* (2009) 87:922-934.
- [38] McEwen S.A., Fedorka-Cray P.J., Antimicrobial use and resistance in animals, *Clin. Infect. Dis.* (2002) 34 Suppl 3:S93-S106.
- [39] Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., Julkunen I., Lactobacilli and Streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells, *Infect. Immun.* (1998) 66:6058-6062.
- [40] Mizuno Y., Takada H., Nomura A., Jin C.H., Hattori H., Ihara K., Aoki T., Eguchi K., Hara T., Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection, *Clin. Exp. Immunol.* (2003) 131:111-117.
- [41] Moue M., Tohno M., Shimazu T., Kido T., Aso H., Saito T., Kitazawa H., Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line, *Biochim. Biophys. Acta* (2008) 1780:134-144.
- [42] Niewold T.A., Kerstens H.H.D., Van Der Meulen J., Smits M.A., Hulst M.M., Development of a porcine small intestinal cDNA micro-array: characterization and functional analysis of the response to enterotoxigenic *E. coli*, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2005) 105:317-329.

- [43] Pavlova B., Volf J., Alexa P., Rychlik I., Matiasovic J., Faldyna M., Cytokine mRNA expression in porcine cell lines stimulated by enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vet. Microbiol.* (2008) 132:105-110.
- [44] Pfaffl M.W., Hageleit M., Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR, *Biotechnol. Lett.* (2001) 23:275-282.
- [45] Roselli M., Finamore A., Britti M.S., Mengheri E., Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, *Br. J. Nutr.* (2006) 95:1177-1184.
- [46] Roselli M., Finamore A., Britti M.S., Konstantinov S.R., Smidt H., de Vos W.M., Mengheri E., The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage, *J. Nutr.* (2007) 137:2709-2716.
- [47] Ruiz P.A., Hoffmann M., Szcesny S., Blaut M., Haller D., Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats, *Immunology* (2005) 115:441-450.
- [48] Sarmiento J.I., Casey T.A., Moon H.W., Postweaning diarrhea in swine: experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection, *Am. J. Vet. Res.* (1988) 49:1154-1159.
- [49] Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T.A., Stange E.F., Fellermann K., Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia*

- coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin, *Infect. Immun.* (2007) 75:2399-2407.
- [50] Schlee M., Harder J., Koten B., Stange E.F., Wehkamp J., Fellermann K., Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2, *Clin. Exp. Immunol.* (2008) 151:528-535.
- [51] Sherman P.M., Johnson-Henry K.C., Yeung H.P., Ngo P.S., Goulet J., Tompkins T.A., Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements, *Infect. Immun.* (2005) 73:5183-5188.
- [52] Shu Q., Qu F., Gill H.S., Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2001) 33:171-177.
- [53] Smythies L.E., Sellers M., Clements R.H., Mosteller-Barnum M., Meng G., Benjamin W.H., Orenstein J.M., Smith P.D., Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity, *J. Clin. Invest.* (2005) 115:66-75.
- [54] Sougioultzis S., Simeonidis S., Bhaskar K.R., Chen X., Anton P.M., Keates S., Pothoulakis C., Kelly C.P., *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006) 343:69-76.

- [55] Spencer R.J., Chesson A., The effect of *Lactobacillus spp.* on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes, *J. Appl. Bacteriol.* (1994) 77:215-220.
- [56] Veldhuizen E.J., Rijnders M., Claassen E.A., van Dijk A., Haagsman H.P., Porcine  $\beta$ -defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria, *Mol. Immunol.* (2008) 45:386-394.
- [57] Veldhuizen E.J.A., van Dijk A., Tersteeg M.H.G., Kalkhove S.I.C., van der Meulen J., Niewold T.A., Haagsman H.P., Expression of  $\beta$ -defensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig: Lack of upregulation *in vivo* upon *Salmonella typhimurium* infection, *Mol. Immunol.* (2007) 44:276-283.
- [58] Vinderola G., Matar C., Perdigon G., Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of Toll-Like Receptors, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2005) 12:1075-1084.
- [59] Wehkamp J., Harder J., Wehkamp K., Wehkamp-von Meissner B., Schlee M., Enders C., Sonnenborn U., Nuding S., Bengmark S., Fellermann K., Schroder J.M., Stange E.F., NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated induction of human  $\beta$ -defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium, *Infect. Immun.* (2004) 72:5750-5758.
- [60] Zareie M., Johnson-Henry K., Jury J., Yang P.C., Ngan B.Y., McKay D.M., Soderholm J.D., Perdue M.H., Sherman P.M., Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress, *Gut* (2006) 55:1553-1560.

- [61] Zeyner A., Boldt E., Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets, J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl) (2006) 90:25-31.

**Table I.** Nutrient composition of the weaning diet (day 21 to 31).

Nutrient	Concentration
Protein, %	21.5
Fat, %	7.52
Fiber, %	2.34
Calcium, %	1.00
Phosphorus, %	0.76
Sodium, %	0.2
Copper, mg/kg	128.17
Zinc, mg/kg	138.41
Vitamin A, IU/kg	11,500
Vitamin D, IU/kg	1,140
Vitamin E, IU/kg	56

**Table II.** Oligonucleotides for real-time PCR.

mRNA target	Oligonucleotides (5' → 3') <sup>a</sup>	Product size (bp)	Final concentration (nM) <sup>b</sup>
IL-4	F:GGTCTGCTTACTGGCATGTACC R:CTCCATGCACGAGTTCTTTCTC	117	F 150; R 150
IL-6	F:GGAAATGTCGAGGCTGTGCAGATT R:GGTGGTGGCTTTGTCTGGATTCTT	87	F 300; R 300
IL-8	F:AGAACTGAGAAGCAACAACAACAG R:CACAGGAATGAGGCATAGATGTAG	132	F 300; R 300
IL-10	F:GATATCAAGGAGCACGTGAACTC R:GAGCTTGCTAAAGGCACTCTTC	137	F 300; R 300
IL-12p35	F:TGCAGGCTCTGAATTTCAAC R:CACGAATTCTGAAGGCATGA	111	F 150; R 150
IL-12p40	F:CTTCATCAGGGACATCATCAAAC R:GGTCCGTGAAGAGTTTATCTTTCT	196	F 300; R 150
IFN- $\gamma$	F:AGGTTCTCTAAATGGTAGCTCTGGG R:AGTTCCTGATGGCTTTGCGCT	101	F 300; R 300
TNF- $\alpha$	F:CACTGACCACCACCAAGAATTGGA R:CATTCCAGATGTCCCAGGTTGCAT	94	F 300; R 300
pBD-2	F:CCGACCACTACATATGTGCCAAGA R:TGCCACTGTAACAGGTCCCTTCAA	93	F 300; R 300
COX-2	F:AAGCGAGGACCAGCTTTCACCAAA R:GCGCAGTTTATGCTGTCTCTCCAA	93	F 300; R 300
$\beta$ -actin	F:CTCTTCCAGCCCTCCTTCTCCT R:GCGTAGAGGTCCTTCCTGATGT	104	F 300; R 300

<sup>a</sup>F and R indicate forward and reverse primers, respectively.

<sup>b</sup>Final concentration of forward (F) and reverse (R) primers.

**Table III.** ETEC F4 colonization of different intestinal tissues in F4-receptor-positive pigs treated with probiotics, antibiotics or without treatment at 24 h after ETEC F4 challenge.

	Intestinal ETEC F4 colonization (Log <sub>10</sub> CFU/g of tissue) for group treated with <sup>1</sup> :					SEM <sup>2</sup>
	CTRL	ATB	PA	SCB	PA + SCB	
Ileum content	7.49	7.72	7.07	7.37	7.98	0.44
Ileum mucosa	6.24	6.98	6.17	6.53	6.52	0.55
Colon content	7.41	7.72	7.52	7.66	8.31	0.50
MLN	3.88	4.16	3.58	3.54	4.59	0.27
Ileum content/ Ileum mucosa	1.25	0.75 <sup>a</sup>	0.90	0.87	1.46 <sup>b</sup>	0.29
Ileum content/MLN	3.61	3.56	3.49	3.85	3.40	0.63

<sup>1</sup>CTRL = No probiotic and no antibiotic; ATB = tiamulin and aureomycin; PA = *P. acidilactici*; SCB = *S. cerevisiae boulardii*; PA + SCB = a mixture of the two probiotics.

<sup>2</sup>Pooled standard error of the mean (SEM); n = 8/treatment, except for SCB; n = 7.

<sup>a, b</sup>Means within rows without common letters tend to differ ( $P = 0.07$ ).



**Table IV.** Consistency scores of ileum, cecum, and colon contents of F4-receptor-positive pigs treated with probiotics, antibiotics or without treatment at 24 h after ETEC F4 challenge.

	Mean consistency score <sup>1</sup> of intestinal contents of pigs treated with <sup>2</sup> :					SEM <sup>3</sup>	P-value
	CTRL	ATB	PA	SCB	PA + SCB		
Ileum	2.94	2.81	1.94 <sup>ab</sup>	2.46	2.44	0.40	0.38
Cecum	1.21	2.29 <sup>a</sup>	1.75	2.07	2.13 <sup>a</sup>	0.39	0.33
Colon	1.25	1.25	1.25	1.00	0.94	0.38	0.94

<sup>1</sup>Score: 0, normal, solid content; 1, soft intestinal content, and looser content than normal; 2, semi-liquid intestinal content and 3, liquid content.

<sup>2</sup>CTRL = No probiotic and no antibiotic; ATB = tiamulin and aureomycin; PA = *P. acidilactici*; SCB = *S. cerevisiae boulardii*; PA + SCB = a mixture of the two probiotics.

<sup>3</sup>Pooled SEM; n = 8/treatment, except for SCB, n = 7.

<sup>a</sup>Mean of the treatment tends to differ from the mean of the CTRL group ( $P < 0.10$ ).

<sup>b</sup>Mean of the treatment tends to differ of the mean of the ATB group ( $P < 0.10$ ).

**Table V.** Cytokines mRNA expression levels normalized to  $\beta$ -actin in non-challenged (day 31) and ETEC F4 challenged pigs (day 29) treated with probiotics, antibiotics or without treatment.

Day	Mean cytokine mRNA expression level <sup>1</sup> in the ileum of pigs treated with <sup>2</sup> :					<i>P</i> -value		
	CTRL	ATB	PA	SCB	PA + SCB	Tr	Challenge (C)	Tr $\times$ C
<b>IL-6 (<math>10^{-4}</math>)</b>								
29	0.9 <sup>a</sup> [0.3; 3.1]	1.1 [0.3; 3.6]	3.5 <sup>c</sup> [1.1; 11.3]	0.6 [0.2; 1.9]	3.9 <sup>b</sup> [1.2; 12.7]			
31	0.8 [0.2; 3.2]	1.7 [0.4; 7.4]	0.9 [0.2; 3.8]	1.2 [0.3; 5.0]	1.2 [0.3; 5.0]	0.33	0.47	0.29
<b>TNF-<math>\alpha</math> (<math>10^{-3}</math>)</b>								
29	1.28 <sup>a</sup> [0.38; 4.32]	2.94 [0.94; 9.19]	3.87 [1.24; 12.09]	1.65 [0.49; 5.56]	5.28 <sup>c</sup> [1.69; 16.48]			
31	1.59 [0.46; 5.52]	4.40 [1.10; 17.52]	4.53 [1.31; 15.73]	3.04 [0.88; 10.54]	3.03 [0.87; 10.51]	0.24	0.59	0.85
<b>pBD-2</b>								
29	0.025 <sup>a</sup> [0.013; 0.05]	0.045 [0.024; 0.085]	0.053 <sup>c</sup> [0.028; 0.1]	0.05 [0.025; 0.1]	0.041 [0.021; 0.077]			
31	0.027 <sup>a</sup> [0.01; 0.068]	0.040 [0.015; 0.11]	0.034 [0.013; 0.088]	0.065 <sup>c</sup> [0.026; 0.17]	0.043 [0.017; 0.11]	0.33	0.83	0.88
<b>IL-12p35</b>								
29	0.018 <sup>a</sup> [0.007; 0.046]	0.029 [0.012; 0.069]	0.059 <sup>c</sup> [0.025; 0.142]	0.017 [0.006; 0.042]	0.027 [0.011; 0.065]			
31	0.011 [0.003; 0.038]	0.033 [0.008; 0.13]	0.022 [0.006; 0.074]	0.025 [0.007; 0.085]	0.025 [0.007; 0.091]	0.31	0.59	0.65

Table V. Continued.

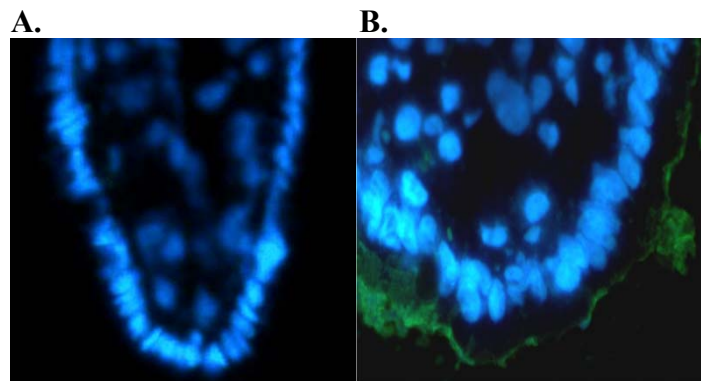
Day	Mean cytokine mRNA expression level in the ileum of pigs treated with:					<i>P</i> -value		
	CTRL	ATB	PA	SCB	PA + SCB	Tr	Challenge (C)	Tr × C
<b>IL-8</b>								
29	11.59 [1.29; 104,14]	16.86 [2.12; 133.91]	6.46 [0.81; 51.3]	6.41 [0.71; 57.63]	10.08 [1.27; 80.04]			
31	0.59 <sup>a</sup> [0.08; 4.47]	3.79 <sup>b</sup> [0.44; 32.9]	1.62 [0.21; 12.36]	3.12 <sup>b</sup> [0.41; 23.73]	3.55 <sup>b</sup> [0.44; 28.63]	0.48	0.003	0.68
<b>IFN-<math>\gamma</math> (10<sup>-4</sup>)</b>								
29	0.6 [0.1; 2.7]	0.9 [0.2; 3.7]	0.4 [0.1; 1.7]	0.9 [0.2; 3.7]	1.6 [0.4; 6.6]			
31	2.9 [0.6; 13.5]	1.8 [0.3; 9.2]	0.7 [0.2; 3.5]	1.2 [0.3; 5.7]	3.0 [0.6; 14.1]	0.26	0.07	0.88
<b>IL-10</b>								
29	0.2 [0.05; 0.77]	0.29 [0.08; 1]	0.22 [0.06; 0.77]	0.09 [0.02; 0.32]	0.45 [0.13; 1.57]			
31	0.15 [0.05; 0.45]	0.38 [0.12; 1.25]	0.13 [0.04; 0.37]	0.25 [0.08; 0.72]	0.24 [0.08; 0.73]	0.39	0.085	0.47

<sup>1</sup>Data are presented as the mean of target copy number/ $\beta$ -actin copy number with the range of values for a 95 % confidence interval.

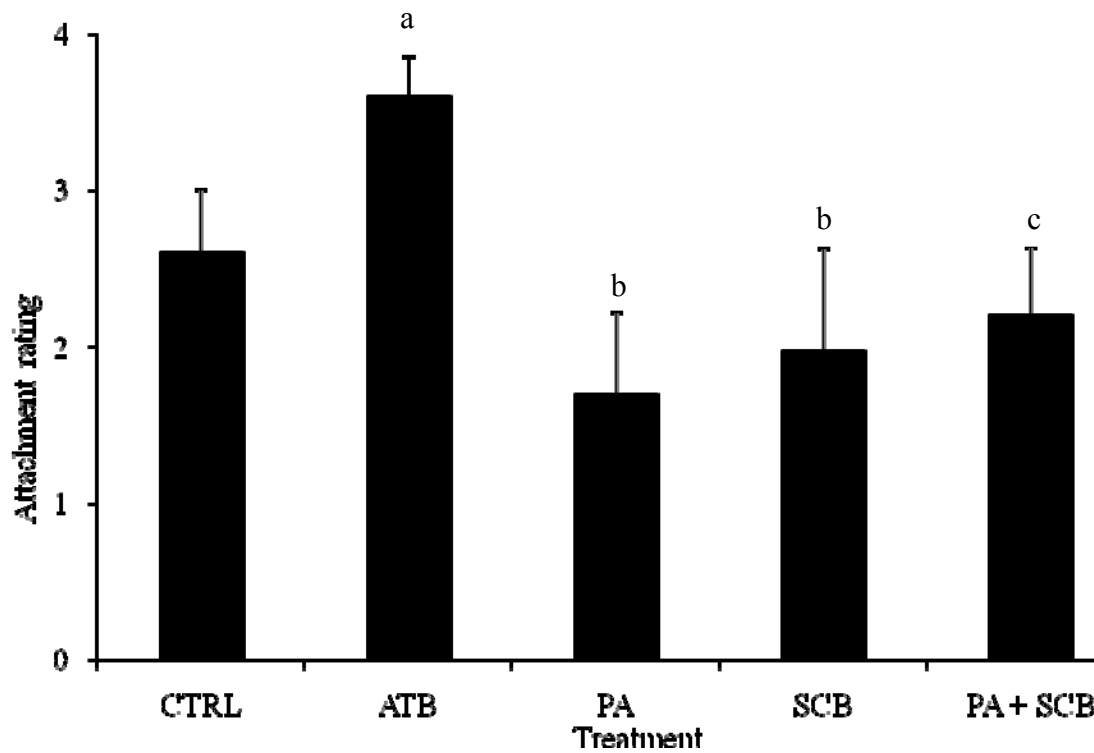
<sup>2</sup>CTRL = No probiotic and no antibiotic; ATB = tiamulin and aureomycin; PA = *P. acidilactici*; SCB = *S. cerevisiae boulardii*; PA + SCB = a mixture of the two probiotics.

<sup>a, b</sup>Means within rows are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>a, c</sup>Means within rows tend to be different ( $P < 0.10$ ).



**Figure 1.** Detection of adherent ETEC F4 bacteria on ileal sections of challenged F4-receptor positive pigs using the immunofluorescent assay. Green staining (fluorescein isothionate) represented ETEC F4 bacteria and nuclei of epithelial cells were stained with 5  $\mu\text{g/ml}$  of DAPI (blue). Representative ileal sections with an attachment rating of 0 (A) or 4 (B).



**Figure 2** Attachment of ETEC F4 bacteria to the ileal mucosa following challenge in F4-receptor positive pigs receiving no antibiotic or probiotic (CTRL), antibiotics (ATB), *P. acidilactici* (PA), *S. cerevisiae boulardii* (SCB) or both, PA + SCB. Results are presented as the mean for six pigs per treatment, except for CTRL and ATB, where five pigs were used. <sup>a,b</sup>Bars ( $\pm$  SEM) with different letters statistically differ ( $P < 0.05$ ). <sup>a,c</sup> Bars ( $\pm$  SEM) with different letters tend to differ ( $P = 0.06$ ).

## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

## 6. DISCUSSION

Le but du présent travail était d'évaluer l'impact d'administrer dès la naissance les probiotiques PA et SCB, seul ou en combinaison, sur la colonisation et la réponse cytokinaire intestinale, lors d'une infection expérimentale à ETEC F4 chez le porcelet, après le sevrage. Nos résultats ont démontré que l'administration de PA et SCB seul, réduit l'attachement des ETEC F4 à la muqueuse iléale, la première étape dans la pathogenèse de diarrhée causée par ce pathogène (Jin et Zhao, 2000), en comparaison avec les antibiotiques. Plusieurs études *in vitro* ont démontré une inhibition de l'attachement des *E. coli* par des probiotiques sur différents types de cellules épithéliales intestinales et dans le mucus (Blomberg et al., 1993; Collado et al., 2007; Jin et al., 2000; Kim et al., 2008; Sherman et al., 2005; Spencer et Chesson, 1994). De plus, en accord avec ces résultats, une étude *in vitro* a démontré que le traitement avec *L. sobrius* DSM 16698 de cellules épithéliales intestinales porcines infectées avec ETEC F4, diminue fortement l'adhésion de ce pathogène (Roselli et al., 2007). De façon similaire, un isolat humain de *L. casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35 peut aussi diminuer l'adhésion des ETEC aux cellules Caco-2 (Forestier et al., 2001). Cependant, notre étude est la première à avoir démontré *in vivo* un effet antagoniste des probiotiques sur l'attachement des *E. coli* à la muqueuse intestinale, en comparaison avec des antibiotiques.

La réduction de l'attachement des ETEC F4 pourrait être attribuée en partie par une augmentation de la fonction de barrière de la muqueuse intestinale induite par les probiotiques. Plusieurs études dans différents modèles animaux, incluant le porc, ont clairement démontré une diminution de la translocation bactérienne par les probiotiques (Laudanno et al., 2008; Lessard et al., 2009; Zareie et al., 2006). Dans notre étude, les traitements de probiotiques n'ont pas eu d'effet sur la translocation des ETEC F4 dans les ganglions mésentériques. Ce résultat contraste avec celui obtenu par notre laboratoire dans une étude précédente qui avait démontré une diminution de la translocation des bactéries anaérobies facultatives chez les groupes ATB, PA, SCB et PA + SCB en comparaison avec le groupe témoin (Lessard et al., 2009). Les différences dans les résultats dans la présente étude pourraient être expliquées par la proximité du sevrage et

la différence de milieu utilisé pour l'énumération des bactéries. En effet, des géloses sang sans antibiotique avait été utilisées dans l'expérience précédente, ce qui ne permettait pas de discriminer la souche infectante des autres bactéries entériques présents dans les contenus intestinaux.

Les entéropathogènes, comme les *E. coli* entérotoxinogènes, doivent d'abord coloniser l'intestin pour causer la diarrhée. Une tendance à la réduction de la colonisation des ETEC F4 au niveau de la muqueuse iléale a été observée dans le groupe PA + SCB. Une autre équipe de recherche a obtenu un effet similaire sur la quantité de ETEC F4 dans l'iléon de porcelets, lorsque ceux-ci recevaient *L. sobrius* DSM 16698, après le sevrage (Konstantinov et al., 2008). La tendance à la réduction de la colonisation des *E. coli* pourrait être en partie expliquée par la compétition entre les probiotiques et les ETEC F4 pour l'espace et les nutriments présents dans l'environnement de la muqueuse iléale (Brashears et al., 2003; Genovese et al., 2000; Harvey et al., 2005). De plus, il a été démontré dans une étude antérieure que différents pathotypes de *E. coli* peuvent adhérer à la surface de SCB (Gedek, 1999). En outre, il est connu que PA sécrète massivement de l'acide lactique, ce qui pourrait interférer avec la survie et la colonisation des ETEC F4 présents dans les microenvironnements intestinaux, où l'acide lactique pourrait s'accumuler. Cependant, une diminution de la colonisation n'est pas observée lorsque PA ou SCB est administré seul. Ceci suggère que la dose de probiotiques administrée individuellement pourrait être insuffisante pour contrer la dose massive de la souche infectante administrée aux porcelets ou que les probiotiques agissent en synergie contre ETEC F4. De plus, du carbonate de calcium a été administrée aux porcelets avant de recevoir la souche infectante, ce qui a neutralisé l'acidité gastrique, permettant aux ETEC F4 de survivre plus facilement aux passages dans l'estomac. Ce produit n'a cependant pas été administré aux porcelets avant de recevoir la dose de probiotiques. Il serait intéressant, dans une expérience subséquente, de faire croître les probiotiques dans un milieu acide avant de les administrer aux porcelets, afin que ceux-ci s'adaptent plus facilement aux conditions acides de l'estomac et ainsi mieux survivre au passage dans l'estomac.



Plusieurs études ont démontré que différentes souches de probiotiques pouvaient réduire la sévérité de la diarrhée causée par *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar typhimurium et le rotavirus (Casey et al., 2007; Shu et al., 2001; Zeyner et Boldt, 2006). Nos résultats démontrent que l'accumulation de fluide intestinale, utilisée comme un indicateur de la sévérité des infections causées par ETEC F4, tend à être affectée par les traitements de probiotiques. Les contenus iléaux des porcelets des groupes témoins (CTRL et ATB) tendent à être plus liquides que les porcelets recevant PA seul. La réduction significative de l'attachement des ETEC F4 à la muqueuse iléale observée chez le groupe PA, pourrait en partie expliquer la diminution de l'accumulation de fluide dans cette région intestinale. En fait, l'attachement des ETEC à des récepteurs F4 présents sur la muqueuse iléale, amène les entérotoxines à proximité de récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, augmentant ainsi leur capacité à induire la sécrétion de fluide (Fairbrother et al., 2005). De plus, il a été récemment démontré dans une étude *in vitro*, que plusieurs souches de *Pediococcus* ont le potentiel de réguler négativement l'expression génique de la Shiga toxine 2 chez *E. coli* O157:H7 (Carey et al., 2008). Il serait intéressant dans une étude future, de déterminer si PA module l'expression génique des différentes entérotoxines sécrétées par ETEC F4. En contrepartie, lorsque PA et SCB sont combinés, l'effet de PA sur la consistance du contenu iléal est inhibé et une augmentation de l'indice de consistance a même été observée dans le caecum. Ce résultat suggère que SCB pourrait avoir des effets antagonistes sur l'action de PA. En accord avec cette hypothèse, une interférence par SCB sur PA a été récemment rapportée dans notre laboratoire. En effet, une augmentation des cellules T CD8<sup>+</sup> dans l'iléon a été obtenue chez le groupe PA, alors que cet effet n'est pas observé lorsque PA et SCB ont été administrés en combinaison (Lessard et al., 2009). Une tendance à l'augmentation de l'accumulation de fluide dans le caecum a aussi été observée chez le groupe recevant des antibiotiques en comparaison avec le groupe témoin. Ce résultat pourrait être expliqué par l'utilisation d'antibiotiques qui n'ont pas d'effet directe sur la souche infectante, celle-ci étant résistante aux antibiotiques utilisés dans cette étude. Finalement, les indices de consistance dans les différentes régions intestinales n'ont pas été affectés chez les porcelets recevant le SCB seul. Dans une expérience future, il serait intéressant de comparer l'effet de l'administration de probiotiques sur la disparition des symptômes de

diarrhée, en évaluant quotidiennement l'état général des animaux et la consistance des fèces. La présente étude n'a pas permis d'effectuer ce type d'analyse, étant donné que les porcelets ont été euthanasiés 24 heures après l'infection expérimentale. En outre, les résultats obtenus sont des tendances étant donné la grande variabilité entre les différents animaux. En fait, plusieurs facteurs peuvent influencer la consistance des contenus intestinaux. L'augmentation de la sécrétion intestinale, les cycles de réabsorption des liquides et le temps après le repas, sont des exemples de facteurs pouvant influencer la consistance. De plus, des différences génétiques chez les porcelets utilisés dans cette étude pourraient entraîner de la variabilité dans les résultats obtenus pour les paramètres étudiés. L'utilisation d'un plus grand nombre de porcelet aurait pu contribuer à obtenir des résultats significatifs.

Il a été démontré antérieurement que la colonisation et l'attachement des ETEC F4 à la muqueuse iléale stimulent la réponse immunitaire innée (Huang et al., 2004; Niewold et al., 2005; Roselli et al., 2006). Dans la présente étude, nous avons observé que l'infection à ETEC F4 stimule l'expression de cytokines intestinales et que les probiotiques pouvaient moduler l'expression de cytokines impliquées dans la défense immunitaire innée contre ETEC F4. Par exemple, chez le groupe PA + SCB, une augmentation significative de l'expression de l'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, a été observée dans l'iléon de porcelets infectés avec ETEC F4. D'autres études ont démontré que des probiotiques tels que *L. helveticus* R389 et *B. lactis* BB12 pouvaient stimuler la production d'IL-6 dans des cellules épithéliales intestinales murines (Ruiz et al., 2005; Vinderola et al., 2005). De plus, il a été observé que cette cytokine multifonctionnelle était requise pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice lors d'une infection systémique à *E. coli* chez la souris (Dalrymple et al., 1996). Il a aussi été démontré que cette cytokine augmente la sécrétion d'IgA, une importante immunoglobuline impliquée dans la défense contre les infections à *E. coli* (Goodrich et McGee, 1999). Une tendance à l'augmentation de l'expression de l'IL-6 a été observée chez le groupe PA, mais pas chez le groupe SCB, suggérant que l'effet obtenu lorsque les deux probiotiques sont combinés est principalement causé par l'action de PA sur la muqueuse iléale. Quant au TNF- $\alpha$ , une autre cytokine pro-inflammatoire, son expression

tendait à être augmentée chez le groupe PA + SCB, mais pas lorsque PA ou SCB est administré seul. Ce possible effet synergique pourrait être causé par l'interaction des probiotiques avec les cellules immunitaires présentes sur la muqueuse iléale ou à la sécrétion de modulines par les probiotiques, ce qui induirait l'expression de cytokines (Freitas et al., 2003). D'autres études ont démontré que des bactéries lactiques peuvent induire l'expression de TNF- $\alpha$  par les leucocytes intestinaux et les cellules de la rate (Haller et al., 2000; Kim et al., 2006).

Une tendance à l'augmentation de l'expression génique de l'IL-12p35 a aussi été observée chez le groupe PA, après une infection à ETEC F4. L'IL-12 est une cytokine de la voie Th1 impliquée dans la réponse immunitaire innée contre les pathogènes entériques (Mizuno et al., 2003). De façon similaire, *L. rhamnosus* GG E522, un probiotique fréquemment utilisé chez l'humain, stimule la production d'IL-12 dans les cellules mononucléées du sang périphérique (Miettinen et al., 1998). Dans une étude antérieure, une infection à *E. coli* a été contrée par l'activation des macrophages par l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  chez des rats recevant *L. casei* I-5 (Ishida-Fujii et al., 2007). En outre, il a été démontré qu'une déficience en IL-12 est associée à des infections récurrentes chez l'humain (Haraguchi et al., 1998). Il est intéressant de remarquer que la  $\beta$ -défensine 2, un peptide antimicrobien récemment découvert dans le petit intestin du porc (Veldhuizen et al., 2007), tend à être surexprimée dans l'iléon de porcelets infectés et alimentés avec PA. Des études *in vitro* ont démontré que la  $\beta$ -défensine 2 porcine a des propriétés antimicrobiennes contre plusieurs bactéries intestinales pathogènes chez le porc et l'humain (Veldhuizen et al., 2008). En résumé, ces résultats suggèrent que PA seul ou combiné à SCB accentue la défense immunitaire innée contre une infection à ETEC F4.

Un des résultats intéressants obtenus dans cette étude est l'augmentation significative de l'abondance de l'ARNm codant pour l'IL-8 dans l'iléon de porcelets infectés, lorsque comparée aux porcelets non infectés. Cette observation est en accord avec des résultats obtenus dans des études *in vitro* utilisant des cellules épithéliales intestinales porcines, des cellules Caco-2 ou la lignée de macrophage porcine 3D4/31 stimulées avec ETEC F4 (Moue et al., 2008; Pavlova et al., 2008; Roselli et al., 2007;

Roselli et al., 2006). Cette augmentation de l'expression de l'IL-8 pourrait être associée au recrutement des neutrophiles et des monocytes en réponse à l'infection à ETEC F4 (Baggiolini et Clark-Lewis, 1992). De plus, dans notre modèle d'infection, ETEC F4 tend à diminuer l'expression de l'IFN- $\gamma$  dans l'iléon des porcelets infectés en comparaison avec les porcelets non infectés. Un des rôles importants de l'IFN- $\gamma$  est d'activer la phagocytose et la destruction intracellulaire des bactéries par les macrophages qui sont largement impliqués dans la défense contre les bactéries pathogènes comme *E. coli* (Smith et al., 2005).

Chez les porcelets non infectés, l'expression des cytokines de l'iléon n'a pas été affectée par les différents traitements, à l'exception de l'IL-8 et de la  $\beta$ -défensine 2. En effet, une augmentation de l'expression de l'IL-8 a été observée chez les groupes non infectés : SCB, PA + SCB et ATB en comparaison avec le groupe CTRL. Ces observations ne sont pas en accord avec des résultats obtenus *in vitro* démontrant que différentes souches de SCB ont des effets anti-inflammatoires en produisant un facteur bloquant l'expression de NF- $\kappa$ B dans des cellules épithéliales intestinales humaines (Sougioultzis et al., 2006). L'augmentation de l'expression de cette cytokine n'a pas été observée chez les porcelets recevant PA seul, ce qui nous permet de conclure que l'effet observé dans le groupe PA + SCB est principalement causé par l'action de SCB. De plus, SCB tend à augmenter l'expression de la  $\beta$ -défensine 2 chez les porcelets non-infectés. Ce mécanisme d'action est bien connu chez les probiotiques d'origine bactérienne, mais il serait nouveau pour une levure (Schlee et al., 2008; Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004).

En conclusion, l'administration de PA ou SCB limite l'attachement des ETEC F4 à la muqueuse iléale en comparaison avec le groupe ATB. Tel que prévu, les antibiotiques utilisés dans l'étude n'ont pas d'effet direct sur ETEC F4, la souche étant résistante aux antibiotiques utilisés dans l'étude. De plus, PA augmente l'expression de cytokines intestinales impliquées dans la défense immunitaire innée contre ETEC F4, en comparaison avec le groupe ATB. SCB a pour sa part aucun effet sur l'expression de cytokines, lors d'une infection à ETEC F4. Ces résultats suggèrent que l'administration

de probiotiques pourrait être une alternative prometteuse pour limiter les infections causées par ETEC F4 chez le porc.

## 7. CONCLUSION

Dans cette étude, l'administration dès la naissance de probiotiques a permis de limiter une infection causée par ETEC F4, un pathogène causant des pertes économiques importantes chez les producteurs de porc. Il a été démontré que l'administration dès la naissance de PA et SCB diminuent l'attachement des ETEC F4, une étape clé dans la pathogenèse de diarrhée associée à cette bactérie. De plus, l'administration de la combinaison de PA et SCB tend à diminuer la colonisation des ETEC F4 à la muqueuse iléale. Sans surprise, ces effets n'ont pas été observés chez les porcelets ayant reçu des antibiotiques fréquemment ajoutés dans les aliments de sevrage en production porcine, mais qui n'ont pas d'effet direct sur ETEC F4. L'accumulation de fluide au niveau de l'iléon tend à être diminuée chez le groupe PA en comparaison avec les groupes ATB et CTRL. En outre, PA, mais pas SCB, stimule l'expression de cytokines proinflammatoires impliquées dans la défense immunitaire innée contre ETEC F4.

Le projet a aussi permis de valider un modèle d'infection expérimental à ETEC chez le porc permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement prophylactique de la diarrhée post-sevrage. Ce modèle *in vivo* permet d'étudier plus spécifiquement la réponse de l'hôte lors d'une infection à ETEC F4. En effet, ce projet apporte une meilleure compréhension de la réponse cytokinaire intestinale de l'hôte face à une infection à ETEC F4, tout en confirmant des résultats obtenus *in vitro*.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude ont permis de confirmer que les probiotiques constituent une alternative prometteuse pour limiter les infections à ETEC F4 en production porcine. Toutefois, une meilleure compréhension des mécanismes d'action des probiotiques, ainsi qu'une étude d'efficacité contrôlée avec évaluation des signes cliniques sur les fermes, est nécessaire pour justifier une utilisation à grande échelle de ces microorganismes.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abe, F., N. Ishibashi, and S. Shimamura. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci* 78: 2838-2846.
- Abreu, M. T., M. Fukata, and M. Arditi. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 174: 4453-4460.
- Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8: 411-420.
- Baggiolini, M., and I. Clark-Lewis. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 307: 97-101.
- Bailey, M., and K. Haverson. 2006. The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals. *Vet Res* 37: 443-453.
- Bailey, M., K. Haverson, C. Inman, C. Harris, P. Jones, G. Corfield, B. Miller, C. Stokes, S. R. Konstantinov, A. A. Awati, B. A. Williams, B. G. Miller, P. Jones, C. R. Stokes, A. D. Akkermans, H. Smidt, and W. M. de Vos. 2005. The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 189-198.
- Barrett, E., M. Hayes, P. O'connor, G. Gardiner, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, R. P. Ross, and C. Hill. 2007. Salivaricin P, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* 73: 3719-3723.
- Berg, R. D. 1980. Inhibition of *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract by normal cecal flora in gnotobiotic or antibiotic-decontaminated mice. *Infect Immun* 29: 1073-1081.
- Berg, R. D. 1999. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 473: 11-30.
- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T<sub>H</sub>17 cells. *Nature* 453: 1051-1057.
- Bianchi, A. T. J., J.-W. Scholten, B. H. W. M. Moonen Leusen, and W. J. A. Boersma. 1999. Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Dev Comp Immunol* 23: 511-520.

- Bianchi, A. T. J., J. W. Scholten, A. M. Van Zijderveld, F. G. Van Zijderveld, and B. A. Bokhout. 1996. Parenteral vaccination of mice and piglets with F4+ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine* 14: 199-206.
- Blomberg, L., A. Henriksson, and P. L. Conway. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 59: 34-39.
- Bontempo, V., A. Di Giancamillo, G. Savoini, V. Dell'orto, and C. Domeneghini. 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Anim Feed Sci Technol* 129: 224-236.
- Bosi, P., L. Casini, A. Finamore, C. Cremokolini, G. Merialdi, P. Trevisi, F. Nobili, and E. Mengheri. 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci* 82: 1764-1772.
- Brashears, M. M., D. Jaroni, and J. Trimble. 2003. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Food Prot* 66: 355-363.
- Broom, L. J., H. M. Miller, K. G. Kerr, and J. S. Knapp. 2006. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res Vet Sci* 80: 45-54.
- Carey, C. M., M. Kostrzynska, S. Ojha, and S. Thompson. 2008. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods* 73: 125-132.
- Casey, P. G., G. E. Gardiner, G. Casey, B. Bradshaw, P. G. Lawlor, P. B. Lynch, F. C. Leonard, C. Stanton, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and C. Hill. 2007. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 73: 1858-1863.
- Castagliuolo, I., M. F. Riegler, L. Valenick, J. T. LaMont, and C. Pothoulakis. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 67: 302-307.



- Chen, C. C., S. Louie, H. N. Shi, and W. A. Walker. 2005. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res* 58: 1185-1191.
- Chikindas, M. L., M. J. Garcia-Garcera, A. J. Driessen, A. M. Ledebøer, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, T. Abee, W. N. Konings, and G. Venema. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl Environ Microbiol* 59: 3577-3584.
- Chowdhury, S. R., D. E. King, B. P. Willing, M. R. Band, J. E. Beever, A. B. Lane, J. J. Loor, J. C. Marini, L. A. Rund, L. B. Schook, A. G. Van Kessel, and H. R. Gaskins. 2007. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics* 8: 215.
- Christensen, H. R., H. Frokiaer, and J. J. Pestka. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168: 171-178.
- Collado, M. C., L. Grzeskowiak, and S. Salminen. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol* 55: 260-265.
- Collado, M. C., M. Gueimonde, Y. Sanz, and S. Salminen. 2006. Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *J Food Prot* 69: 1675-1679.
- Cummings, J. H., and G. T. Macfarlane. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl. Microbiol* 70: 443-459.
- Czerucka, D., S. Dahan, B. Mograbi, B. Rossi, and P. Rampal. 2000. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 Cells. *Infect Immun* 68: 5998-6004.
- Czerucka, D., and P. Rampal. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infect* 4: 733-739.

- Dalloul, R. A., H. S. Lillehoj, T. A. Shellem, and J. A. Doerr. 2003. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. *Poult Sci* 82: 62-66.
- Dalrymple, S. A., R. Slattery, D. M. Aud, M. Krishna, L. A. Lucian, and R. Murray. 1996. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 64: 3231-3235.
- Davis, M. E., D. C. Brown, A. Baker, K. Bos, M. S. Dirain, E. Halbrook, Z. B. Johnson, C. Maxwell, and T. Rehberger. 2007. Effect of direct-fed microbial and antibiotic supplementation on gastrointestinal microflora, mucin histochemical characterization, and immune populations of weanling pigs. *Livestock Science* 108: 249-253.
- De Haan, L., and T. R. Hirst. 2004. Cholera toxin: A paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol. Membr. Biol.* 21: 77-92.
- Destoumieux-Garzon, D., J. Peduzzi, and S. Rebuffat. 2002. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* 84: 511-519.
- Di Giancamillo, A., F. Vitari, G. Savoini, V. Bontempo, C. Bersani, V. Dell'Orto, and C. Domeneghini. 2008. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histol Histopathol* 23: 651-664.
- Drakes, M., T. Blanchard, and S. Czinn. 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 72: 3299-3309.
- Dubreuil, J. D. 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* 143: 1783-1795.
- Dugas, B., A. Mercenier, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Arnaud, N. Dugas, and E. Postaire. 1999. Immunity and probiotics. *Immunol Today* 20: 387-390.
- Erkkila, S., and E. Petaja. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science* 55: 297-300.
- Fairbrother, J. M., R. Higgins, and C. Desautel. 2000. Trends in pathotypes and antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from weaned pigs. In: *Proceedings of the 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia.* p 16-17.

- Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6: 17-39.
- Forestier, C., C. De Champs, C. Vatoux, and B. Joly. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol* 152: 167-173.
- Fort, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M. Gorman, and D. M. Rennick. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo*. *Immunity* 15: 985-995.
- Francis, D. H. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *Journal of Swine Health and Production* 10: 171-175.
- Freitas, M., E. Tavan, C. Cayuela, L. Diop, C. Sapin, and G. Trugnan. 2003. Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell* 95: 503-506.
- Frydendahl, K. 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 85: 169-182.
- Fukata, M., K. S. Michelsen, R. Eri, L. S. Thomas, B. Hu, K. Lukasek, C. C. Nast, J. Lechago, R. Xu, Y. Naiki, A. Soliman, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2005. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G1055-1065.
- Gagnon, N., G. Talbot, P. Ward, D. Roy, M. Dupuis, E. Farnworth, T. A. Tompkins, and M. Lessard. 2007. Evaluation of bacterial diversity in the gut of piglets supplemented with probiotics using ribosomal intergenic spacer analysis. *Can J Anim Sci* 87: 207-219.
- Gedek, B. R. 1999. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella Typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses* 42: 261-264.

- Genovese, K. J., R. C. Anderson, R. B. Harvey, and D. J. Nisbet. 2000. Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Can J Vet Res* 64: 204-207.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278: 8869-8872.
- Gonçalves, C., V. Vachon, J.-L. Schwartz, and J. D. Dubreuil. 2007. The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* 75: 2208-2213.
- Goodrich, M. E., and D. W. McGee. 1999. Effect of intestinal epithelial cell cytokines on mucosal B-cell IgA secretion: enhancing effect of epithelial-derived IL-6 but not TGF- $\beta$  on IgA+ B cells. *Immunol Lett* 67: 11-14.
- Gronlund, M. M., O. P. Lehtonen, E. Eerola, and P. Kero. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28: 19-25.
- Guerra, N. P., P. F. Bernardez, J. Mendez, P. Cachaldora, and L. P. Castro. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim Feed Sci Technol* 134: 89-107.
- Haller, D., C. Bode, W. P. Hammes, A. M. A. Pfeifer, E. J. Schiffrin, and S. Blum. 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47: 79-87.
- Haraguchi, S., N. K. Day, R. P. Nelson, P. Emmanuel, J. E. Duplantier, C. S. Christodoulou, and R. A. Good. 1998. Interleukin 12 deficiency associated with recurrent infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13125-13129
- Harvey, R. B., R. C. Anderson, K. J. Genovese, T. R. Callaway, and D. J. Nisbet. 2005. Use of competitive exclusion to control enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* in weaned pigs. *J Anim Sci* 83: E44-47.
- Hershberg, R. M., and L. F. Mayer. 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 21: 123-128.

- Hooper, L. V., T. S. Stappenbeck, C. V. Hong, and J. I. Gordon. 2003. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 4: 269-273.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk, and J. I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291: 881-884.
- Hotamisligil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867.
- Huang, D. B., H. L. DuPont, Z.-D. Jiang, L. Carlin, and P. C. Okhuysen. 2004. Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 548-551.
- Inoue, R., T. Tsukahara, N. Nakanishi, and K. Ushida. 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J Gen Appl Microbiol* 51: 257-265.
- Ishida-Fujii, K., R. Sato, S. Goto, X.-P. Yang, H. Kuboki, S.-I. Hirano, and M. Sato. 2007. Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic *Lactobacillus casei* I-5. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 866-873.
- Isolauri, E., Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi, and S. Salminen. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73: 444S-450S.
- Jadamus, A., W. Vahjen, K. Schafer, and O. Simon. 2002. Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 86: 42-54.
- Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Sonnenberg, and J. B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7996-8000.
- Jin, L. Z., R. R. Marquardt, and X. Zhao. 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol* 66: 4200-4204.

- Jin, L. Z., and X. Zhao. 2000. Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine - a Review. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 311-318.
- Johnson-Henry, K. C., K. A. Donato, G. Shen-Tu, M. Gordanpour, and P. M. Sherman. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect Immun* 76: 1340-1348.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.
- Ke, Y., K. Pearce, J. P. Lake, H. K. Ziegler, and J. A. Kapp. 1997.  $\gamma\delta$  T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol* 158: 3610-3618.
- Kim, J. G., S. J. Lee, and M. F. Kagnoff. 2004. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* 72: 1487-1495.
- Kim, P., and M. Kagnoff. 1990. Transforming growth factor  $\beta$ 1 increases IgA isotype switching at the clonal level. *J Immunol* 145: 3773-3778.
- Kim, Y., S. H. Kim, K. Y. Whang, Y. J. Kim, and S. Oh. 2008. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1278-1285.
- Kim, Y. G., T. Ohta, T. Takahashi, A. Kushiro, K. Nomoto, T. Yokokura, N. Okada, and H. Danbara. 2006. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase signaling pathways. *Microbes Infect* 8: 994-1005.
- Konstantinov, S. R., A. A. Awati, B. A. Williams, B. G. Miller, P. Jones, C. R. Stokes, A. D. Akkermans, H. Smidt, and W. M. de Vos. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ Microbiol* 8: 1191-1199.
- Konstantinov, S. R., C. F. Favier, W. Y. Zhu, B. A. Williams, J. Kluss, W. B. Souffrant, W. M. De Vos, A. D. L. Akkermans, and H. Smidt. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim Res* 53: 317-324.

- Konstantinov, S. R., H. Smidt, A. D. L. Akkermans, L. Casini, P. Trevisi, M. Mazzoni, S. De Filippi, P. Bosi, and W. M. De Vos. 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 599-607.
- Lala, S., Y. Ogura, C. Osborne, S. Y. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez, and S. Keshav. 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125: 47-57.
- Lallès, J. P., G. Boudry, C. Favier, N. Le Floc'h, I. Luron, L. Montagne, I. P. Oswald, S. Pié, C. Piel, and B. Sève. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: *Physiology. Anim. Res.* 53: 301-316.
- Lallès, J. P., S. Konstantinov, et H. Rothkotter. 2004. Bases physiologiques, microbiologiques et immunitaires des troubles digestifs du sevrage chez le porcelet: données récentes dans le contexte de la suppression des antibiotiques additifs alimentaires. *Journées Recherche porcine* 36: 139-150.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201: 233-240.
- Laudanno, O. M., J. A. Cesolari, A. Godoy, E. Sutich, S. Sarangone, J. Catalano, and P. San Miguel. 2008. Bioflora probiotic in immunomodulation and prophylaxis of intestinal bacterial translocation in rats. *Dig Dis Sci* 53: 2667-2670.
- Lee, S. H., H. S. Lillehoj, R. A. Dalloul, D. W. Park, Y. H. Hong, and J. J. Lin. 2007. Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poult Sci* 86: 63-66.
- Leser, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye, and K. Moller. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68: 673-690.
- Lessard, M., M. Dupuis, N. Gagnon, E. Nadeau, J. J. Matte, J. Goulet, and J. M. Fairbrother. 2009. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and

- reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J Anim Sci* 87: 922-934.
- Li, J., D. Li, L. Gong, Y. Ma, Y. He, and H. Zhai. 2006. Effects of live yeast on the performance, nutrient digestibility, gastrointestinal microbiota and concentration of volatile fatty acids in weanling pigs. *Arch Anim Nutr* 60: 277-288.
- Liang, W., Y. Huang, X. Yang, Z. Zhou, A. Pan, B. Qian, C. Huang, J. Chen, and D. Zhang. 2006. Oral immunization of mice with plant-derived fimbrial adhesin FaeG induces systemic and mucosal K88ad enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific immune responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 393-399.
- Lloyd, A. B., R. B. Cumming, and R. D. Kent. 1977. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust Vet J* 53: 82-87.
- Mack, D. R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall, and M. A. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276: G941-950.
- Macdonald, T. T., and G. Monteleone. 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307: 1920-1925.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69: 1035S-1045S.
- Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J.-W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich, and S. K. Baidoo. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol Med Microbiol* 23: 283-288.
- Matsuzaki, T., and J. Chin. 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 78: 67-73.
- Ménard, L. P., and J. D. Dubreuil. 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): A new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* 28: 43-60.
- Miettinen, M., S. Matikainen, J. Vuopio-Varkila, J. Pirhonen, K. Varkila, M. Kurimoto, and I. Julkunen. 1998. Lactobacilli and Streptococci induce interleukin-12 (IL-



- 12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 66: 6058-6062.
- Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, and K. Varkila. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 64: 5403-5405.
- Mizuno, Y., H. Takada, A. Nomura, C. H. Jin, H. Hattori, K. Ihara, T. Aoki, K. Eguchi, and T. Hara. 2003. Th1 and Th1-inducing cytokines in *Salmonella* infection. *Clin Exp Immunol* 131: 111-117.
- Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Mota, R. M., J. L. Moreira, M. R. Souza, M. F. Horta, S. M. Teixeira, E. Neumann, J. R. Nicoli, and A. C. Nunes. 2006. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnol* 6: 2.
- Moue, M., M. Tohno, T. Shimazu, T. Kido, H. Aso, T. Saito, and H. Kitazawa. 2008. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta* 1780: 134-144.
- Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3: 331-341.
- Neumann, E., M. A. P. Oliveira, C. M. Cabral, L. N. Moura, J. R. Nicoli, E. C. Vieira, D. C. Cara, G. I. Podoprigora, and L. Q. Vieira. 1998. Monoassociation with *Lactobacillus Acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz J Med Biol Res* 31: 1565-1573.
- Nguyen, T. V., L. Yuan, M. S. Azevedo, K. I. Jeong, A. M. Gonzalez, and L. J. Saif. 2007. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: *in vivo* and *in vitro* models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 117: 236-248.
- Niewold, T. A., H. H. D. Kerstens, J. Van Der Meulen, M. A. Smits, and M. M. Hulst. 2005. Development of a porcine small intestinal cDNA micro-array:

- characterization and functional analysis of the response to enterotoxigenic *E. coli*. *Vet Immunol Immunopathol* 105: 317-329.
- O'Sullivan, G. C., P. Kelly, S. O'Halloran, C. Collins, J. K. Collins, C. Dunne, and F. Shanahan. 2005. Probiotics: an emerging therapy. *Curr Pharm Des* 11: 3-10.
- Pabst, R., M. Geist, H. J. Rothkotter, and F. J. Fritz. 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 64: 539-544.
- Park, H.-B., D.-J. Paik, E. Jang, S. Hong, and J. Youn. 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor- $\beta$ -costimulated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells. *The Japanese Society for Immunology* 16: 1203-1213.
- Pavlova, B., J. Volf, P. Alexa, I. Rychlik, J. Matiasovic, and M. Faldyna. 2008. Cytokine mRNA expression in porcine cell lines stimulated by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 132: 105-110.
- Pie, S., J. P. Lalles, F. Blazy, J. Laffitte, B. Seve, and I. P. Oswald. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134: 641-647.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361-367.
- Rhee, K. J., P. Sethupathi, A. Driks, D. K. Lanning, and K. L. Knight. 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J Immunol* 172: 1118-1124.
- Riley, M. A., and J. E. Wertz. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84: 357-364.
- Rimoldi, M., M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena, and M. Rescigno. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 507-514.
- Rippinger, P., H. U. Bertschinger, H. Imberechts, B. Nagy, I. Sorg, M. Stamm, P. Wild, and W. Wittig. 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types

- F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet Microbiol* 45: 281-295.
- Roselli, M., A. Finamore, M. S. Britti, S. R. Konstantinov, H. Smidt, W. M. de Vos, and E. Mengheri. 2007. The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J Nutr* 137: 2709-2716.
- Roselli, M., A. Finamore, M. S. Britti, and E. Mengheri. 2006. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr* 95: 1177-1184.
- Ruiz, P. A., M. Hoffmann, S. Szcesny, M. Blaut, and D. Haller. 2005. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* 115: 441-450.
- Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 347-358.
- Savage, D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31: 107-133.
- Schlee, M., J. Harder, B. Koten, E. F. Stange, J. Wehkamp, and K. Fellermann. 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2. *Clin Exp Immunol* 151: 528-535.
- Schlee, M., J. Wehkamp, A. Altenhoefer, T. A. Oelschlaeger, E. F. Stange, and K. Fellermann. 2007. Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 75: 2399-2407.
- Seidman, E. 2006. The role of probiotics in modulating T regulatory cell function: induction of tolerance. Probiotics and health international symposium, Montreal, Quebec, Canada.
- Shanahan, F. 2003. Probiotics: a perspective on problems and pitfalls. *Scand J Gastroenterol Suppl*: 34-36.

- Sherman, P. M., K. C. Johnson-Henry, H. P. Yeung, P. S. Ngo, J. Goulet, and T. A. Tompkins. 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun* 73: 5183-5188.
- Shirkey, T. W., R. H. Siggers, B. G. Goldade, J. K. Marshall, M. D. Drew, B. Laarveld, and A. G. Van Kessel. 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp Biol Med* 231: 1333-1345.
- Shu, Q., F. Qu, and H. S. Gill. 2001. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33: 171-177.
- Sinclair, J. F., and A. D. O'Brien. 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin- $\gamma$  of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 277: 2876-2885.
- Smith, P. D., C. Ochsenbauer-Jambor, and L. E. Smythies. 2005. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 206: 149-159.
- Sougioultzis, S., S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. Pothoulakis, and C. P. Kelly. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 69-76.
- Spencer, R. J., and A. Chesson. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J Appl Bacteriol* 77: 215-220.
- Spreeuwenberg, M. A., J. M. Verdonk, H. R. Gaskins, and M. W. Verstegen. 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J Nutr* 131: 1520-1527.
- Steidler, L., S. Neiryneck, N. Huyghebaert, V. Snoeck, A. Vermeire, B. Goddeeris, E. Cox, J. P. Remon, and E. Remaut. 2003. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 21: 785-789.

- Swords, W. E., C. C. Wu, F. R. Champlin, and R. K. Buddington. 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol Neonate* 63: 191-200.
- Taras, D., W. Vahjen, M. Macha, and O. Simon. 2006. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci* 84: 608-617.
- Taras, D., W. Vahjen, and O. Simon. 2007. Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. *Livestock Science* 108: 229-231.
- Tauschek, M., R. J. Gorrell, R. A. Strugnell, and R. M. Robins-Browne. 2002. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7066-7071.
- Tortuero, F., J. Rioperez, E. Fernandez, and M. L. Rodriguez. 1995. Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 58: 1369-1374.
- Trevisi, P., S. De Filippi, M. Modesto, M. Mazzoni, L. Casini, B. Biavati, and P. Bosi. 2007. Investigation on the ability of different strains and doses of exogenous bifidobacteria, to translocate in the liver of weaning pigs. *Livestock Science* 108: 109-112.
- Van den Broeck, W., E. Cox, and B. M. Goddeeris. 1999. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vaccine* 17: 2020-2029.
- Van den Broeck, W., E. Cox, and B. M. Goddeeris. 1999. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infect Immun* 67: 520-526.
- van der Peet-Schwering, C. M., A. J. Jansman, H. Smidt, and I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *J Anim Sci* 85: 3099-3109.

- van Heugten, E., D. W. Funderburke, and K. L. Dorton. 2003. Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J Anim Sci* 81: 1004-1012.
- Veldhuizen, E. J., M. Rijnders, E. A. Claassen, A. van Dijk, and H. P. Haagsman. 2008. Porcine  $\beta$ -defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol Immunol* 45: 386-394.
- Veldhuizen, E. J. A., A. van Dijk, M. H. G. Tersteeg, S. I. C. Kalkhove, J. van der Meulen, T. A. Niewold, and H. P. Haagsman. 2007. Expression of  $\beta$ -defensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig: Lack of upregulation in vivo upon *Salmonella typhimurium* infection. *Mol Immunol* 44: 276-283.
- Vinderola, G., C. Matar, and G. Perdigon. 2005. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of Toll-Like Receptors. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1075-1084.
- Vora, P., A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2004.  $\beta$ -defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 173: 5398-5405.
- Wehkamp, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schroder, and E. F. Stange. 2004. NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated induction of human  $\beta$ -defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 72: 5750-5758.
- Wehkamp, J., J. Schaubert, and E. F. Stange. 2007. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 32-38.
- Whipp, S. C., E. Kokue, R. W. Morgan, R. Rose, and H. W. Moon. 1987. Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb). *Vet Res Commun* 11: 41-55.
- Zareie, M., K. Johnson-Henry, J. Jury, P. C. Yang, B. Y. Ngan, D. M. McKay, J. D. Soderholm, M. H. Perdue, and P. M. Sherman. 2006. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 55: 1553-1560.

Zeyner, A., and E. Boldt. 2006. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 90: 25-31.

