



**Université de Montréal**

**La texture et la granulométrie de la moulée influencent les concentrations d'acide propionique et butyrique de même que la prévalence d'*Escherichia coli* dans le tractus gastro-intestinal du porc d'engraissement**

**Par Jessie Longpré**

**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 hygiène et innocuité des aliments

Juin 2015

©Jessie Longpré, 2015

## RÉSUMÉ

Certaines stratégies alimentaires sont actuellement considérées pour remplacer l'usage des antimicrobiens dans les fermes porcines. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer l'effet de la granulométrie et de la texture des aliments sur les concentrations d'acides gras volatils intestinaux, la composition des populations pathogènes et commensales d'*E. coli* et sur les performances de croissance des porcs. Des porcs d'engraissement (n= 840) ont reçu l'une des six diètes suivantes: moulée texturée 500, 750 et 1250  $\mu\text{m}$  et moulée cubée 500, 750 et 1250  $\mu\text{m}$ . Le gain de poids a été mesuré à chaque changement de formulation de moulée. À l'abattoir, les contenus du caecum et du côlon de 165 porcs ont été échantillonnés pour le dénombrement des *E. coli* par PCR quantitatif (qPCR) et pour la quantification des AGV. Le gène *yccT* a été utilisé pour dénombrer les *E. coli* totaux. Une diminution du taux de conversion alimentaire a été associée avec la moulée cubée et/ou la moulée de 500  $\mu\text{m}$ . Les concentrations d'acide propionique et butyrique, et ce tant au niveau du caecum que du côlon, étaient plus élevées chez les porcs recevant de la moulée texturée que chez ceux recevant de la moulée cubée. Du point de vue de la granulométrie, les concentrations caecales et du côlon d'acide butyrique étaient plus élevées chez les porcs alimentés avec de la moulée de 1250  $\mu\text{m}$  que chez ceux recevant de la moulée de 500  $\mu\text{m}$ . D'autre part, les niveaux intestinaux d'*E. coli* totaux étaient plus élevés pour les porcs nourris avec de la moulée cubée que pour ceux ayant reçu de la moulée texturée. Les résultats ont montré que la moulée texturée est associée à des performances de croissance plus faibles mais à des changements intestinaux favorables.

Mots clés: Moulée/Texture/Granulométrie/Acides gras volatils/Porcs/*Escherichia coli*

## ABSTRACT

Natural approaches, such as dietary modifications, are now being considered to replace antimicrobials for the control of bacterial infections in pigs. The objectives of this study were to assess the effect of feed size and texture on intestinal Volatile fatty acids profiles and concentrations, *E. coli* populations, and on growth performance. Fattening pigs (n=840) received one of six different diets: mash feed 500, 750 and 1250 µm and pellet feed 500, 750 and 1250 µm. Weight gain of pigs was monitored for each diet formulation over the fattening period. At the slaughterhouse, caecal and colon contents from 165 pigs were sampled for enumeration of *E. coli* by quantitative PCR (qPCR) and for acetic, propionic and butyric acid quantification. The *yccT* gene was used to enumerate total *E. coli*. A decrease in feed conversion associated with pellet texture and/or 500 µm particle size was observed for each diet formulation. In addition, caecal and colon propionic acid concentrations and caecal and colon butyric acid concentrations were lower for pigs receiving pellet rather than mash feed. Moreover, caecal (p=0,0208) and colon (p=0,0006) butyric acid concentrations were higher for pigs receiving a feed with a 1250 µm rather than 500 µm particle size. For total *E. coli* enumeration, caecal (p=0,01) and colon (p=0,04) *yccT* gene copies were higher for pigs receiving pellet rather than for those receiving mash feed. Taken together, results showed that mash feed is associated with favourable intestinal changes (VFA levels) and with a reduction of *E. coli* in the pig.

Key words: Feed size/Feed texture/Volatile fatty acids/Pigs/*Escherichia coli*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS PAR ORDRE ALPHABÉTIQUE</b> .....	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>RECENSION DES ÉCRITS</b> .....	<b>4</b>
1. Nutrition du porc.....	4
1.1. Pathogènes alimentaires.....	5
1.2. Stratégies alimentaires .....	6
1.3. Texture et granulométrie de la moulée .....	9
1.4. <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.4.1. Source de contamination .....	12
1.4.2. Classification des <i>E. coli</i> .....	13
1.4.2.1. Sérotypes .....	13
1.4.2.2. Pathotypes.....	14
1.4.2.2.1 Les <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC).....	14
1.4.2.2.1.1 La toxine thermolabile (LT).....	15
1.4.2.2.1.2 Les toxines thermostables (STa et STb).....	15
1.4.2.2.1.3 La toxine thermostable (EAST1).....	16
1.4.2.2.1.4 Les fimbriae (F4 et F18).....	17
1.4.2.2.2 Les <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC).....	18
1.4.2.2.2.1 Le «Bundle-forming Pili» (BFP).....	19
1.4.2.2.2.2 L'intimine (EAE).....	19
1.4.2.2.3 Les <i>Escherichia coli</i> producteurs de toxine Shiga (STEC) ou <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC) .....	21
1.4.2.2.3.1 Les toxines Shiga (Stx1 et Stx2).....	22

1.4.2.2.4 Les <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatifs (EAEC) .....	23
1.4.2.2.5 Les <i>Escherichia coli</i> entéro-invasifs (EIEC).....	24
1.4.2.2.6 Les <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (DAEC) .....	25
1.4.2.2.7 Les <i>Escherichia coli</i> extraintestinaux (ExPEC).....	25
1.4.2.2.7.1 Le «cytotoxic necrotizing factor» (CNF).....	26
1.4.2.2.7.2 La «temperature-sensitive hemagglutinin» (Tsh).....	26
1.4.2.2.7.3 Le fimbriae (P).....	27
1.4.2.2.7.4 L'aérobactine .....	27
1.4.2.2.8 STEC O104:H4 .....	29
2. Performances zootechniques et impact économique .....	29
3. Impact sur le système immunitaire .....	30
3.1. Immunité intestinale .....	30
3.1.1. Les plaques de Peyer (PP).....	32
3.1.2. Les cellules M .....	33
3.1.3. Les follicules isolés .....	33
3.1.4. La lamina propria .....	34
4. Impact sur les lésions gastriques.....	34
5. Activités métaboliques de la flore intestinale.....	35
5.1. Acides gras volatils.....	36
5.1.1. Acide acétique .....	41
5.1.2. Acide propionique.....	42
5.1.3. Acide butyrique .....	42
6. Modification de la flore intestinale.....	43
7. Résistance aux antimicrobiens chez <i>E. coli</i> .....	45
8. Hypothèse .....	48
9. Objectifs.....	48
<b>MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS .....</b>	<b>49</b>
Abstract.....	51
Introduction.....	53
Materials and methods .....	54
Animals and diets.....	54

Sample collection .....	55
Volatile fatty acids analysis .....	55
Multiplex PCR analysis .....	56
Quantitative PCR .....	56
Statistical analysis .....	57
Results .....	58
Effect of feed texture and particle size on VFA levels in the intestinal contents of pigs .....	58
Effect of feed texture and particle size on prevalence of E. coli virulence genes in the intestinal contents of pigs .....	59
Quantitative PCR .....	59
Pig performance parameters .....	60
Gastric lesions .....	60
Discussion .....	61
Literature cited .....	68
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>87</b>
<b>SOURCES DOCUMENTAIRES .....</b>	<b>xvi</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## RECENSION DES ÉCRITS

Tableau I.	Genres bactériens indigènes de la flore intestinale porcine et les AGV qu'ils produisent respectivement.....	40
Tableau II.	Classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine.....	46

## MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Table 1.	Oligonucleotide primers used for multiplex PCR .....	73
Table 2.	Oligonucleotide primers used for quantitative PCR.....	74
Table 3.	Least square mean VFA concentration (mmol/L) $\pm$ SEM according to feed texture and particle size.....	75
Table 4.	Least square mean $\pm$ SEM of ADG, ADFI and G:F according to feed texture and particle size (n=84 pens).....	76
Appendix 1.	Diet formulation.....	79

## LISTE DES FIGURES

### RECENSION DES ÉCRITS

Figure 1.	Pathogénèse des <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes (ETEC) chez le porc.....	18
Figure 2.	Pathogénèse des <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC) chez le porc.....	20
Figure 3.	Pathogénèse des <i>Escherichia coli</i> producteurs de toxine Shiga (STEC) chez le porc .....	23
Figure 4.	Pathogénèse des <i>Escherichia coli</i> extraintestinaux (ExPEC) chez le porc.....	28
Figure 5.	Mécanisme d'action de l'effet bactériostatique des acides gras volatils.....	37
Figure 6.	Effets des AGV dans le tractus gastro-intestinal .....	39

### MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Figure 1.	Quantification of specific <i>E. coli</i> genes in cecal and colon contents of animals according to feed texture and particle size diets.....	77
Figure 2.	Predicted probabilities of detecting hyperkeratosis or ulcer lesions in pigs at the slaughterhouse according to feed texture and feed particle size.....	78

# LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS PAR ORDRE

## ALPHABÉTIQUE

<b>ACIA</b>	Agence canadienne d'inspection des aliments
<b>ADFI</b>	Consommation moyenne quotidienne ( <i>Average daily food intake</i> )
<b>ADG</b>	Gain moyen quotidien ( <i>Average daily gain</i> )
<b>AGV</b>	Acides gras volatils
<b>AIDA-1</b>	Adhésine bactérienne associée à certaines souches de <i>E. coli</i> diarrhéiques
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>ARNr</b>	Acide ribonucléique ribosomique
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BFP</b>	<i>Bundle-forming pili</i>
<b>bp</b>	Paire de bases ( <i>Base pairs</i> )
<b>BW</b>	Poids du corps ( <i>Body weight</i> )
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ions calcium
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CNF</b>	Facteur cytotoxique nécrosant ( <i>Cytotoxic necrotizing factor</i> )
<b>CRIPA</b>	Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole
<b>CRSV</b>	Chaire de recherche en salubrité des viandes
<b>CT</b>	Toxine cholérique
<b>d</b>	Jour ( <i>Day</i> )
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse
<b>DNA</b>	Acide désoxyribonucléique ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DPS</b>	Diarrhée post-sevrage
<b>DFD</b>	Viande à coupe sombre ( <i>Dark, firm, dry meat</i> )
<b>EAE</b>	Intimine

<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatifs
<b>EAST1</b>	<i>Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1</i>
<b>EcL</b>	Laboratoire de référence pour <i>Escherichia coli</i>
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entéro-invasifs
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entérotoxinogènes
<b>ExPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> extraintestinaux
<b>FAE</b>	Épithélium associé aux follicules
<b>FCR</b>	Taux de conversion alimentaire ( <i>Feed conversion ratio</i> )
<b>FSIS</b>	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
<b>F4</b>	Fimbriae F4
<b>F18</b>	Fimbriae F18
<b>GALT</b>	Tissu lymphoïde associé à l'intestin ( <i>Gut-associated lymphoid tissue</i> )
<b>Gb3</b>	Globotriaosylcéramide
<b>GMPC</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>GM1</b>	Monosialotetrahexosylganglioside
<b>GRESA</b>	Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HACCP</b>	Système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques
<b>IgA</b>	Immunoglobulines A
<b>IgE</b>	Immunoglobulines E
<b>IgM</b>	Immunoglobulines M
<b>IL-6</b>	Interleukine 6
<b>IL-8</b>	Interleukine 8
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol triphosphate
<b>ITU</b>	Infection du tractus urinaire
<b>kg</b>	Kilogramme
<b>K88</b>	Fimbriae K88

<b>LEE</b>	Locus d'effacement des entérocytes
<b>Lésions A/E</b>	Lésions d'attachement et d'effacement ( <i>Attaching and Effacing lesions</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>LT</b>	Toxine Thermolabile
<b>MAPAQ</b>	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
<b>MDa</b>	Méga dalton
<b>MDR</b>	Multirésistante aux antimicrobiens ( <i>Multidrug resistant</i> )
<b>mM</b>	Millimolaire
<b>Mmol/L</b>	Millimole par litre
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
<b>ng</b>	Nanogramme
<b>no.</b>	Nombre ( <i>Number</i> )
<b>NSERC</b>	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada ( <i>Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada</i> )
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PICRA</b>	Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
<b>pKa</b>	Constante de dissociation d'un acide
<b>PP</b>	Plaques de Peyer
<b>PSE</b>	Viande pâle, molle et exsudative ( <i>Pale, soft, exudative meat</i> )
<b>qPCR</b>	PCR quantitatif
<b>s</b>	Seconde
<b>SAS</b>	<i>Statistical Analysis System</i>
<b>SCFA</b>	Acides gras à chaîne courte ( <i>Short-chain fatty acids</i> )
<b>SEM</b>	Erreur-type de la moyenne ( <i>Standard error of the mean</i> )
<b>SIDA</b>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>SPI</b>	Îlot de pathogénicité de <i>Salmonella</i> ( <i>Salmonella pathogenicity island</i> )
<b>SSTT</b>	Système de sécrétion de type III
<b>ST</b>	Toxine thermostable

<b>STEC</b>	<i>Escherichia coli</i> producteurs de toxine Shiga
<b>Stx</b>	Toxine Shiga
<b>SUH</b>	Syndrome urémique hémolytique
<b>TIR</b>	Récepteur d'intimine à translocation ( <i>Translocated intimin receptor</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>tsh</b>	Hémagglutinine thermosensible ( <i>Temperature-sensitive hemagglutinin</i> )
<b>USDA</b>	<i>United States Department of Agriculture</i>
<b>VFA</b>	Acides gras volatils ( <i>Volatile fatty acids</i> )
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Microlitre
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micromètre
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Micromolaire

## REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à plusieurs personnes auxquelles je voudrais témoigner ma reconnaissance :

- Je tiens dans un premier temps à remercier tous les membres de l'équipe de la CRSV et du laboratoire EcL pour leur aide et leur contribution à ce projet.
- Je remercie Ann Letellier, Philippe Fravallo et John M. Fairbrother pour m'avoir confié ce projet de recherche ainsi que pour votre générosité, votre disponibilité et vos judicieux conseils qui ont contribué à mon apprentissage et ma réflexion.
- Je remercie mes amies Simone, Audrey-anne, Marie-Pier, Camille, Brigitte et Mélanie pour leur support moral et intellectuel tout au long de mon parcours universitaire. Merci de m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.
- J'aimerais également adresser un remerciement particulier à Gabriel pour son aide, sa patience et son soutien tout au long de ces années.
- Mes derniers remerciements iront à mes parents, Yves et France, pour leur confiance, leurs encouragements et leur support inestimable.

# INTRODUCTION

L'industrie de la viande est la plus importante industrie du secteur de la transformation alimentaire au Canada. Le contrôle de la salubrité de même que le maintien de la qualité des produits au sein de cette industrie représentent un enjeu de taille. Malgré les nombreuses mesures appliquées dans les différents paliers de la chaîne de production et de transformation, une contamination par des microorganismes potentiellement pathogènes subsiste. Étant donné ces considérations, il s'avère nécessaire d'améliorer les connaissances épidémiologiques associées à la contamination microbienne de la viande. L'engagement des personnes impliquées dans la production animale, l'industrie ainsi que dans la recherche vise à améliorer la maîtrise et la surveillance de ces agents pathogènes via le développement de méthodes de détection et de caractérisation moléculaire tout en demeurant concurrentiel. En effet, des risques de maladies animales et humaines sont reliés à la présence intestinale de ces microorganismes zoonotiques qui entraînent, outre des problèmes de santé publique, des pertes économiques importantes. L'application des principes HACCP «de la ferme à la table» de même que l'avancement des recherches ciblées en épidémiologie des principaux pathogènes alimentaires, tels que *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, Norovirus et *Shigella*, s'avèrent donc essentiels (<http://www.inspection.gc.ca/aliments/information-pour-les-consommateurs/fiches-de-renseignements/empoisonnements-alimentaire/fra/1331151916451/1331152055552>, Juin 2015) pour assurer la sécurité du consommateur. À titre d'exemple, au Québec, près de 33% des déclarations de toxi-infections alimentaires enregistrées en 2012-2013 par le MAPAQ étaient reliées au groupe alimentaire des « viandes et volailles ». Les agents pathogènes

bactériens qui ont été le plus souvent à l'origine des signalements en 2012-2013 sont les salmonelles, *E. coli* O157 :H7 et *Campylobacter*. De plus, on signale une augmentation de la fréquence des bactéries résistantes aux antimicrobiens (Economou and Gousia, 2015). Le développement de solutions alternatives à l'emploi des antimicrobiens représente l'un des enjeux les plus importants pour la santé humaine et animale pour contrer ce phénomène. En effet, les antimicrobiens sont présentement utilisés en prophylaxie en production animale, ce qui accentue les risques de propagation par des bactéries résistantes. Cette propagation engendre trois types de dangers. Tout d'abord, les bactéries résistantes peuvent être transmises à la population humaine via les aliments. Puis, il existe un risque de transfert horizontal des gènes de résistance aux bactéries en plus d'un risque plausible de contamination résiduelle par les résidus chimiques dans la chaîne alimentaire (viande). Les probiotiques, prébiotiques, acides organiques et/ou extraits de plantes ajoutés à la diète des animaux d'élevage figurent présentement parmi les alternatives aux antimicrobiens (Vondruskova et al., 2010). Outre ces additifs alimentaires, il a été suggéré que la texture de la moulée pourrait affecter la prévalence de certaines bactéries pathogènes, par exemple *Salmonella spp.*, dans la microflore intestinale des porcs en plus d'améliorer la santé globale de ces derniers (O'Connor et al., 2008a; Taube et al., 2009). La granulométrie de la moulée jouerait également un rôle sur la survie d'entérobactéries pathogènes dans l'estomac des porcs, tel que démontré pour *Salmonella spp.* (Mikkelsen et al., 2004). Néanmoins, aucune étude ne s'est penchée sur l'impact des modifications de la présentation (texture et/ou granulométrie) de l'aliment des porcs sur les différents pathotypes d'*Escherichia coli*. Il existe donc toujours un besoin d'identifier les caractéristiques physiques optimales de l'alimentation des porcs dans le but de réduire l'occurrence des infections microbiennes, certaines ayant un potentiel zoonotique, et

d'améliorer la santé gastro-intestinale. Le projet était fondé sur l'hypothèse que l'aliment texturé de granulométrie élevée permet une diminution de la prévalence des *E. coli* pathogènes, une augmentation de la concentration gastro-intestinale d'acides gras volatils, une réduction du dénombrement des ulcères gastro-oesophagiens et une diminution des performances de croissance. L'objectif de cette étude consistait à mesurer l'impact de la texture et de la granulométrie de l'alimentation sur la concentration intestinale en *Escherichia coli* et particulièrement sur la prévalence des *Escherichia coli* pathogènes (ETEC, EPEC, STEC et ExPEC), sur les profils et concentrations intestinales des acides gras volatils et, finalement, sur certains paramètres reliés à la santé du porc notamment par la mesure des performances de croissance, du développement des ulcères d'estomac et de la conversion alimentaire.

# RECENSION DES ÉCRITS

## 1. NUTRITION DU PORC

La qualité de la viande porcine est influencée par de nombreux facteurs d'élevage tels l'âge et le poids à l'abattage, le sexe, la nature de la ration alimentaire, l'activité physique, le stress pré-abattage, etc. Bien entendu, d'autres composantes comme les conditions d'abattage et la génétique auront aussi une incidence directe sur le produit mis en marché. Parmi ces facteurs, l'alimentation des porcs représente une composante de taille. En effet, les éleveurs de porcs adaptent la diète en fonction des coûts économiques (sources protéiques animales versus sources protéiques végétales) et des besoins des animaux (stade physiologique, âge, sexe, etc). L'alimentation des porcs constitue la majeure partie des coûts de production d'un élevage (O'Connor et al., 2008a). Conséquemment, les producteurs porcins sont particulièrement sensibles à la concurrence chez les fabricants d'aliments du bétail ainsi qu'à l'inflation des matières premières, telles les céréales. Le blé, le maïs, le seigle et l'orge peuvent composer jusqu'à 75% de l'alimentation des porcs. Au Québec, l'élevage du porc s'échelonne sur trois grands paliers : la maternité, la pouponnière (ou post sevrage) et l'engraissement. De façon générale, suite à la naissance, les porcelets demeurent jusqu'à vingt jours en maternité. Puis, ils sont transférés dans une pouponnière pour une durée variant de six à huit semaines avant d'être transportés en engraissement pour une période de douze à treize semaines approximativement. Bien entendu, il est essentiel d'adapter les aliments au stade physiologique de l'animal mais également aux contraintes de manutention et à la mécanisation des équipements d'élevage. En engraissement, par exemple, cinq formules de moulée sont distribuées : le pré-engrais, le début, la croissance, le fini ordinaire et le fini illimité. Chaque

formule de moulée est conçue spécifiquement en fonction du stade de développement de l'animal et comprend donc différentes quantités de céréales. Au Québec, par exemple, l'utilisation du maïs est privilégiée en raison de ses caractéristiques, notamment sa digestibilité et son rendement énergétique ([http://www.agrireseau.qc.ca/porc/documents/MAPAQ\\_07-02-07.pdf](http://www.agrireseau.qc.ca/porc/documents/MAPAQ_07-02-07.pdf), Juin 2015). Ce type d'alimentation par «phase» est un concept fortement recommandé et permet de maximiser les performances animales ([http://www.agrireseau.qc.ca/porc/documents/MAPAQ\\_07-02-07.pdf](http://www.agrireseau.qc.ca/porc/documents/MAPAQ_07-02-07.pdf), Juin 2015). Lorsque le porc a atteint un poids optimal (environ 125 kg), celui-ci est envoyé à l'abattoir.

## 1.1 PATHOGÈNES ALIMENTAIRES

Les pathogènes alimentaires constituent une source importante de toxi-infections alimentaires et de décès chaque année chez l'humain, et ce à travers le monde entier. Par exemple, aux États-Unis, il a été estimé qu'annuellement 48 millions cas de maladies étaient reliées aux infections alimentaires ([http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/foodborne-illness-what-consumers-need-to-know/ct\\_index](http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/foodborne-illness-what-consumers-need-to-know/ct_index), Juin 2015). Parmi celles-ci 128 000 cas nécessitent des hospitalisations et 3000 personnes en décèdent. Les animaux destinés à la consommation humaine, dont la volaille et le porc, représentent les plus importants réservoirs de pathogènes alimentaires. Des stratégies de contrôle à la ferme ont donc été élaborées afin de réduire le nombre d'animaux porteurs de ces pathogènes transportés à l'abattoir. Les pathogènes alimentaires affectant le plus la santé publique aux États-Unis sont : *Salmonella spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Norovirus* et *Campylobacter spp* (<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>,

Juin 2015). Or, certains de ces genres bactériens représentent des pathogènes zoonotiques (transmission de l'animal à l'humain). Au sein de l'industrie porcine canadienne, il y a présentement une sensibilisation vis-à-vis l'intégration et la coopération de tous les stades de la chaîne de production porcine afin de réduire la prévalence de *Salmonella* chez le porc, et conséquemment le nombre d'infections chez les consommateurs (Mikkelsen et al., 2004). En effet, les diverses pratiques agricoles ont un impact sur l'incidence des microorganismes présents chez les animaux (Téllez et al., 2015). L'émergence de microorganismes résistants aux antimicrobiens contribue également aux nombreuses épidémies recensées et rend le traitement plus difficile. Certaines espèces bactériennes résistantes aux antimicrobiens peuvent survivre aux processus de transformation et ainsi persister dans le produit mis en marché (Saeed, 2015). En ce qui concerne les infections à *Salmonella*, il est important de noter que les porcs sont rarement des porteurs symptomatiques. Cette problématique augmente le risque de propagation du microorganisme. Au Canada, 87 510 cas d'infections à *Salmonella* sont estimés chaque année (Otto et al., 2014; St. Amand et al., 2013; Varga et al., 2013). Du côté des États-Unis, les infections causées par *Salmonella* engendrent plus de 1,4 millions de cas de maladies et près de 500 décès chaque année, ce qui coûte plus de 2,9 milliards à l'économie du pays (Callaway et al., 2008).

## **1.2 STRATÉGIES ALIMENTAIRES**

Depuis quelques années, plusieurs stratégies alimentaires ciblant la limitation de l'usage des antimicrobiens, ont été étudiées afin d'améliorer la santé et la performance de croissance chez les porcs, tout en limitant les infections bactériennes répertoriées chez ces derniers (Naqid et al., 2015; Postma et al., 2015). L'ajout de probiotiques figure parmi ces

alternatives à l'usage des antimicrobiens. En effet, les probiotiques sont des microorganismes vivants ajoutés comme compléments à la diète des porcs. Ces microorganismes agissent de façon bénéfique en améliorant la microbiocénose intestinale de même qu'en augmentant la digestibilité des aliments. Ils facilitent la croissance des microorganismes indigènes de la flore intestinale au détriment de certains microorganismes spécifiques tels *E. coli* pathogènes, *Salmonella*, *Campylobacter* et *Listeria* (Patterson and Burkholder, 2003). Cependant, les probiotiques semblent plus efficaces chez les porcelets que chez les porcs d'engraissement (Adjiri-Awere and Van Lunen, 2005). Les prébiotiques, quant à eux, sont généralement des oligosaccharides qui ne peuvent être digérés par le porc, mais qui sont spécialement dégradés par la microflore. En d'autres termes, ils permettent le maintien et la promotion des activités de fermentation et de prolifération des microorganismes probiotiques et des bactéries indigènes. Par exemple, une supplémentation de prébiotiques influence les niveaux d'acides gras volatils, les niveaux d'acide lactique et les niveaux d'ammoniaque dans l'estomac (Pié et al., 2007). Or, une augmentation du taux d'acides gras volatils mène à la prolifération des bifidobactéries et des bactéries lactiques (Vondruskova et al., 2010). Les probiotiques et les prébiotiques favorisent la croissance de la flore indigène intestinale (principalement composée de bactéries à Gram positif dont les bactéries lactiques), ce qui crée de la compétition avec les pathogènes pour les nutriments et la colonisation du tube digestif. La flore indigène exclut les microorganismes pathogènes en sécrétant des composés antimicrobiens tels que les acides organiques (acide formique, acide fumarique, acide butyrique, acide citrique et acide propionique) entre autres. Les acides organiques détiennent donc un pouvoir antimicrobien en plus d'avoir un impact favorable sur la résorption et la digestibilité des nutriments (Borojjeni et al., 2014). En plus de la flore indigène, plusieurs éléments retrouvés dans le système digestif

tels que l'acidité gastrique, les sels biliaires et les sécrétions pancréatiques affectent déjà la survie des microorganismes pathogènes (Lee and Salminen, 2009). L'acide gastrique, un des principaux facteurs contribuant au stress rencontré par les bactéries, constitue le premier mécanisme de défense. Les sels biliaires représentent les constituants majeurs de la bile et sont des dérivés de l'acide cholique. Ils forment le deuxième facteur important du mécanisme de défense. Le passage dans l'estomac constitue une difficulté majeure pour les bactéries qui doivent atteindre l'intestin dans un état viable. D'ailleurs, le phénomène d'adaptation au stress acide est particulièrement bien étudié chez les bactéries entériques (Foster and Moreno, 1999). Chez le porcelet, une supplémentation alimentaire en acides organiques (acide fumarique, propionique, butyrique, lactique, malique, citrique et/ou formique) en période de sevrage pourrait être bénéfique notamment pour contrôler l'apparition de la diarrhée post-sevrage (Tsiloyiannis et al., 2001). En effet, il semblerait qu'à cette période, la sécrétion gastrique soit insuffisante pour acidifier le contenu digestif (Heo et al., 2013). L'acidification du tractus gastro-intestinal via la supplémentation d'acides dans l'aliment entraînerait une activation enzymatique, ce qui améliorerait la dégradation des protéines au niveau stomacal et la digestion intestinale (Pastuszewska et al., 2007). Aussi, cela engendrerait une prolifération de la flore acidophile bénéfique, à base de lactobacilles, puis une inhibition de la prolifération de bactéries pathogènes (Pastuszewska et al., 2007). La supplémentation en acides organiques permet une amélioration potentielle de la digestibilité au niveau de l'iléon, avec amélioration de l'efficacité alimentaire et de la vitesse de croissance des porcs (Blank et al., 1999). De plus, les acides organiques stimulent le système immunitaire (augmentation de la sécrétion d'IgA) et renforcent la barrière physique de l'intestin en haussant le taux de sécrétion de mucus par les cellules gobelets (Gill, 2003). Certains extraits de plantes possèdent eux aussi des vertus

bactéricides ou bactériostatiques en plus de détenir des activités anti-inflammatoires, anti-tumeurs et anti-oxydatives (Visscher et al., 2009; Vondruskova et al., 2010). Même si les supports de ces activités demeurent encore souvent partiellement identifiés, certains principes actifs, tels le thymol ou le menthol, sont bien connus. Néanmoins, l'utilisation d'extraits végétaux comme alternative aux antimicrobiens et aux facteurs de croissance présente un réel intérêt, sinon zootechnique, dans un contexte de recherche d'alternatives naturelles aux antimicrobiens. Une étude récente rapporte que l'utilisation d'huiles essentielles prévient les infections à *Salmonella* et *E. coli* chez le porc (Penalver et al., 2005). Outre ces mesures sous forme d'additif, des stratégies ciblant cette fois la texture, la granulométrie et la formulation des aliments existent (Pieper et al., 2009).

### **1.3 TEXTURE ET GRANULOMÉTRIE DE LA MOULÉE**

Au Québec, la moulée généralement distribuée aux porcs dans l'industrie est une moulée de type cubée et d'environ 750 µm de diamètre. Or, la granulométrie des aliments distribués aux porcs joue un rôle dans la valeur alimentaire et les troubles digestifs (Wondra et al., 1995a). Par ailleurs, le broyage grossier des céréales réduirait la prévalence des *Salmonella spp.* et des *E. coli* pathogènes dans le tractus gastro-intestinal porcin (Taube et al., 2009; Visscher et al., 2009). Ce résultat pourrait être expliqué par l'augmentation de la flore lactique et la production d'acides gras volatils dans l'estomac (Serena et al., 2009). Aussi, certaines études démontrent qu'une moulée cubée à granulométrie plus fine aiderait la vidange gastrique lors de la mise à jeun et conséquemment diminuerait le risque de contamination de la carcasse à l'abattoir en réduisant les risques de rupture du tube digestif (Gregory et al., 1990; Guise et al., 1995). Par contre, la structure farineuse de la moulée texturée représente une contrainte majeure en ce qui concerne la distribution des aliments. Si l'aliment demeure coincé dans le

système de distribution de la moulée et les porcs sont anormalement rationnés, cela peut fortement limiter les performances de croissance des porcs. Une autre étude a montré que le contenu intestinal des porcs alimentés avec une moulée texturée contribue à la protection vis-à-vis la colonisation de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 sur des lignées cellulaires, *in vitro*, en comparaison à celui de porcs recevant de la moulée cubée (Hedemann et al., 2005). D'ailleurs, Guillou et Landeau mentionnent que «les contraintes techniques pèsent aujourd'hui plus lourd que les avantages nutritionnels dans le choix d'une qualité de mouture» (Guillou and Landeau, 2000). Les porcs peuvent également avoir une préférence au niveau de la présentation des aliments, ce qui peut également avoir des répercussions sur les performances zootechniques (Millet et al., 2012; Solà-Oriol et al., 2009). Une étude montre d'ailleurs que les porcs préfèrent la moulée cubée par rapport à la moulée texturée lorsque la diète est à base d'orge (Solà-Oriol et al., 2009). Néanmoins, lorsque la diète est à base d'avoine, aucune différence entre la moulée cubée et la moulée texturée n'a été observée (Solà-Oriol et al., 2009). En d'autres termes, cela signifie qu'à la fois la formulation et la texture de la moulée peuvent avoir un impact majeur sur la consommation moyenne quotidienne. De plus, la qualité de la viande n'est pas en reste. Par exemple, Faucitano *et al.* ont démontré que la moulée cubée génère des rendements plus performants au niveau des carcasses mais pas du point de vue de la qualité de la viande (Faucitano et al., 2006). En effet, les paramètres tels que la couleur, le pH<sub>45</sub>, la conductivité électrique et la perte en eau de la viande ne sont pas affectés par la texture de la moulée (Faucitano et al., 2006). Dans le cadre de ce projet, trois différentes granulométries (500, 750 et 1250 µm) de moulée texturée et de moulée cubée ont été distribuées manuellement à l'engraissement pendant toute la période d'essai, et ce pour chacune des formules de moulée (le pré-engrais, le début, la croissance, le

fini ordinaire et le fini illimité). Il est important de mentionner que les cinq formules de moulée texturée et les cinq formules de moulée cubée étaient composées des mêmes céréales, et que seul le processus de transformation était différent. La moulée cubée nécessite des températures de cuisson élevées au cours de sa fabrication (Medel et al., 2004). Conséquemment, l'utilisation de la moulée cubée représente un moins grand risque de contamination exogène (entérobactéries) que la moulée texturée (Jones and Richardson, 2004).

#### **1.4 *ESCHERICHIA COLI***

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif, aérobie, sous forme de bacille (1-2 µm de longueur) non-sporulant, fermenteur des sucres, dégradant le glucose, réduisant les nitrates et les nitrites, catalase positif, oxydase négatif et est généralement mobile par des flagelles péritriches. *E. coli* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et est retrouvée communément dans la microflore intestinale des animaux à sang chaud. Certaines souches pathogènes d'*E. coli* peuvent causer un éventail de maladies chez l'humain: gastroentérite, dysenterie, syndrome urémique hémolytique (SUH), infection du tractus urinaire (ITU), septicémie, pneumonie et méningite. Chez le porc, certaines souches pathogènes associées aux pathotypes ETEC, STEC, EPEC et ExPEC sont reconnues pour causer les diarrhées colibacillaires, la diarrhée post-sevrage (DPS), la gastro-entérite hémorragique, la maladie de l'œdème la septicémie et les infections urinaires (Fairbrother et al., 2005; Johnson and Russo, 2002; Sonntag et al., 2005). *E. coli* peut de plus être utilisé comme un marqueur de contamination fécale.

### 1.4.1 SOURCE DE CONTAMINATION

La majorité des souches d'*E. coli* dans le tractus intestinal des humains et des animaux sont non-pathogènes et commensales, mais *E. coli* est aussi souvent associée à divers désordres intestinaux et extra-intestinaux. Les cas de toxi-infections à *E. coli* ont été associés à ce jour, à la consommation d'aliments contaminés tels que la viande de boeuf, les produits laitiers mais aussi, le jus de pomme et les fèves germées (<http://www.phac-aspc.gc.ca/fs-sa/fs-fi/ecoli-fra.php>, Juin 2015). En effet, les bactéries *E. coli* sont particulièrement dispersées dans l'environnement via les fèces (elles peuvent donc contaminer l'eau et le sol). Conséquemment, les fruits et les légumes sont sujets à la contamination. La viande est également une importante source de contamination à *E. coli*, cette contamination peut, elle aussi, être acquise lors de l'abattage à l'étape de l'éviscération par contact avec les fèces. Bien entendu, le risque de développement d'une intoxication dépendra de trois facteurs importants : la quantité de fèces en contact avec la carcasse, la quantité de bactéries présentes dans les fèces et la proportion de bactéries pathogènes parmi ces dernières. Au Canada, tout comme aux États-Unis, une évaluation de la charge bactérienne en *E. coli* sur les carcasses animales est d'ailleurs obligatoire. Par exemple, aux États-Unis, le «Food Safety and Inspection Service» (FSIS) du département de l'agriculture a établi des critères quant à la technique de dénombrement des *E. coli* totaux sur les carcasses et révisé régulièrement ces critères de prévalence et de degré de contamination ([http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0b0fb57d-c23d-4b26-913e-499dd99aca86/26\\_IM\\_PR\\_Generic\\_Ecoli.pdf?MOD=AJPERES](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0b0fb57d-c23d-4b26-913e-499dd99aca86/26_IM_PR_Generic_Ecoli.pdf?MOD=AJPERES), Juin 2015). Conséquemment, tous les abattoirs du pays doivent mettre en place un plan d'échantillonnage sous la

réglementation fédérale et démontrer que le contrôle de la contamination fécale (*E. coli*) est conforme. Aussi, en vertu des exigences sur la réduction du nombre de pathogènes et les systèmes HACCP (Pathogen Reduction and HACCP Systems Final Rule) édictées par l'United States Department of Agriculture (USDA), les établissements inspectés par le Food Safety and Inspection Service (FSIS) qui produisent de la viande porcine doivent satisfaire aux normes de rendement (Performance Standards) relatives à *Salmonella* et s'assurer que les résultats de ces tests sont conservés (<http://www.inspection.gc.ca/aliments/produits-de-viande-et-de-volaille/manuel-des-methodes/chapitre-11/etats-unis-d-amerique/annexe-u/fra/1371663720505/1371663913885>, Juin 2015).

## **1.4.2 CLASSIFICATION DES *E. COLI***

### **1.4.2.1 SÉROTYPES**

Il est possible de distinguer les différents *E. coli* pathogènes par le sérotypage, en se basant sur les différences antigéniques de l'antigène O et de l'antigène H (Prager et al., 2003). Les antigènes «O» d'*E. coli* correspondent à la chaîne polysaccharidique des lipopolysaccharides (LPS) tandis que les antigènes «H» sont associés aux flagelles. On dénombre, jusqu'à aujourd'hui, 174 antigènes «O» et 56 antigènes «H». Aussi, les antigènes «O» permettent d'identifier les *E. coli* selon différents sérogroupes alors que les antigènes «H» classent les *E. coli* selon divers sérotypes. Par exemple, les souches O111: H4 et O111: H12 appartiennent au même séro groupe mais représentant deux sérotypes distincts.

### 1.4.2.2 PATHOTYPES

La classification des *E. coli* selon les virotypes ou les pathotypes est basée sur la présence de certains facteurs de virulence et leurs mécanismes d'interactions avec les cellules des mammifères ou les tissus (adhésion, invasion et production de toxines) (Robins-Browne and Hartland, 2002). En d'autres termes, un virotype ou un pathotype est une combinaison spécifique de gènes de virulence. Les souches pathogéniques d'*E. coli* sont distribuées dans huit principaux pathotypes (Donnenberg and Whittam, 2001): les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC), les *Escherichia coli* producteurs de toxine Shiga (STEC), les *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), les *Escherichia coli* extraintestinaux (ExPEC), les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), les *Escherichia coli* entéro-invasifs (EIEC), les *Escherichia coli* entéroaggrégatifs (EAEC) et les *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC).

#### 1.4.2.2.1 LES *ESCHERICHIA COLI* ENTÉROTOXINOGENÈS (ETEC)

Les ETEC sont connus en santé publique puisqu'elles représentent l'agent causal de la diarrhée du voyageur. En effet, elles affectent les touristes qui consomment de l'eau ou de la nourriture contaminée. De plus, en raison des pauvres mesures d'hygiène, les ETEC affectent communément les individus vivant dans les régions tropicales en causant des diarrhées infectieuses. Les enfants d'âge préscolaire y sont très susceptibles (Dubreuil, 2012). Chez le porc, les ETEC sont responsables de la diarrhée néonatale et post sevrage ainsi que de la maladie de l'œdème en combinaison avec des STEC. Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections porcines à ETEC sont O8, O9, O20, O45, O64, O101, O138, O139, O141, O147, O149, O157 (Fairbrother et al., 2005). Les ETEC sont porteurs d'un ou plusieurs

gènes codant pour les entérotoxines LT, STa, STb et EAST1 (Berberov et al., 2004; Harel et al., 1991). Elles produisent également des adhésines telles Paa qui lui permettent de s'établir au sein de l'hôte en conférant un pouvoir d'adhérence à des récepteurs sur les cellules qu'elles infectent (Leclerc et al., 2007).

#### **1.4.2.2.1.1 LA TOXINE THERMOLABILE (LT)**

La toxine thermolabile (LT) est l'homologue de la toxine cholérique (CT) et elle produit des symptômes similaires à la toxine de *Vibrio cholerae* (diarrhée aqueuse, vomissements, yeux enfoncés, déshydratation intense, etc.) (Dubreuil, 2012; Haan and Hirst, 2004). De façon générale, la diarrhée engendrée par l'entérotoxine LT persiste de 3 à 4 jours puis elle se résorbe par elle-même. Le taux de mortalité associé à cette diarrhée non-hémorragique et sans fièvre est de moins de 1%. Il existe deux types de protéine LT : LT-I que l'on retrouve chez l'humain et les animaux et LT-II qui est isolée chez les animaux (Dubreuil, 2012). Cette protéine, avec une structure A:B<sub>5</sub>, se lie aux cellules épithéliales intestinales grâce à un lien GTP entre les sous-unités B et les récepteurs gangliosides (GM<sub>1</sub>), tout comme le fait la toxine cholérique (Erume et al., 2013). L'entérotoxine LT, après son endocytose stimule l'adénylate cyclase et crée des niveaux excessifs d'AMPc, chez certaines cellules elle provoque l'activation des lymphocytes B ou l'altération de la sécrétion des cytokines par les monocytes (Dubreuil, 2012). Elle peut aussi engendrer l'apoptose, par exemple chez les cellules CD8<sup>+</sup>. La synthèse de LT est régulée par un opéron : *eltAB*.

#### **1.4.2.2.1.2 LES TOXINES THERMOSTABLES (STa ET STb)**

La toxine thermostable (ST) représente une famille de toxines peptidiques qui sont stables à 100°C pour 30 minutes. Il y a deux principaux types de toxines ST : STa et STb qui

sont isolées à partir de souches pouvant être retrouvées chez le porc et chez l'humain (Dubreuil, 1997). STb et STa ne présentent aucune homologie de séquence et ne possèdent pas les mêmes récepteurs. Le gène *estA*, celui qui code pour STa, fait partie du transposon Tn1681 et ce dernier est retrouvé sur des plasmides de poids moléculaires différents. STa est une protéine de 18-19 acides aminés qui agit en liant une guanylate cyclase C et en activant le cycle de production de GMPc dans la cellule de l'hôte (Dubreuil, 2012). Le GMPc est un messenger cellulaire qui affecte les pompes à ions. STb est une protéine d'environ 48 acides aminés, retrouvée principalement chez les souches ETEC porcines (Dubreuil, 2012). STb est également presque exclusivement associée avec les ETEC. STb réussit à agir sur la libération de calcium causant ainsi la formation de prostaglandine E<sub>2</sub> (Dubreuil, 2012; Gonçalves and Dubreuil, 2009). La prostaglandine E<sub>2</sub>, quant à elle, régule la libération d'électrolytes et d'eau des cellules intestinales (Erume et al., 2013). De plus, STb stimule la sécrétion de bicarbonate à partir des cellules épithéliales (Rousset et al., 1998). STb induit donc la diarrhée (relâchement d'eau, de bicarbonate, de sodium et de chlore dans le lumen intestinal) de cette façon sans activer les adénylate ou guanylate cyclases (Gonçalves and Dubreuil, 2009).

#### **1.4.2.2.1.3 LA TOXINE THERMOSTABLE (EAST1)**

Les ETEC sécrètent aussi une autre toxine thermostable, EAST1. Ce peptide de 38 acides aminés a été isolé à partir de souches ETEC humaines et animales. EAST1 fait partie de la famille des STa. D'ailleurs, EAST1 est elle aussi codée par le gène *astA* (ce gène est répandu chez les ETEC et possède 98% d'homologie avec son dérivé humain) (de Sousa and Dubreuil, 2001). EAST1 active le messenger GMPc, induit des accumulations de fluides et joue possiblement un rôle dans le symptôme de la diarrhée (Dubreuil, 2012).

#### 1.4.2.2.1.4 LES FIMBRIAE (F4 ET F18)

Chez le porc, les facteurs d'adhésion F18 et F4 (ou K88) permettent de détecter les souches ETEC qui sont souvent responsables des diarrhées colibacillaires de sevrage (Nagy and Fekete, 1999). Les fimbriae F18 possèdent deux variants antigéniques (F18ab et F18ac) tandis qu'il existe trois variants pour les fimbriae F4 (F4ab, F4ac et F4ad) (Nagy and Fekete, 1999). F4ac représentant le variant le plus commun chez les fimbriae F4. Il est également le variant le plus impliqué dans la diarrhée post-sevrage chez le porc. Ces variants sont exprimés à 37°C (et pas à 18°C). Les variants antigéniques de F18 permettent l'adhérence à l'épithélium intestinal du porc de plus de trois semaines d'âge (Nagy and Fekete, 1999). Plus précisément, les fimbriae F4 permettent aux ETEC d'adhérer aux récepteurs F4 spécifiques présents sur les bordures en brosse des entérocytes des porcs de tous âges et par conséquent à coloniser l'intestin grêle (Nagy and Fekete, 1999). Lorsque les trois variants de F4 (F4ab, F4ac et F4ad) sont examinés, six phénotypes porcins peuvent être décrits à l'égard de leur adhérence au niveau de la bordure en brosse des entérocytes : le phénotype A se lie aux trois variants, le phénotype B se lie à F4ab et F4ac, le phénotype C se lie à F4ab et F4ad, le phénotype D se lie à F4ad, le phénotype E ne se lie à aucun des variants et le phénotype F se lie à F4ab (Van Den Broeck et al., 2000). Les récepteurs des phénotypes A, B et F sont des glycoprotéines tandis que les récepteurs pour les phénotypes C et D ont été décrits comme des glycosphingolipides (Van Den Broeck et al., 2000). La prévalence des différents phénotypes porcins peut donc avoir un impact sur l'apparition de la diarrhée post-sevrage chez le porc.

Une résistance à l'infection par les porcelets est également possible lorsque le récepteur de F18 n'est pas présent. F18 est codé par un opéron contenant cinq gènes (*fedA*,

*fedB*, *fedC*, *fedE* et *fefF*). L'opéron de F4 (*fedA*, *fedB*, *fedC*, *fedE*, *fefF* et *faeG*) possède les mêmes gènes que l'opéron de F18 en plus du gène *faeG*. L'expression de F4 peut, cependant, être réprimée par *hrp* (et localement par la protéine FaeA) (Fairbrother et al., 2005).

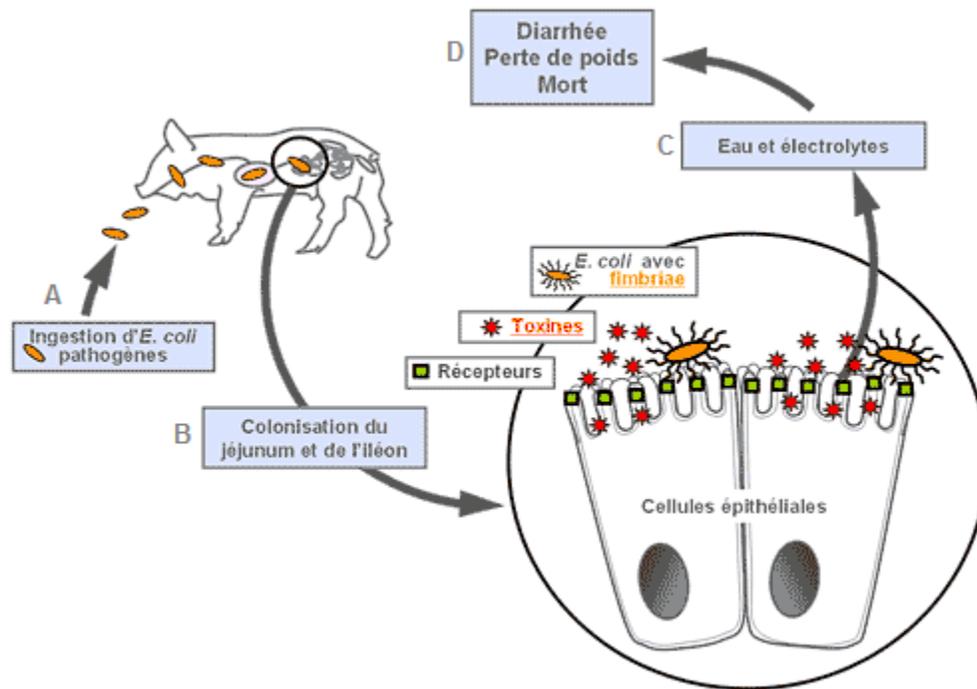


Figure 1 – Pathogénèse des *Escherichia coli* entérotoxinogènes (ETEC) chez le porc (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/pathogenesis.asp>, Juin 2015)

#### 1.4.2.2.2 LES *ESCHERICHIA COLI* ENTÉROPATHOGÈNES (EPEC)

Les EPEC affectent principalement les enfants (Giron et al., 1991). Les EPEC sont grandement invasives et elles causent des réponses inflammatoires de même que des diarrhées potentiellement fatales pour les enfants et les bébés. Les EPEC sont également pathogènes chez le bœuf, le porc, le lapin et le chien. L'interaction spécifique des EPEC avec les cellules de l'hôte s'effectue en quatre étapes : l'expression des facteurs d'adhésion, l'initiation de l'adhérence localisée, le signal de transduction et le contact intime ainsi que le réarrangement

du cytosquelette et la formation du piédestal. Les différents facteurs de virulence associés aux EPEC sont véhiculés sur un îlot de pathogénicité appelé «locus d'effacement des entérocytes» ou LEE (Mellies et al., 1999). Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections porcines à EPEC sont O45 et O103 (Fairbrother et al., 2005).

#### **1.4.2.2.2.1 LE «BUNDLE-FORMING PILI» (BFP)**

L'adhésion est régulée par un fimbriae de type IV, soit le «bundle-forming pili» (BFP) (Giron et al., 1991). Le BFP se trouve chez les souches EPEC typiques isolées chez l'humain. Chez les animaux, les souches EPEC isolées sont plutôt non-typiques. L'expression de BFP est codée par *bfpA*, qui est localisé sur un plasmide de 60 MDa (Franke et al., 1994).

#### **1.4.2.2.2.2 L'INTIMINE (EAE)**

Les EPEC produisent également l'intimine (EaeA) et un court filament de surface, EspA (Cleary et al., 2004). L'intimine est une protéine de 94 kDa de la membrane externe (Kenny et al., 1997). Elle est codée par le gène *eaeA*, qui lui est localisé sur un îlot de pathogénicité nommé «locus of enterocyte effacement» (LEE). Il existe dix-sept types d'intimines (variation au niveau de la séquence en C-terminal). Par la suite, l'initiation de l'adhésion est provoquée par le système de sécrétion de type III (injection du «translocated intimin receptor» (TIR) et de molécules effectrices dans la cellule hôte) (Cleary et al., 2004; Elliott et al., 2000). L'attachement des EPEC nécessite une voie de signalisation qui active la tyrosine kinase de la cellule hôte. Par conséquent, deux molécules de signalisation seront relâchées : l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le calcium intracellulaire (Ca<sup>2+</sup>) (Kenny et al., 1997). Ces deux molécules permettront le réarrangement du cytosquelette, résultant à la formation des «attaching and effacing lesions». À noter, ces lésions sont régulées par des gènes localisés

sur LEE qui possède cinq opérons polycistroniques (LEE1 à LEE5) et contient les gènes pour les A/E lésions, l'intimine, TIR et le SSTT (Mellies et al., 1999). Le LEE est également retrouvé chez les EHEC, mais la taille et le nombre de gènes différent. Les nombreuses anomalies du cytosquelette mèneront à la formation d'un piedestal. Le contact intime, quant à lui, sera médié par l'adhésion de l'intimine au récepteur TIR de la cellule hôte (Cleary et al., 2004). Finalement, suite à la formation du piédestal, les protéines effectrices injectées par le SSTT affecteront les jonctions serrées, les propriétés mitochondriales et la perméabilité membranaire. Alors, l'augmentation de la perméabilité membranaire mènera à une malabsorption des nutriments et des ions, la mort de la cellule de l'hôte et l'apparition d'une diarrhée osmotique.

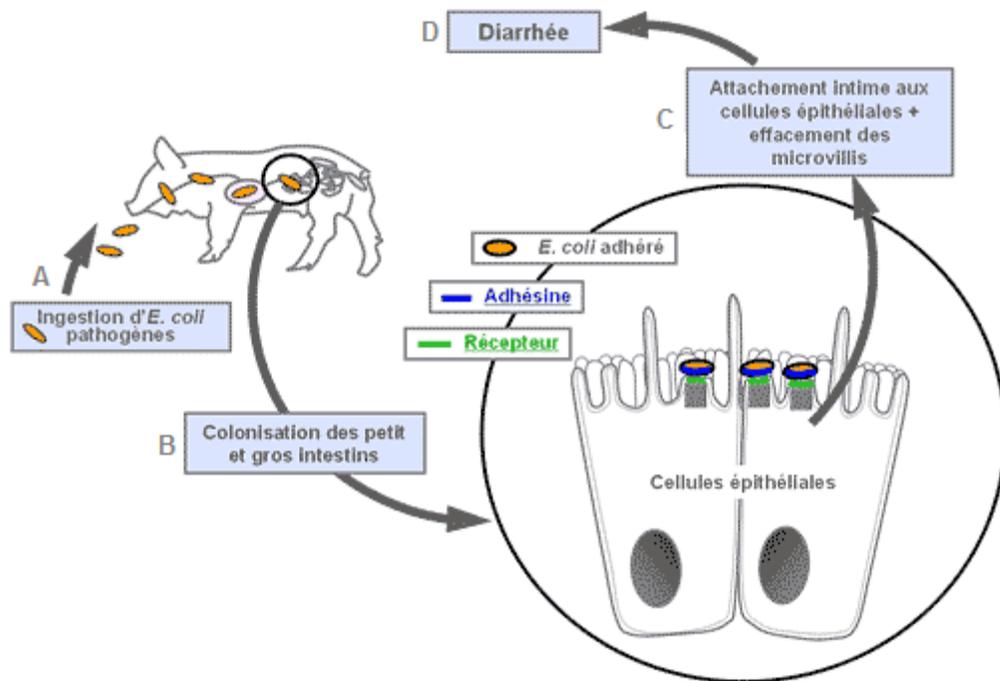


Figure 2 – Pathogénèse des *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) chez le porc (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/pathogenesis.asp>, Juin 2015)

### **1.4.2.2.3 LES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE TOXINE SHIGA (STEC) OU *ESCHERICHIA COLI* ENTÉROHÉMORRAGIQUES (EHEC)**

Les STEC ou EHEC (sous-groupe des STEC) peuvent causer des gastro-entérites et des colites hémorragiques ainsi que le syndrome urémique hémolytique (SUH) chez l'humain (Boerlin et al., 1998). Chez le porc, les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections (maladie de l'œdème) à STEC sont O138, O139, O141 et O147. À noter chez l'homme, environ 6% des infections à EHEC évoluent en SUH, une forme aiguë d'insuffisance rénale. Les sérogroupes impliqués chez les infections humaines sont O26, O103, O111, O118, O145, O157 et O163 (Beutin et al., 1998). On distingue également les EHEC via la présence des gènes *stx*. À savoir, LEE contient les gènes codant pour le système de sécrétion de type III (SSTT), certains régulateurs tels que les chaperonines, l'hémolysine, la catalase peroxydase et la sérine protéase. Pour la plupart, les gènes nécessaires à l'induction des lésions A/E sont homologues à ceux trouvés chez les EPEC en plus d'être eux aussi contenus sur le LEE (Boerlin et al., 1998). La formation des «Attaching and Effacing lesions» est l'un des traits caractéristiques de la pathogénicité des EHEC. Ceci se produit en trois grandes étapes : adhérence localisée, événements de signalisation et contact intime. Notamment, les EHEC se lient intimement aux cellules épithéliales intestinales via les fimbriae (Hacker, 1992). Au contraire des EPEC, les EHEC n'expriment pas le BFP. Par la suite, un signal est transmis à la cellule hôte via le SSTT ce qui engendre une déformation et une perte des microvillosités, un réarrangement des protéines du cytosquelette de l'hôte de même que la polymérisation des filaments d'actine. Finalement, un contact intime est médié par l'intimine (EaeA). Conséquemment, l'attachement des bactéries est favorisé et le développement d'un piédestal est réalisable. Par ailleurs, les STEC ont été divisées en cinq catégories, ou séropathotypes, en

fonction de la sévérité des infections qu'elles causent. Fait à noter, le sérotypage principal associé aux EHEC est *E. coli* O157:H7. *E. coli* O157:H7 est le sérotype le plus communément associé au SUH (Anjum et al., 2014). La période d'incubation d'*E. coli* O157:H7 varie entre 2 et 8 jours (<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/04vol30/rm3009a-fra.php>, Juin 2015). Il n'existe pas de traitement curatif aux antibiotiques contre *E. coli* O157:H7.

#### **1.4.2.2.3.1 LES TOXINES SHIGA (Stx1 ET Stx2)**

Les STEC produisent deux types de toxine Shiga : Stx1 et Stx2 (Herold et al., 2004). La séquence de la toxine Stx1 est hautement conservée et exprime une grande homologie avec la toxine Stx produite par *Shigella dysenteriae* de type 1 (Herold et al., 2004). À savoir, les anticorps déployés contre la toxine Stx de *S. dysenteriae* de type 1 peuvent neutraliser la toxine Stx1 des STEC, mais pas la toxine Stx2. Stx2 possède plusieurs variants. Le variant Stx2e est responsable de la maladie de l'œdème chez le porc (Hacker, 1992). Stx2e est jusqu'à mille fois plus toxique que Stx1, Stx2 et EaeA réunis (grands risques de développement du SUH). Les gènes codant pour la production des toxines Stx1 et Stx2 sont rassemblés dans un bactériophage, semblable à un phage lambda (Herold et al., 2004). Il est possible d'induire un cycle lytique à ce bactériophage. Les phages résultants peuvent ainsi transférer les gènes *stx*, de façon horizontale, à des *E. coli* ou à d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Aussi, Stx1 et Stx2 se lient au même récepteur, un glycolipide appelé globotriaosylceramide (Gb3) (Karmali, 2004). La sévérité d'une infection aux STEC et les dommages causés aux tissus dépend du nombre de récepteurs présents. La toxine Shiga, grâce à une activité de N-glycosylation, coupe une adénine de l'ARNr 28S et inactive ainsi la fonction de la sous-unité ribosomale 60S (le ribosome ne peut plus interagir avec les facteurs

d'élongation EF-1 et EF-2) (Endo et al., 1988). Elle prévient donc la liaison de l'ARNt et elle inhibe la synthèse protéique. Or, une déficience de synthèse protéique mène à la mort cellulaire programmée.

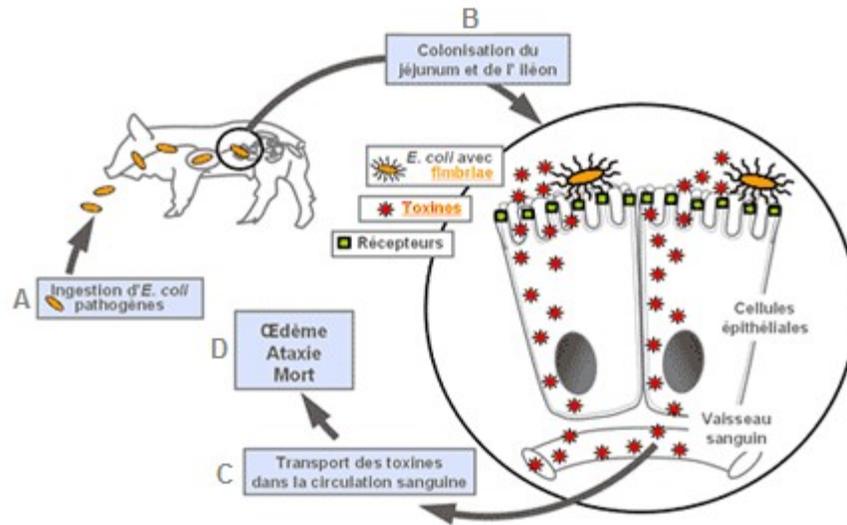


Figure 3 – Pathogenèse des *Escherichia coli* producteurs de toxine Shiga (STEC) chez le porc (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/pathogenesis.asp>, Juin 2015)

#### 1.4.2.2.4 LES *ESCHERICHIA COLI* ENTÉROAGGRÉGATIFS (EAEC)

Les EAEC peuvent causer des diarrhées persistantes chez l'humain, soit de plus de quatorze jours. Ces diarrhées sont souvent accompagnées de faible fièvre et de perte de mucus. Néanmoins, elles ne sont pas accompagnées de vomissements. Les diarrhées persistantes chez les enfants engendrées par les EAEC sont très similaires aux diarrhées causées par les ETEC. En outre, les EAEC sont fréquemment isolées de patients atteints du SIDA étant donné qu'elles infectent couramment des hôtes immunodéficients (Savarino et al., 1996). Les EAEC expriment les fimbriae d'adhérence agrégative I, II et III, les «Curli», les «coiled pilus» et les

protéines d'adhésion sur la membrane externe (Osek, 2003). L'ensemble des gènes responsables de l'adhésion des EAEC se retrouve sur un plasmide de 60 MDa (Savarino et al., 1996). De plus, les EAEC produisent deux types de toxines : «ST-like toxin», aussi nommée EAST (enteroaggregative ST) et l'«hemolysin-like *E. coli* toxin» (Savarino et al., 1996). Cette dernière est une exotoxine «pore-forming», très semblable à l'hémolysine. Elle agit également comme une molécule signal augmentant l'influx de calcium, la dépolymérisation de l'actine et la déstructuration du cytosquelette de la cellule de l'hôte. Les EAEC adhèrent aux entérocytes formant ainsi un agrégat caractéristique, le «stacked-brick». L'invasion des cellules épithéliales ne se produit pas chez les EAEC. C'est plutôt une cytotoxine produite par ces bactéries qui est responsable des effets histopathologiques observés (Osek, 2003).

#### **1.4.2.2.5 LES *ESCHERICHIA COLI* ENTÉRO-INVASIFS (EIEC)**

Les EIEC rappellent les *Shigella spp.*, et ce autant du point de vue génétique, biochimique que pathologique. Chez l'humain, ces EIEC peuvent causer des diarrhées sanglantes sans SUH et la dysentérie. Cependant, une ingestion de  $10^6$  bactéries est nécessaire pour qu'un individu développe une infection à EIEC (Gorden and Small, 1993). L'implication des EIEC dans des cas cliniques chez d'autres espèces animales n'a pas été signalée jusqu'à présent. Les EIEC adhèrent et pénètrent les cellules épithéliales des muqueuses pour s'y multiplier dans le cytoplasme. Par la suite, elles se déplacent directionnellement et se propagent aux cellules adjacentes (comme *Shigella*, mais sans la production de toxine). Ce sont d'ailleurs les dommages cellulaires dus à l'invasion et la propagation qui provoquent une forte réponse inflammatoire et des diarrhées sanglantes semblables à la dysentérie bacillaire

causée par *Shigella*. Les gènes responsables de l'invasion chez les EIEC sont situés sur un plasmide de 140 MDa, nommé pInv (Lan et al., 2003).

#### **1.4.2.2.6 LES *ESCHERICHIA COLI* À ADHÉSION DIFFUSE (DAEC)**

Les DAEC constituent un groupe hétérogène contenant à la fois des souches pathogènes et non-pathogènes. Néanmoins, les DAEC peuvent causer des diarrhées infantiles non sanglantes (Beinke et al., 1998). En effet, il a été observé que les diarrhées étaient corrélées avec l'âge des enfants. Une augmentation du nombre de diarrhées causées par les DAEC est parallèle au vieillissement, et ce à partir de un an jusqu'à 5 ans. Les DAEC possèdent certaines adhésines telles qu'AIDA-1, F1845, CF16K (Beinke et al., 1998). Certaines souches AIDA-1 positives ont été isolées de cas de diarrhée chez le porc. Le LEE a lui aussi été isolé chez les DAEC (Beinke et al., 1998).

#### **1.4.2.2.7 LES *ESCHERICHIA COLI* EXTRAINTestinaux (EXPEC)**

Les ExPEC possèdent une gamme de facteurs de virulence leurs permettant de causer des maladies à l'extérieur du tractus gastro-intestinal de leur hôte (Johnson and Russo, 2002). Les ExPEC ont donc développé des stratégies de survie et de multiplication en milieux hostiles, pauvres en fer, et en présence des divers mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. Les maladies humaines engendrées par les ExPEC incluent les infections urinaires, les méningites néonatales, les pneumonies, les septicémies et autres infections (Smith et al., 2007b). Les ExPEC causent également des infections extra-intestinales chez les animaux d'élevage et les animaux de compagnie. Comparativement aux *E. coli* commensaux et contrairement aux *E. coli* pathogènes vus précédemment, les ExPEC ne causent pas de maladies entériques. Parmi les facteurs de virulence des ExPEC figurent le «cytotoxique

necrotizing factor» (CNF-1, CNF-2 ou CNF-3), la «temperature-sensitive hemagglutinin» (tsh), les fimbriae P (opérons *pap*) et l'«aerobactin» (*iucD*). La majorité des ExPEC appartient à des groupes phylogéniques et à des sérogroupes O restreints (Johnson and Russo, 2002).

#### **1.4.2.2.7.1 LE «CYTOTOXIC NECROTIZING FACTOR» (CNF)**

CNF-1, CNF-2 (85% d'homologie de séquence avec CNF-1) et CNF-3 (70% d'homologie de séquence avec CNF-1), tout comme CNFY (61% d'homologie de séquence avec CNF-1) chez *Yersinia pseudotuberculosis* et DNT chez *Bordetella*, font partie de la famille des «dermonecrotics toxins» (Knust and Schmidt, 2010; Lemonnier et al., 2007). CNF-1 agit sur les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou les monocytes-macrophages via l'activation des protéines Rho (Hofman et al., 2000; Lemonnier et al., 2007). Les protéines Rho sont alors constitutivement liées à un GTP, entraînant chez la cellule eucaryote un réarrangement du cytosquelette d'actine (BurrIDGE and Wennerberg, 2004; Jaffe and Hall, 2005), l'activation de NF-KB et la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  (Falzano et al., 2003). Les gènes codant pour CNF-1 et CNF-3 sont localisés sur le chromosome d'*E. coli* tandis que le gène codant pour CNF-2 se retrouve sur un plasmide. Des études génomiques ont démontrés que le gène codant pour CNF-1 est plus commun que le gène codant pour CNF-2 (Kadhun et al., 2008). Les mécanismes d'action de CNF-2 et CNF-3, notamment en ce qui à trait à l'activation des protéines Rho, sont très similaires aux modes d'action de CNF-1 (Stoll et al., 2009).

#### **1.4.2.2.7.2 LA «TEMPERATURE-SENSITIVE HEMAGGLUTININ » (TSH)**

Tsh est un membre d'un groupe de protéines, dont le gène *tsh* se retrouve dans un plasmide, que l'on retrouve parmi le groupe des autotransporteurs (Dozois et al., 2000). Les

autotransporteurs représentent une famille de protéines autonomes sécrétées par les bactéries à Gram négatif. Ces protéines exercent plusieurs fonctions impliquées dans la virulence : adhésion, cytotoxicité et invasion (Dozois et al., 2000). Chez les ExPEC, Tsh agit comme une adhésine (Schierack et al., 2008).

#### **1.4.2.2.7.3 LE FIMBRIAE (P)**

Les fimbriae P représentent également des adhésines chez les ExPEC (Johnson et al., 2000). Ils jouent un rôle principal dans l'infection des voies supérieures du système urinaire (Lane and Mobley, 2007). L'opéron *pap* («pilus associated with pyelonephritis») code pour diverses sous-unités des fimbriae P. Sur cet opéron on retrouve les gènes de synthèse pour les protéines structurales (PapA, PapE, PapF, PapH, PapK, PapG), les protéines d'assemblage (PapC, PapD et PapJ) et pour finir les protéines régulatrices (PapB et PapI) (Waksman and Hultgren, 2009). L'opéron *pap* codent pour toutes les sous-unités des fimbriae P (*papBAHCDJKEFG*), sauf *papI* qui est transcrit seul et en sens inverse du reste de l'opéron (Casadesús and Low, 2006). La variation de phase des fimbriae de type P (Pap), comprend l'intervention de plusieurs protéines : Lrp, PapI, PapB et Dam (Casadesús and Low, 2006). Les phases ON et OFF d'expression de Pap sont reliées à l'état de fixation de Lrp dans la région intergénique de l'opéron. La variation de phase de Pap étant un mécanisme épigénétique, elle est réversible et transmissible de génération en génération.

#### **1.4.2.2.7.4 L'AÉROBACTINE**

Chez les animaux, le fer est généralement lié aux protéines, ce qui limite sa disponibilité pour les bactéries. Certaines bactéries, et en particulier les ExPEC, expriment donc à leur surface des récepteurs de molécules riches en fer comme l'hème, hémoglobine,

lactoferrine et utilisent plusieurs systèmes de capture de fer connus sous le nom de sidérophore (Mietzner and Morse, 1994). L'aérobactine, encodée par un opéron comprenant le gène *iucD*, joue un rôle dans la colonisation du tractus urinaire par les ExPEC via l'acquisition du fer. En effet, l'aérobactine est un sidérophore qui permet à la bactérie de capter le fer nécessaire à sa survie. L'ensemble des gènes codant pour l'aérobactine sont *iucABCD* et *iutA*. Quatre de ces gènes sont nécessaires pour la biosynthèse de l'aérobactine. Le gène *iutA*, quant à lui, code pour un récepteur membranaire d'*E. coli*, soit ferriaérobactine (Thariath et al., 1993).

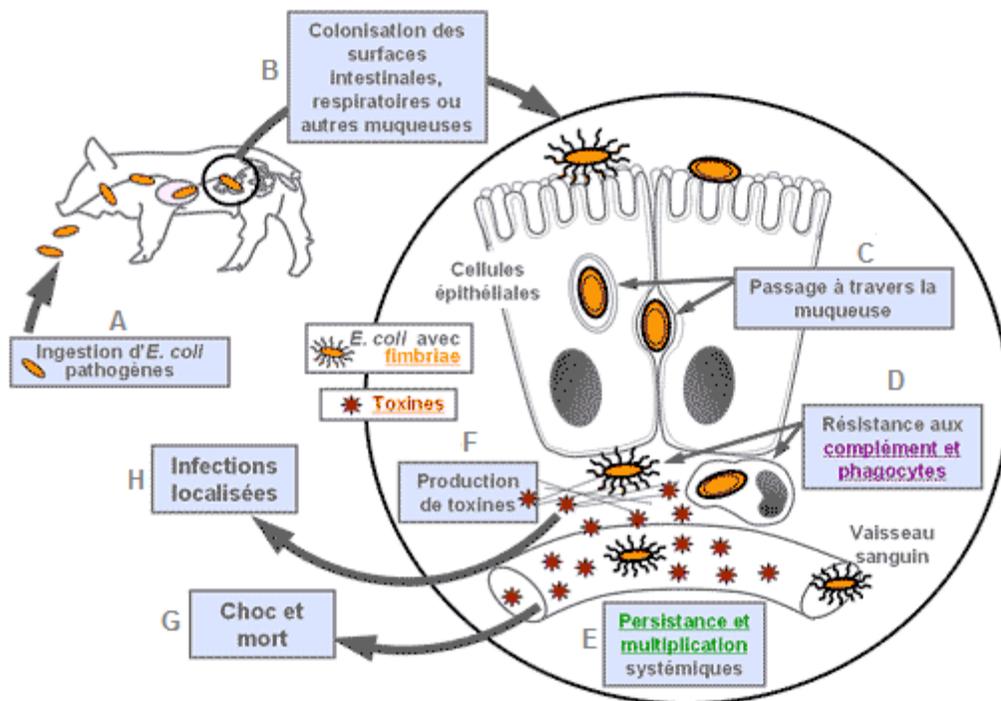


Figure 4 – Pathogénèse des *Escherichia coli* extraintestinaux (ExPEC) chez le porc (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/pathogenesis.asp>, Juin 2015)

#### 1.4.2.2.8 STEC O104:H4

En 2011, une souche pathogénique alimentaire d'*E. coli* O104:H4 a causé une épidémie massive de SUH en Allemagne en 2011. Ce *E. coli* O104:H4 possède des facteurs de virulence homologues avec les STEC de même qu'avec les EAEC. En effet, ce nouveau sérotypothype dispose d'une combinaison inusitée de caractères pathogéniques typiques des EAEC (*aggR*, *sigA*, *sepA*, *pic*, *aatA*, *aaiC*, *aap* et *aggA*) en plus de produire la toxine Shiga (*stx2a*) (Scheutz et al., 2011). Qui plus est, *E. coli* O104:H4 possède également le gène *iutA* codant pour un récepteur d'aérobactine répertorié chez 80% des ExPEC (Scheutz et al., 2011). L'apparition et la propagation rapide de ce nouveau sérotype démontre donc la possibilité d'apparition de nouveaux variants.

## 2. PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES ET IMPACT ÉCONOMIQUE

Les *E. coli* virulentes figurent parmi les pathogènes alimentaires affectant le plus l'économie publique et le portefeuille des éleveurs d'animaux destinés à la consommation. En effet, ce genre bactérien est à l'origine de plusieurs maladies humaines et animales. Les producteurs sont affligés par la diminution des performances zootechniques, voire même la perte de certains sujets, tandis que les gouvernements doivent répondre aux épisodes épidémiques et aux besoins en traitements de la population infectée (Newell et al., 2010). L'usage de la moulée texturée aurait pour objectif de diminuer la prévalence des *E. coli* pathogènes, afin d'éviter le développement de maladies chez les porcs. Or, la moulée texturée présente également quelques désavantages du point de vue financier. Comme mentionné précédemment, l'indice de la conversion alimentaire est corrélé avec la taille des particules, ce qui engendre des coûts supplémentaires et non-négligeables pour les producteurs. Cela est

d'autant plus vrai pour les producteurs de porcs en engraissement (Agostini et al., 2014; Niemi et al., 2015). Cependant, le taux de mortalité des porcs bénéficie des effets de la moulée texturée (Melnichouk, 2002). Toutefois, les systèmes de distribution de la moulée présentement retrouvés dans les porcheries ne sont pas adaptés à la moulée texturée. La granulométrie des aliments, quant à elle, influence la conversion alimentaire (g d'aliment / g de gain de poids). Dans une étude de Guillou et Landeau (2000), il a été démontré que la performance de croissance des porcelets et des porcs en stade de croissance-finition n'était pas affectée par la taille des particules de la diète (Guillou and Landeau, 2000). Néanmoins, plus le diamètre des particules était grand, plus la conversion alimentaire était élevée. Le producteur a donc dû déboursier plus d'argent en frais de nourriture. Guillou et Landeau ont aussi remarqué que le broyage grossier améliorait le gain de poids pendant la phase de croissance, mais pas pendant la phase de finition au cours de laquelle l'indice de conversion alimentaire a augmenté (Guillou and Landeau, 2000).

### **3. IMPACT SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

#### **3.1 IMMUNITÉ INTESTINALE**

Le tractus gastro-intestinal peut agir dans le système de défense. En effet, la muqueuse du tractus gastro-intestinal est en contact direct avec de nombreux antigènes, certains comme la nourriture sont inoffensifs et d'autres comme les microorganismes exogènes peuvent être de véritables pathogènes. La couche de mucus représente donc la première barrière de l'immunité innée. Le maintien de l'intégrité de l'intestin et de sa fonction digestive dépend en partie de la capacité du système immunitaire et de sa muqueuse à faire la distinction entre les antigènes offensifs et inoffensifs et de produire une réponse appropriée: une immunité active ou une

tolérance (Brandtzaeg, 1996). L'écosystème gastro-intestinal se compose d'une alliance entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont d'ailleurs continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité normale de l'écosystème (McCracken and Lorenz, 2001). Afin de se protéger contre d'éventuels agents pathogènes, le système immunitaire intestinal est géré par ce qu'on nomme les tissus lymphoïdes associés à l'intestin ou GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), un système immunitaire spécialisé lui permettant une défense adéquate en cas de besoin. Les principales composantes du GALT sont les plaques de Peyer (PP), incluant les cellules M, les follicules isolés et la *lamina propria*. Le système immunitaire intestinal a deux fonctions majeures: il doit reconnaître et exclure les antigènes à l'aide d'anticorps sécrétoires IgA et IgM en modulant ou inhibant la colonisation de l'hôte par les microorganismes et la pénétration d'antigènes solubles dangereux et il doit établir des mécanismes de suppression de la réponse immunitaire afin d'obtenir une tolérance face aux antigènes alimentaires et aux bactéries commensales dans le but d'éviter une réaction excessive (hypersensibilité). C'est par cette dernière fonction que le GALT se démarque. En tout temps, il doit y avoir un étroit contrôle de la réaction immunitaire pour prévenir l'inflammation et les allergies alimentaires, sans toutefois empêcher l'établissement d'une réponse contre les pathogènes.

Les antigènes du contenu intestinal peuvent changer soudainement dû à la modification de la diète et à l'introduction de nouvelles espèces et souches bactériennes. Des portes d'entrée spécifiques ainsi qu'un mécanisme complexe de reconnaissance des différents antigènes présents dans la lumière intestinale existent. De nos jours, trois routes principales

d'entrée des antigènes ont été élucidées. La première voie d'entrée est formée de cellules spécialisées nommées cellules M. Ces cellules sont retrouvées au niveau de l'épithélium qui recouvre les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes. Les cellules M sont responsables du transport de macromolécules, de particules et de microorganismes à travers l'épithélium intestinal. Ces cellules sont capables d'endocytose et de transcytose, mécanismes grandement facilités par le fait qu'elles sont dépourvues de bordure en brosse rigide, par opposition aux autres cellules de l'épithélium intestinal (Neutra et al., 1996). La deuxième voie d'entrée est constituée par les cellules absorbantes de l'épithélium qui peuvent aussi participer activement à la réponse immunitaire. Ces cellules peuvent capter des macromolécules et les présenter, via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II, directement aux cellules T activées intraépithéliales ou encore transférer l'antigène aux cellules dendritiques immatures de la *lamina propria* (Cheroutre and Madakamutil, 2004). La troisième voie s'explique par les cellules dendritiques, équipées de longues dendrites, qui peuvent agripper directement les antigènes de la lumière intestinale (Rescigno et al., 2001).

### **3.1.1 LES PLAQUES DE PEYER (PP)**

Les plaques de Peyer sont composées de larges follicules riches en lymphocytes B, d'une région inter-folliculaire riche en lymphocytes T, de macrophages et de cellules dendritiques. Ces différentes zones, formant le dôme sub-épithélial, sont recouvertes par une monocouche cellulaire appelée épithélium associé aux follicules (FAE). Cet épithélium particulier est composé de cellules M. Chez le porc, deux catégories bien distinctes de PP existent : les plaques de Peyer jéjunales et iléales. Les PP jéjunales sont distribuées le long du jéjunum et de l'iléon proximal en de tout petits amas. Environ 25 à 35 PP jéjunales persistent tout au long de la vie du porcelet (Bianchi and Van Der Heijden, 1994). L'unique plaque

située vers la jonction iléo-caecale peut atteindre jusqu'à 2.5m de long (Stokes et al., 1994). Cette plaque finit par former une série de petites plaques alors comparables en tout point à celles du jéjunum après la première année de vie du porc. Ces deux types de plaques diffèrent aussi quant à leur structure et l'activité lymphocytaire qu'on y retrouve (Stokes et al., 1994).

### **3.1.2 LES CELLULES M**

Afin de rejoindre les structures du GALT et ainsi induire une réponse immunitaire adéquate, les antigènes potentiellement pathogènes doivent franchir la barrière cellulaire formée par l'épithélium intestinal et le FAE des PP. Ce dernier épithélium renferme un type bien particulier de cellules appelées cellules M (Jepson and Clark, 1998; Neutra et al., 1996). Les cellules M actives permettent le transfert de l'antigène aux cellules présentatrices d'antigène. L'antigène est ensuite digéré et présenté par les macrophages. Conséquemment, les cellules dendritiques et les lymphocytes B se différencieront en plasmocytes conduisant à la synthèse d'IgA sécrétoires et à la réduction concomitante de lymphocytes B sécrétant des IgE responsables des allergies. Malgré tout, certains pathogènes entériques comme les salmonelles peuvent, grâce à leurs différents facteurs de virulence, contourner les défenses intestinales et causer une infection sévère qui peut, dans certains cas, causer la mort de l'hôte. *Salmonella spp.* utilisent d'ailleurs les cellules M afin de pénétrer à l'intérieur de l'épithélium et exercer leur action pathogène sur l'intestin (Goosney et al., 1999).

### **3.1.3 LES FOLLICULES ISOLÉS**

Les follicules lymphoïdes des PP, bien que structurellement moins définis, sont semblables aux plaques de Peyer. La plupart des cellules épithéliales des follicules ressemblent aux cellules épithéliales des villosités intestinales et présentent une bordure en brosse à leur pôle apical. Ces follicules consistent en un épithélium spécialisé contenant des

cellules M qui prélèvent le contenu de la lumière intestinale pour le transporter vers les macrophages et les cellules dendritiques sous-jacentes. À proximité de ces cellules on trouve des zones contenant des lymphocytes T et B à des degrés de maturation divers. Ces follicules sont des sites inducteurs de la réponse immunitaire adaptative. Chez le porc, les follicules lymphoïdes isolés sont présents dans toutes les parties du gros intestin du porc et en plus grand nombre à l'embranchement du côlon (Liebler-Tenorio and Pabst, 2006). Aussi, une accumulation hétéroclite de nodules lymphoïdes est retrouvée vers l'ouverture iléocœcale.

### **3.1.4 LA LAMINA PROPRIA**

La *lamina propria* sert de base à la couche épithéliale. Elle est très diversifiée sur le plan cellulaire puisqu'elle comprend une population diffuse de cellules de défense telles les lymphocytes B, T, les cellules plasmatiques, les macrophages, les granulocytes et un faible nombre de cellules dendritiques et de neutrophiles. Après la phase d'induction dans les plaques de Peyer, les lymphocytes B et T matures migrent dans les nodules lymphatiques mésentériques via la circulation lymphatique avant de se loger dans la *lamina propria* (Hokari et al., 2001). De là, les lymphocytes T peuvent directement éliminer les pathogènes et les lymphocytes B et T peuvent participer à la production d'immunoglobulines et de cytokines. La *lamina propria* est également bien vascularisée et densément innervée.

## **4. IMPACT SUR LES LÉSIONS GASTRIQUES**

Selon Mikkelsen *et al.*, les porcs se nourrissant avec de la moulée texturée présentent des tissus stomacaux moins endommagés, alors que les porcs recevant de la moulée cubée à granulométrie plus fine présentent des lésions et de la kératinisation aux niveaux de ces tissus. Ces résultats pourraient être liés à l'uniformité du contenu de l'estomac. Les porcs se nourrissant avec de la moulée texturée avaient une plus haute teneur en matière sèche et une

meilleure capacité de liaison à l'eau. Le contenu de leur estomacs ne se divisait donc pas en plusieurs phases (Mikkelsen et al., 2004). La granulométrie des aliments influence également le développement d'ulcères (Mikkelsen et al., 2004). Or, les ulcères gastro-œsophagiens peuvent diminuer la performance de croissance ou même mener à la mort du porc (Regina et al., 1999; Taube et al., 2009). La forte teneur en acides organiques maintenue dans l'estomac en raison de l'utilisation de la moulée texturée ne semble pas avoir d'impact négatif sur l'état du tube digestif (Regina et al., 1999; Taube et al., 2009). Une modulation de l'acidité du tractus gastro-intestinal mènera à la stabilisation du mucus intestinal, à la stimulation du système immunitaire et à la maintenance d'une bonne santé intestinale en général (Vondruskova et al., 2010).

## **5. ACTIVITÉS MÉTABOLIQUES DE LA FLORE INTESTINALE**

En modifiant le processus de transformation, la composition, la texture et la granulométrie de la diète servie aux porcs, une modulation des populations de la microflore du tractus gastro-intestinal surviendra. Effectivement, une granulométrie élevée améliore la santé gastro-intestinale en favorisant la prolifération des *Lactobacillus* et en inhibant la croissance des *Enterobacteriaceae* (Callan et al., 2007). Les particules grossières induisent des conditions physico-chimiques qui favorisent la croissance des bactéries anaérobies, la production d'une variété d'acides organiques et une baisse du pH affectant la population des *Enterobacteriaceae* (Mikkelsen et al., 2004). Or, l'augmentation du nombre total de bactéries anaérobies correspond à une hausse de la fermentation microbienne entraînant ainsi une élévation de la concentration totale d'AGV (Wang et al., 2005). Les AGV seraient donc produits en plus grande quantité quand le péristaltisme est ralenti en raison de la forte granulométrie et lorsque

la fermentation microbienne est plus longue (Prohászka, 1986). D'un autre côté, une fine granulométrie distribuée sous forme cubée privilégie la conversion alimentaire et la performance de croissance (Mikkelsen et al., 2007; Wondra et al., 1995a).

## 5.1 ACIDES GRAS VOLATILS

Les acides gras volatils (AGV) ou *Short-Chain Fatty Acids* (SCFA) sont des acides gras à courte chaîne de 2 à 6 atomes de carbone produits par la fermentation microbienne dans le tractus gastro-intestinal. À vrai dire, les AGV représentent 92% de la concentration totale des acides organiques du gros intestin (Prohászka, 1986). Les principaux AGV du gros intestin, soient les acides acétique, propionique et butyrique, sont produits dans un ratio variant de 75:15:10 à 40:40:20 pour chaque espèce animale (Bergman, 1990). Les AGV, de même que l'acide lactique, sont connus pour leurs activités bactéricides efficaces (Gantois et al., 2006; Hung et al., 2013; Prohászka, 1986; Ricke, 2003).

En élevage, les AGV sont parfois ajoutés dans l'eau que boivent les animaux, principalement les poulets de chairs et les pores, afin de réduire le développement de bactéries pathogènes. Deux principales versions commerciales d'additifs à base d'AGV existent déjà, la version non-encapsulée et la version encapsulée. Une étude de Prohaszka et al. a d'ailleurs démontrée l'action antibactérienne des AGV lors d'infections intestinales à *E. coli* chez le lapin (Prohászka, 1986). Mikkelsen et al. ont, quant à eux, démontré chez le modèle porcin que les hauts niveaux d'acide lactique et d'AGV de même que la chute du pH stomacal permettent de tuer certaines *Enterobacteriaceae* pathogènes (*Salmonella* et *E. coli*) (Canibe et al., 2005; Gantois et al., 2006; Mikkelsen et al., 2004). Plus encore, les AGV ont démontré un

effet sur la diminution significative de l'adhésion des STEC (*E. coli* O157:H7) aux cellules du côlon chez les bovins (Cobbold and Desmarchelier, 2004). On peut alors poser l'hypothèse que la moulée texturée pourrait augmenter la prolifération de bactéries produisant des AGV et ainsi contribuer à la santé gastro-intestinale des porcs en réduisant le risque de multiplication de certaines bactéries pathogènes telles que certains pathotypes de *E. coli*.

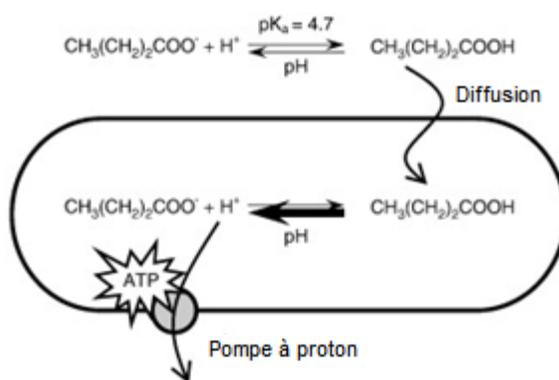


Figure 5 – Mécanisme d'action de l'effet bactériostatique des acides gras volatils (Defoirdt et al., 2009). La forme non-dissociée de l'acide gras volatil diffuse à travers la membrane puis se dissocie dans le cytoplasme. Conséquemment, la cellule doit expulser les protons excédant en dépensant de l'énergie (ATP).

Vraisemblablement, l'effet antibactérien des AGV dépend du pH (effet optimal entre 5,6 et 6,6) puisque la structure des AGV est modulée selon ce paramètre et selon leurs pKa (constante de dissociation) respectifs (Figure 5). En effet, le mécanisme d'action le mieux connu des AGV implique que la forme non-dissociée des AGV qui peut traverser librement la membrane bactérienne via un processus de diffusion. Lorsqu'entrés dans la cellule, les AGV se dissocient pour se convertir en leurs formes CoA thioesters (forme dissociée), créant une baisse dramatique du pH intracellulaire et un surplus de protons et d'anions. La cellule expulse donc l'excès de proton, un processus énergivore menant à la mort de celle-ci (Defoirdt et al.,

2009). Lorsque le pH est plus élevé que 6,6, la concentration d'AGV non-dissociés est trop faible pour qu'une activité antibactérienne soit observée. Les acides acétique, propionique et butyrique produits par la microflore ont également d'autres effets bénéfiques pour la santé intestinale (figure 6). Notamment, ils stimulent la libération de mucine dans les organes augmentant ainsi le débit sanguin de la muqueuse (Plöger et al., 2012). Ils génèrent également un milieu acide et par le fait même la stimulation de l'absorption d'eau et l'électrolyte. L'acide butyrique a également des effets qui lui sont spécifiques au niveau de la santé intestinale, spécialement au niveau du métabolisme des cellules épithéliales (source d'énergie) et/ou à l'inhibition de la désacétylation des histones (régulation de certains gènes) (Plöger et al., 2012). Ce dernier effet est impliqué dans la régulation de la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Ceci peut avoir un impact majeur dans la prévention du cancer du côlon notamment au niveau des actions anti-inflammatoires et du rôle de barrières de préservation (préservation de l'intégrité des jonctions serrées et inhibition de la relâche de TNF- $\alpha$ ) qui sont essentielles pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (Plöger et al., 2012). Certaines études ont aussi démontré que les AGV ont des propriétés neuroactives. En pénétrant dans la circulation sanguine, ils agissent sur des régions du cerveau via des récepteurs transmembranaires ou des récepteurs d'acides gras –FFA2/FFA3- (Akiba et al., 2015; Russell et al., 2013).

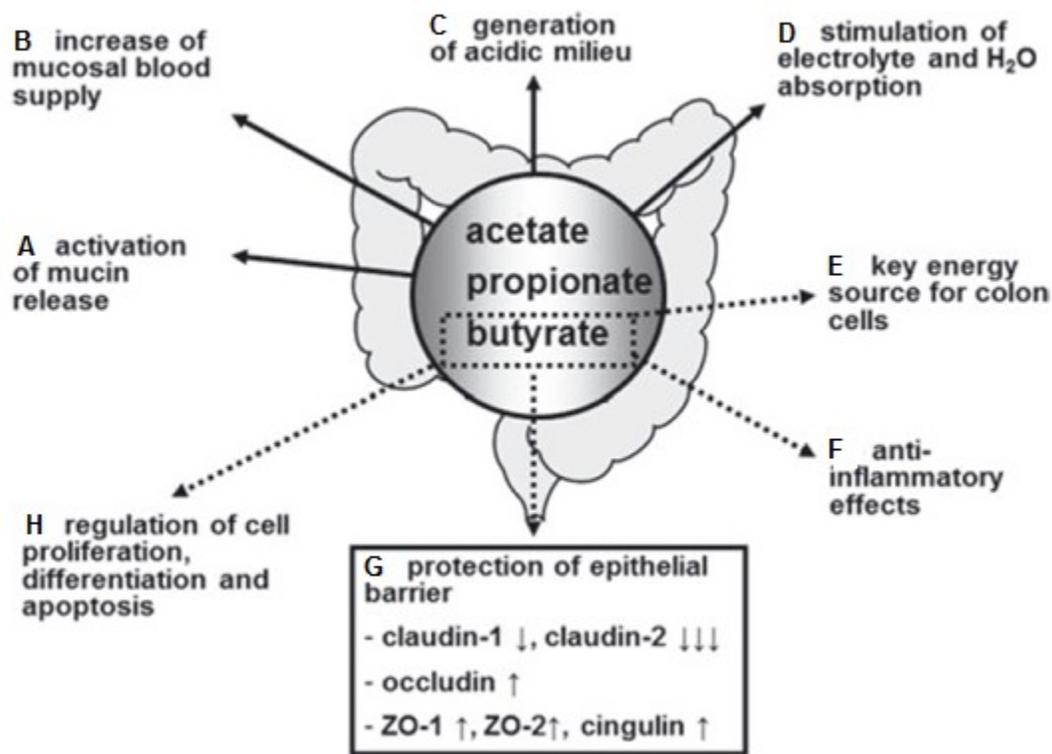


Figure 6 - Effets des AGV dans le tractus gastro-intestinal (Plöger et al., 2012)

Malgré la forte teneur en AGV dans le gros intestin, l'effet antimicrobien des AGV est plus grand dans l'estomac que dans le gros intestin. Les propriétés physicochimiques et microbiennes du contenu de l'estomac sont modulées plus facilement par l'alimentation tandis qu'aucunes altérations n'est observées dans le gros intestin (Mikkelsen et al., 2004). De ce fait, l'estomac agit comme une barrière pour le reste du tractus gastro-intestinal. S'il y a une moins grande colonisation par les bactéries pathogènes dans le reste du tractus gastro-intestinal, moins de bactéries pathogènes seront excrétées par les fèces et les risques de dissémination seront diminués. La différence de la sensibilité des bactéries vis-à-vis les acides gras volatils ainsi que l'éventail d'impacts de l'effet antibactérien des différents AGV demeurent des sujets à étudier (Van Immerseel et al., 2006). Les trois AGV les plus connus

sont : l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Il existe aussi l'acide isobutyrique, valérique, isovalérique et caproïque (Willig et al., 2004).

C'est dans le tractus intestinal porcin que commence la production d'acides gras volatils par la microflore indigène (Russell, 1979; Zhu, 2000). Grâce à diverses méthodes classiques de microbiologie, il a été possible d'isoler et d'identifier les genres bactériens producteurs d'AGV à partir de fèces porcines. Les genres bactériens dominants qui y étaient retrouvés sont décrits dans le tableau I.

<b>Tableau I.</b> Genres bactériens indigènes de la flore intestinale porcin et les AGV qu'ils produisent respectivement (Zhu, 2000)	
Genres bactériens	AGV
<i>Streptococcus</i>	Acides acétique, propionique et butyrique
<i>Peptostreptococcus</i>	Acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, caproïque et isovalérique
<i>Eubacterium</i>	Acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, caproïque, isocaproïque et isovalérique
<i>Clostridium</i>	Acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, caproïque, isocaproïque et isovalérique
<i>Lactobacillus</i>	Acides acétique, propionique et butyrique
<i>Escherichia</i>	Acides acétique, propionique et butyrique
<i>Bacteroides</i>	Acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, caproïque et isovalérique

Les *Streptococcus*, bactéries pour la plupart anaérobies facultatives, fermentent les hydrates de carbone et produisent principalement l'acide lactique et, en plus faibles proportions, les acides acétique, propionique et butyrique (Cotta et al., 2003; Zhu, 2000). Il y a aussi les *Peptostreptococcus* qui sont des anaérobies chimiohétérotrophes et qui catabolisent les acides aminés en acides acétique, isobutyrique, valérique et isovalérique. La microflore contient aussi les *Eubacterium* et les *Clostridium* qui sont des bactéries anaérobies utilisant surtout les hydrates de carbone et les acides aminés, respectivement (Russell, 1979; Salanitro et al., 1977). Elles sont connues pour produire de grandes quantités d'acides gras volatils comme l'acide acétique, butyrique, lactique, caproïque, propionique, valérique, isobutyrique, isocaproïque, isovalérique et l'acide formique. Les *Lactobacillus* produisent des acides lactique, acétique, propionique et/ou butyrique selon leur mode de fermentation (Yin and Zheng, 2005). Dans le lisier, le genre *Escherichia* est représenté surtout par *E. coli* qui est anaérobie facultatif (Salanitro et al., 1977). Il fermente le glucose et autres hydrates de carbone en acides lactique, acétique et formique. Finalement, les *Bacteroides* sont des anaérobies chimiohétérotrophes qui produisent les acides lactique, acétique, formique, propionique et butyrique lors de la fermentation (Cotta et al., 2003).

### **5.1.1 ACIDE ACÉTIQUE**

L'acide acétique ( $C_2H_4O_2$ ) est un produit de la fermentation bactérienne qui joue un rôle important dans la génération d'ATP en plus d'être une source majeure d'acétyl-CoA pour la synthèse des lipides (Fujino et al., 2001; Yamashita, 2015).

### 5.1.2 ACIDE PROPIONIQUE

L'acide propionique ( $C_3H_6O_2$ ) représente un substrat majeur pour la néoglucogénèse pour les cellules. Récemment, Hung *et al.* ont illustré *in vitro* que l'acide propionique pouvait inhiber la virulence d'entérobactéries pathogènes. Cette action spécifique sur le «*Salmonella pathogenicity island 1 (SPI-1)*» via le contrôle anti-traductionnel de *HilD* permet par le fait même une réduction de l'invasion de *Salmonella spp.* dans les cellules épithéliales (Hung *et al.*, 2013).

### 5.1.3 ACIDE BUTYRIQUE

L'acide butyrique ( $C_4H_8O_2$ ) est, quant à lui, impliqué dans la production d'énergie de l'hôte. Il représente d'ailleurs une source d'énergie importante pour les entérocytes (Houdijk *et al.*, 2002). L'acide butyrique est également associé à des capacités d'inhibition spécifiques de la colonisation d'entérobactéries pathogènes, en plus de ses effets bactériostatiques. Gantois *et al.*, ont ainsi démontré que l'acide butyrique pouvait inhiber précisément l'expression du «*Salmonella pathogenicity island 1 (SPI-1)*» (Gantois *et al.*, 2006). Une étude de Boyen *et al.* a démontré une réduction de l'expression de *hilA* ainsi qu'une baisse de l'invasion des cellules intestinales porcines chez certaines souches d'origine porcine de *Salmonella Typhimurium* lorsque de l'acide butyrique ou de l'acide propionique à 10 mM de concentration étaient ajoutés au milieu de culture. Cette étude a également illustré une réduction de l'excrétion de *Salmonella* chez des porcs recevant un additif alimentaire à base d'acide butyrique encapsulé (Boyen *et al.*, 2008b).

## 6. MODIFICATION DE LA FLORE INTESTINALE

Le porc est un omnivore monogastrique et la physiologie et l'anatomie de son système digestif sont proches de celles de l'homme. Chez le porc, comme dans les autres espèces, la flore varie en fonction des stades physiologiques et de l'alimentation (Hara et al., 1995; Katouli et al., 1995). La flore intestinale forme donc un écosystème complexe dont la composition varie en fonction de la localisation dans le tube digestif et en fonction de l'individu (Arumugam et al., 2011; Lu et al., 2003). La composition bactérienne, virale et parasitaire de la flore du tube digestif est relativement stable pour un individu au cours du temps. Il a déjà été montré qu'il existait des différences dans la composition de la flore entre des porcs de même origine génétique, et qui étaient hébergés dans des conditions identiques (Harmoinen et al., 2003). La flore intestinale porcine est complexe et se compose principalement d'une flore dominante, d'une flore sous-dominante et d'une flore transitoire. La flore bactérienne dominante, anaérobie stricte ou anaérobie facultative, est composée de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* et *Bacteroides* (Moore et al., 1987). Cette flore dominante représente plus de 90% de la flore intestinale du porc. Qui plus est, le genre *Lactobacillus* constitue la flore dominante de l'intestin grêle et du gros intestin du porc. La flore sous-dominante, qui regroupe moins de 10% de la flore intestinale du porc, est composée d'espèces bactériennes anaérobies strictes mais aussi d'espèces aérobie-anaérobie facultatives telles que les entérobactéries et les entérocoques. Chez le porc, les souches d'*E. coli* représentent environ 2% des bactéries fécales. À côté de cette flore résidente, il peut exister une flore transitoire, qui ne s'implante pas dans le tube digestif, sauf dans des circonstances pathologiques ou lors d'une antibiothérapie. Cette flore transitoire est composée de *Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*

et *Shigella*. Chaque segment du tube digestif offre des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes (présence d'oxygène et acidité). La flore de l'estomac, du duodénum et de l'intestin grêle est essentiellement composée de lactobacilles alors que les bactéries anaérobies strictes, comme les *Bacteroides*, dominent dans le secteur caeco-colique (Kararli, 1995). Le côlon abrite la densité microbienne la plus abondante avec  $10^9$ - $10^{11}$  unités formatrices de colonie/g et une majorité de bactéries anaérobies strictes, composée de nombreuses espèces. Le transit digestif y est également plus lent. La durée du transit alimentaire est de l'ordre de 30 heures chez le porc en croissance et de 50 heures chez l'adulte.

La microflore bactérienne joue plusieurs rôles. Tout d'abord, elle exerce une action sur l'anatomie du tube digestif et elle agit également sur les caractéristiques physico-chimiques du tube digestif (modification du pH notamment) et sur la physiologie digestive (vitesse de transit, métabolisme). Enfin, elle stimule également les mécanismes de défense immunitaire et exerce un effet barrière vis-à-vis de bactéries colonisatrices. Cet effet de barrière est principalement assuré par la flore anaérobie, mais aussi par des facteurs anatomiques et physiologiques (péristaltisme, sécrétion de salive et acidité gastrique). La microflore digestive est un système dynamique en perpétuel renouvellement et susceptible d'être modifié par différents facteurs comme le stress, les agents microbiens, l'alimentation et l'environnement. Le stress perturbe la physiologie digestive et est à l'origine d'un déséquilibre de la flore (Al-Fataftah and Abdelqader, 2014). Les stress sont fréquents en élevage porcin et le porc y est particulièrement sensible. Les modifications brutales et importantes du régime alimentaire, quant à elles, peuvent affecter la microflore digestive. Par exemple, une diète composée d'aliments plus grossiers, telle que la moulée texturée, ralentie le péristaltisme, modifie la

qualité du chyme dans les différentes sections du tractus gastro-intestinal et module la microflore commensale et pathogène (Mikkelsen et al., 2004). La multiplication des microorganismes à Gram positif sera favorisée dans l'estomac créant de la compétition pour les *Salmonella spp.* et les *E. coli* pathogènes réduisant ainsi leur dispersion dans le petit intestin (Mikkelsen et al., 2004) Gantois *et al.* de même que Van Immerseel *et al.* ont suggéré que les modifications de la microflore et l'augmentation de la production d'acide butyrique engendrées par le ralentissement du péristaltisme pouvaient réduire les infections invasives causées par les *Salmonella spp.* (Gantois et al., 2006; Van Immerseel et al., 2006). Aussi, un ratio lactobacilles/entérobactéries élevé constitue un bon indicateur de santé intestinale (Muralidhara et al., 1977).

## **7. RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS CHEZ *E. COLI***

L'augmentation du nombre de pathogènes alimentaires multirésistants aux antimicrobiens («Multidrug resistant» (MDR)) représente une problématique internationale en santé publique. Au Canada, un programme de surveillance, le Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) a même été établi (Boerlin et al., 2005). L'encadrement de l'utilisation des antimicrobiens a même conduit la Direction des médicaments vétérinaires de Santé Canada à classer les antimicrobiens en quatre grandes catégories selon leur importance en médecine humaine (Tableau II).

**Tableau II.** Classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine (<http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2012/chap1-section-4-fra.php>, Juin 2015)

Catégorie d'importance en médecine humaine		Classe d'antimicrobiens
I	Très haute importance	Carbapénems, Céphalosporines de troisième et de quatrième génération, Fluoroquinolones, Glycopeptides, Glycylcyclines, Kétolides, Lipopeptides, Monobactams, Nitroimidazoles (métronidazole), Oxazolidinones, Associations pénicilline-inhibiteur de $\beta$ -lactamase, Polymyxines (colistine) et Agents thérapeutiques contre la tuberculose
II	Haute importance	Aminoglycosides (sauf les agents topiques), Céphalosporines – Première et deuxième générations (y compris les céphamycines), Acide fusidique, Lincosamides, Macrolides, Pénicillines, Quinolones (sauf les fluoroquinolones), Streptogramines et Triméthoprime-sulfaméthoxazole
III	Moyenne importance	Aminocyclitols, Aminoglycosides (agent topique), Bacitracines, Fosfomycine, Nitrofuranes, Phénicoles, Sulfamides, Tétracyclines et Triméthoprime
IV	Faible importance	Flavophospholipols et Ionophores

L'acquisition de gènes de résistance par les bactéries commensales constitue aussi un enjeu puisque ces microorganismes peuvent former des réservoirs et donc transmettre ces gènes de résistance aux microorganismes pathogènes chez l'humain et/ou l'animal (Karczmarczyk et al., 2011). De plus, le potentiel de transmission de ces bactéries, par exemple *E. coli*, entre différents hôtes humains et animaux est bien connu (Johnson et al., 2005). La détection d'*E. coli* (et autres pathogènes alimentaires) possédant des gènes de résistance aux antimicrobiens est de plus en plus fréquente (Boerlin et al., 2005; Sanchez et al., 2002). Il faut également savoir que les variations de prévalence sont aussi liées au statut sanitaire des animaux, à l'âge des animaux de même qu'au mode de gestion de production (Smith et al., 2007a). Le développement de solution alternative à l'usage des antimicrobiens, comme les différentes stratégies alimentaires (supplémentation ou modification de la

présentation de l'aliment des porcs), est donc devenu une nécessité. Par exemple, une étude de Jahanbakhsh *et al.* montre que la supplémentation de la diète du porcelet en sevrage avec du clinoptilolite peut diminuer la prévalence d'*E. coli* porteurs de certains gènes de résistance aux antimicrobiens et gènes de virulence (Jahanbakhsh *et al.*, 2015). Il est également primordial de connaître certaines caractéristiques de l'antibiorésistance des agents pathogènes causant les maladies en élevage porcin afin de bien contrôler les maladies et d'éviter l'échec du traitement. Plusieurs études démontrent des résultats concernant la surveillance de l'antibiorésistance de souches d'*E. coli* isolées chez les porcs ou la viande porcine. Une étude espagnole sur 205 isolats d'*E. coli* provenant des fèces de porcs à l'abattoir a pu démontrer que les antimicrobiens pour lesquels la résistance était plus souvent détectée étaient l'acide nalidixique (40,4%), le chloramphénicol (59,5%), l'amoxicilline (72,2%), le triméthoprim (83,4%), le sulfaméthazine (87,8%) et la tétracycline (95,6%) (Teshager *et al.*, 2000). Une étude albertaine sur 41 isolats d'*E. coli* provenant de viande porcine a quant à elle pu démontrer que les antimicrobiens pour lesquels la résistance était plus souvent détectée étaient la tétracycline (2,4 à 24,4%), les  $\beta$ -lactamases (2,4 à 14,6%) et la streptomycine (9,8 à 22,2%) (Sheikh *et al.*, 2012). Cette étude montre aussi que 31,7% des isolats d'*E. coli* possédaient plus de deux gènes de résistance aux antimicrobiens. Une étude en République tchèque rapportait des résultats d'antibiorésistance pour 32 *E. coli* isolés de viande porcine. Plusieurs *E. coli* étaient résistants à la sulfaméthoxazole/triméthoprim (21,9%), la triméthoprim (25,0%), la streptomycine (25,0%), la tétracycline (43,8%) et l'ampicilline (46,9%) (Skočková *et al.*, 2015). À savoir, les méthodes pour déterminer les statuts de résistance des souches ne sont pas toujours les mêmes, il faut donc être prudent lorsque vient le temps de comparer les résultats des études de ce genre.

## **8. HYPOTHÈSE**

Les caractéristiques physiques (texture et granulométrie) de la moulée du porc d'engraissement influencent les activités métaboliques et la prévalence des *Escherichia coli* pathogènes dans le tractus gastro-intestinal. Plus précisément, des moulées texturée et/ou de forte granulométrie permettent une diminution de la prévalence des *E. coli* pathogènes, une augmentation de la concentration gastro-intestinale d'acides gras volatils, une réduction du dénombrement des ulcères gastro-oesophagiens et une diminution des performances de croissance.

## **10. OBJECTIFS**

Les objectifs de cette étude consistaient à mesurer l'impact de la texture et de la granulométrie de la moulée sur la concentration intestinale en *Escherichia coli* totaux et particulièrement sur la prévalence des *Escherichia coli* pathogènes (ETEC, EPEC, STEC et ExPEC), sur les profils et concentrations intestinaux des acides gras volatils et finalement sur la santé globale du porc (performances de croissance, développement ulcères d'estomac et conversion alimentaire).

# MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

**Article : Impact of mash feeding versus pellets on propionic / butyric acid levels and on total *E. coli* load in the gastrointestinal tract of growing pigs<sup>1</sup>**

**J. Longpré,\*† || ¶ J. M. Fairbrother,† || ¶ P. Fravalo,\*† || J. Arsenault,† || P. LeBel,\*† || B. Laplante,§ C. Surprenant,§ D. Massé,‡ and A. Letellier\*† ||<sup>2</sup>**

\*NSERC Industrial Research Chair in Meat Safety, Department of Pathology and Microbiology, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, †3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6; Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre, Department of Pathology and Microbiology, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6; ||Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA), Department of Pathology and Microbiology, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6; ¶OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL), Department of Pathology and Microbiology, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6; ‡Dairy and Swine Research and Development Center, Agriculture and Agri-food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1M 0C8; and §F. Ménard Inc., 251 Route 235, Ange-Gardien, Quebec, Canada, J0E 1E0

<sup>1</sup>Acknowledgments: We thank Guy Maynard and Martine Messier (Research and Development, F. Ménard Inc., Ange-Gardien, QC) for technical help at the farm and the slaughterhouse and Denis Deslauriers (Dairy and Swine Research and Development Center,

Agriculture and Agri-Food Canada, Lennoxville, QC) for conducting the gas chromatograph analysis. We also thank the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, Financial partners in the Industrial Research chair in meat safety and the Swine and Avian Infectious Disease Research Centre (CRIPA) for funding this study.

<sup>2</sup>Corresponding author: Ann Letellier

**ABSTRACT:** Feed characteristics may influence the bacterial community composition and metabolic activities in the pig gastrointestinal tract, known to be associated with positive effects on the gut. Use of mash feed is associated with reduced *Salmonella* excretion although little is known of its effect on the *E. coli* population, nor of the mechanism of action. Our objectives were to assess the effect of feed texture combined with feed particle size on VFA profiles and levels, total *E. coli* count, and presence of genes encoding virulence factors of pathogenic *E. coli* strains in the digestive tract, along with their impact on pig performance of fattening pigs. Pigs (n=840) on a commercial farm received mash or pellet diets of different particle sizes during the fattening period. Caecal and colon contents from 165 pigs were sampled at the slaughterhouse for enumeration of *E. coli* by quantitative PCR (qPCR) and for VFA quantification by capillary gas chromatography. The *yccT* gene was used to enumerate total *E. coli*. Improved pig performance associated with pellet texture and 500 µm size were observed. Caecal (p=0.02) and colon (p<0.01) propionic acid concentrations were lower for pigs receiving pellet rather than mash feed. Similarly, caecal (p=0.01) and colon (p<0.001) butyric acid concentrations were also lower for pigs receiving pellet rather than mash feed, as determined by capillary gas chromatography. Moreover, caecal (p=0.03) and colon (p<0.001) butyric acid concentrations were higher for pigs receiving a feed with a 1250 µm rather than 500 µm particle size. On the other hand, total caecal and colon *E. coli* levels were higher for pigs receiving pellet feed than for those receiving mash feed. For total *E. coli* enumeration, caecal (p<0.01) and colon (p<0.01) *yccT* gene copies were higher for pigs receiving pellet rather than mash feed. No effect of particle size on fatty acid concentrations or on *E. coli* numbers was observed. Virulence genes quantification revealed no trend. Taken together,

results showed that mash feed is associated with lower growth performance but with favourable intestinal changes linked to VFA levels and *E. coli* reduction in the intestine.

**Key words:** *E. coli*, feed particle size, feed texture, pigs, volatile fatty acid, pig performance

## INTRODUCTION

Foodborne diseases are still a major public health concern, as many etiological agents may be zoonotic, and their control on farm may be quite challenging. Moreover, antimicrobials are commonly used to control bacterial infections at the farm level, generating public health concerns. Changes in feed characteristics, such as the use of non-pelleted rather than pelleted feed or different particle size, may enhance pig gastrointestinal tract health, reduce *Salmonella* spp. prevalence, and influence pig performance (Lo Fo Wong et al., 2004; O'Connor et al., 2008). However, this has not yet been clearly confirmed in field conditions and the mechanism of action is still unknown. In addition, no data are available regarding the effect of feed characteristics on *E. coli* populations. For instance, dietary modifications resulting in a modulation of the bioregulation of volatile fatty acids can have a potential impact on the intestinal microflora (Knudsen et al., 2003). It has been recognized, for some time, that volatile fatty acids such as acetic, propionic, butyric, valeric, and lactic acid have antibacterial activity. Propionic and butyric acids are particularly important metabolites because of their specific inhibition of enteric bacteria such as *Salmonella* spp. and general antibacterial effects on *E. coli* in pigs (Hedemann et al., 2005; Stecher and Hardt, 2011). The aim of this study was to investigate the effect of feed texture (mash versus pellet) combined with particle size (500  $\mu\text{m}$  versus 750  $\mu\text{m}$  versus 1,250  $\mu\text{m}$ ) on volatile fatty acid profiles and levels, total *E. coli*, and genes encoding virulence factors of pathogenic *E. coli* in the digestive tract. As a secondary objective, performance of fattening pigs was also evaluated with respect to the different diets.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and diets*

The study was conducted with an integrated pig production company owning feed mills, farms, slaughterhouse and animal transportation trucks. A total of 840 crossbred Duroc-Yorkshire-Landrace fattening pigs from an all-in all-out commercial herd in Québec, Canada, were distributed in 84 pens (5 females and 5 males per pen). Each pen received one of six different diets (mash feed 500, 750 or 1,250  $\mu\text{m}$  and pellet feed 500, 750 or 1,250  $\mu\text{m}$ ), resulting in 14 pens (140 pigs) allocated to each diet. Diets were assigned randomly for each pen at the beginning of the assay (55 d of age) and maintained until the end of the fattening period (120 d later) in a commercial production unit. Each pig had 2.29 square meter space. Formulation of each of the six different diets was the same (Appendix 1). Only the feed texture and/or the feed particle size were variable. Particle size of the diets was determined by using a Tyler Ro-tap shaker machine with sieve stack as recommended by the American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE) (Standard, 2003). Four diet formulations were given over the fattening period: the Pre-starter formulation was fed from day 1 to 21, the Starter from day 22 to 46, the Grower from day 47 to 88 and the Finisher from day 89 to the end (d 120) according to common commercial feeding practices. All pigs were weighed at each change of formulation and the feed consumption data were collected. Feed consumption was estimated by the amount of feed used divided by the number of pigs per pen. All procedures were approved by the ethics committee on animal use of the Université de Montréal based on the guidance of the *Canadian Council on Animal Care (CCAC)*.

### ***Sample collection***

After a transport to the slaughterhouse early in the morning and a lairage of two hours in cleaned pens, the pigs were slaughtered as the first batch of the day. Ileal, cecal and colon contents from 164 pigs were sampled individually, pigs being selected from each pen and followed until the end of the assay. More specifically, two pigs (one male and one female) were selected per pen. However, some pigs could not be sampled because they had died previously at the farm or because they were condemned by an inspector at the slaughterhouse. Intestinal contents were collected using two conical 15 ml plastic tubes. For each sample, one tube was filled and stored at -20°C for analysis of VFA, the other tube being stored at -80°C for subsequent DNA extraction for quantitative PCR (qPCR) analyses of individual samples of cecal and colon contents. Following the period of fasting, the gastrointestinal tract of the pigs was almost empty, especially the ileum. It was decided to use the small amount of ileum content for the VFA quantification. In addition, caecum and colon are associated to an increase risk of contamination at slaughterhouse, during evisceration.

### ***Volatile fatty acids analysis***

Samples of ileal, caecal and colon contents from 164 pigs were thawed at 4°C overnight and 4 g of each sample was weighed into a centrifuge tube containing six g of deionised water. Tubes were centrifuged at 38724 X g for 30 minutes. Then, 0.25 ml of sulfuric acid 0.5M was added to 1.30 g of supernatant. The suspension was vortexed and centrifuged at 13793 X g for 15 minutes. The supernatants (0.5 ml) were separated and mixed with 0.5 ml of an internal standard (2-ethylbutyric). Resin DOWEX 50W X8 from Sigma-Aldrich (0.2 g) was added to each sample. Tubes were then gently vortexed and the

suspension was filtered using a BD Luer-Lok 3 ml Syringue with a 25 mm Syringue Filter w/0.45 µm cellulose (VWR International, Mississauga, ON). All the vials were kept at 4°C until they were analysed with the chromatograph. The VFA (acetic, propionic, butyric, isobutyric, isovaleric and valeric) concentrations were measured using a Perkin-Elmer gas chromatograph model 8310 (Perkin-Elmer, Waltham, Mass.), equipped with a DB-FFAP high resolution column.

### ***Multiplex PCR analysis***

Samples from cecal and colon contents were enriched in Luria Bertani broth overnight at 37°C and DNA templates prepared from the resulting enrichments by heat lysis (22). Twelve virulence genes (Table 1) defining the *E. coli* pathotypes found in animals were selected for use in our study (Herrero et al., 1988; Furrer et al., 1990; Lortie et al., 1991; Woodward et al., 1992; Ojeniyi et al., 1994; Beaudry et al., 1996; Dozois et al., 2000; Ngeleka et al., 2003; Antaoa et al., 2007). Four multiplex PCR procedures were performed according to a protocol of the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL – Faculty of Veterinary Medicine from the Université de Montréal) available at [http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC\\_PCR\\_en.aspx](http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx) with slight modifications (Maluta et al., 2013).

### ***Quantitative PCR***

For qPCR, total DNA was extracted from cecal and colon contents of pigs by use of a physical-chemical method with phenol-chloroform essentially as previously described, with a few modifications (Juteau et al., 2004). Briefly, cells were disrupted in FastPrep Lysing Matrix tubes using the FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals, Solon, OH). The DNA was

purified by phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction and precipitated with ethanol. DNA was quantified using Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (ND1000 V3.1.2). The qPCR was performed on an Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA) using the Eco Software (version 4.1). Each reaction was run in triplicate in a volume of 20  $\mu$ L. The reaction mixture consisted of 4  $\mu$ L MBI EVolution EvaGreen qPCR master mixes (Montreal Biotech Inc.), 1  $\mu$ L (10 $\mu$ M) primers (Table 2), 9  $\mu$ L of sterilized water, and 5  $\mu$ L (10 ng/ $\mu$ L) of DNA of cecal or colon contents. Amplification involved 1 cycle at 95  $^{\circ}$ C for 10 min for initial denaturation, followed by 40 cycles of denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 15 s, primer annealing at optimal temperatures (Table 2) for 15 s (except for fimbriae F4 45 s), and extension at 72  $^{\circ}$ C for 15 s. All standard curves were constructed using PCR products. To quantify total *E. coli* by qPCR, serial dilutions of DNA from 10<sup>8</sup> to 10<sup>2</sup> copies were prepared and tested in triplicate. Primer efficiency was 96.68% with an R<sup>2</sup> of 0.989.

### ***Statistical analysis***

Pig performance parameters (average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR) were calculated for each pen using the average pig BW, quantity of feed distributed and the number of pigs. Multiple linear regression analyses were used for the analysis of each VFA, qPCR data, and pig performance, whereas multiple logistic regressions were used for PCR data (positive/negative) and gastric lesion (positive/negative) data. The unit of analysis was the pig, except for the performances for which it was the pen. For qPCR, data were log-transformed to scope normality. For gastric lesions, a first model was used to evaluate if the presence of ulcers vs. hyperkeratosis was associated with feed texture and particle size. In the absence of significant association, the two lesions were combined for modeling; otherwise, a separate model was performed for

hyperkeratosis (positive/negative) and ulcers (positive/negative). The feed texture and feed particle size were included as categorical explanatory variables in all models. Their interaction was tested and only kept in the model if statistically significant ( $p < 0.05$ ). For VFA and qPCR data models, the pen was added as a random effect to account for potential clustering of pigs within each pen. For PCR data, estimates were also adjusted for clustering within pen using generalized estimating equations. This pen correlation effect was not considered for pig performance analyses as the unit of analysis was the pen nor for the ulcer data as the information on the pen of origin was not available. Residual plots were used to assess the fit of the models and to detect the presence of outliers. Least-square means or predicted probabilities were used to present the results. All statistical analyses were performed in SAS software version 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## RESULTS

### *Effect of feed texture and particle size on VFA levels in the intestinal contents of pigs*

Feeding of mash to the pigs resulted in a significant increase in levels for many VFA in the cecum and colon contents compared to feeding of pellets (Table 3). Propionic and butyric acid levels were significantly greater in both the cecum and colon contents of pigs receiving the mash feed than of those receiving the pellet feed (Table 3). In addition, the valeric acid level was significantly higher in the colon contents but not in the cecum contents of pigs receiving the mash feed than of those receiving the pellet feed. With respect to the feed particle size, colon isobutyric and isovaleric acid levels were higher for the 500  $\mu\text{m}$  and 750  $\mu\text{m}$  diets than for the 1,250  $\mu\text{m}$  diet. Moreover, a significant interaction between feed texture and particle size was observed in relation to colon butyric acid levels (data not shown).

Indeed, colon butyric acid levels for the mash 1,250  $\mu\text{m}$  diet were significantly higher than those for all the other diets ( $24.7 \pm 2.0$  mmol/l versus  $\leq 18.8 \pm 2.3$  mmol/l;  $P < 0.05$ ). For all other models, the interaction between feed particle size and feed texture was not statistically significant (all  $P$  values  $> 0.05$ ) (data not shown). VFA levels in the ileum were similar for all feed textures and feed particle sizes tested.

***Effect of feed texture and particle size on prevalence of E. coli virulence genes in the intestinal contents of pigs (data not shown)***

The detection of the various tested genes did not differ according to particle size or feed texture (all  $P > 0.20$ ), with the exception of *estA* for which detection was higher in mash compared to pellet feed ( $P = 0.02$ ). The *faeG*, *F18* and *stxA* were not tested due to the absence or very low number of positive samples.

***Quantitative PCR***

For total *E. coli* enumeration by real-time PCR (Fig. 1), the number of *yccT* log gene copies per g of cecal contents was higher for pellet than mash fed animals ( $P < 0.01$ ). Similarly, the number of *yccT* log gene copies per g of colon contents was higher for pellet than mash fed animals ( $P < 0.01$ ). According to feed particle size, the number of *yccT* log gene copies per g of cecal contents was higher for 500  $\mu\text{m}$  than 750  $\mu\text{m}$  fed animals ( $P < 0.05$ ). On the other hand, the enumeration of the genes *faeG*, *estB* and *cnf1*, amplified for the quantification of virulent *E. coli* populations, showed no differences between the pellet and the mash fed animals. Furthermore, feed particle size had no effect on *faeG*, *estB* and *cnf1* gene enumeration.

### ***Pig performance parameters***

Overall, pig performance parameters were significantly greater in pigs receiving pellet feed than in pigs receiving mash feed (Table 4), except in pigs receiving the Starter feed formulation, where a similar ADFI was observed for the pellet and the mash diets ( $P=0.21$ ). For each feed formulation, FCR of pigs receiving pellet feed were significantly lower ( $P<0.001$ ) than FCR of pigs receiving mash feed. With respect to the feed particle size, significant differences were only observed when comparing the FCR and the ADFI of pigs receiving the 500  $\mu\text{m}$  feed size with those of pigs receiving the 750 or 1,250  $\mu\text{m}$  feed size. Cumulative results for particle size from all feed formulations demonstrated that the 500  $\mu\text{m}$  feed particle size was associated with a lower FCR than that observed for the 750 and 1,250  $\mu\text{m}$  feed particle sizes ( $P<0.001$ ). Also, the ADFI for the 500  $\mu\text{m}$  feed particle size was significantly lower than that observed for the 1,250  $\mu\text{m}$  feed particle size ( $P<0.01$ ). Moreover, cumulative results for the four different feed formulations showed significant interaction between feed texture and feed particle size with respect to the FCR (data not shown). Thus, the impact of feed texture on the FCR observed in pigs receiving the mash 500  $\mu\text{m}$  diets was significantly lower than those observed in pigs receiving the mash 750 and mash 1,250  $\mu\text{m}$  diets ( $P=0.04$ ).

### ***Gastric lesions***

Gastric lesions were evaluated at slaughterhouse in 733 pigs. The presence of stomach hyperkeratosis was noted in 110 pigs (graded as moderate ( $n=28$ ) or severe ( $n=82$ )), whereas 189 pigs had gastric ulcers graded as mild ( $n=126$ ), moderate ( $n=42$ ) or severe ( $n=21$ ). The particle size and texture were not associated with the presence of ulcers when compared to

hyperkeratosis as the baseline; thus, the two lesions were combined for the final model. The presence of gastric lesions (hyperkeratosis or ulcers) was significantly associated with feed particle size and texture; a significant interaction was also observed between the two variables (all  $P < 0.001$ ). Overall, the probability of observing gastric lesions was higher with low particle size and in pellet feed; moreover, the effect for the mash feed was larger in pigs receiving 750  $\mu\text{m}$  diets compared to other particle sizes. The predicted probabilities from the model are presented in Figure 2.

## DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that administration of mash rather than pellet feed is strongly associated with higher intestinal propionic and butyric acid levels, specifically in the colon and cecum contents. The effect of mash feed was specific to propionic and butyric acids, no significant effects being observed for acetic, isobutyric, valeric and isovaleric acids. It is possible that mash feeding may promote an increase in bacteria producing specific VFA, thus contributing to gastrointestinal health by preventing the proliferation and/or virulence of harmful bacteria such as *Salmonella* spp. and pathogenic *E. coli* (Lo Fo Wong et al., 2004; Mikkelsen et al., 2007). LeBel *et al.* observed a higher prevalence of *Salmonella* in colon in pigs fed with pellet feed, in contrast to those fed with mash feed ( $P=0.026$ ) (LeBel et al., 2013). An increase in the concentration of VFA in association with mash structure and higher particle size diets has also already been observed (Canibe et al., 2005). In fact, Canibe *et al.* showed that feeding a coarse, nonpelleted diet to finishing pigs stimulated the growth of total anaerobes and lactic acid bacteria at the same time as enhancing lactic, acetic, propionic and butyric acid concentrations in the stomach. However, these authors observed no significant

effect of the coarse, nonpelleted diet on VFA concentrations in the cecum and the colon contents. The feeding of a higher particle size mash diet which results in a slower gastric passage rate leading to an increased proliferation of certain microorganisms of the microbiota associated with a decrease in pH may explain the changes in *E. coli* populations and observed effects on *Salmonella* excretion (LeBel et al., 2013)). LeBel *et al.* demonstrated that pigs fed with mash 1,250  $\mu\text{m}$  feed had significantly more *Bifidobacterium* spp. in their feces during the fattening period than pigs receiving pellet feed (LeBel et al., 2013). Interestingly, bacteria of *Bifidobacterium* spp. genus have often been associated with an increase in antibacterial compounds such as VFA (Mountzouris et al., 2006). Furthermore, results from our study showed that a 1,250  $\mu\text{m}$  diet, mash or pellet, is also associated with higher intestinal butyric acid production. The effect of a greater feed particle size on increasing butyric acid concentrations in the cecum and the colon contents found in our study is in accordance with in another study on the impact of feed on microbial ecology in pig (Mikkelsen et al., 2004). Similarly, grinding (coarse versus fine diets) also resulted in higher acetic ( $P < 0.001$ ), propionic ( $P < 0.05$ ) and butyric ( $P < 0.10$ ) acid concentration in the stomach. These results suggest that change in feed presentation could be associated with microbiota modification (different composition and/or metabolic activities) in the gastrointestinal tract of pigs. No significant effect of a 1,250  $\mu\text{m}$  diet was observed for the other VFA examined in our study. These marked effects of mash feed and greater feed particle size on butyric acid levels suggest promising strategies to reduce *Salmonella* spp. colonization as has also been reported in a study where coated butyric acid used as a feed supplement decreased the levels of *Salmonella* Typhimurium excretion and intestinal colonization of piglets (Boyen et al., 2008). *Salmonella* Typhimurium virulence gene expression, as demonstrated by colonisation and invasion, can

also be decreased and inhibited *in vitro* in response to higher butyrate concentrations. A study showed that pigs fed a non-pelleted diet are less susceptible to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 colonization than pigs fed a pelleted diet (Hedemann et al., 2005). Gantois *et al.* showed that these effects of butyric acid on *Salmonella* spp. are caused by the specific down-regulation of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1) gene expression (Gantois et al., 2006). Reduction of the pH obviously inhibited the dissociation of the VFA, resulting in an increase in the quantity of non-dissociated VFA molecules, which seemed to be responsible for bactericidal activity. In the pig colon contents, the pH may vary between 5.6 and 7.2, depending on the metabolic status, and may also be influenced by feeding. Antibacterial activity is observed only between pH 5.6 and 6.6; above pH 6.6 the proportion of non-dissociated VFA molecules is so low that the antibacterial effect ceases. This can be an explanation for our results in the ileum samples showing no effect of the feed diets on the concentrations of VFA and indicating that the pH in this section of gastrointestinal tract was around 7, suggesting an impact on VFA molecules. For the colon and cecum contents, no statistically significant effects of the feed texture or the feed particle size on the pH were observed in our study. However, the pH was always between 5.6 and 6.6. Prohaszka *et al.* demonstrated that, when compared at identical pH values, VFA from the rabbit, pig and human intestinal tract exerted an antibacterial effect of similar intensity on all members of the *Enterobacteriaceae* family (Prohaszka, 1980; Prohászka, 1986). The antibacterial defence mechanism functioning in the colon is sensitive to all nutritional factors, which alter the pH of the colon. This underlines the importance of VFA-producing anaerobic bacterial flora, mainly consisting of species of the genus *Bacteroides*, that is considered to play an important role in the maintenance of gastrointestinal health through the production of butyric acid and the

consumption of lactic acid (Guilloteau et al., 2010). It is tempting to speculate that modification of gut flora by modifying feed texture to produce more butyric acid could reduce invasive infections by enteric bacteria such as *E. coli* in growing pigs. Additionally, this study reports an effect of non-pelleted feed on propionic acid levels in different phases of growing pigs. Interestingly, it has recently been shown that propionic acid directly affect *Salmonella* transcriptional regulators, reducing bacterial penetration of cultured epithelial cells (Hung et al., 2013). Consequently, enteric bacteria like *Salmonella* spp. and certain *Escherichia coli* virotypes may be killed or reduced in number in the gastrointestinal tract by this diet change. However, it is important to evaluate the impact of this alternative strategy on potentially pathogenic subpopulations of *E. coli* to avoid selection pressure on bacteria potentially linked to animal health problems or human disease.

This study is the first to report the effect of feed texture combined with the effect of feed particle size on *E. coli* prevalence in pigs. Total *E. coli* were quantified using qPCR because of the ease and rapidity of qPCR compared with traditional culture and taking into account that qPCR does not rely on the ability of bacteria to grow. Moreover, qPCR offers the option of storing samples until their analysis, which is an important advantage in field conditions. The results showed that total *E. coli* load is markedly lowered in both the caecal and colon contents of mash fed animals. However, quantification of virulence genes revealed that there is no evidence that mash feed affected the proliferation of pathogenic *E. coli* populations, consistent effects of feed texture and feed particles size not being observed for *faeG*, *estB* and *cnf1* gene copies in caecal and colon contents. This raises the question of the biological significance of a greater representation of the subset of *E. coli* carrying virulence genes in the intestinal contents of mash fed pigs. Interestingly, another study has

reported an influence of nonstarch polysaccharides in the diet on swine-pathogenic *E. coli* by quantifying similar virulence factors (Metzler-Zebeli et al., 2010). This shows that diet may have an impact on *E. coli* virulence gene levels. More importantly, virulence genes such as *faeG* and *estB* are found on plasmids, which can be horizontally transferred (Fernández-Alarcón et al., 2011). Thus, impact of feed modifications may be different for the quantification of virulence genes carried on plasmids than for the quantification of bacterial population count. This suggests that by reducing the total load of *E. coli*, the risk of spreading virulence genes in the *E. coli* population and the potential risk of dissemination of pathogenic and/or zoonotic bacteria is decreased. Nevertheless, the present study showed a feed texture effect on the F4 fimbriae gene cecal prevalence as demonstrated by enrichment PCR. The fimbriae F4 was only detectable in the cecum contents of pigs fed a pelleted diet and not in those of pigs fed a mash diet. This fimbriae is an important virulence factor as it allows the bacteria to bind to specific receptors on intestinal epithelial cells, resulting in colonization and subsequently the secretion of enterotoxins such as STa, STb and LT leading to diarrhea in piglets (Melkebeek et al., 2012). As previously mentioned, ETEC strains causing diarrhea are more often detected in neonatal and newly weaned pigs (Amezcuca et al., 2002; Martins et al., 2010). However, reducing the prevalence and the persistence of ETEC in growing pigs herd may contribute to protecting pigs from contamination between production cycles and reducing the risk of cross-contamination of piglets in the production network. Nevertheless, it would be interesting to compare the effect of the feed texture on ETEC experimentally infected animals and better understand the mechanism involved to increase animal health and to target strategic production periods in pigs to use this diet without performance loss.

Consequently, in addition to the pig's gastrointestinal tract health status, this study considered pig performance and economic consequences linked with feed texture and particle size. Our study showed that mash feed generated reduced pig performance to a greater extent than pellet feed and therefore had an impact on the profitability of the farms. However, there have been few reports on the study of pigs in intensive conditions and on the impact of particle size on pig performance as in our study. FCR associated with mash feed diets were higher than those associated with pellet feed diets. This supports data from previous studies (Wondra et al., 1995a; Wondra et al., 1995b; Mikkelsen et al., 2004) although feed texture did not appear to affect daily feed intake in pigs receiving the Starter feed formulation. Nevertheless, mash feeding could be used at strategic time points at the beginning of the growing phase to reduce excretion of potential pathogens in pigs, and consequently reduce environmental contamination and exposure of pigs and humans, without generating significant effects on the FCR. Further, mash 500  $\mu\text{m}$  diets showed lower feed conversion ratios than the two other mash diets. Consequently, the mash 500  $\mu\text{m}$  diet would represent the more economically reliable mash diet with considerable gastrointestinal tract health benefits. Interestingly, for the larger particle size mash diet, no reduction of voluntary intake of the pigs compromised the energy intake during the growing stage, as was observed by Anguita *et al.* (Anguita et al., 2007). Gregory *et al.* have demonstrated that the retention time of food in the digestive tract of the pig simultaneously increases with the size of the feed particle (Gregory et al., 1990). Pigs would feel satiated and satisfied for a longer period, resulting in a drop in voluntary intake of the food. However, these analyzes are not consistent with the results of our study. Indeed, for the Grower diet formulation, pigs fed with a 1,250  $\mu\text{m}$  particle size diet have average daily consumption indices significantly higher than those of pigs fed with the 500  $\mu\text{m}$  diet. Pigs fed

with 1,250 µm diet therefore ingested greater quantities, which contributes to the reduced growth performance (ADG and FCR).

In conclusion, this study is the first to demonstrate that mash feed diets are associated with higher propionic and butyric acid levels and a decrease of total *E. coli* load in both the cecum and the colon contents of growing pigs raised in field intensive conditions. This approach could participate in reducing *E. coli* intestinal load and consequently have a beneficial impact on animal health and/or human disease. Contribution to an increase of the microbiological quality and shelf life of the meat product is still to be investigated. Optimistically, economic disadvantages of mash feeding can be countered by optimizing strategies, such as the use of mash feed for curative purposes or in the maternity to reduce piglet exposure to potential pathogens and during stressful periods associated with greater vulnerability of animals. Hence, such strategies provide interesting alternatives to increase global health of pigs and consequently help to improve use of antimicrobial agents at the farm level.

## LITERATURE CITED

- Amezcuca, R., R. M. Friendship, C. E. Dewey, C. Gyles, and J. M. Fairbrother. 2002. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can. J. Vet. Res.* 66: 73.
- Anguita, M., J. Gasa, M. Nofrarias, S. Martín-Orúe, and J. Pérez. 2007. Effect of coarse ground corn, sugar beet pulp and wheat bran on the voluntary intake and physicochemical characteristics of digesta of growing pigs. *Livestock Science* 107 doi: 10.1016/j.livsci.2006.09.016.
- Antaoa, E.-M. et al. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297 doi: doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.003.
- Beaudry, M., C. Zhu, J. Fairbrother, and J. Harel. 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J. Clin. Microbiol.* 34: 144-148.
- Boyen, F. et al. 2008. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Veterinary microbiology* 132 doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.008.
- Canibe, N., O. Højberg, S. Højsgaard, and B. B. Jensen. 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83.

- Dozois, C. M. et al. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68: 4145-4154.
- Fernández-Alarcón, C., R. S. Singer, and T. J. Johnson. 2011. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One* 6 doi: 10.1371/journal.pone.0023415.
- Furrer, B., U. Candrian, and J. Lüthy. 1990. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 31-34.
- Gantois, I. et al. 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 doi: 10.1128/AEM.72.1.946-949.2006.
- Gregory, P., McFadyen, M., Rayner, D., 1990. Pattern of gastric emptying in the pig: relation to feeding. *Br. J. Nutr.* 64, 45-58.
- Guilloteau, P. et al. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr. Res. Rev.* 23 doi: 10.1017/S0954422410000247.
- Hedemann, M. S., L. Mikkelsen, P. Naughton, and B. B. Jensen. 2005. Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *J. Anim. Sci.* 83: 1554-1562.
- Herrero, M., V. De Lorenzo, and J. Neilands. 1988. Nucleotide sequence of the iucD gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with phoA and lacZ gene fusions. *J. Bacteriol.* 170: 56-64.

- Hung, C. C. et al. 2013. The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. Mol. Microbiol. doi: 10.1111/mmi.12149.
- Juteau, P., D. Tremblay, R. Villemur, J.-G. Bisailon, and R. Beaudet. 2004. Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 115-122.
- Knudsen, K. E. B., A. Serena, N. Canibe, and K. S. Juntunen. 2003. New insight into butyrate metabolism. Proc. Nutr. Soc. 62: 81-86.
- LeBel, P. et al. 2013. Digestive microbiota changes during application of an effective, feed presentation based, mitigation option against *Salmonella* shedding in pigs. Safepork 2013. Portland, Maine, USA. 9 to 12 September 2013 Pages 147-150
- Lo Fo Wong, D. et al. 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. Preventive Veterinary Medicine 62: 253-266.
- Lortie, L.-A., J. D. Dubreuil, and J. Harel. 1991. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 29: 656-659.
- Maluta, R. P. et al. 2013. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. Veterinary microbiology doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.013.
- Martins, R. P., M. C. da Silva, V. Dutra, L. Nakazato, and D. da Silva Leite. 2010. Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. The Journal of Infection in Developing Countries 5.

- Melkebeek, V., B. M. Goddeeris, and E. Cox. 2012. ETEC vaccination in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.024.
- Metzler-Zebeli, B. U. et al. 2010. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 doi: 10.1128/AEM.00257-10.
- Mikkelsen, L. L., O. Højberg, and B. B. Jensen. 2007. Coarse structured feed stimulates members of the genera *Lactobacillus* and *Mitsuokella* as well as propionate and butyrate producers in the pig stomach. *Livestock Science* 109 doi: 10.1016/j.livsci.2007.01.130.
- Mikkelsen, L. L., P. J. Naughton, M. S. Hedemann, and B. B. Jensen. 2004. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3485-3492.
- Mountzouris, K. C. et al. 2006. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. *Anaerobe* 12: 178-185.
- Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 242-252.
- O'Connor, A., T. Denagamage, J. Sargeant, A. Rajić, and J. McKean. 2008. Feeding management practices and feed characteristics associated with *Salmonella* prevalence in live and slaughtered market-weight finisher swine: A systematic review and

- summation of evidence from 1950 to 2005. Preventive veterinary medicine 87: 213-228.
- Ojeniyi, B., P. Ahrens, and A. Meyling. 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. Journal of Veterinary Medicine, Series B 41: 49-59.
- Prohaszka, L. 1980. Antibacterial Effect of Volatile Fatty Acids in Enteric *E. coli* infections of Rabbits. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 27: 631-639.
- Prohászka, L. 1986. Antibacterial Mechanism of Volatile Fatty Acids in the Intestinal Tract of Pigs against *Escherichia coli*. Journal of Veterinary Medicine, Series B 33: 166-173.
- Standard, A. 2003. Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving. ASABE, St. Joseph, MI.
- Stecher, B., and W.-D. Hardt. 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. Curr. Opin. Microbiol. 14 doi: 10.1016/j.mib.2010.10.003.
- Wondra, K., J. Hancock, K. Behnke, R. Hines, and C. Stark. 1995a. Effects of particle size and pelleting on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. J. Anim. Sci. 73: 757-763.
- Wondra, K., J. Hancock, K. Behnke, and C. Stark. 1995b. Effects of mill type and particle size uniformity on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. J. Anim. Sci. 73: 2564-2573.
- Woodward, M., P. Carroll, and C. Wray. 1992. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. Veterinary microbiology 31: 251-261.

**TABLE 1. Oligonucleotide primers used for multiplex PCR**

Virulence factor	Gene	Accession no.	Ori-entation	Primer sequence (5'-3')	Size of PCR product, bp	Annealing temp, °C	Reference
LT	<i>eltB</i>	J01646	F R	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC	275	60	Furrer et al., 1990
STa	<i>estA</i>	M58746	F R	TCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG GCACAGGCAGGATTACAACAAAGT	163	60	Ojeniyi et al., 1994
STb	<i>estB</i>	M35586	F R	GCAATAAGGTTGAGGTGAT GCCTGCAGTGAGAAATGGAC	368	60	Lortie et al., 1991
F4	<i>faeG</i>	M29374	F R	ATCGGTGGTAGTATCACTGC AACCTGCGACGTCAACAAGA	601	60	Ojeniyi et al., 1994
Stx1	<i>stxA</i>	M19437	F R	TTAGACTTCTCGACTGCAAAG TGTTGTACGAAATCCCCTCTG	531	60	Woodward et al., 1992
Stx2	<i>Stx2A</i>	X07865	F R	TTATATCTGCGCCGGGTCTG AGACGAAGATGGTCAAAAACG	327	60	Woodward et al., 1992
EAE	<i>eae</i>	U66102	F R	CATTATGGAACGGCAGAGGT ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA	791	60	Beaudry et al., 1996
CNF1/2	<i>cnf</i>	U42629	F R	TCGTTATAAAATCAAACAGTG CTTACAATATTGACATGCTG	446	55	Antaoa et al., 2007
P	<i>papC</i>	M30806	F R	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAAC	501	55	Antaoa et al., 2007
Aerobactin	<i>iucD</i>	M18968	F R	AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	778	60	Herrero et al., 1988
Tsh	<i>tsh</i>	L27423	F R	GGTGGTGCAGTGGAGTGG AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	55	Dozois et al., 2000
F18	<i>F18</i>	M61713	F R	GTGAAAAGACTAGTGTATTTC CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	510	60	Ngeleka et al., 2003

**TABLE 2.** Oligonucleotide primers used for quantitative PCR

Targeted bacterial species or virulence factor	Gene	Accession no.	Orientation	Primer sequence (5'-3')	Size of PCR product, bp	Annealing temp, °C	Reference
<i>E. coli</i>	<i>yccT</i>	EG13722 <sup>1</sup>	F R	GCATCGTGACCACCTTGA CAGCGTGGTGGCAAAA	59	56	Clifford et al., 2012
CNF1	<i>cnfI</i>	U42629	F R	TTAAGGGTTCTGGAAGCTTTGG CATCTGCACTGTAAACATTTGAGG	194	61	Our study
STb	<i>estB</i>	M35586	F R	CTTCTTGATCTATGTTTCGT ACTTTCCTTGGCTATTTGTC	107	54	Our study
F4	<i>faeG</i>	M29374	F R	AATGCATCTTATGCCGGTG TCTTTGAATCTGTCCGAGAATATC	163	61	Stahl et al., 2011

<sup>1</sup>EcoGene Accession Number

**TABLE 3.** Least square mean VFA concentration (mmol/L)  $\pm$  SEM according to feed texture and particle size. Propionic and butyric acid concentrations were higher in cecal and colon contents of mash fed animals

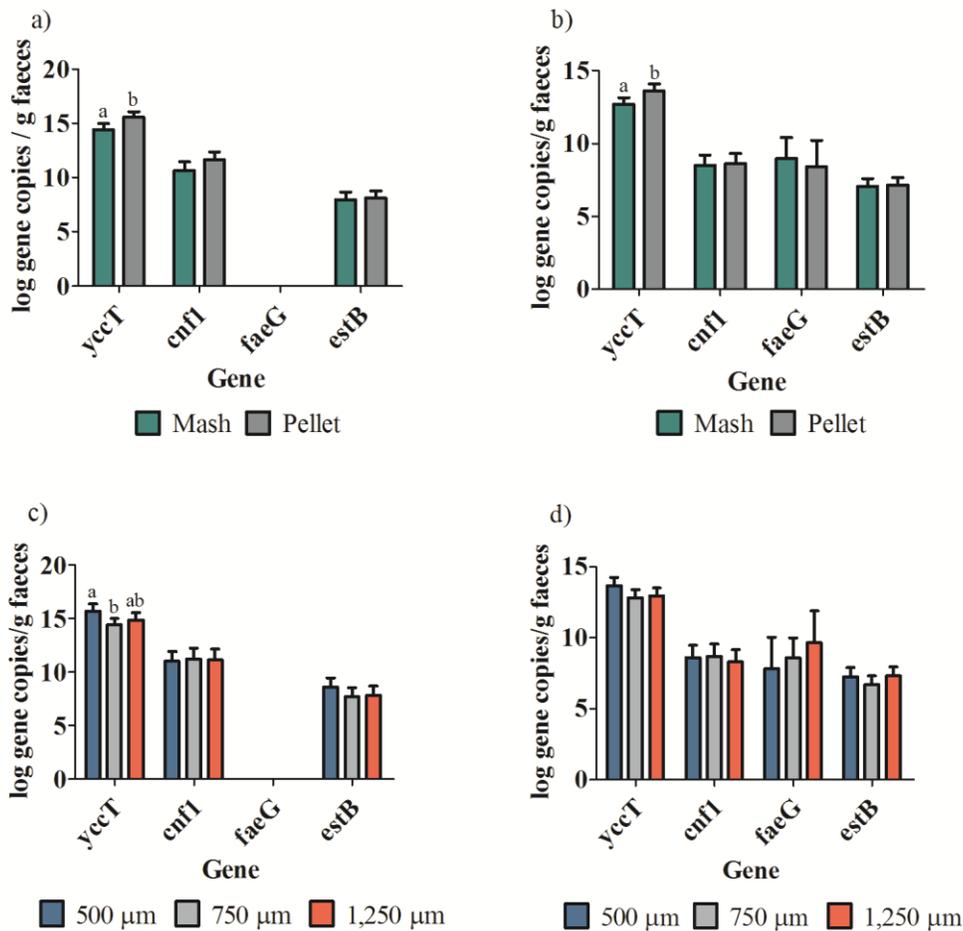
VFA and pH	n	Feed texture			Feed particle size			
		Mash (n=81)	Pellets (n=83)	<i>P</i> value	500 $\mu$ m (n=51)	750 $\mu$ m (n=55)	1250 $\mu$ m (n=58)	<i>P</i> value
<b>Ileum</b>								
Acetic	163	20.53 $\pm$ 1.16	22.80 $\pm$ 1.28	0.16	21.05 $\pm$ 1.44	23.08 $\pm$ 1.43	20.87 $\pm$ 1.33	0.47
Propionic	163	2.90 $\pm$ 0.24	2.90 $\pm$ 0.24	0.99	2.93 $\pm$ 0.31	3.01 $\pm$ 0.30	2.77 $\pm$ 0.28	0.84
Butyric	163	3.11 $\pm$ 0.24	3.33 $\pm$ 0.24	0.51	3.23 $\pm$ 0.30	3.18 $\pm$ 0.30	3.25 $\pm$ 0.28	0.99
Isobutyric	163	0.36 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.03	0.76	0.37 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.03	0.61
Valeric	163	0.18 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02	0.44	0.18 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03	0.65
Isovaleric	163	0.73 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.06	0.94	0.80 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.07	0.20
pH	147	6.98 $\pm$ 0.04	6.99 $\pm$ 0.04	0.84	7.03 $\pm$ 0.05	7.04 $\pm$ 0.05	6.89 $\pm$ 0.05	0.07
<b>Cecum</b>								
Acetic	162	86.02 $\pm$ 2.01	82.74 $\pm$ 1.99	0.25	84.90 $\pm$ 2.54	86.38 $\pm$ 2.45	81.87 $\pm$ 2.35	0.40
Propionic	162	36.74 $\pm$ 0.99	33.42 $\pm$ 0.98	0.02	34.64 $\pm$ 1.25	33.53 $\pm$ 1.20	37.07 $\pm$ 1.16	0.10
Butyric	162	16.29 $\pm$ 0.54	14.28 $\pm$ 0.53	0.01	14.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.68	14.91 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.65	16.70 <sup>b</sup> $\pm$ 0.63	0.03
Isobutyric	162	2.21 $\pm$ 0.09	2.25 $\pm$ 0.09	0.76	2.36 $\pm$ 0.11	2.27 $\pm$ 0.11	2.07 $\pm$ 0.11	0.17
Valeric	162	2.57 $\pm$ 0.08	2.50 $\pm$ 0.08	0.57	2.69 $\pm$ 0.10	2.51 $\pm$ 0.10	2.40 $\pm$ 0.09	0.13
Isovaleric	162	2.75 $\pm$ 0.12	2.82 $\pm$ 0.12	0.72	2.95 $\pm$ 0.16	2.86 $\pm$ 0.15	2.54 $\pm$ 0.15	0.13
pH	145	6.40 $\pm$ 0.06	6.51 $\pm$ 0.06	0.21	6.55 $\pm$ 0.07	6.46 $\pm$ 0.07	6.35 $\pm$ 0.07	0.16
<b>Colon</b>								
Acetic	162	83.59 $\pm$ 2.04	83.38 $\pm$ 2.04	0.94	84.89 $\pm$ 2.47	85.87 $\pm$ 2.47	79.69 $\pm$ 2.41	0.17
Propionic	162	37.05 $\pm$ 1.04	32.29 $\pm$ 1.04	<0.01	33.69 $\pm$ 1.33	33.74 $\pm$ 1.26	36.58 $\pm$ 1.22	0.18
Butyric	162	20.73 $\pm$ 0.64	17.44 $\pm$ 0.64	<0.001	17.62 <sup>a</sup> $\pm$ 0.83	18.08 <sup>a</sup> $\pm$ 0.78	21.57 <sup>b</sup> $\pm$ 0.75	<0.001
Isobutyric	162	3.03 $\pm$ 0.10	2.93 $\pm$ 0.10	0.48	3.04 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12	3.15 <sup>a</sup> $\pm$ 0.12	2.74 <sup>b</sup> $\pm$ 0.12	0.04
Valeric	162	3.02 $\pm$ 0.10	2.56 $\pm$ 0.10	<0.001	2.65 $\pm$ 0.13	2.75 $\pm$ 0.12	2.98 $\pm$ 0.11	0.13
Isovaleric	162	4.18 $\pm$ 0.13	3.95 $\pm$ 0.13	0.21	4.07 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.16	4.33 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16	3.78 <sup>b</sup> $\pm$ 0.15	0.04
pH	146	6.17 $\pm$ 0.04	6.24 $\pm$ 0.03	0.16	6.23 $\pm$ 0.04	6.20 $\pm$ 0.04	6.18 $\pm$ 0.04	0.67

Multiple linear regression SAS 9.3 – Different superscript letters between subcategories of the feed particles size or feed texture indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) while superscripts of the same letter indicate no significant differences ( $p \geq 0.05$ ).

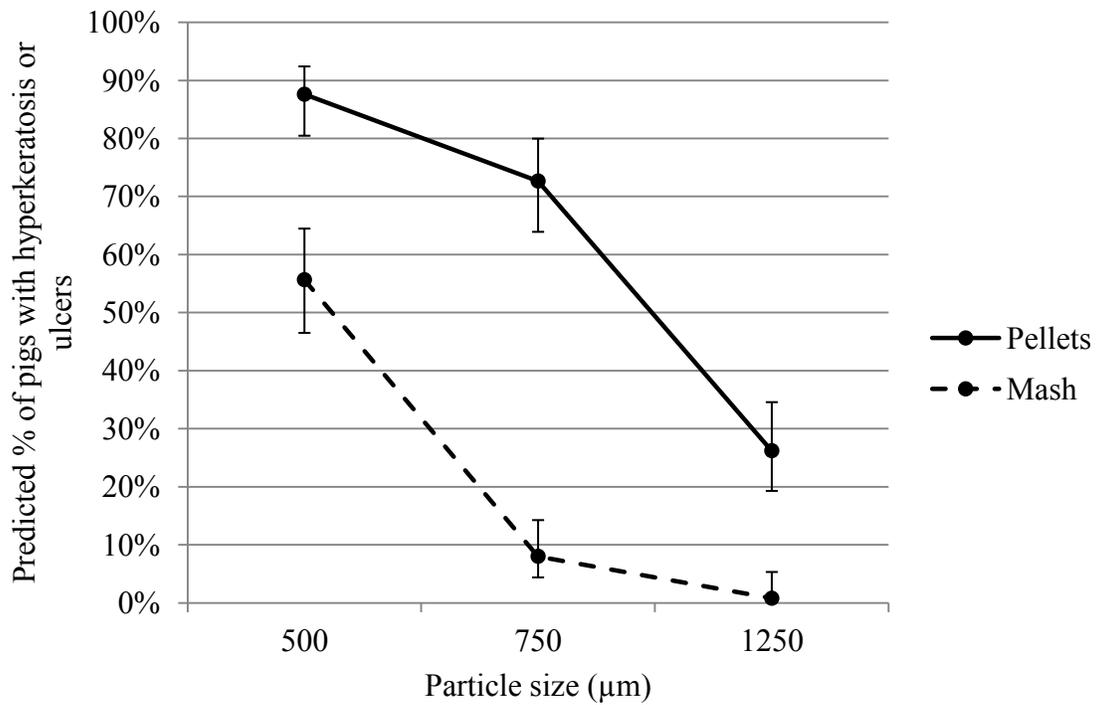
**TABLE 4.** Least square mean  $\pm$  SEM of ADG, ADFI and FCR according to feed texture and particle size (n=84 pens)

Feed formulation	Feed texture			Feed particle size			
	Mash (n=42)	Pellets (n=42)	<i>P</i> value	500 $\mu$ m (n=28)	750 $\mu$ m (n=28)	1250 $\mu$ m (n=28)	<i>P</i> value
Pre-starter							
ADG (kg)	0.684 $\pm$ 0.007	0.711 $\pm$ 0.007	0.01	0.707 $\pm$ 0.009	0.693 $\pm$ 0.009	0.694 $\pm$ 0.009	0.49
ADFI (kg)	1.344 $\pm$ 0.011	1.311 $\pm$ 0.011	0.04	1.340 $\pm$ 0.0134	1.323 $\pm$ 0.013	1.319 $\pm$ 0.013	0.51
FCR	1.968 $\pm$ 0.014	1.846 $\pm$ 0.014	<0.001	1.901 $\pm$ 0.018	1.911 $\pm$ 0.018	1.908 $\pm$ 0.018	0.91
Starter							
ADG (kg)	0.880 $\pm$ 0.007	0.925 $\pm$ 0.007	<0.001	0.912 $\pm$ 0.008	0.896 $\pm$ 0.008	0.899 $\pm$ 0.008	0.38
ADFI (kg)	2.061 $\pm$ 0.012	2.040 $\pm$ 0.012	0.21	2.036 $\pm$ 0.015	2.041 $\pm$ 0.015	2.045 $\pm$ 0.015	0.13
FCR	2.347 $\pm$ 0.014	2.207 $\pm$ 0.014	<0.001	2.238 <sup>a</sup> $\pm$ 0.017	2.282 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.017	2.311 <sup>b</sup> $\pm$ 0.017	0.01
Grower							
ADG (kg)	1.021 $\pm$ 0.006	1.048 $\pm$ 0.006	<0.01	1.044 $\pm$ 0.008	1.030 $\pm$ 0.008	1.031 $\pm$ 0.008	0.35
ADFI (kg)	2.875 $\pm$ 0.023	2.776 $\pm$ 0.023	<0.01	2.769 <sup>a</sup> $\pm$ 0.028	2.839 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.028	2.867 <sup>b</sup> $\pm$ 0.028	0.05
FCR	2.817 $\pm$ 0.020	2.650 $\pm$ 0.020	<0.001	2.654 <sup>a</sup> $\pm$ 0.025	2.761 <sup>b</sup> $\pm$ 0.025	2.786 <sup>b</sup> $\pm$ 0.025	<0.001
Finisher							
ADG (kg)	0.932 $\pm$ 0.011	0.968 $\pm$ 0.011	0.03	0.933 $\pm$ 0.014	0.951 $\pm$ 0.014	0.966 $\pm$ 0.014	0.27
ADFI (kg)	3.104 $\pm$ 0.037	2.892 $\pm$ 0.037	<0.001	2.890 <sup>a</sup> $\pm$ 0.046	3.007 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.046	3.098 <sup>b</sup> $\pm$ 0.046	<0.01
FCR	3.337 $\pm$ 0.034	2.993 $\pm$ 0.034	<0.001	3.101 <sup>a</sup> $\pm$ 0.042	3.176 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.042	3.218 <sup>b</sup> $\pm$ 0.042	<0.01
Cumulative							
ADG (kg)	0.903 $\pm$ 0.004	0.936 $\pm$ 0.004	<0.001	0.923 $\pm$ 0.005	0.915 $\pm$ 0.005	0.919 $\pm$ 0.005	0.57
ADFI (kg)	2.431 $\pm$ 0.016	2.328 $\pm$ 0.016	<0.001	2.334 <sup>a</sup> $\pm$ 0.019	2.385 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.019	2.420 <sup>b</sup> $\pm$ 0.019	<0.01
FCR	2.648 $\pm$ 0.014	2.448 $\pm$ 0.014	<0.001	2.493 <sup>a</sup> $\pm$ 0.017	2.564 <sup>b</sup> $\pm$ 0.017	2.587 <sup>b</sup> $\pm$ 0.017	<0.001

Multiple linear regression SAS 9.3 – Different superscript letters between subcategories of the feed particles size or feed texture indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) while superscripts of the same letter indicate no significant differences ( $p \geq 0.05$ ).



**Figure 1.** Quantification of specific *E. coli* genes in cecal and colon contents of animals according to feed texture and particle size diets. a) Effect of feed texture on cecal *E. coli* populations. b) Effect of feed texture on colon *E. coli* populations. c) Effect of feed particles size on cecal *E. coli* populations. d) Effect of feed particles size on colon *E. coli* populations. Multiple linear regression SAS 9.3 - Different superscript letters between subcategories of the feed particles size or feed texture indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) while superscripts of the same letter indicate no significant differences ( $p \geq 0.05$ ).



**Figure 2.** Predicted probabilities of detecting hyperkeratosis or ulcer lesions in pigs at the slaughterhouse, according to feed texture and feed particle size. Multiple logistic regression SAS® 9.3 - all predicted probabilities were statistically different ( $P < 0.01$ ) from each other.

## APPENDIX 1: DIET FORMULATION

### Appendix 1. Diet formulation

	Pre-starter	Starter	Grower	Finisher
<b>Ingredient, %</b>				
Corn	47,18	47,96	53,53 or 54,06	52,70
Soybean meal 47%	21,00	16,60	11,40	13,00
Corn DDGS	15,00	20,00	20,00	20,00
Wheat	10,00	10,00	10,00	10,00
Animal fat	2,40	2,20	1,60	1,60
Limestone	1,50	1,60	1,60	1,30
Lysine sulfate 65	0,90	0,60	0,60	0,60
Phosphate Dical-21%	0,50	0,25	-	-
Salt	0,45	0,45	0,45	0,45
Vit/Min Premix	0,15	0,15	0,15	0,13
Threonine	0,13	-	-	0,06
MHA 88%	0,10	-	-	0,00
Phytase 1000 FTU	0,05	0,05	0,05	0,05
Copper chloride 58%	0,02	0,02	0,02	-
<b>Drug or additive, ppm</b>				
Chlortetracycline	1210	-	1210 or 0	-
Salonimycin	-	60	0 or 25	-
Ractopamine	-	-	-	10

## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce projet était de comparer les effets de la texture et de la granulométrie de la moulée sur la prévalence des *Escherichia coli* pathogènes et totaux, les concentrations gastro-intestinale des acides gras volatils et les performances de croissance de porcs d'engraissement.

Afin d'atteindre ces objectifs, un cheptel de 840 porcs d'engraissement a été sélectionné. Il est à noter ici que les porcs étudiés ont été suivis dans des conditions d'élevage intensif/commercial et que leur nombre confère une excellente portée statistique, ce qui distingue notre étude. Les *E. coli* ont été étudiés extensivement durant l'engraissement, notamment lors des changements de formulation des aliments. Aucune donnée n'a été amassée à la maternité ni à la pouponnière étant donné que nous voulions étudier l'impact d'une stratégie de contrôle sur les populations d'*E. coli* pendant la période d'engraissement. La phase d'élevage à l'engraissement a donc été ciblée. À l'abattoir, les contenus gastro-intestinaux de 164 porcs ont été sélectionnés puis échantillonnés parmi les 840 porcs provenant de la ferme d'engraissement.

Plusieurs études ont déjà démontré que la moulée texturée générait des performances de croissance moindre que la moulée cubée et avait donc un impact sur la rentabilité des élevages (Chung, 1997; Faucitano et al., 2006). Cependant, peu d'études ont employé des porcs en conditions commerciales et comparer le simple impact de la granulométrie sur les performances zootechniques. Dans le cadre de ce projet, les résultats confirment que l'utilisation de la moulée texturée représente une alternative moins rentable pour les éleveurs, générant des résultats de performances zootechniques statistiquement inférieures aux résultats

liés à la moulée cubée, et ce pour les quatre formulations de moulée qui ont été distribuées au cours de la période d'engraissement. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Par exemple, Gregory *et al.* ont démontré que le temps de rétention de la nourriture dans le tube digestif du porc augmente simultanément avec la taille de la moulée (Gregory et al., 1990). Anguita *et al.* quant à eux ont montré que la quantité d'aliment spontanément ingérée ainsi que l'apport énergétique des porcs diminuaient lorsque ces derniers étaient nourris avec de la moulée texturée de forte granulométrie (Anguita et al., 2007). Les porcs se sentiraient donc rassasiés et satisfaits sur une plus longue période, ce qui entraîne une chute de l'ingestion volontaire de l'aliment. Toutefois, ces analyses ne concordent pas avec les résultats de notre étude. En effet, à partir de la formulation «Croissance», les porcs alimentés avec la moulée d'une granulométrie de 1250  $\mu\text{m}$  présentent des indices de consommation moyenne quotidienne significativement plus élevés que ceux des porcs nourris avec la moulée de particules 500  $\mu\text{m}$ . Les porcs alimentés avec la moulée ayant des particules de 1250  $\mu\text{m}$  ont donc ingéré plus de moulée contribuant à des performances de croissance (gain moyen quotidien et ratio de conversion alimentaire) insatisfaisantes. Une étude réalisée en 1997 par Chung *et al.*, a montré, quant à elle, des gains moyens quotidiens et des ratios de conversion alimentaire plus avantageux pour la moulée cubée que la moulée texturée, mais des indices de consommation moyenne quotidienne similaires (Chung, 1997). L'aspect physique de la moulée n'est toutefois pas le seul facteur pouvant affecter l'ingestion volontaire. Les facteurs environnementaux tels la chaleur et le climat social ainsi que l'état de l'animal, à savoir son âge et son état de santé sont également à considérer (Nyachoti et al., 2004).

Du point de vue de la granulométrie de la moulée, seule la moulée ayant des particules de 500  $\mu\text{m}$  de diamètre engendre des résultats statistiquement plus concurrentiels à certains moments lors de la croissance. Parallèlement, les seules données pour lesquelles une interaction statistique a pu être mise en évidence concernent le lien entre la consommation moyenne quotidienne et la conversion alimentaire de la formulation «Fini-Paylean» de même que les données de conversion alimentaire cumulatives. Plus précisément, les écarts de performances zootechniques entre la granulométrie 500  $\mu\text{m}$  versus la granulométrie 1250 $\mu\text{m}$  étaient significativement plus grands pour la moulée texturée que pour la moulée cubée. Cela signifie que pour toutes les autres données amassées sur les performances zootechniques, l'effet de la granulométrie n'est pas significativement différent entre la moulée texturée et la moulée cubée. En d'autres termes, les écarts de performances entre la moulée de 500  $\mu\text{m}$  versus la moulée de 1250  $\mu\text{m}$  sont similaires peu importe la texture de la moulée.

D'autre part, cette étude confirme l'impact de la texture et de la granulométrie de la moulée sur le bien-être animal. En effet, les porcs nourris avec de la moulée texturée de 750  $\mu\text{m}$  ou plus présentaient une réduction au niveau du développement des ulcères d'estomacs. Chung *et al.* n'ont observé aucune différence du point de vue de l'incidence des ulcères d'estomacs entre les porcs alimentés avec la moulée texturée et les porcs alimentés avec la moulée cubée (Chung, 1997). Cependant, les granulométries des moulées utilisées dans l'étude de Chung *et al.* étaient de plus de 5 mm pour la moulée texturée et de 3 mm pour la moulée cubée. Au cours des dernières années, parallèlement à l'intensification de l'industrie porcine, une augmentation substantielle de l'incidence de développement des ulcères d'estomacs a été observée (Guise et al., 1997). Tel que mentionné par Maxwell *et al.*, les

principaux facteurs prédisposant aux ulcères d'estomacs chez le porc sont la moulée de fine granulométrie et le cubage de la moulée (Maxwell et al., 1970). Au Canada, une étude réalisée en 2002 démontre que 27% des mortalités dans les fermes d'engraissement de porcs sont dues aux hémorragies découlant des ulcères d'estomacs (Melnichouk, 2002). La deuxième cause de décès (environ 20%) est l'apparition de pneumonies. Selon cette étude, la période de jeûne pourrait aussi être un facteur prédisposant aux ulcères d'estomacs. Néanmoins, l'industrie porcine canadienne ne diminuera pas cette période de jeûne étant donné les complications que cela peut engendrer. Plus précisément, les porcs présentant un tractus gastro-intestinal gorgé risquent de contaminer la chaîne d'abattage lors de l'éviscération en plus de générer de la viande de moindre qualité (viande de type PSE; *Pale, Soft and Exudative*). Au contraire, une période de jeûne trop longue pourrait diminuer l'accumulation de glycogène dans les muscles et augmenter le stress chez l'animal ce qui engendrerait une augmentation du pH et conséquemment de la viande de type DFD (*Dark, Firm and Dry*) (Gispert et al., 2000). Cependant, la moulée de fine granulométrie et la moulée cubée sont associées aux meilleures performances de croissance, comme nous l'avons constaté lors de cette étude. Des chercheurs ont également démontré que la moulée de fine granulométrie améliorerait la performance de lactation des truies en augmentant la digestibilité. De son côté, la moulée cubée présente moins de résidus poussiéreux et d'ingrédients ségrégés et elle est plus facile à distribuer dans le réseau d'alimentation de la porcherie (Wondra et al., 1995a). Son coût de production est cependant plus élevé (Potter et al., 2009). Malgré cela, en considérant l'aspect économique du point de vue de la rentabilité, la moulée cubée permet d'engranger plus de profits avec des performances de croissances plus compétitives.

La réduction de la charge des *E. coli* totaux au niveau du caecum et du côlon pourrait être attribuée en partie à l'augmentation des concentrations des acides propionique et butyrique observés lors de cette étude. En effet, les activités bactériostatiques des AGV ont été démontrées chez certaines entérobactéries telles que *Salmonella spp.*, *E. coli* et *Shigella flexneri*, et ce à des concentrations variant entre 10-100 mmol/L (Defoirdt et al., 2009). Il est à noter que les divergences notées au sein de plusieurs études sur le sujet pourraient être attribuables à la formulation et les différentes granulométries de la moulée. Parallèlement, il est possible que la moulée texturée favorise la multiplication des principaux genres bactériens de la microflore intestinale producteurs d'AGV, tels les *Lactobacillus* et les *Bacteroides*. De plus, la diminution observée au niveau de la charge en *E. coli* totaux pourrait potentiellement mener à une réduction du risque de contamination de la carcasse à l'abattoir. Fait intéressant, les stratégies d'intervention à la ferme pour contrôler les risques de contamination par des agents pathogènes, comme c'est le cas dans ce projet, ont plus d'impacts positifs sur la salubrité des produits de viandes destinés à la consommation que les stratégies employées subséquentement dans la chaîne de production (abattoir), si l'on compare les deux types de stratégies utilisées séparément (Smith et al., 2013). Chez le bovin, par exemple, lorsque toutes les stratégies d'interventions de la chaîne de production sont combinées, il est à noter que l'implantation de mesures d'intervention efficaces en ferme améliorent grandement l'efficacité des stratégies d'intervention à l'abattoir (Smith et al., 2013). Au sein de la chaîne de production porcine, il a aussi été démontré que l'implantation de stratégies de contrôles de *Salmonella spp.* à la ferme puis à l'abattoir était une solution rentable (van der Gaag et al., 2004). Les étapes de la stabulation et du transport des porcs semblaient être les cibles stratégiques pour le contrôle de *Salmonella spp.* Bien entendu, la stratégie d'intervention la

plus efficace demeure l'implantation de plusieurs stratégies tout au long de la chaîne de production (Smith et al., 2013). De ce fait, la salubrité de la viande et la santé publique sont grandement améliorées via la réduction du risque d'exposition des consommateurs aux pathogènes alimentaires.

En ce qui a trait aux populations d'*E. coli* pathogènes, aucune différence significative n'a été observée au niveau de la quantification des différents facteurs de virulence, et ce tant dans le caecum que dans le côlon. Malgré une prévalence caecale assez élevée pour certains facteurs de virulence, ces résultats pourraient être attribuables au fait que les porcs étudiés étaient des porcs en santé pendant l'engraissement, ne présentant aucun symptôme et destinés à la consommation. Nos résultats dégagent toutefois une interrogation d'une plus grande prévalence des *E. coli* porteurs de gènes de virulence au sein de la population des *E. coli* totaux retrouvée chez ces porcs, et ce étant donné les moindres dénombrements des *E. coli* totaux chez les porcs alimentés de moulée texturée et la stabilité des dénombrements des gènes de virulence associés aux *E. coli* pathogènes. Fait intéressant, une étude rapportant les effets de polysaccharides non amylacés dans la diète des porcs a démontré un effet quantitatif sur des gènes de virulence d'*E. coli* similaires (Metzler-Zebeli et al., 2010). Une autre étude menée, quant à elle sur des isolats provenant de poulets ayant eu des différentes diètes avec antimicrobiens à montrer des effets sur la distribution de certains pathotypes d'*E. coli* et certains facteurs de virulence (Bonnet et al., 2009). Cela démontre que la diète peut avoir un impact significatif sur la prévalence des gènes de virulence d'*E. coli*. Il ne faut toutefois pas oublier que certains gènes de virulence, tels que *faeG* et *estB* se situent sur des plasmides, qui peuvent être transférés horizontalement. L'impact de différentes caractéristiques alimentaires

peut donc s'avérer variable pour les gènes de virulence se retrouvant sur des plasmides que pour le dénombrement de la population bactérienne totale, comme ce fût le cas ici avec les *E. coli* totaux. Les mesures de biosécurité appliquées dans l'élevage ayant servi à cette étude ont aussi pu prévenir l'apparition de maladies.

Il serait également intéressant d'observer dans quelques années si les formulations de moulée des porcs seront similaires à celles utilisées dans cette étude en raison de la hausse prévue des coûts des matières premières. Si les formulations sont très divergentes, il serait possible que les résultats d'une étude comme la nôtre soient bien différents. De plus, la population mondiale est en constante augmentation et elle est également de plus en plus intéressée par les méthodes d'élevage plus rentables des animaux de production. Cela nous mènera peut-être vers des changements imposants dans le mode d'élevage des porcs (Godfray et al., 2010). Cette étude a également permis de mieux comprendre certains mécanismes d'action de la moulée texturée, notamment sur les changements des concentrations intestinales des différents acides gras volatils. Ces modifications ont eu un impact important sur le taux d'*E. coli* totaux et cet avancement de la connaissance permettra, potentiellement, le développement d'un additif alimentaire pouvant avoir ces mêmes propriétés et avoir un impact avantageux sur les performances zootechniques.

## CONCLUSION

Pour conclure, il est important de souligner que la plupart des études antérieures se sont penchées sur des petits groupes de porcs, la présente analyse a fait intervenir ici un grand nombre de porcs issus d'un élevage de type intensif/commercial en plus de permettre la comparaison des moulées de même formulation. D'une manière générale, notre étude a permis d'améliorer les connaissances sur l'impact qu'ont les caractéristiques physiques de la moulée au sein des populations bactériennes en lien avec des activités métaboliques dans le tractus gastro-intestinal du porc d'engraissement. De façon plus spécifique, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

1. La moulée texturée est associée avec des concentrations d'acides propionique et butyrique plus élevées, et ce tant au niveau du caécum que du colon.
2. Les porcs nourris avec la moulée cubée présentent un taux d'*E. coli* totaux dans leur tractus gastro-intestinal plus élevé que l'aliment texturé.
3. Il n'y a pas de différences notables du point de vue de la quantification des populations d'*E. coli* pathogènes entre les porcs alimentés avec la moulée texturée et la moulée cubée.
4. La moulée texturée améliore le bien-être animal en réduisant la présence d'ulcères gastro-oesophagiens comparativement à la moulée cubée.
5. La moulée texturée est associée avec des performances de croissance moins rentables.

Néanmoins, des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer l'implication des matières premières constituant la moulée dans ce genre d'analyse. L'objectif pourrait être

d'optimiser la production intestinale des AGV par les porcs tout en améliorant leur conversion alimentaire. Aussi, l'impact de l'âge et de la génétique des porcs pourraient être étudiés.

Pour l'instant, nous pouvons cependant recommander l'usage de la moulée texturée dans des situations de courte durée : à titre curatif juste avant l'abattage, en maternité, ou lors de périodes de stress en élevage ou d'instabilité sanitaire du troupeau. Cette approche pourrait permettre de réduire la charge intestinale en *E. coli* et conséquemment avoir un impact bénéfique sur la santé animale et/ou la santé publique. Les vétérinaires et les producteurs disposent ainsi d'un outil supplémentaire de prévention qui représente une alternative intéressante à l'utilisation d'antimicrobiens.

## SOURCES DOCUMENTAIRES

- Adjiri-Awere, A., Van Lunen, T.A., 2005. Subtherapeutic use of antibiotics in pork production: Risks and alternatives. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 117-130.
- Agostini, P., Fahey, A., Manzanilla, E., O'Doherty, J., de Blas, C., Gasa, J., 2014. Management factors affecting mortality, feed intake and feed conversion ratio of grow-finish pig. *animal* 8, 1312-1318.
- Akiba, Y., Inoue, T., Kaji, I., Higashiyama, M., Narimatsu, K., Iwamoto, K.i., Watanabe, M., Guth, P.H., Engel, E., Kuwahara, A., 2015. Short-chain fatty acid sensing in rat duodenum. *The Journal of physiology* 593, 585-599.
- Al-Fataftah, A.-R., Abdelqader, A., 2014. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 198, 279-285.
- Amezcuca, R., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Gyles, C., Fairbrother, J.M., 2002. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can. J. Vet. Res.* 66, 73.
- Anguita, M., Gasa, J., Nofrarias, M., Martín-Orúe, S., Pérez, J. 2007. Effect of coarse ground corn, sugar beet pulp and wheat bran on the voluntary intake and physicochemical characteristics of digesta of growing pigs. In *Livestock Science*, 182-191.
- Anjum, M., Jones, E., Morrison, V., Tozzoli, R., Morabito, S., Toth, I., Nagy, B., Smith, G., Aspan, A., Nielsen, E., 2014. Use of virulence determinants and seropathotypes to

- distinguish high-and low-risk *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates from Europe. *Epidemiol. Infect.* 142, 1019-1028.
- Antaoa, E.-M., Laturnusa, C., Diehla, I., Gloddea, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H.-C., Wieler, L.H. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? In *Int. J. Med. Microbiol.*, 163-176.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174-180.
- Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J., Harel, J., 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J. Clin. Microbiol.* 34, 144-148.
- Beinke, C., Laarmann, S., Wachter, C., Karch, H., Greune, L., Schmidt, M.A., 1998. Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strains Induce Attaching and Effacing Phenotypes and Secrete Homologs of Esp Proteins. *Infect. Immun.* 66, 528-539.
- Berberov, E.M., Zhou, Y., Francis, D.H., Scott, M.A., Kachman, S.D., Moxley, R.A., 2004. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect. Immun.* 72, 3914-3924.
- Bergman, E., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev* 70, 567-590.
- Beutin, L., Zimmermann, S., Gleier, K., 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerging Infect. Dis.* 4, 635.

- Bianchi, A., Van Der Heijden, P., 1994. Antigen presenting cells and B-cells in the pig. *Veterinary immunology and immunopathology* 43, 63-68.
- Blank, R., Mosenthin, R., Sauer, W., Huang, S., 1999. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 77, 2974.
- Boerlin, P., Chen, S., Colbourne, J.K., Johnson, R., De Grandis, S., Gyles, C., 1998. Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in Shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect. Immun.* 66, 2553-2561.
- Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Lim, N.J.H., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R., Archambault, M., 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6753-6761.
- Bonnet, C., Diarrassouba, F., Brousseau, R., Masson, L., Topp, E., Diarra, M.S., 2009. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6955-6962.
- Borojani, F.G., Mader, A., Knorr, F., Ruhnke, I., Röhe, I., Hafeez, A., Männer, K., Zentek, J., 2014. The effects of different thermal treatments and organic acid levels on nutrient digestibility in broilers. *Poult. Sci.* 93, 1159-1171.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Vanparrys, A., Volf, J., Mahu, M., Van Immerseel, F., Rychlik, I., Dewulf, J., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2008a. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Veterinary microbiology* 132, 319-327.

- Boyen, F., Haesebrouck, F., Vanparrys, A., Volf, J., Mahu, M., Van Immerseel, F., Rychlik, I., Dewulf, J., Ducatelle, R., Pasmans, F. 2008b. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. In *Veterinary microbiology*, 319-327.
- Brandtzaeg, P., 1996. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 778, 1-27.
- Burridge, K., Wennerberg, K., 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Callan, J., Garry, B., O'Doherty, J., 2007. The effect of expander processing and screen size on nutrient digestibility, growth performance, selected faecal microbial populations and faecal volatile fatty acid concentrations in grower–finisher pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134, 223-234.
- Callaway, T., Edrington, T., Anderson, R., Byrd, J., Nisbet, D., 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J. Anim. Sci.* 86, E163-E172.
- Canibe, N., Højberg, O., Højsgaard, S., Jensen, B.B. 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. In *J. Anim. Sci.*, 1287-1302.
- Casadesús, J., Low, D., 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 830-856.
- Chapman, T.A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., Chin, J.J.-C., 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4782-4795.

- Cheroutre, H., Madakamutil, L., 2004. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 290-300.
- Chung, Y., 1997. Effects of feed processing and feeding methods on growth and carcass traits for growing-finishing pigs.
- Cleary, J., Lai, L.-C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., Knutton, S., 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150, 527-538.
- Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2004. In vitro studies on the colonization of bovine colonic mucosa by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC). *Epidemiol. Infect.* 132, 87-94.
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Zeltwanger, R.L., 2003. Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environ. Microbiol.* 5, 737-745.
- de Sousa, C.P., Dubreuil, J.D., 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 15-20.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P. 2009. Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates:(New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. In *Biotechnol. Adv.*, 680-685.
- Donnenberg, M.S., Whittam, T.S., 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 107, 539.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R., 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia*

- coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68, 4145-4154.
- Dubreuil, J.D., 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* 143, 1783-1795.
- Dubreuil, J.D., 2012. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Curr. Issues Mol. Biol* 14, 71-82.
- Economou, V., Gousia, P., 2015. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and drug resistance* 8, 49.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Girón, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., Kaper, J.B., 2000. The Locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 68, 6115-6126.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., Igarashi, K., 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 171, 45-50.
- Erume, J., Wijemanne, P., Berberov, E.M., Kachman, S.D., Oestmann, D.J., Francis, D.H., Moxley, R.A., 2013. Inverse relationship between heat stable enterotoxin-b induced fluid accumulation and adherence of F4ac-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in ligated jejunal loops of F4ab/ac fimbria receptor-positive swine. *Veterinary microbiology* 161, 315-324.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, É., Gyles, C.L. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. In *Anim. Health Res. Rev.*, 17-39.

- Falzano, L., Quaranta, M.G., Travaglione, S., Filippini, P., Fabbri, A., Viora, M., Donelli, G., Fiorentini, C., 2003. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 71, 4178-4181.
- Faucitano, L., Saucier, L., Correa, J., Méthot, S., Giguère, A., Foury, A., Mormède, P., Bergeron, R., 2006. Effect of feed texture, meal frequency and pre-slaughter fasting on carcass and meat quality, and urinary cortisol in pigs. *Meat Sci.* 74, 697-703.
- Fernández-Alarcón, C., Singer, R.S., Johnson, T.J. 2011. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. In *PLoS One*, e23415.
- Foster, J.W., Moreno, M., 1999. Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. *Bacterial responses to pH*, 55-69.
- Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L.H., Baljer, G., Beutin, L., Karch, H., 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2460-2463.
- Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., Yamamoto, T.T., 2001. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J. Biol. Chem.* 276, 11420-11426.
- Furrer, B., Candrian, U., Lüthy, J., 1990. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. *Lett. Appl. Microbiol.* 10, 31-34.

- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J., Van Immerseel, F. 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 946-949.
- Gill, H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17, 755-773.
- Giron, J.A., Ho, A., Schoolnik, G.K., 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254, 710-713.
- Gispert, M., Faucitano, L., Oliver, M., Guàrdia, M.D., Coll, C., Siggers, K., Harvey, K., Diestre, A., 2000. A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Sci.* 55, 97-106.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C., 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327, 812-818.
- Gonçalves, C., Dubreuil, J.D., 2009. Effect of *Escherichia coli* STb toxin on NIH-3T3 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55, 432-441.
- Goosney, D.L., Knoechel, D.G., Finlay, B.B., 1999. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infect. Dis.* 5, 216.
- Gorden, J., Small, P., 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* 61, 364-367.
- Gregory, P., McFadyen, M., Rayner, D., 1990. Pattern of gastric emptying in the pig: relation to feeding. *Br. J. Nutr.* 64, 45-58.

- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. In *Nutr. Res. Rev.*, 366.
- Guillou, D., Landeau, E., 2000. Granulométrie et nutrition porcine. *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE- 13*, 137-145.
- Guise, H., Carlyle, W., Penny, R., Abbott, T., Riches, H., Hunter, E., 1997. Gastric ulcers in finishing pigs: their prevalence and failure to influence growth rate. *The Veterinary Record* 141, 563-566.
- Guise, H., Penny, R., Baynes, P., Abbott, T., Hunter, E., Johnston, A., 1995. Abattoir observations of the weights of stomachs and their contents in pigs slaughtered at known times after their last feed. *Br. Vet. J.* 151, 659-670.
- Haan, L.d., Hirst, T.R., 2004. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol. Membr. Biol.* 21, 77-92.
- Hacker, J., 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can. J. Microbiol.* 38, 720-727.
- Hara, H., Orita, N., Hatano, S., Ichikawa, H., Hara, Y., Matsumoto, N., Kimura, Y., Terada, A., Mitsuoka, T., 1995. Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 45-49.
- Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L., Bigras-Poulin, M., Lariviere, S., Fairbrother, J., 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29, 745-752.

- Harmoinen, J., Vaali, K., Koski, P., Syrjänen, K., Laitinen, O., Lindevall, K., Westermarck, E., 2003. Enzymic degradation of a  $\beta$ -lactam antibiotic, ampicillin, in the gut: a novel treatment modality. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 361-365.
- Hedemann, M.S., Mikkelsen, L., Naughton, P., Jensen, B.B., 2005. Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *J. Anim. Sci.* 83, 1554-1562.
- Heo, J., Opapeju, F., Pluske, J., Kim, J., Hampson, D., Nyachoti, C., 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97, 207-237.
- Herold, S., Karch, H., Schmidt, H., 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages—genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 115-121.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., Neilands, J., 1988. Nucleotide sequence of the iucD gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with phoA and lacZ gene fusions. *J. Bacteriol.* 170, 56-64.
- Hofman, P., Le Negrate, G., Mograbi, B., Hofman, V., Brest, P., Alliana-Schmid, A., Flatau, G., Boquet, P., Rossi, B., 2000. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *J. Leukocyte Biol.* 68, 522-528.

- Hokari, R., Kato, S., Matsuzaki, K., Kuroki, M., Iwai, A., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miyahara, T., Itoh, K., Sekizuka, E., 2001. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to chronic colitis. *Free Radical Biol. Med.* 31, 153-163.
- Houdijk, J.G., Verstegen, M.W., Bosch, M.W., van Laere, K.J., 2002. Dietary fructooligosaccharides and transgalactooligosaccharides can affect fermentation characteristics in gut contents and portal plasma of growing pigs. *Livest. Prod. Sci.* 73, 175-184.
- Hung, C.C., Garner, C.D., Slauch, J.M., Dwyer, Z.W., Lawhon, S.D., Frye, J.G., McClelland, M., Ahmer, B.M., Altier, C. 2013. The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. In *Mol. Microbiol.*
- Jaffe, A.B., Hall, A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269.
- Jahanbakhsh, S., Kabore, K.P., Fravallo, P., Letellier, A., Fairbrother, J.M., 2015. Impact of medicated feed along with clay mineral supplementation on *Escherichia coli* resistance to antimicrobial agents in pigs after weaning in field conditions. *Res. Vet. Sci.* 102, 72-79.
- Jepson, M.A., Clark, M.A., 1998. Studying M cells and their role in infection. *Trends in microbiology* 6, 359-365.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Smith, K., O'Bryan, T.T., Tatini, S., 2005. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J. Infect. Dis.* 191, 1040-1049.
- Johnson, J.R., Russo, T.A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* :“The other bad E coli”. *J. Lab. Clin. Med.* 139, 155-162.

- Johnson, J.R., Russo, T.A., Tarr, P.I., Carlino, U., Bilge, S.S., Vary, J.C., Stell, A.L., 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroNE*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect. Immun.* 68, 3040-3047.
- Jones, F., Richardson, K., 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult. Sci.* 83, 384-391.
- Juteau, P., Tremblay, D., Villemur, R., Bisailon, J.-G., Beaudet, R., 2004. Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 115-122.
- Kadhun, H., Finlay, D., Rowe, M., Wilson, I., Ball, H., 2008. Occurrence and characteristics of cytotoxic necrotizing factors, cytolethal distending toxins and other virulence factors in *Escherichia coli* from human blood and faecal samples. *Epidemiol. Infect.* 136, 752-760.
- Kararli, T.T., 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm. Drug Disposition* 16, 351-380.
- Karczmarczyk, M., Abbott, Y., Walsh, C., Leonard, N., Fanning, S., 2011. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a university veterinary hospital. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7104-7112.
- Karmali, M.A., 2004. Prospects for Preventing Serious Systemic Toxic Complications of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections Using Shiga Toxin Receptor Analogues. *J. Infect. Dis.* 189, 355-359.

- Katouli, M., Lund, A., Wallgren, P., Kühn, I., Söderlind, O., Möllby, R., 1995. Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 778-783.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., Finlay, B.B., 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520.
- Knudsen, K.E.B., Serena, A., Canibe, N., Juntunen, K.S., 2003. New insight into butyrate metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 81-86.
- Knust, Z., Schmidt, G., 2010. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)– A Growing Toxin Family. *Toxins* 2, 116-127.
- Lan, R., Stevenson, G., Reeves, P.R., 2003. Comparison of two major forms of the Shigella virulence plasmid pINV: positive selection is a major force driving the divergence. *Infect. Immun.* 71, 6298-6306.
- Lane, M., Mobley, H., 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 72, 19-25.
- Leclerc, S., Boerlin, P., Gyles, C., Dubreuil, J.D., Mourez, M., Fairbrother, J.M., Harel, J., 2007. paa, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res. Microbiol.* 158, 97-104.
- Lee, Y.K., Salminen, S., 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons.
- Lemonnier, M., Landraud, L., Lemichez, E., 2007. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 515-534.

- Liebler-Tenorio, E.M., Pabst, R., 2006. MALT structure and function in farm animals. *Veterinary research* 37, 257-280.
- Lo Fo Wong, D., Dahl, J., Stege, H., Van der Wolf, P., Leontides, L., Von Altrock, A., Thorberg, B., 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 62, 253-266.
- Lortie, L.-A., Dubreuil, J.D., Harel, J., 1991. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29, 656-659.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., Lee, M.D., 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6816-6824.
- Maluta, R.P., Fairbrother, J.M., Stella, A.E., Rigobelo, E.C., Martinez, R., Ávila, F.A.d. 2013. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. In *Veterinary microbiology*.
- Martins, R.P., da Silva, M.C., Dutra, V., Nakazato, L., da Silva Leite, D. 2010. Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. In *The Journal of Infection in Developing Countries*, 123-127.
- Maxwell, C., Reimann, E., Hoekstra, W., Kowalczyk, T., Benevenga, N., Grummer, R., 1970. Effect of dietary particle size on lesion development and on the contents of various regions of the swine stomach. *J. Anim. Sci.* 30, 911-922.
- McCracken, V.J., Lorenz, R.G., 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell. Microbiol.* 3, 1-11.

- Medel, P., Latorre, M., De Blas, C., Lázaro, R., Mateos, G., 2004. Heat processing of cereals in mash or pellet diets for young pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113, 127-140.
- Melkebeek, V., Goddeeris, B.M., Cox, E. 2012. ETEC vaccination in pigs. In *Veterinary immunology and immunopathology*.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Sonnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* 33, 296-306.
- Melnichouk, S.I., 2002. Mortality associated with gastric ulceration in swine. *The Canadian Veterinary Journal* 43, 223.
- Metzler-Zebeli, B.U., Hooda, S., Pieper, R., Zijlstra, R.T., van Kessel, A.G., Mosenthin, R., Gänzle, M.G. 2010. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 3692-3701.
- Mietzner, T.A., Morse, S.A., 1994. The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 471-493.
- Mikkelsen, L.L., Højberg, O., Jensen, B.B. 2007. Coarse structured feed stimulates members of the genera *Lactobacillus* and *Mitsuokella* as well as propionate and butyrate producers in the pig stomach. In *Livestock Science*, 153-156.
- Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., 2004. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3485-3492.

- Millet, S., Kumar, S., De Boever, J., Meyns, T., Aluwé, M., De Brabander, D., Ducatelle, R., 2012. Effect of particle size distribution and dietary crude fibre content on growth performance and gastric mucosa integrity of growing–finishing pigs. *The Veterinary Journal* 192, 316-321.
- Moore, W., Moore, L., Cato, E., Wilkins, T., Kornegay, E., 1987. Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1638-1644.
- Muralidhara, K., Sheggeby, G., Elliker, P., England, D., Sandine, W., 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and *lactobacillus* flora of intestinal tissue and feces from piglets. *Journal of Food Protection*® 40, 288-295.
- Nagy, B., Fekete, P.Z., 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary research* 30, 259-284.
- Naqid, I.A., Owen, J.P., Maddison, B.C., Gardner, D.S., Foster, N., Tchórzewska, M.A., La Ragione, R.M., Gough, K.C., 2015. Prebiotic and probiotic agents enhance antibody-based immune responses to *Salmonella* Typhimurium infection in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 201, 57-65.
- Neutra, M.R., Frey, A., Kraehenbuhl, J.-P., 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86, 345-348.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., 2010. Food-borne diseases—The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* 139, S3-S15.
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D.M., Fairbrother, J.M., 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with

- diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 242-252.
- Niemi, J., Sevón-Aimonen, M.-L., Stygar, A.H., Partanen, K., 2015. The economic and environmental value of genetic improvements in fattening pigs: An integrated dynamic model approach. *J. Anim. Sci.* 93, 4161-4171.
- Nyachoti, C., Zijlstra, R., De Lange, C., Patience, J., 2004. Voluntary feed intake in growing-finishing pigs: A review of the main determining factors and potential approaches for accurate predictions. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 549-566.
- O'Connor, A., Denagamage, T., Sargeant, J., Rajić, A., McKean, J. 2008a. Feeding management practices and feed characteristics associated with *Salmonella* prevalence in live and slaughtered market-weight finisher swine: A systematic review and summation of evidence from 1950 to 2005. In *Preventive veterinary medicine*, 213-228.
- O'Connor, A., Denagamage, T., Sargeant, J., Rajić, A., McKean, J., 2008b. Feeding management practices and feed characteristics associated with *Salmonella* prevalence in live and slaughtered market-weight finisher swine: A systematic review and summation of evidence from 1950 to 2005. *Preventive veterinary medicine* 87, 213-228.
- Ojeniyi, B., Ahrens, P., Meyling, A., 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 41, 49-59.

- Osek, J., 2003. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Veterinary microbiology* 91, 65-72.
- Otto, S.J., Carson, C.A., Finley, R.L., Thomas, M.K., Reid-Smith, R.J., McEwen, S.A., 2014. Estimating the number of human cases of ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in Quebec and Ontario, Canada. *Clin. Infect. Dis.* 59, 1281-1290.
- Pastuszewska, B., Tomaszewska-Zaremba, D., Buraczewska, L., Świąch, E., Taciak, M., 2007. Effects of supplementing pig diets with tryptophan and acidifier on protein digestion and deposition, and on brain serotonin concentration in young pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 49-65.
- Patterson, J., Burkholder, K., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82, 627-631.
- Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A., 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* 113, 1-6.
- Pié, S., Awati, A., Vida, S., Falluel, I., Williams, B., Oswald, I., 2007. Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *J. Anim. Sci.* 85, 673-683.
- Pieper, R., Bindelle, J., Rossnagel, B., Van Kessel, A., Leterme, P., 2009. Effect of carbohydrate composition in barley and oat cultivars on microbial ecophysiology and proliferation of *Salmonella enterica* in an in vitro model of the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7006-7016.

- Plöger, S., Stumpff, F., Penner, G.B., Schulzke, J.D., Gäbel, G., Martens, H., Shen, Z., Günzel, D., Aschenbach, J.R., 2012. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258, 52-59.
- Postma, M., Stärk, K.D., Sjölund, M., Backhans, A., Beilage, E.G., Lösken, S., Belloc, C., Collineau, L., Iten, D., Visschers, V., 2015. Alternatives to the use of antimicrobial agents in pig production: A multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Preventive veterinary medicine* 118, 457-466.
- Potter, M., Tokach, M.D., DeRouchey, J.M., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Dritz, S.S., 2009. Effects of meal or pellet diet form on finishing pig performance and carcass characteristics.
- Prager, R., Strutz, U., Fruth, A., Tschäpe, H., 2003. Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 477-486.
- Prohaszka, L., 1980. Antibacterial Effect of Volatile Fatty Acids in Enteric *E. coli*-infections of Rabbits. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 27, 631-639.
- Prohászka, L., 1986. Antibacterial Mechanism of Volatile Fatty Acids in the Intestinal Tract of Pigs against *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 33, 166-173.
- Regina, D.C., Eisemann, J.H., Lang, J.A., Argenzio, R.A., 1999. Changes in gastric contents in pigs fed a finely ground and pelleted or coarsely ground meal diet. *J. Anim. Sci.* 77, 2721-2729.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P., Ricciardi-Castagnoli, P., 2001. Dendritic cells express tight

- junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361-367.
- Ricke, S., 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* 82, 632-639.
- Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L., 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 467-475.
- Rousset, É., Harel, J., Dubreuil, J.D., 1998. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect. Immun.* 66, 5650-5658.
- Russell, E.G., 1979. Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 187-193.
- Russell, W.R., Hoyles, L., Flint, H.J., Dumas, M.-E., 2013. Colonic bacterial metabolites and human health. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 246-254.
- Saeed, R.M., 2015. Incidence of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria Isolated From Various Fermented Foods. UOFK,
- Salanitro, J., Blake, I., Muirhead, P., 1977. Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 79-84.
- Sanchez, S., Stevenson, M.M., Hudson, C.R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q., Maurer, J.J., 2002. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3586-3595.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., Fasano, A., 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173, 1019-1022.

- Scheutz, F., Møller Nielsen, E., Frimodt-Møller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J., Caprioli, A., 2011. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill* 16, 19889.
- Schierack, P., Walk, N., Ewers, C., Wilking, H., Steinrück, H., Filter, M., Wieler, L.H., 2008. ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environ. Microbiol.* 10, 1742-1751.
- Serena, A., Jørgensen, H., Bach Knudsen, K., 2009. Absorption of carbohydrate-derived nutrients in sows as influenced by types and contents of dietary fiber. *J. Anim. Sci.* 87, 136-147.
- Sheikh, A.A., Checkley, S., Avery, B., Chalmers, G., Bohaychuk, V., Boerlin, P., Reid-Smith, R., Aslam, M., 2012. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 625-631.
- Skočková, A., Koláčková, I., Bogdanovičová, K., Karpíšková, R., 2015. Characteristic and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from retail meats purchased in the Czech Republic. *Food Control* 47, 401-406.
- Smith, B.A., Fazil, A., Lammerding, A.M., 2013. A risk assessment model for *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef and beef cuts in Canada: Evaluating the effects of interventions. *Food Control* 29, 364-381.

- Smith, J., Drum, D., Dai, Y., Kim, J., Sanchez, S., Maurer, J., Hofacre, C., Lee, M., 2007a. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1404-1414.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.W., 2007b. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog. Dis.* 4, 134-163.
- Solà-Oriol, D., Roura, E., Torrallardona, D., 2009. Feed preference in pigs: Effect of cereal sources at different inclusion rates. *J. Anim. Sci.* 87, 562-570.
- Sonntag, A.-K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L.H., Schmidt, M.A., Karch, H., 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8855-8863.
- St. Amand, J.A., Otto, S.J., Cassis, R., Annett Christianson, C.B., 2013. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from poultry in Alberta. *Avian Pathol.* 42, 379-386.
- Stecher, B., Hardt, W.-D. 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. In *Curr. Opin. Microbiol.*, 82-91.
- Stokes, C., Bailey, M., Wilson, A., 1994. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Veterinary immunology and immunopathology* 43, 143-150.
- Stoll, T., Markwirth, G., Reipschläger, S., Schmidt, G., 2009. A new member of a growing toxin family – *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 3 (CNF3). *Toxicon* 54, 745-753.
- Taube, V., Neu, M., Hassan, Y., Verspohl, J., Beyerbach, M., Kamphues, J., 2009. Effects of dietary additives (potassium diformate/organic acids) as well as influences of grinding

- intensity (coarse/fine) of diets for weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby or *Escherichia coli*. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 93, 350-358.
- Téllez, G., Lauková, A., Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Hargis, B.M., Callaway, T., 2015. Food-producing animals and their health in relation to human health. Microb. Ecol. Health Dis. 26.
- Teshager, T., Herrero, I.A., Porrero, M.C., Garde, J., Moreno, M.A., Domínguez, L., 2000. Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. Int. J. Antimicrob. Agents 15, 137-142.
- Thariath, A., Socha, D., Valvano, M.A., Viswanatha, T., 1993. Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the IucD protein (lysine: N6-hydroxylase) encoded by the pColV-K30 aerobactin gene cluster. J. Bacteriol. 175, 589-596.
- Tsiloyiannis, V., Kyriakis, S., Vlemmas, J., Sarris, K., 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. Res. Vet. Sci. 70, 287-293.
- Van Den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B., Goddeeris, B., 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. Veterinary microbiology 71, 223-244.
- van der Gaag, M.A., Saatkamp, H.W., Backus, G.B., van Beek, P., Huirne, R.B., 2004. Cost-effectiveness of controlling *Salmonella* in the pork chain. Food Control 15, 173-180.
- Van Immerseel, F., Russell, J., Flythe, M., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathol. 35, 182-188.
- Varga, C., Pearl, D.L., McEwen, S.A., Sargeant, J.M., Pollari, F., Guerin, M.T., 2013. Incidence, distribution, seasonality, and demographic risk factors of *Salmonella*

- Enteritidis human infections in Ontario, Canada, 2007–2009. *BMC Infect. Dis.* 13, 212.
- Visscher, C., Winter, P., Verspohl, J., Stratmann-Selke, J., Upmann, M., Beyerbach, M., Kamphues, J. 2009. Effects of feed particle size at dietary presence of added organic acids on caecal parameters and the prevalence of *Salmonella* in fattening pigs on farm and at slaughter. In *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 423-430.
- Vondruskova, H., Slamova, R., Trekova, M., Zraly, Z., Pavlik, I. 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. In *Veterinarni Medicina*, 199-224.
- Waksman, G., Hultgren, S.J., 2009. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 765-774.
- Wang, Z., Qiao, S., Lu, W., Li, D., 2005. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. *Poult. Sci.* 84, 875-881.
- Willig, S., Lacorn, M., Claus, R., 2004. Development of a rapid and accurate method for the determination of key compounds of pig odor. *J. Chromatogr.* 1038, 11-18.
- Wondra, K., Hancock, J., Behnke, K., Hines, R., Stark, C., 1995a. Effects of particle size and pelleting on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 757-763.
- Wondra, K., Hancock, J., Behnke, K., Stark, C., 1995b. Effects of mill type and particle size uniformity on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 2564-2573.

- Woodward, M., Carroll, P., Wray, C., 1992. Detection of entero-and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology* 31, 251-261.
- Yamashita, H., 2015. Biological function of acetic acid-Improvement of obesity and glucose tolerance by acetic acid in type 2 diabetic rats. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 00-00.
- Yin, Q., Zheng, Q., 2005. Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 68-71.
- Zhu, J., 2000. A review of microbiology in swine manure odor control. *Agric., Ecosyst. Environ.* 78, 93-106.

