



HAL
open science

Étude expérimentale sur les modifications du microbiote intestinal chez la chienne en gestation et en lactation

Fanny Mercier

► **To cite this version:**

Fanny Mercier. Étude expérimentale sur les modifications du microbiote intestinal chez la chienne en gestation et en lactation. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03777386

HAL Id: dumas-03777386

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03777386v1>

Submitted on 14 Sep 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ETUDE EXPERIMENTALE SUR LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ LA CHIENNE EN GESTATION ET EN LACTATION

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

**MERCIER Fanny, Isabelle,
Renée**

Directrice de thèse : Mme Hanna MILA

JURY

PRESIDENT :
M. Laurent ALRIC

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURES :
Mme Hanna MILA
Mme Véronique GAYRARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ETUDE EXPERIMENTALE SUR LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ LA CHIENNE EN GESTATION ET EN LACTATION

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MERCIER Fanny, Isabelle, Renée
Née, le 24/06/1997 à ALES (30)

Directrice de thèse : Mme Hanna MILA

JURY

PRESIDENT :
M. Laurent ALRIC

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURES :
Mme Hanna MILA
Mme Véronique GAYRARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1^{ère}
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

**PROFESSEURS 2^{ème}
CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

**MAITRES DE CONFERENCES CLASSE
NORMALE**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*

M. **VERGNE** *Timothée*, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
Mme **WASET-SZKUTA** *Agnès*, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

M. **AUMANN** *Marcel*, *Urgences, soins intensifs*
M. **AUVRAY** *Frédéric*, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
M. **CASSARD** *Hervé*, *Pathologie des ruminants*
M. **CROVILLE** *Guillaume*, *Virologie et génomique cliniques*
Mme **DEBREUQUE** *Maud*, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **DIDIER** *Caroline*, *Anesthésie, analgésie*
Mme **DUPOUY GUIRAUTE** *Véronique*, *Innovations thérapeutiques et résistances*
Mme **GAILLARD** *Elodie*, *Urgences, soins intensifs*
Mme **GEFFRE** *Anne*, *Biologie médicale animale et comparée*
Mme **GRISEZ** *Christelle*, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **JEUNESSE** *Elisabeth*, *Bonnes pratiques de laboratoire*
Mme **PRESSANTI** *Charline*, *Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL** *Félipe*, *Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS** *Brice*, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK** *Pétra*, *Médecine préventive*

REMERCIEMENTS

Au président du jury de thèse,
A Monsieur le Professeur Laurent ALRIC,
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Médecine Interne et Hépatogastro-entérologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse
Hommages respectueux

Au jury de thèse,

A Madame le Docteur Hanna MILA,
Maître de conférences de l'École Nationale vétérinaire de Toulouse,
Élevage des carnivores domestiques

Pour votre encadrement, votre gentillesse et votre implication
Profonde gratitude

A Madame le Professeur Véronique GAYRARD,
Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Physiologie de la reproduction et endocrinologie

Qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse,
Sincères remerciements

A Monsieur Quentin GARRIGUES,
Ingénieur agronome et doctorant de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Élevage des carnivores domestiques

Pour ton aide précieuse, ta gentillesse, ta patience et ces moments partagés
Affectueusement

A la société LALLEMAND ainsi qu'à l'élevage canin partenaire,
Pour avoir financé et soutenu ce projet
Sincères remerciements

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES.....	9
LISTE DES ANNEXES	11
TABLE DES FIGURES.....	12
TABLE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PRINCIPALES MODIFICATIONS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES CHEZ LA FEMELLE EN GESTATION ET EN LACTATION.....	19
1. MODIFICATIONS HORMONALES	19
1.1. <i>La Progestérone : variations de sa concentration au cours de la gestation</i>	<i>19</i>
1.2. <i>Progestérone, physiologie digestive et microbiote intestinal.....</i>	<i>21</i>
2. ADAPTATIONS DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	21
2.1. <i>Balance entre états pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.....</i>	<i>21</i>
2.2. <i>Lien entre inflammation et microbiote intestinal maternel</i>	<i>22</i>
3. MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE.....	23
3.1. <i>Adaptations du métabolisme énergétique au cours de la gestation – état d’insulino-résistance ..</i>	<i>23</i>
3.2. <i>Lien entre insulino-résistance et microbiote intestinal</i>	<i>23</i>
4. MODIFICATIONS ANATOMIQUES DU TUBE DIGESTIF.....	24
5. TRANSLOCATION BACTÉRIENNE	24
6. MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL.....	25
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE SUR LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ LA CHIENNE EN GESTATION ET EN LACTATION	26
1. PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	26
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
2.1. <i>Animaux inclus dans l’étude</i>	<i>27</i>
2.2. <i>Logements et conditions de vie des animaux.....</i>	<i>29</i>
2.3. <i>Protocole de prophylaxie médicale des mères.....</i>	<i>29</i>
2.4. <i>Régime alimentaire des mères</i>	<i>30</i>
2.4.1. <i>Régime alimentaire des mères au cours de la première partie de gestation.....</i>	<i>30</i>
2.4.2. <i>Régime alimentaire des mères au cours de la seconde partie de gestation et au cours de la lactation.....</i>	<i>30</i>
2.5. <i>Mesure des paramètres de santé de la mère</i>	<i>31</i>
2.5.1. <i>Suivi de la prise alimentaire</i>	<i>31</i>
2.5.2. <i>Suivi du poids.....</i>	<i>32</i>
2.5.3. <i>Suivi de la Note d’État Corporel</i>	<i>32</i>
2.5.4. <i>Pathogènes et traitements</i>	<i>32</i>
2.6. <i>Prélèvements réalisés sur les mères.....</i>	<i>34</i>
2.6.1. <i>Réalisation des prélèvements</i>	<i>34</i>
2.6.2. <i>Stockage des prélèvements.....</i>	<i>34</i>
2.7. <i>Traitements des échantillons.....</i>	<i>35</i>
2.8. <i>Analyse des données.....</i>	<i>35</i>
2.8.1. <i>Préparation des données de séquençage</i>	<i>35</i>
2.8.2. <i>Analyse d’alpha diversité</i>	<i>36</i>
2.8.3. <i>Analyses de bêta-diversité.....</i>	<i>36</i>
2.8.4. <i>Analyses de la composition.....</i>	<i>37</i>
3. RÉSULTATS	38
3.1. <i>Description de la population.....</i>	<i>38</i>
3.1.1. <i>Suivi de la NEC.....</i>	<i>38</i>
3.1.2. <i>Suivi de la prise alimentaire</i>	<i>39</i>

3.1.3.	Suivi du poids.....	40
3.1.4.	Synthèse des traitements administrés aux chiennes au cours de l'étude.....	42
3.2.	<i>Alpha-diversité</i>	43
3.3.	<i>Bêta-diversité</i>	44
3.4.	<i>Abondance des différents taxa au cours de la gestation et de la lactation</i>	46
3.4.1.	Principaux phylums et leur évolution au cours du temps	46
3.4.2.	Volcano-Plot.....	48
3.4.3.	Principales familles et genres au cours de la gestation et de la lactation.....	52
a.	Phylum Firmicutes	52
b.	Phylum Bacteroidetes.....	58
c.	Phylum Actinobacteria	59
d.	Phylum Proteobacteria	61
4.	DISCUSSION	63
4.1.	<i>Les limites de l'étude</i>	63
4.2.	<i>Modifications du microbiote intestinal lors de la gestation et de la lactation</i>	65
4.2.1.	Modifications des diversités alpha et bêta.....	66
4.2.2.	Modifications des principaux phylums.....	66
4.2.3.	Modifications des principales familles	68
	CONCLUSION	71
	BIBLIOGRAPHIE	72
	ANNEXES	85
	AGREMENT	95

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Composition de l'aliment sec complet pour chiens adultes.....	85
Annexe 2: Composition de l'aliment sec complet pour chiots	85
Annexe 3: Grille d'évaluation des Notes d'Etat Corporel des chiennes (NEC).....	86
Annexe 4: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre J28 et J56 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student).....	87
Annexe 5: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre J56 et P1 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)	87
Annexe 6: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre P1 et P28 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)	87
Annexe 7: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre P28 et P56 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)	88
Annexe 8: Composition du phylum Firmicutes au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%).....	89
Annexe 9: Composition de la famille <i>Peptostreptococaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%)	89
Annexe 10: Composition de la famille <i>Lactobacillaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%)	90
Annexe 11: Variations de l'abondance du genre <i>Faecalibacterium</i> au cours de la gestation et de la lactation – abondance brute	90
Annexe 12: Composition de la famille <i>Clostridiaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%).....	91
Annexe 13: Composition du phylum Bacteroidetes au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%).....	91
Annexe 14: Composition de la famille <i>Preovotellaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%).....	92
Annexe 15: Composition du phylum Actinobacteria au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%).....	92
Annexe 16: Composition de la phylum Proteobacteria au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%).....	93
Annexe 17 : Poster scientifique "Evolution of the fecal microbiota during gestation, birth and lactation in the canine species" réalisé par Quentin Garrigues (PhD Student – Agricultural engineering MSc)	93

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Variations des concentrations en progestérone au cours de la gestation et conséquences de ces variations d’après Kowalewski et al. 2015; Papa, Kowalewski 2020....	20
Figure 2: Synthèse du protocole expérimental. Les jours de suivis ont été codifiés selon la période ante-partum (J) et post-partum (P), suivie du numéro du jour correspondant (Jn est le n-ème jour de la période ante-partum, avec n=0 le jour de l’ovulation; Pn est le n-ème jour de la période post-partum, avec n=0 le jour de la mise-bas).....	31
Figure 3: Evolution de la note d’état corporel des 36 chiennes de l’étude entre le jour d’ovulation (J0) puis au cours de la gestation (J28, J56) et au cours de la lactation (P1, P28, P56)	39
Figure 4: Evolution de la prise alimentaire des 36 chiennes de l’étude sur trois périodes : en cours de gestation (de J30 à P0, jour de mise-bas), en première partie de lactation (de P0 à P21) et en seconde partie de lactation (de P21 à P56)	40
Figure 5: Evolution du poids des 36 chiennes de moyen format au cours de la gestation (J28, J56) et au cours de la lactation (P1, P28, P56).....	41
Figure 6: Evolution du poids des 36 chiennes de grand format au cours de la gestation (J28, J56) et au cours de la lactation (P1, P28, P56).....	42
Figure 7: Variations de la richesse bactérienne intra-échantillon (alpha-diversité) chez les 36 chiennes selon leur stade physiologique : en gestation (J28, J56) ou en lactation (P1, P28, P56) –Méthode utilisée : InvSimpson.....	44
Figure 8: Profils bactériens (bêta-diversité) chez les 36 chiennes selon leur stade physiologique: en gestation (J28, J56) ou en lactation (P1, P28, P56). Méthode utilisée : analyse en composantes principales (indice de Bray Curtis)	45
Figure 9: Evolution des principaux phylums observés au cours de la gestation et de la lactation chez les 36 chiennes de l’étude. A- l’abondance relative de l’ensemble des phylums ; B- résultats d’analyses statistiques de l’évolution au cours du temps pour chaque phylum ; C- Evolution de l’abondance brute des 4 phylums.....	47
Figure 10: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de p=0.05) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la gestation à J28 (points verts) et à J56 (points orange)	48
Figure 11: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de p=0.05) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la lactation à P28 (points verts) et à P56 (points orange).....	49

Figure 12: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de $p=0.05$) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la gestation à J56 (points verts) et la mise-bas à P1 (points orange)	50
Figure 13: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de $p=0.05$) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la mise-bas à P1 (points verts) et de la lactation à P28 (points orange).....	51
Figure 14: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Peptostreptococcaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	53
Figure 15: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Lactobacillaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	53
Figure 16: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Streptococcaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	54
Figure 17: Variations de l'abondance brute du genre <i>Peptostreptococcus</i> au cours de la gestation et de la lactation	55
Figure 18: Variations de l'abondance brute du genre <i>Romboutsia</i> au cours de la gestation et de la lactation	55
Figure 19: Variations de l'abondance brute du genre <i>Peptoclostridium</i> au cours de la gestation et de la lactation.....	56
Figure 20: Variations de l'abondance brute du genre <i>Ligilactobacillus</i> au cours de la gestation et de la lactation.....	57
Figure 21: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Bacteroidaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	58
Figure 22: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Corynebacteriaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	60
Figure 23: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Bifidobacteriaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	60
Figure 24: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Succinivibrionaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	61
Figure 25: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Sutterellaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation.....	62
Figure 26: Variations de l'abondance brute de la famille <i>Enterobacteriaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	62

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (non exhaustif), d'après Sykes et al. 2012; Olejniczak, Kasprzak 2008; Opal, DePalo 2000; Mitchell et al. 1991	22
Tableau 2: Caractéristiques de 36 chiennes incluses dans l'étude à J28 de gestation.....	28
Tableau 3: Récapitulatif des traitements administrés aux 36 chiennes de l'étude au cours des différentes périodes (en pourcentage de chiennes ayant reçu le traitement).....	43
Tableau 4: Résultats du test d'ANOVA par permutation réalisé afin de comparer deux à deux les profils bactériens des 36 chiennes selon le stade de gestation ou de lactation via l'indice de Bray Curtis (J28, J56 au cours de la gestation et P1, P28 et P56 au cours de la lactation	45
Tableau 5: Abondance des cinq principaux phylums chez 36 chiennes de l'étude au cours de la gestation (J28 et J56) et de la lactation (P1, P28 et P56) dans l'ordre décroissant	46
Tableau 6: Les bactéries les plus abondantes à J56 (fin de gestation) comparé à P1 (J1 post-partum) chez les 36 chiennes (tests de Student multiples).....	52
Tableau 7: Les bactéries les plus abondantes à P1 (J1 post-partum) comparé à P28 (J28 de lactation) chez les 36 chiennes (tests de Student multiples)	52
Tableau 8: Résultats d'analyses d'évolution d'abondance relative des 3 genres de la famille <i>Lactobacillaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation.....	57
Tableau 9: Résultats d'analyses d'évolution d'abondance relative des 3 genres de la famille <i>Prevotellaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	59
Tableau 10: Résultats d'analyses d'évolution d'abondance relative des 3 genres de la famille <i>Sutterellaceae</i> au cours de la gestation et de la lactation	63
Tableau 11: Résumé des principales variations observées dans la diversité et la composition du microbiote intestinal au cours de la gestation et de la lactation. Les flèches indiquent une augmentation ou une diminution significative, une case vide signifie l'absence de modifications au cours de la période étudiée.	65

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien
ANOVA : Analyse de la variance
ARN : Acide ribonucléique
CJ : Corps jaune
FROGS : Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution
IM : Intra-musculaire
J : Jours *ante-partum*
LH : Hormone lutéinisante
LPS : Liposaccharide
NEC : Note d'état corporel
OTU : Unité taxonomique opérationnelle
P : Jours *post-partum*
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGF2alpha : Prostaglandine F2 alpha
PO : *per-os*

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal est caractérisé par l'ensemble des bactéries, virus, champignons ou parasites présents dans l'écosystème intestinal. Il joue un rôle majeur dans la santé des individus grâce à la relation symbiotique qui existe entre l'hôte et son microbiote intestinal (Amon, Sanderson 2017).

Les rôles du microbiote intestinal sont multiples. Il impacte bien sûr la santé digestive (Minamoto et al. 2014; 2015; Suchodolski et al. 2012; 2010; Guard et al. 2015) mais son influence va au-delà. Le microbiote intestinal stimule le système immunitaire de l'hôte (Rakoff-Nahoum et al. 2004) et régule la réponse inflammatoire. Certaines bactéries induisent la production de cytokines pro-inflammatoires tandis que d'autres permettent un phénotype anti-inflammatoire (Asarat et al. 2016). D'autre part, il participe au métabolisme énergétique notamment au travers de la régulation du stockage des graisses (Bäckhed et al. 2004).

Enfin, il existerait un lien entre métabolisme hormonal et microbiote intestinal, certaines études mettant en évidence la notion de « microgenderome » (Flak, Neves, Blumberg 2013).

De par son importance, il est primordial que le jeune développe un microbiote intestinal bien équilibré. Celui-ci se met en place dès la naissance et est notamment influencé par le microbiote vaginal de la mère au moment de la parturition (Dominguez-Bello et al. 2010).

Le microbiote intestinal du jeune continue d'évoluer dans les premiers jours de vie (Guard et al. 2017) notamment grâce au microbiote maternel au niveau de la mamelle qui est transmis directement au nouveau-né par ingestion de lait (Rodríguez 2014). De plus, le jeune est en contact direct avec le microbiote cutané de la mère (au travers de la tétée) et le microbiote présent dans l'environnement (notamment fécal maternel).

Ainsi, le microbiote intestinal maternel joue un rôle majeur dans la mise en place du microbiote du chiot.

Cependant, il n'existe actuellement pas d'études détaillant la composition du microbiote intestinal de la chienne au cours de la gestation et de la lactation.

L'objectif de notre étude est donc de caractériser les modifications du microbiote intestinal chez la chienne au cours de la gestation et de la lactation.

Nous discuterons ensuite de possibles liens entre physiologie de la gestation et microbiote intestinal de la mère ainsi que d'un possible passage du microbiote intestinal du tube digestif à la glande mammaire.

La première partie de ce manuscrit consiste en une synthèse bibliographique des principales modifications anatomiques et physiologiques chez la femelle en gestation et en lactation. Bien qu'une grande partie des résultats soient valables et démontrés chez l'espèce canine, certains articles n'ont pas comme modèle expérimental la chienne.

La seconde partie s'intéressera à la présentation et à la discussion des résultats expérimentaux concernant la caractérisation du microbiote intestinal chez la chienne en gestation et en lactation (alpha et bêta diversité, variations de la composition au cours du temps). Ces résultats sont issus d'une étude conduite sur 36 chiennes suivies du milieu de la gestation à la fin de la lactation.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PRINCIPALES MODIFICATIONS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES CHEZ LA FEMELLE EN GESTATION ET EN LACTATION

Dans cette première partie, nous détaillerons les principales modifications physiologiques chez la femelle en gestation et en lactation. Nous nous intéresserons particulièrement aux variations du métabolisme hormonal, du système immunitaire et du métabolisme énergétique nécessaires au bon déroulement de la gestation.

Tout au long de cette présentation, nous mettrons en évidence les liens connus entre microbiote et métabolisme hormonal, énergétique et système immunitaire. Ceci aura pour but d'établir un possible lien entre les modifications physiologiques et anatomiques observées chez la chienne en gestation et lactation et les variations de son microbiote intestinal.

1. MODIFICATIONS HORMONALES

Quelle que soit l'espèce, la gestation est caractérisée par de multiples variations hormonales nécessaires à son bon déroulement. Une des hormones principales de la gestation est la progestérone.

1.1. La Progestérone : variations de sa concentration au cours de la gestation

Chez la chienne, contrairement à d'autres espèces domestiques, la production de progestérone commence dès la période pré-ovulatoire et elle est uniquement sécrétée par le corps jaune (Concannon, McCann, Temple 1989; Concannon 2009) sous l'action directe ou indirecte de plusieurs hormones lutéotropes (prolactine, œstrogènes, relaxine) (Concannon et al. 1988; Hoffmann et al. 2004; Li et al. 1993).

Suite à l'ovulation, les concentrations en progestérone croissent rapidement (de 5-6 ng/mL à l'ovulation à 30-35 ng/mL 15 à 30 jours après le pic de LH (hormone lutéinisante)) avec la maturation du corps jaune (Concannon, McCann, Temple 1989; Concannon 2009). Les concentrations en progestérone diminuent en fin de gestation, due notamment à la production de prostaglandines F2 alpha (PGF2alpha) par le fœtus. Ceci joue un rôle dans l'initiation de la mise-bas. Les principaux rôles de la progestérone sont résumés en Figure 1.

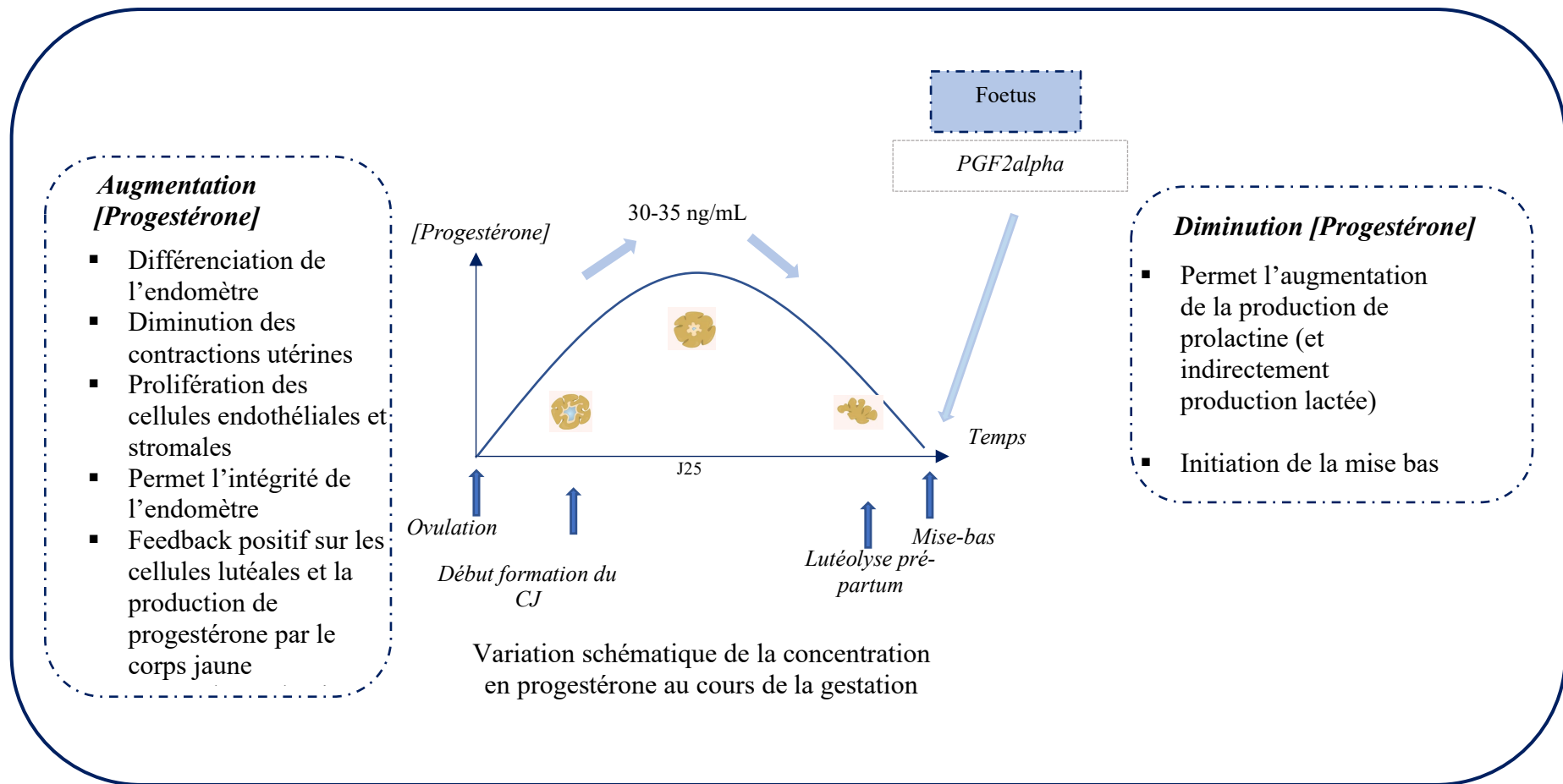


Figure 1: Variations des concentrations en progesterone au cours de la gestation et conséquences de ces variations d'après Kowalewski et al. 2015; Papa, Kowalewski 2020

Outre les modifications placentaires permettant le maintien de la gestation, la progestérone permet de conserver un environnement anti-inflammatoire autour du fœtus participant ainsi au phénomène de tolérance immunitaire (Druckmann, Druckmann 2005; Sentman et al. 2004). Néanmoins, son rôle ne se limite pas à l'interface avec le fœtus. Elle a aussi un rôle direct sur la physiologie digestive et le microbiote de la femelle en gestation.

1.2. Progestérone, physiologie digestive et microbiote intestinal

Au cours de la gestation, des phénomènes de translocation bactérienne sont observés et seront détaillés dans une partie dédiée. Un des facteurs favorisant la translocation bactérienne est la diminution de la motilité intestinale, induite notamment par des concentrations élevées en progestérone (Cong et al. 2007).

D'autre part, les hormones de la gestation (œstrogènes et progestérone) sont connues pour stimuler la croissance de certaines bactéries dont *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.* et *Escherichia coli* (Pelzer et al. 2012). D'autres bactéries, porteuses de LPS (liposaccharide) à leur surface (phylum Proteobacteria notamment), entraîneraient des diminutions des concentrations circulantes en progestérone. En effet, chez le chien, une étude a montré qu'une injection intra-veineuse de LPS entraînait une diminution de la concentration en progestérone circulante après 3 heures (Corder-Ramos et al. 2019). Aucun lien n'a été démontré entre une augmentation de l'abondance de ces bactéries et les chutes de concentrations en progestérone observées avant la mise-bas. Ces observations mériteraient d'être approfondies.

2. ADAPTATIONS DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

2.1. Balance entre états pro-inflammatoires et anti-inflammatoires

Le fœtus est reconnu comme étranger à l'organisme maternel. Le système immunitaire maternel ainsi que la réponse inflammatoire s'adaptent afin de permettre le bon déroulement de la gestation (Saito et al. 2010).

La gestation est caractérisée par un phénotype anti-inflammatoire permettant une tolérance immunitaire vis-à-vis du fœtus tandis que l'implantation et la mise-bas nécessitent un phénotype pro-inflammatoire pour leur bon déroulement (Fuhler 2020).

Il y a donc une balance entre états pro et anti-inflammatoires, médiés par des réponses immunitaires différentes.

Chaque type de réponse immunitaire est à l'origine de la production de différentes cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (Tableau 1).

Tableau 1: Principales cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (non exhaustif), d'après Sykes et al. 2012; Olejniczak, Kasprzak 2008; Opal, DePalo 2000; Mitchell et al. 1991

Cytokines pro-inflammatoires	Cytokines anti-inflammatoires
IFN gamma	IL4
TNF alpha	IL10
IL2	IL13
IL6	TGFbêta

Les cytokines pro-inflammatoires IL1, IL6 et TNFalpha participent au remaniement des tissus et activent l'angiogénèse au moment de l'implantation (Bourdiec et al. 2016; Fuhler 2020). A la mise-bas, la cytokine TNFalpha induit la production de NFkappaB, facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la mise-bas (Sykes et al. 2012).

Les cytokines anti-inflammatoires régulent l'inflammation et permettent le maintien de la gestation entre l'implantation et la mise-bas. Leur production est notamment permise par la quantité croissante de lymphocytes T régulateurs au niveau du placenta au cours de la gestation (Saito et al. 2010; Shima et al. 2015; Robertson et al. 2009).

2.2.Lien entre inflammation et microbiote intestinal maternel

Certaines bactéries du microbiote intestinal ont une action anti-inflammatoire *via* la production d'acides gras à courtes chaînes comme le butyrate. Ce dernier est à l'origine d'une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL10) et d'une diminution de cytokines pro-inflammatoires (IL1bêta, IL6, TGFbêta) (Asarat et al. 2016). Les principales familles productrices de butyrate appartiennent au phylum Firmicutes (Louis et al. 2004).

D'autres bactéries, porteuses de LPS à leur surface, stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires (IL6, TGFbêta). C'est le cas des bactéries appartenant au phylum Proteobacteria (Asarat et al. 2016). De plus, la présence de bactéries porteuses de LPS au niveau du tractus

digestif est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale (Mokkala et al. 2018; 2017; Mukhopadhyaya et al. 2012).

Les conséquences de cette augmentation seront détaillées dans une partie dédiée.

Ainsi, des variations d'abondance de ces bactéries au cours de la gestation pourraient contribuer à la balance entre phénotypes pro et anti-inflammatoires.

3. MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

Au cours de la gestation, la femelle doit subvenir aux besoins énergétiques du fœtus en plus de ses propres besoins. Au cours de la lactation, elle assure un apport énergétique pour le chiot en exportant une grande quantité d'énergie dans le lait.

3.1. Adaptations du métabolisme énergétique au cours de la gestation – état d'insulino-résistance

Au cours de la gestation, un apport important d'énergie doit être dédié au fœtus en croissance. Les femelles gestantes présentent un état d'insulino-résistance qui permet de « réserver » le glucose au fœtus. La sensibilité à l'insuline peut diminuer jusqu'à 40% au cours de la gestation (Balogh et al. 2018). En parallèle, une autre source d'énergie doit être mobilisée pour subvenir aux besoins de la femelle gestante. Ceci se fait *via* la lipolyse.

En l'absence de transport de glucose dans les cellules, un état d'hypoglycémie relative se met en place. Cet état est d'autant plus marqué que la gestation bloque les mécanismes permettant de lutter contre l'hypoglycémie (Connolly et al. 2004; Johnson 2008).

3.2. Lien entre insulino-résistance et microbiote intestinal

L'état d'insulino-résistance est commun aux femelles gestantes et aux individus atteints de syndrome métabolique. Chez ces individus, une dysbiose (altération du microbiote intestinal) a été mise en évidence (Haro et al. 2016; Chassaing, Gewirtz 2014). Celle-ci serait à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires qui interféreraient avec les voies de signalisation de l'insuline (Caricilli, Saad 2013).

4. MODIFICATIONS ANATOMIQUES DU TUBE DIGESTIF

Au cours de la lactation, on observe une augmentation de la demande énergétique (25% chez la femme et jusqu'à 200% chez la ratte), proportionnelle à la taille de sa portée (Cripps, Williams 1975; Oftedal 1984; Prentice, Prentice 1988; Hammond et al. 1994). Afin de répondre à ce besoin croissant d'énergie, la faculté de l'organisme maternel à absorber des nutriments augmente tout au long de la gestation. Une étude a montré que chez des rattes gestantes le taux d'absorption atteint un pic à la mise-bas puis reste constant au cours de la lactation (Hammond et al. 1994).

L'absorption des nutriments se fait grâce au tissu mucosal composant l'intestin. Il est directement exposé aux nutriments de la lumière intestinale, contient des enzymes permettant leur clivage, ainsi que des transporteurs assurant le passage des produits de la lumière intestinale à la circulation sanguine. La capacité d'absorption dépend donc de la longueur du tube digestif (les nutriments restent plus longtemps dans la lumière intestinale) et de la taille de la muqueuse intestinale (dont le rôle est d'absorber les nutriments) (Hammond 1997).

On observe des modifications anatomiques macroscopiques intestinales au cours de la lactation. Une augmentation de la masse intestinale a été mise en évidence chez plusieurs espèces (jusqu'à 200% chez la ratte). On observe également des modifications anatomiques microscopiques des surfaces d'absorption : augmentation de la taille des villosités intestinales (Fell, Smith, Campbell 1963), hypertrophie et hyperplasie de la couche mucosale (Prieto et al. 1994). Enfin, on observe une augmentation de la perméabilité intestinale en cours de gestation (Qi et al. 2021), permettant une absorption croissante des nutriments.

5. TRANSLOCATION BACTÉRIENNE

Plusieurs études, basées sur l'analyse microbiologique du lait, ont montré sa non stérilité (Gueimonde et al. 2007; Rodríguez 2014).

Plusieurs hypothèses visaient à expliquer la présence de bactéries dans le lait (McGuire, McGuire 2017) :

- passage de bactéries de la peau ou de la cavité buccale du nouveau-né par flux rétrograde du lait vers la mamelle ;
- passage de bactéries de l'intestin vers la mamelle : « entero-mammary pathway ».

Cette dernière hypothèse vient du fait que l'on retrouve au niveau du lait certaines bactéries anaérobies strictes, telles que les bactéries du genre *Bifidobacterium spp.* Ces dernières ne peuvent donc pas provenir du microbiote cutané ou du microbiote buccal, mais pourraient avoir migré à partir du tube digestif (Gueimonde et al. 2007).

Ce phénomène peut être expliqué par une translocation bactérienne en fin de gestation et au cours de la lactation du tube digestif vers la mamelle. Une étude (Perez et al. 2007) a comparé les cultures bactériennes de nœuds lymphatiques mésentériques et de glandes mammaires chez des souris gestantes et non gestantes. Les souris gravides présentent plus de cultures positives (10% chez les souris contrôles contre 70% de cultures positives chez les souris gestantes). Un jour après la mise-bas, le pourcentage de cultures positives du nœud lymphatique diminue chez les souris gestantes mais 80% des individus gestants présentent des bactéries au niveau de leur glande mammaire.

Une autre étude a permis de mettre en évidence cette translocation bactérienne à travers une administration orale de probiotiques marqués par un gène de bioluminescence. On retrouve les bactéries marquées dans le lait mais aussi dans des biopsies réalisées au niveau des plaques de Peyer et de la glande mammaire (de Andrés et al. 2017).

Cette translocation bactérienne est favorisée par les modifications anatomiques et physiologiques observées au cours de la gestation et mentionnées plus haut comme l'augmentation de la perméabilité intestinale, la diminution de la motilité intestinale et du péristaltisme ou les modifications du microbiote intestinal (Berg 1995). Elle se fait grâce à l'interaction entre les cellules épithéliales intestinales et les cellules dendritiques. Ces dernières « piochent » directement dans l'intestin les bactéries d'intérêt. Ensuite, elles expriment des protéines de la barrière épithéliale afin de préserver son intégrité (Rescigno et al. 2001).

6. MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL

Comme nous l'avons vu tout au long de cette première partie, le rôle du microbiote intestinal n'est pas limité à la sphère digestive mais il est directement impliqué dans le métabolisme hormonal, les processus inflammatoires et le métabolisme énergétique. Ainsi, un lien peut être proposé entre modifications du microbiote intestinal et physiologie de la gestation. Une étude a mis en évidence cette hypothèse en inoculant des microbiotes intestinaux de femmes enceintes au premier et au troisième trimestre de gestation à des souris non gravides dites « germ free »

(élevées de manière à éviter toute exposition à des micro-organismes). Cela a entraîné des symptômes de syndrome métabolique chez ces souris (insulino-résistance et prise de poids), qu'on retrouve aussi chez les femelles gestantes (Koren et al. 2012).

Enfin, le rôle du microbiote intestinal de la mère dépasse son impact sur la physiologie de la gestation. En effet, il joue également un rôle dans le développement du microbiote du nouveau-né. La mère est une source de bactéries pour le chiot dès la mise-bas *via* le microbiote vaginal. Le microbiote intestinal du chiot continue ensuite d'évoluer par contact avec les microbiotes buccal, cutané ou fécal de la mère. Comme détaillé dans la partie précédente, le lait maternel joue également un rôle dans la mise en place du microbiote intestinal du jeune (Rodriguez et al. 2001; Guard et al. 2017; McGuire, McGuire 2017; Gueimonde et al. 2007; Jost et al. 2014; Perez et al. 2007).

Ainsi, une dérive de la flore intestinale de la mère peut perturber le développement physiologique du fœtus et entraîner une dysbiose chez le chiot nouveau-né.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE SUR LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ LA CHIENNE EN GESTATION ET EN LACTATION

1. PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

L'objectif de notre étude était d'évaluer la composition et les modifications du microbiote intestinal chez la chienne au cours de la gestation et de la lactation.

De par son rôle central dans la santé, il semble important que le jeune acquière un microbiote bien équilibré dès sa naissance. Dans la mesure où il existe un lien entre microbiote intestinal maternel et microbiote du jeune, les variations du microbiote intestinal de la mère au cours de la gestation et de la lactation semblent donc primordiales. Or, le microbiote intestinal n'a jamais été évalué chez la chienne gravide malgré son importance pour le nouveau-né ou encore pour les statuts hormonal, immunitaire, inflammatoire et métabolique de la femelle, bouleversés au cours de la gestation.

Cette étude vise à établir un lien entre évolution du microbiote au cours du temps et adaptation de l'organisme maternel à la gestation et à la lactation.

Nos hypothèses sont les suivantes :

- L'alpha-diversité (la richesse bactérienne ou diversité chez une même chienne) et la bêta-diversité (profil bactérien ou diversité entre les différentes chiennes) évoluent au cours de la gestation et de la lactation ;
- L'abondance des différents taxa de bactéries évolue de manière significative au cours de la gestation et de la lactation.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Animaux inclus dans l'étude

Notre étude s'est déroulée entre Novembre 2020 à Avril 2021 au sein d'un élevage canin. Quarante chiennes reproductrices de formats raciaux moyen (> 15kg) et grand (>25kg) ont été mises à la saillie à J1 et J2 post-ovulation, le jour d'ovulation étant défini par une progestéronémie supérieure à 8 ng/mL. Un diagnostic de gestation par échographie réalisé entre 25 et 30 jours post-ovulation a confirmé une gestation chez 36 chiennes.

Les trente-six chiennes incluses par la suite dans l'étude étaient de 9 races différentes (Tableau 2). Les chiennes avaient un âge moyen de 3,3 ans +/-1,1 an (moyenne +/- écart-type).

Au premier jour de l'étude (à J28 post-ovulation), les chiennes présentaient une note d'état corporel (NEC évaluée sur 9 points) de 5 +/- 1, associée à un poids de 23,4 kg +/- 3,4 kg pour les races de format moyen et de 31,8 kg +/- 3,8 kg pour les races de grand format. Au début de l'étude, 15 chiennes présentaient un poids optimal (NEC de 4 et 5), 2 chiennes étaient considérées en sous-poids (NEC de 2 et 3), 17 chiennes en surpoids (NEC de 6 et 7) et 2 comme obèses (NEC de 8 et 9). Cinq chiennes de l'étude étaient primipares, 16 chiennes avaient eu entre une et trois portées, 14 chiennes avaient eu plus de trois portées.

Tableau 2: Caractéristiques de 36 chiennes incluses dans l'étude à J28 de gestation

	Formats raciaux et races		Parité et âge initial (en années)			NEC (J28)		Poids (J28) en kg	
	Moyen	Grand	0	1-3	>3	1-5	6-9	<30	>30
	- Berger Australien : 8	- Berger Allemand : 1	- 1,1	- 1,9	- 3,3	- 3/9 : 2	- 6/9 : 11	- 18,9	- 30,2
	- Dalmatien : 1	- Berger Blanc Suisse : 3	- 1,2	- 2,5	- 3,5	- 4/9 : 9	- 7/9 : 6	- 19,7	- 30,3
		- Bouvier Bernois : 6	- 1,6	- 2,5	- 3,5	- 5/9 : 6	- 8/9 : 2	- 20,0	- 31,0
		- Boxer : 1	- 1,9	- 2,6	- 3,7			- 20,4	- 31,1
		- Golden Retriever : 8	- 3	- 2,7	- 4,1			- 21,1	- 31,9
		- Labrador : 6		- 2,7	- 4,1			- 21,2	- 32,0
		- Montagne des Pyrénées : 2		- 2,7	- 4,3			- 21,9	- 32,4
				- 2,7	- 4,4			- 22,5	- 32,7
				- 3	- 4,5			- 24,6	- 32,8
				- 3	- 4,9			- 24,8	- 33,8
				- 3,1	- 5,1			- 26,4	- 34,1
				- 3,1	- 5,6			- 26,8	- 34,8
				- 3,3	- 5,9			- 27,4	- 35,5
				- 3,4	- 5,9			- 27,6	- 38,0
				- 3,4				- 28,1	- 38,6
				- 3,4				- 28,4	
								- 28,4	
								- 28,5	
								- 28,7	
								- 28,8	
								- 29,0	
Total	9	27	5	16	14	17	19	21	15

2.2. Logements et conditions de vie des animaux

L'étude s'est déroulée dans un unique élevage canin français. Toutes les chiennes ont été logées et nourries selon les mêmes conditions.

De la fécondation à la dernière semaine avant la date prévue de mise-bas, les femelles ont été logées dans des parcs individuels extérieurs, dans un bâtiment dédié aux femelles gestantes. Elles ont reçu un unique repas par jour (composition et ration détaillées en 2.4.) et de l'eau à volonté.

Entre cinq et huit jours avant la date prévue de mise-bas, les femelles ont été transférées vers la maternité où elles ont logé dans des box individuels. La moitié de la surface au sol de chaque box était pourvue d'un système de chauffage. Deux jours avant la date prévue de mise-bas, une à deux lampes chauffantes ont été installées. Les femelles ont reçu deux repas par jour répartis dans deux gamelles.

Entre cinq et six semaines après la mise-bas, les femelles ont été déplacées dans un bâtiment dit de nurserie où elles sont restées jusqu'au sevrage des chiots, à savoir entre 8 et 9 semaines. Une lampe chauffante y a été installée pour les chiots jusqu'à 7 semaines d'âge.

La distribution de la nourriture a été identique à ce qui avait été fait en maternité. L'eau a été distribuée à volonté dans une gamelle ainsi que dans un système d'abreuvoir automatique.

2.3. Protocole de prophylaxie médicale des mères

Au cours du mois précédant l'ovulation, les femelles ont reçu deux vaccins :

- **Vaccin VANGUARD® CPV** (Zoetis, Malakoff, France) : Parvovirus canin (virus atténué),
- **Vaccin BIOCAN Novel® DHPPi+L4** (Bioveta, Ivanovice na Hané, République Tchèque) : Virus de la Maladie de Carré (virus atténué), Adénovirus canin de type 2 (virus atténué), Parvovirus canin de type 2b (virus atténué), Parainfluenza canin de type 2 (virus atténué), *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, serovar *bratislava* et serovar *canicola* (inactivés), *Leptospira kirschneri* serovar *grippotyphosa* (inactivé).

A l'entrée en maternité, les futures mères ont reçu une pulvérisation contenant un traitement antiparasitaire : 1 mL/L d'eau, phoxime, SEBACIL® 50% Solution, 500 mg/mL (Elanco, Cuxhaven, Allemagne).

2.4. Régime alimentaire des mères

2.4.1. Régime alimentaire des mères au cours de la première partie de gestation

Au cours de la première partie de gestation (de l'ovulation au 30^{ème} jour de gestation), les mères ont été nourries avec un aliment complet sec pour chien adulte (Annexe 1). La conservation de l'aliment s'est faite dans un endroit frais et sec.

La ration alimentaire des futures mères a été calculée de la manière suivante (g/j) :

$$\text{Ration} = \frac{BE}{EM}$$

Avec BE, le besoin énergétique (en kcal/j) :

$$BE = 130 \times PV^{0.75} \times k$$

Avec PV le poids vif (en kg) et k le facteur de correction du statut physiologique (ici k = 1,1 car en gestation)

Et EM, l'énergie métabolique de l'aliment (kcal/g) :

$$EM = \frac{0.1464 \times \%PB + 0.3556 \times \%MG + 0.1464 \times \%ENA}{4.1855}$$

Avec %PB le taux de protéines brutes (en %), %MG le taux matière grasse (en %), ENA le taux d'énergie non azotée (en %) et 4.1855 le taux de conversion d'une calorie en Joule

2.4.2. Régime alimentaire des mères au cours de la seconde partie de gestation et au cours de la lactation

A partir du 30^{ème} jour de gestation et tout au long de la lactation, les chiennes ont reçu un aliment complet sec pour chiots (Annexe 2) deux fois par jour. L'aliment a été conservé en intérieur dans un endroit frais et sec. La quantité de croquettes distribuée a été adaptée tous les jours à chaque chienne en fonction de la consommation de la veille et de leur prise de poids hebdomadaire.

2.5. Mesure des paramètres de santé de la mère

Chaque chienne a été suivie durant 12 semaines (+/- 5 jours), du jour de l'ovulation au 58^{ème} jour *post-partum*.

Le protocole expérimental est présenté en Figure 2.

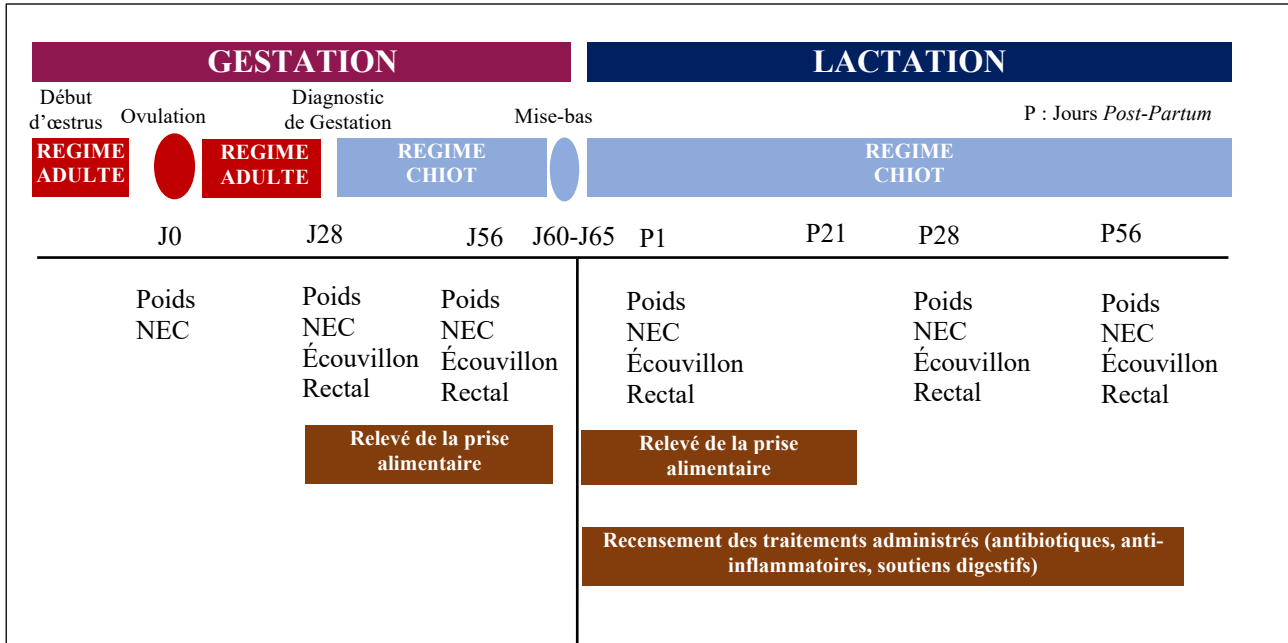


Figure 2: Synthèse du protocole expérimental. Les jours de suivis ont été codifiés selon la période *ante-partum* (J) et *post-partum* (P), suivie du numéro du jour correspondant (Jn est le n-ème jour de la période *ante-partum*, avec n=0 le jour de l'ovulation; Pn est le n-ème jour de la période *post-partum*, avec n=0 le jour de la mise-bas)

Tous les traitements mis en place chez les différentes chiennes au cours de la gestation et de la lactation ont été systématiquement recensés.

2.5.1. Suivi de la prise alimentaire

La prise alimentaire a été mesurée quotidiennement entre J28 et J56 au cours de la gestation et entre P1 et P21 au cours de la lactation.

A l'aide d'une balance électronique (capacité 5000g, précision 1g, B08HQ6VND3, EDCO Eindhoven BN, Eindhoven, Pays-Bas), le contenu des gamelles a été pesé avant et après chaque repas. La différence entre la quantité de croquettes distribuée et la quantité de croquettes

restante le lendemain a été calculée et a permis de déduire la prise alimentaire de la veille afin d'adapter la ration du jour.

2.5.2. Suivi du poids

Au cours de la gestation, les mères ont été pesées à J0 (jour de l'ovulation), J28 et J56 post-ovulation. Au cours de la lactation, elles ont été pesées à P1 (lendemain de la mise-bas), P28 et P56 (c'est-à-dire 28 et 56 jours post-partum).

Les mères ont été pesées à l'aide d'une balance électronique (capacité 200 kg, précision 100g, Soehnle Industrial Solutions GmbH, Backnang, Allemagne).

2.5.3. Suivi de la Note d'État Corporel

A chaque pesée des mères, la Note d'Etat Corporelle (NEC) a été évaluée à partir de la grille disponible en Annexe 3. La NEC s'évalue selon un système de notation allant de 1 (maigreur sévère) à 9 (obésité morbide).

Les NEC ont été évaluées par différents opérateurs ayant suivi la même formation.

2.5.4. Pathogènes et traitements

Certains pathogènes étaient connus comme circulants dans l'élevage tels que le parvovirus, le coronavirus digestif et *Giardia spp.*

Dans le cas où les mères présentaient des signes cliniques (diarrhée, hyperthermie, mammite, éternuements, abattement), des traitements ont été mis en place par le personnel de l'élevage, sans confirmation du diagnostic par des tests de dépistage.

Les traitements antibiotiques ayant été administrés sont les suivants :

- Principe actif : Métronidazole

- FLAGYL® : 25 mg/kg PO, comprimés de 500 mg (Sanofi, Paris, France),
- ERADIA ® : 50 mg/kg PO, suspension buvable 125 mg/mL (Virbac, Carros, France),
- METRONIDAZOLE BIOGARAN ® : 25 mg/kg PO, comprimés de 500 mg (Biogaran, Colombes, France).

- Principe actif : Amoxicilline, acide clavulanique

- SYNULOX® : 14 mg/kg IM, suspension injectable 140 mg/mL d'amoxicilline et 35 mg/mL d'acide clavulanique (Zoetis, Malakoff, France).

- Principe actif : Benzylpenicilline, Dihydrostreptomycine

- SHOTAPEN® : 5,3 mg/kg IM de benzylpenicilline 130,38 mg/mL et 6,7 mg/kg IM de dihydrostreptomycine 164 mg/mL (Virbac, Carros, France).

- Principe actif : Doxycycline

- DOXYVAL® : 10 mg/kg PO, comprimés de 100 mg (Ceva, Santé animale, Libourne, France).

Les traitements anti-inflammatoires ayant été administrés sont les suivants :

- Principe actif : Méloxicam (AINS)

- INFLACAM® : 0,2 mg/kg SC, suspension injectable 20 mg/mL (Virbac, Carros, France),
- METACAM® : 0,2 mg/kg SC, suspension injectable 5 mg/mL (Boehringer Ingelheim Animal health France, Lyon, France).

- Principe actif : Dexaméthasone (AIS)

- DEXALONE® : 0,09 mg/kg IM, suspension injectable 1,8 mg/mL (Dopharma France SAS, Vair sur Loire, France).

Les traitements de soutien digestif ayant été administrés sont les suivants :

- Probiotiques et prébiotiques :

- ENTEROMICRO® : *Enterococcus faecium* et prébiotiques, Complexe (MP Labo, Grasse, France),
- SYNBIOTIC D-C® : *Enterococcus faecium* et prébiotiques (TVM France, Lempdes, France).

- Argile : argile bentonite, smectite 75% (Lafaure SAS, Mazeyrolles, France).

En cas d'otite les traitements auriculaires suivants ont été administrés :

- Nettoyant auriculaire :

- OTOPROF® (MP Labo, Grasse, France),
- OREXIDINE® (MP Labo, Grasse, France).

- Suspension auriculaire EASOTIC® : hydrocortisone 1,11 mg/mL, miconazole 15,1 mg/mL, gentamicine 1505 UI/mL (Virbac, Carros, France).

En cas de dermatose, les traitements dermatologiques suivants ont été administrés :

- Pommade nettoyante et antiseptique DERMAFLON® : acide malique 3,75 mf, acide benzoïque 0,25 mg et acide salicylique 0,06 mg (Zoetis, Malakoff, France).

En cas de dystocie, de l'ocytocine a été administrée aux femelles (entre 5 et 10 UI en intramusculaire, OCYTOVEM ®, 10 UI/mL (CEVA Santé animale, Libourne, France)).

Une seule chienne a nécessité une césarienne après la naissance de 10 chiots par voie naturelle dont un chiot mort-né et un chiot euthanasié en raison d'une malformation ano-rectale. La chirurgie a résulté en un chiot mort-né.

2.6. Prélèvements réalisés sur les mères

2.6.1. Réalisation des prélèvements

Des écouvillons rectaux ont été réalisés à J28 et J56 (28 et 56 jours post-ovulation) ainsi qu'à P1 (lendemain de la mise-bas), P28 et P56 (28 et 56 jours post-partum) à l'aide d'écouvillons stériles (Écouvillon sec stérile, COPAN). L'écouvillon a été introduit à environ 2 cm de profondeur dans le rectum puis tourné 2 fois. Les prélèvements ont été réalisés en évitant au maximum une contamination de l'écouvillon par le milieu extérieur.

2.6.2. Stockage des prélèvements

Après identification, les prélèvements ont été stockés à une température de -20°C dans un congélateur sur le lieu d'expérimentation.

Lorsque le nombre de prélèvements a été suffisamment important et maximum 1 mois après la date de prélèvement, les échantillons ont été envoyés au laboratoire d'analyse dans de la carboglace. Ils ont ensuite été stockés à -80°C au laboratoire jusqu'à leur analyse.

2.7. Traitements des échantillons

L'extraction d'ADN à partir des écouvillons rectaux a été réalisée au sein du laboratoire Lallemand (Lallemand SAS, Blagnac, France) à l'aide du kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research, ville, USA). La PCR a été effectuée au niveau des régions V3-V4 du gène ARN 16S (gènes spécifiques des bactéries). Les amorces universelles utilisées sont : 341F (Muyzer, de Waal, Uitterlinden 1993) et 806R (Caporaso et al. 2011). Les PCR ainsi que le séquençage de l'ADN ont été réalisés au sein du laboratoire GenoToul GET (GenoToul, INRAE, Auzeville, France) avec la plateforme Illumina HiSeq.

2.8. Analyse des données

2.8.1. Préparation des données de séquençage

Les données de séquençage ont été analysées en suivant un pipeline de bioinformatique basé sur les recommandations FROGS (Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution) (Escudé et al. 2018).

Après l'étape de nettoyage de données, les séquences ont été classées en OTUs (Unités Taxonomiques Opérationnelles) puis assignées au niveau des différents taxa selon la base SILVA version 138.

Dans cette étude, ont été gardés les OTUs :

- Présents dans au moins 5 échantillons,
- Possédant plus de 0,005% des séquences,
- N'appartenant pas à phiX (ADN utilisé pour « booster » le séquençage).

Les chimères, séquences d'ADN obtenues à partir de deux séquences mère et père, ont été retirées. Pour retirer ces chimères, FROGS vérifie que les séquences mère et père sont dans le même cluster que la chimère. Si c'est le cas, celle-ci est gardée, sinon elle est retirée.

Dans l'idéal, une identification du micro-organisme se fait jusqu'au rang d'espèce. Mais dans la grande partie des cas, les derniers niveaux de classification taxonomique n'ont pas été accessibles.

Pour rappel, les différents rangs taxonomiques sont : Règne – Phylum – Classe – Famille – Genre – Espèce. Dans notre étude, la plupart des micro-organismes ont été identifiés jusqu'au rang de Famille.

Lorsque les taxa d'une séquence n'ont pas été reconnus, ceux-ci ont été classés comme inconnus (ex. « unknown family / unknown genus / unknown species »). Dans le cas où un OTU était composé de séquences différentes, l'ensemble des taxa à partir de ce rang a été considéré comme des « multi-affiliations ».

2.8.2. Analyse d'alpha diversité

L'analyse de l'alpha-diversité a été réalisée à partir de la table d'abondance des OTUs. La diversité alpha mesure la richesse intra-échantillon. Dans notre étude, elle correspond à la diversité d'OTUs chez une même chienne. L'alpha-diversité a été mesurée selon l'indice d'InvSimpson qui met en évidence la probabilité inverse que deux séquences bactériennes sélectionnées au hasard dans une population appartiennent à la même espèce.

Afin de mettre en évidence l'effet de la date de prélèvement sur l'alpha-diversité ainsi que sur l'abondance des taxa, un premier test statistique non paramétrique pour données appariées a été réalisé avec le logiciel R (package stats) : ANOVA de Friedman.

Dans le cas où la p-value du test ANOVA est $< 0,05$, plusieurs tests de Wilcoxon pour données appariées ont été réalisés (tests non paramétriques) afin de déterminer précisément entre quelles variables la ou les différences significatives sont observées (test de comparaison multiple). Une correction de Bonferroni a alors été appliquée à ces tests pour corriger les seuils des tests de comparaisons multiples. Dans notre cas, 4 comparaisons ont été réalisées donc, si la p-value est inférieure à 0,0125, la variation a été considérée comme significative. Les variations significatives sont reportées sur les graphiques par une *.

2.8.3. Analyses de bêta-diversité

L'analyse de la bêta-diversité a été réalisée à partir de la table d'abondance des OTUs. La diversité bêta mesure la diversité inter-échantillons. Elle est calculée à partir de l'abondance relative des taxons. Dans notre étude, la bêta-diversité correspond à la diversité microbienne

qui existe entre toutes les chiennes de l'étude. Autrement dit, c'est l'« effort » qu'il faudrait apporter pour transformer une communauté (chienne 1) en une autre (chienne 2). La bêta-diversité a été mise en évidence selon l'indice de Bray Curtis. C'est une méthode quantitative qui permet d'évaluer les différences entre deux échantillons en comparant l'abondance des OTUs dans chacun de ces échantillons. Si l'indice de Bray Curtis est proche de 0, cela signifie que les populations présentent une majorité d'OTUs en commun, avec des valeurs d'abondance proches.

Afin de comparer statistiquement l'index de Bray Curtis entre deux dates, une analyse de variance multivariée par permutations (PERMANOVA à 9999 permutations) a été réalisée à l'aide du package *vegan* de R. Si la p-value était inférieure à 0,05, la variation a été considérée comme significative.

2.8.4. Analyses de la composition

Des tests statistiques ont été réalisés au niveau de trois taxa : phylum, famille, genre.

Un test statistique non paramétrique pour données appariées (ANOVA de Friedman) a tout d'abord été réalisé. Dans le cas où ce test a mis en évidence une variation significative de l'abondance au cours du temps, plusieurs tests de Wilcoxon pour données appariées ont été réalisés. Comme dans le cas de l'analyse de l'alpha-diversité, une correction de Bonferonni a été appliquée (quatre comparaisons ont été effectuées donnant ainsi une p-value de référence de 0,0125).

De plus, des analyses statistiques (tests de Student après normalisation des données) grâce aux logiciels FROGS et Galaxy (Goecks et al. 2010) ont été réalisés afin de mettre en évidence le degré de similitude entre des populations bactériennes entre deux dates. Ces résultats sont représentés dans la partie 3. sous la forme de Volcano-Plot. Chaque point représente un OTU. L'abscisse correspond au log-ratio et l'ordonnée correspond à la p-value ajustée. Ainsi, plus le nombre d'OTUs assimilé avec une p-value ajustée $< 0,05$ est grand, plus les populations microbiennes entre les deux dates sont similaires. Par exemple, pour une comparaison entre J28 et J56, les points verts correspondent aux OTUs les plus représentés à J28 et les points orange à J56. Les points gris représentent des OTUs qui ne sont pas significativement plus présents à J28 qu'à J56.

L'ensemble des analyses et graphiques réalisés dans cette étude ont été générés avec la plateforme Galaxy (Goecks et al. 2010) et le logiciel R Studio (version 4.2.0) (R Studio Team 2022). Les données sont présentées avec des graphiques de type boîte à moustache. Les traits représentés sur les boîtes à moustache correspondent à (de bas en haut) : valeur minimale, quartile 1, médiane, quartile 3 et valeur maximale. Les points représentent les valeurs extrêmes. Les variations significatives sont reportées sur les graphiques par une *.

3. RÉSULTATS

3.1. Description de la population

Dans cette partie nous allons présenter l'évolution des différents paramètres de santé des 36 chiennes incluses dans notre étude tels que la NEC, le poids, la prise alimentaire et les traitements administrés.

3.1.1. Suivi de la NEC

En moyenne, les chiennes ne présentaient pas de variations importantes de leur NEC au cours de la gestation ou de la lactation, à part au moment de la mise-bas (Figure 3). En effet, on observe une chute de la NEC dans les jours précédant la mise-bas (de J56 à P1) puis une augmentation de celle-ci au cours de la lactation (de P1 à P28 puis de P28 à P56).

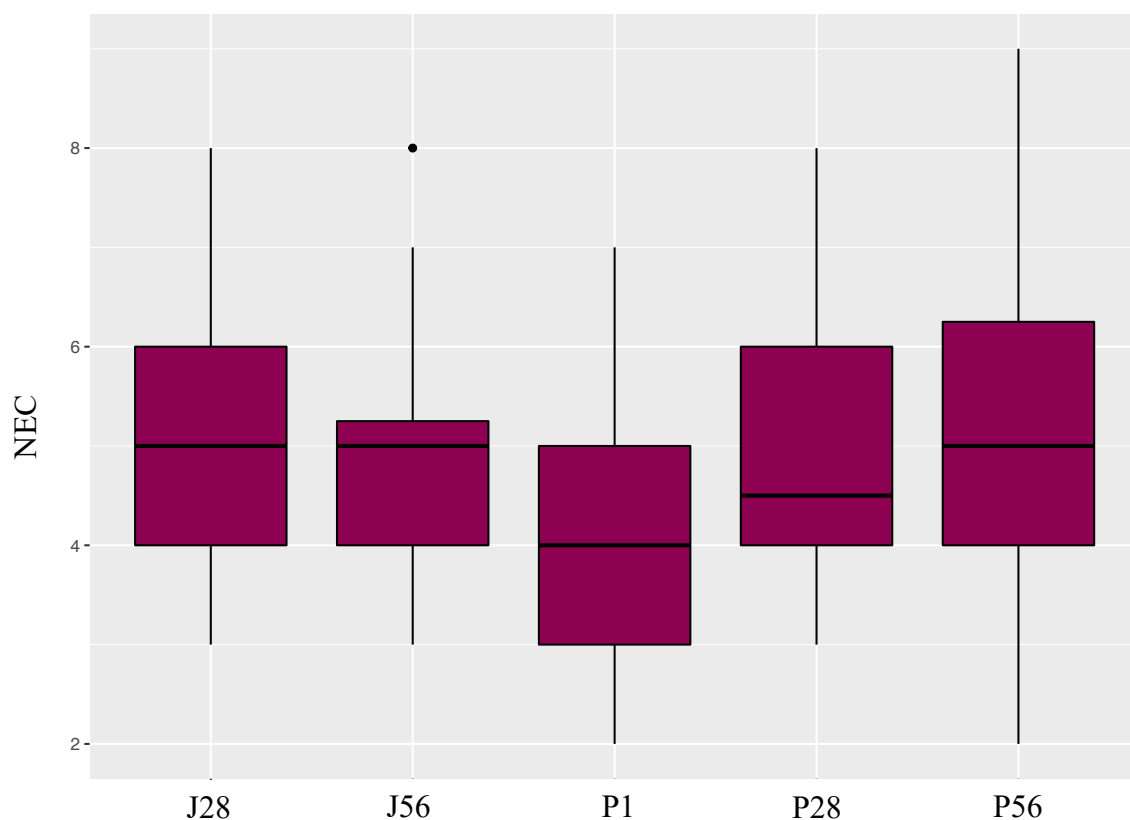


Figure 3: Evolution de la note d'état corporel des 36 chiennes de l'étude entre le jour d'ovulation (J0) puis au cours de la gestation (J28, J56) et au cours de la lactation (P1, P28, P56)

3.1.2. Suivi de la prise alimentaire

Une augmentation de la prise alimentaire a été observée chez les chiennes au cours de temps avec un pic pendant la période de lactation (Figure 4).

Lors de la gestation (de J30 à P0, jour de mise-bas), les chiennes mangeaient en moyenne 551 g +/- 8g de croquettes. En première partie de lactation (de P0 à P21), elles ingéraient 831g +/- 192g de croquettes et 1034g +/- 358g en seconde partie de lactation (de P21 à P56).

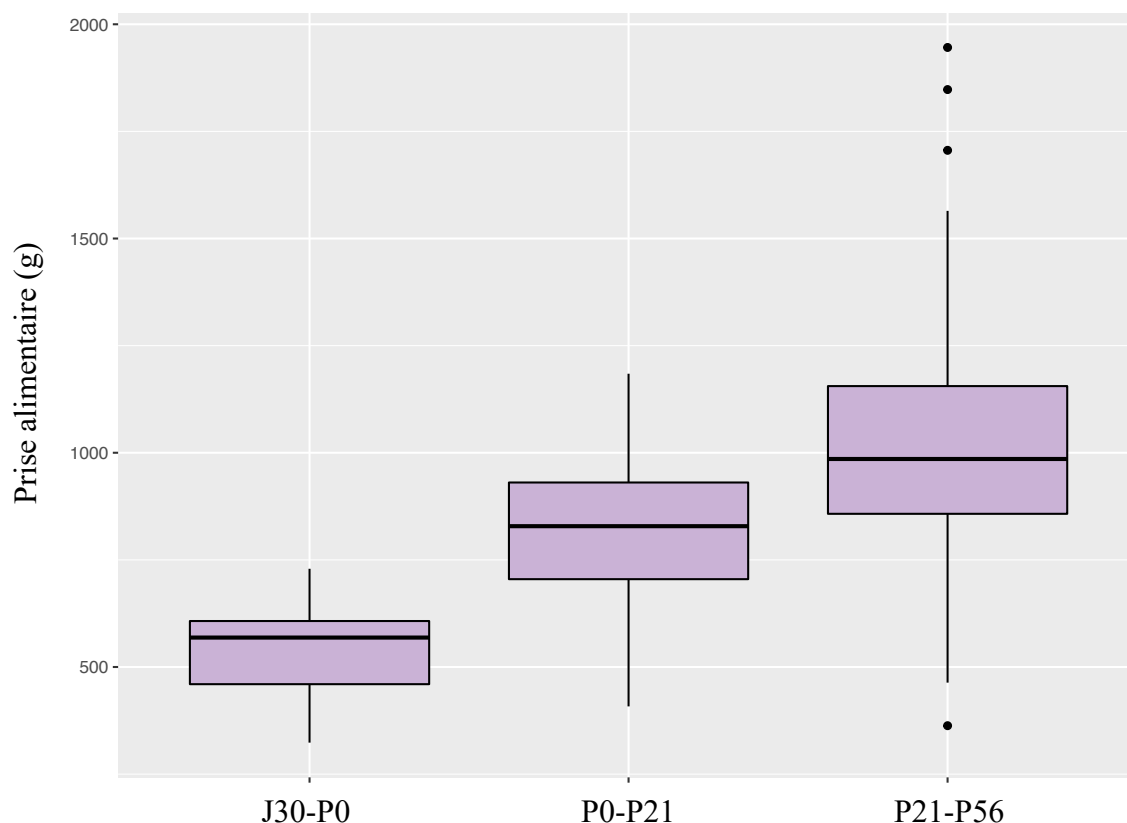


Figure 4: Evolution de la prise alimentaire des 36 chiennes de l'étude sur trois périodes : en cours de gestation (de J30 à P0, jour de mise-bas), en première partie de lactation (de P0 à P21) et en seconde partie de lactation (de P21 à P56)

3.1.3. Suivi du poids

Les courbes de poids au cours de la gestation et de la lactation des chiennes de moyens (Figure 5) et de grands formats (Figure 6) suivent la même évolution.

Une prise de poids en seconde partie de gestation a été observée pour l'ensemble des chiennes (de J28 à J56) avec une augmentation moyenne de 5,4 kg +/- 0,6kg chez les chiennes de grand format et de 4,4 +/- 0,3 kg chez les chiennes de moyen format.

Dans les jours suivant la mise-bas (de J56 à P1), les chiennes ont présenté une diminution de leur poids : de 6,2 kg +/- 0,5 kg pour les grandes races et de 4,7 kg +/- 0,5 kg pour les races moyennes.

Au cours de la première partie de la lactation, les chiennes de l'étude ont à nouveau présenté une prise de poids : de 1,3 kg +/- 0,4 kg pour les grandes races et de 1,5 kg +/- 0,8 kg pour les races moyennes.

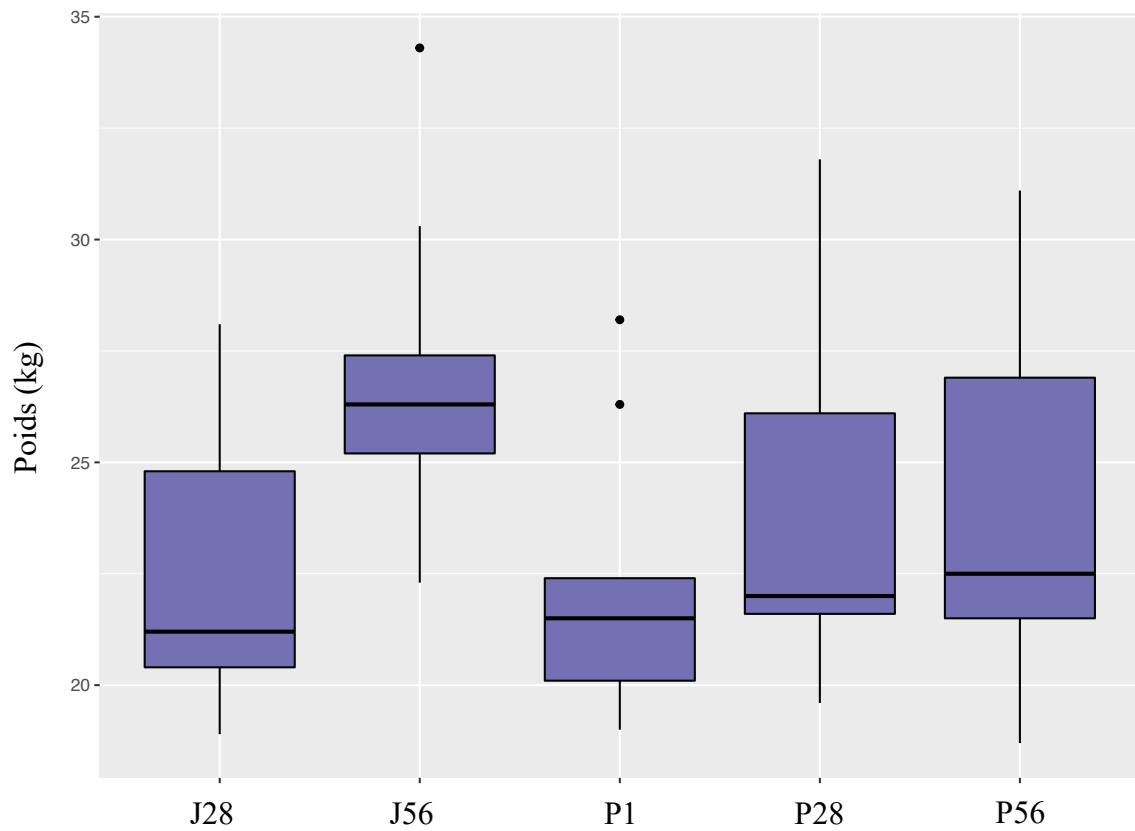


Figure 5: Evolution du poids des 36 chiennes de moyen format au cours de la gestation (J28, J56) et au cours de la lactation (P1, P28, P56)

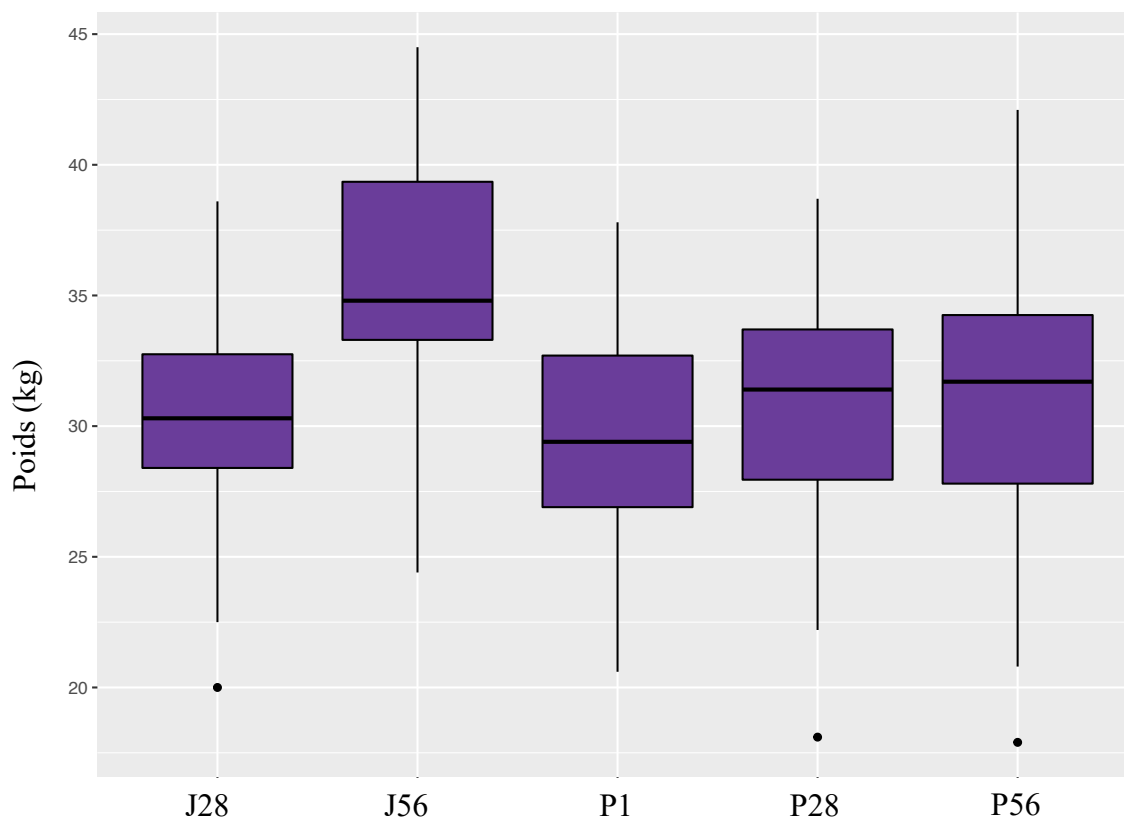


Figure 6: Evolution du poids des 36 chiennes de grand format au cours de la gestation (J28, J56) et au cours de la lactation (P1, P28, P56)

3.1.4. Synthèse des traitements administrés aux chiennes au cours de l'étude

En *ante-partum*, 5 chiennes ont reçu des antibiotiques dont 2 dans les jours précédant la mise-bas (de J56 à P1). Une seule chienne a reçu des prébiotiques et probiotiques au cours de la gestation. Une seule a reçu des AINS (Anti-inflammatoires non-stéroïdiens) et une seule autre a reçu des AIS (anti-inflammatoires stéroïdiens).

En *post-partum*, 19 chiennes ont reçu des antibiotiques, 9 chiennes ont reçu des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et 2 des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS). 3 chiennes ont reçu de l'argile et 4 chiennes ont reçu des probiotiques et prébiotiques.

Les périodes d'administration des différents médicaments ainsi que les pourcentages de chiennes en ayant reçu sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Récapitulatif des traitements administrés aux 36 chiennes de l'étude au cours des différentes périodes (en pourcentage de chiennes ayant reçu le traitement)

	J1-J28	J28-J56	J56-P1	P1-P28	P28-P56
Antibiotiques (%)	0	8,3	8,3	44,4	16,7
Pro/Prébiotiques (%)	2,8	0	0	2,8	11,1
Argile (%)	0	0	0	0	8,3
AINS (%)	2,8	0	0	19,4	8,4
AIS (%)	0	2,8	0	2,8	5,6

3.2. Alpha-diversité

Des variations significatives de l'alpha-diversité au cours du temps ont été observées dans notre étude ($p < 0,001$; Figure 7). Une diminution significative de l'indice d'InvSimpson a été notée au cours de la gestation (entre J28 et J56), suivie d'une augmentation significative dans les jours précédant la mise-bas (entre J56 et P1). L'alpha-diversité a continué d'augmenter significativement dans la première partie de lactation (entre P1 et P28), mais pas en fin de lactation.

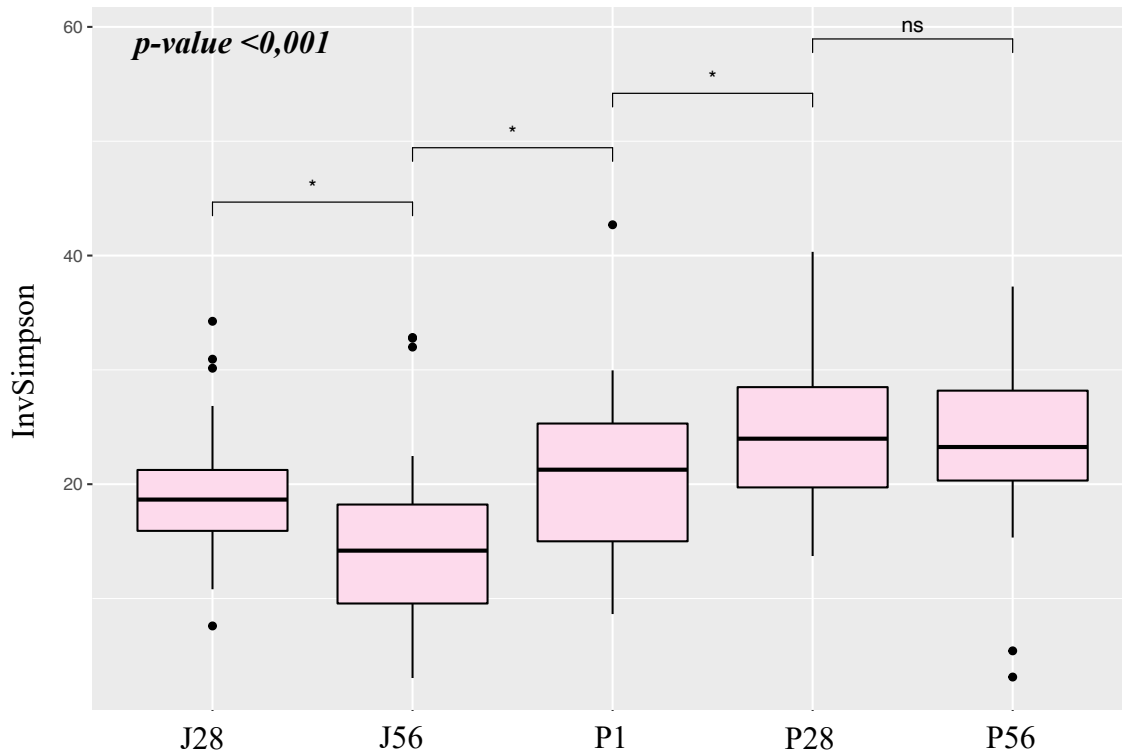


Figure 7: Variations de la richesse bactérienne intra-échantillon (alpha-diversité) chez les 36 chiennes selon leur stade physiologique : en gestation (J28, J56) ou en lactation (P1, P28, P56) –Méthode utilisée : InvSimpson

3.3. Bêta-diversité

Les tests d'ANOVA par permutations ont mis en évidence une variation significative des profils bactériens entre les chiennes à différents stades de gestation et de lactation, excepté pour la comparaison entre J28 et J56 (Tableau 4).

Tableau 4: Résultats du test d'ANOVA par permutation réalisé afin de comparer deux à deux les profils bactériens des 36 chiennes selon le stade de gestation ou de lactation via l'indice de Bray Curtis (J28, J56 au cours de la gestation et P1, P28 et P56 au cours de la lactation)

	J28	J56	P1	P28	P56
J28					
J56	0,14				
P1	0,01	0,01			
P28	0,01	0,01	0,01		
P56	0,01	0,01	0,01	0,01	

Trois profils bactériens sont distinguables selon le résultat de l'analyse en composantes principales (Figure 8) : premier profil au cours de la gestation, deuxième profil en *post-partum* et troisième lors de la lactation.

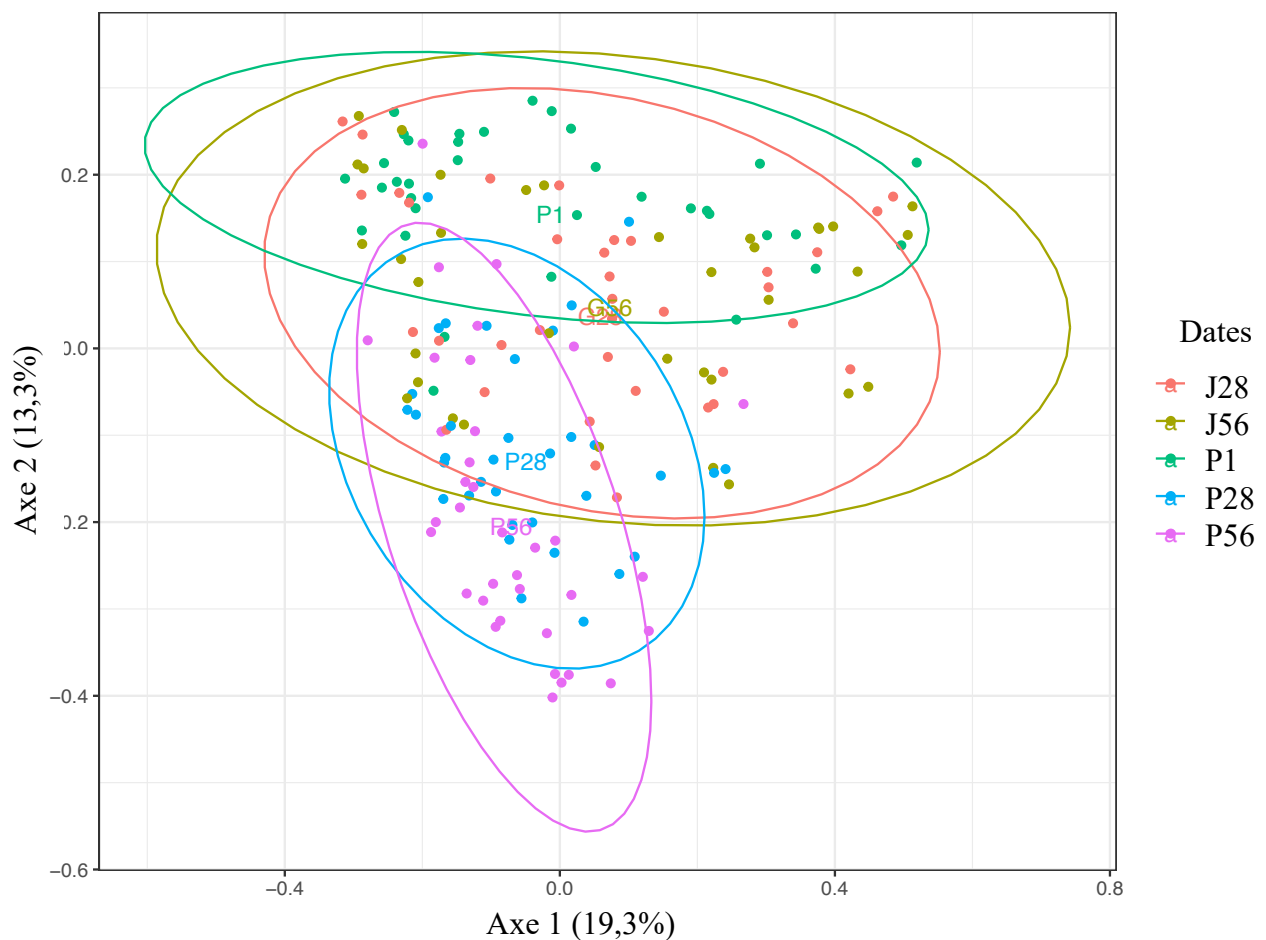


Figure 8: Profils bactériens (bêta-diversité) chez les 36 chiennes selon leur stade physiologique: en gestation (J28, J56) ou en lactation (P1, P28, P56). Méthode utilisée : analyse en composantes principales (indice de Bray Curtis)

3.4. Abondance des différents taxa au cours de la gestation et de la lactation

3.4.1. Principaux phylums et leur évolution au cours du temps

Dans notre étude, cinq principaux phylums ont été mis en évidence chez les chiennes en gestation et en lactation : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et Fusobacteria.

Le phylum Firmicutes s'est montré majoritaire tout au long de la gestation et de la lactation mais les proportions entre les différents phylums ont présenté une variation au cours du temps (Tableau 5 ; Figure 9.A). En effet, des variations significatives ont été observées pour les phylums suivants : Firmicutes, Bacteroidetes et Proteobacteria (Tableau 5 ; Figure 9.B).

Une augmentation significative a été observée pour le phylum Firmicutes en *post-partum* par rapport à la fin de la gestation : l'abondance relative a été de 36% à J56 et de 55% à P28 (Tableau 5 ; Figure 9.C).

Une augmentation significative de l'abondance du phylum Bacteroidetes a été observée dans les jours précédant la mise-bas (de 16% à J56 à 25% à P1) suivie d'une diminution significative en première partie de lactation (de 25% à P1 à 17% à P28). On observe les mêmes variations de l'abondance du phylum Proteobacteria au cours du temps (de 6% à J56 à 10% à P1, puis 5% à P28) (Tableau 5 ; Figure 9.C).

Tableau 5: Abondance des cinq principaux phylums chez 36 chiennes de l'étude au cours de la gestation (J28 et J56) et de la lactation (P1, P28 et P56) dans l'ordre décroissant

	J28	J56	P1	P28	P56
1	Firmicutes (44,0%)	Firmicutes (36%)	Firmicutes (32%)	Firmicutes (55%)	Firmicutes (50%)
2	Bacteroidetes (19%)	Actinobacteria (27%)	Bacteroidetes (25%)	Bacteroidetes (17%)	Bacteroidetes (19%)
3	Actinobacteria (15%)	Bacteroidetes (16%)	Actinobacteria (17%)	Fusobacteria (14%)	Fusobacteria (14%)
4	Fusobacteria (15%)	Fusobacteria (14%)	Fusobacteria (16%)	Actinobacteria (7%)	Actinobacteria (8%)
5	Proteobacteria (6%)	Proteobacteria (6%)	Proteobacteria (10%)	Proteobacteria (5%)	Proteobacteria (6%)

Principaux phylums observés au cours du temps – Abondance relative

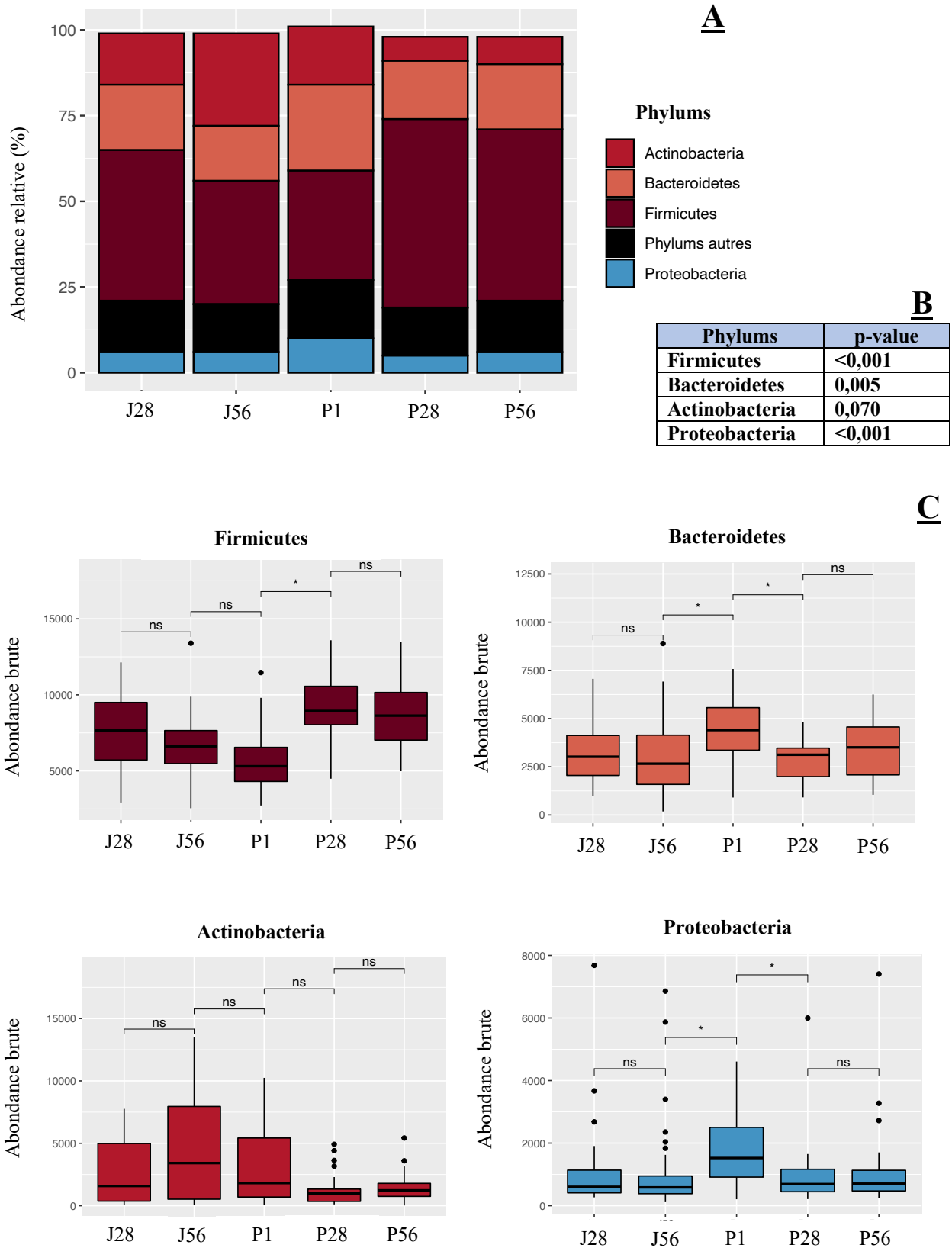


Figure 9: Evolution des principaux phylums observés au cours de la gestation et de la lactation chez les 36 chiennes de l'étude. A- l'abondance relative de l'ensemble des phylums ; B- résultats d'analyses statistiques de l'évolution au cours du temps pour chaque phylum ; C- Evolution de l'abondance brute des 4 phylums

3.4.2. Volcano-Plot

Les analyses *via* le Volcano-Plot, comparant les populations microbiennes entre deux dates, ont permis de mettre en évidence des populations microbiennes relativement proches au cours de la gestation (entre J28 et J56, Figure 10) et au cours de la seconde partie de la lactation (entre P28 et P56, Figure 11).

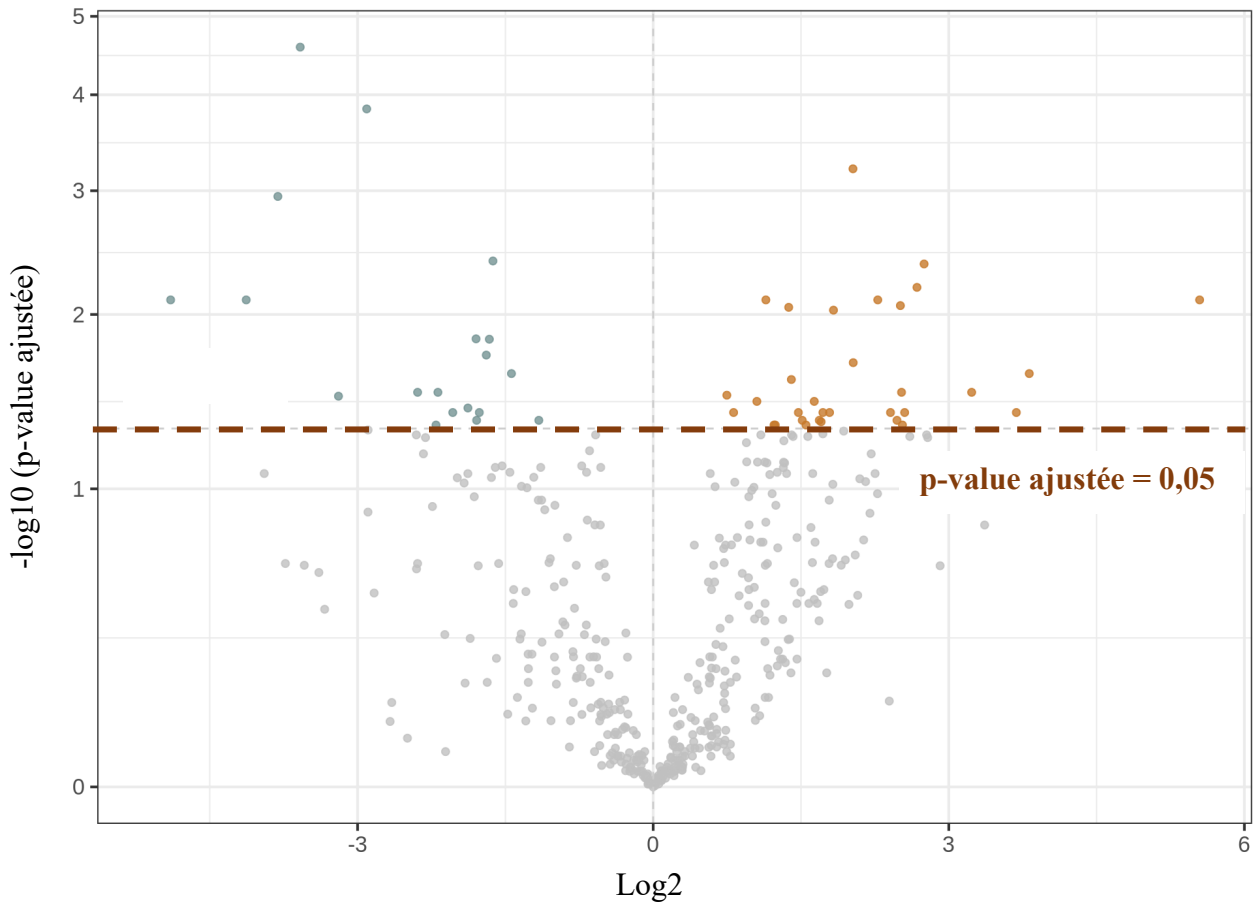


Figure 10: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de $p=0.05$) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la gestation à J28 (points verts) et à J56 (points orange)

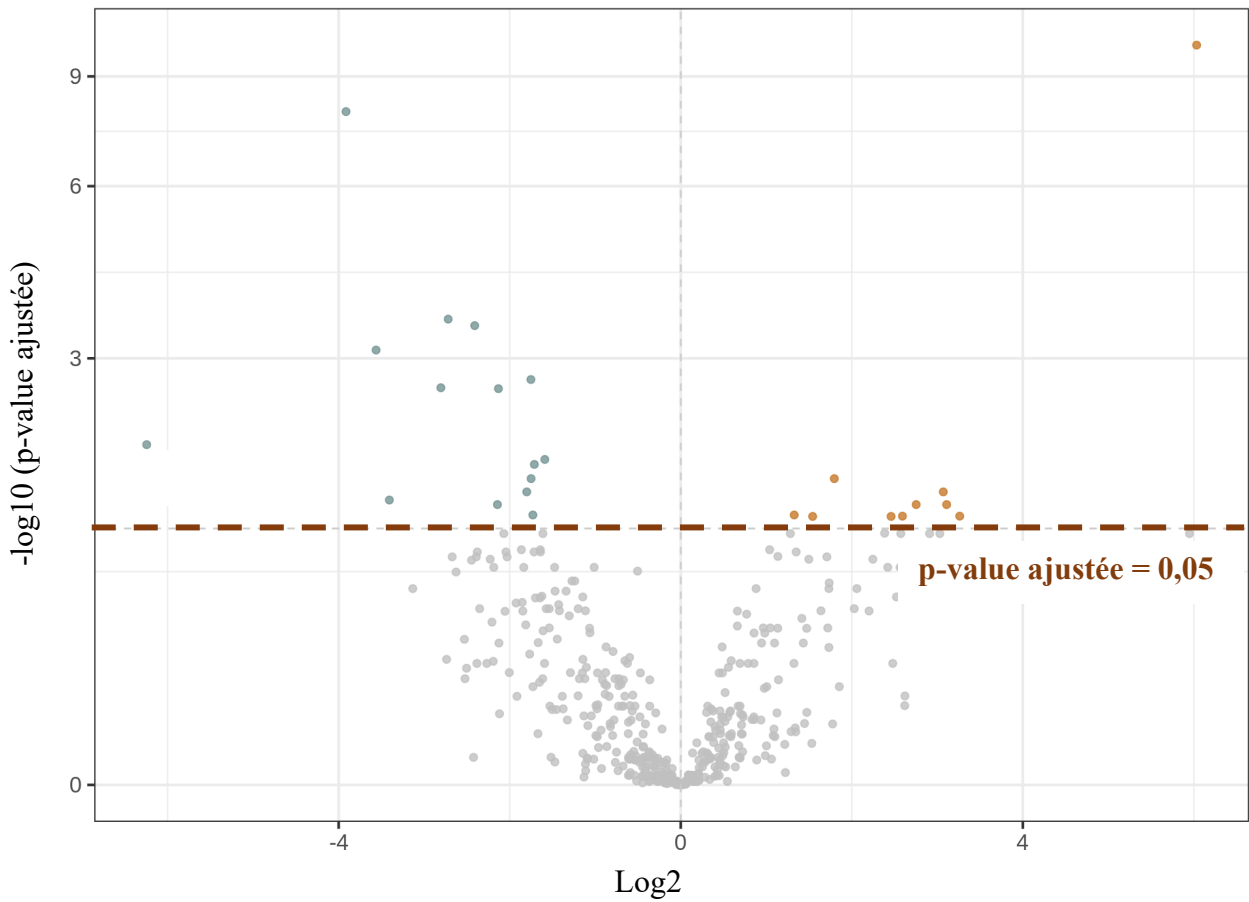


Figure 11: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de $p=0.05$) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la lactation à P28 (points verts) et à P56 (points orange)

En revanche, les populations microbiennes sont plus distinctes entre la fin de la gestation et le *post-partum* immédiat (entre J56 et P1, Figure 12) ainsi qu'entre le début et le milieu de lactation (entre P1 et P28, Figure 13). Cela signifie que le nombre d'OTUs dont l'abondance diffère significativement entre deux dates est plus élevé.

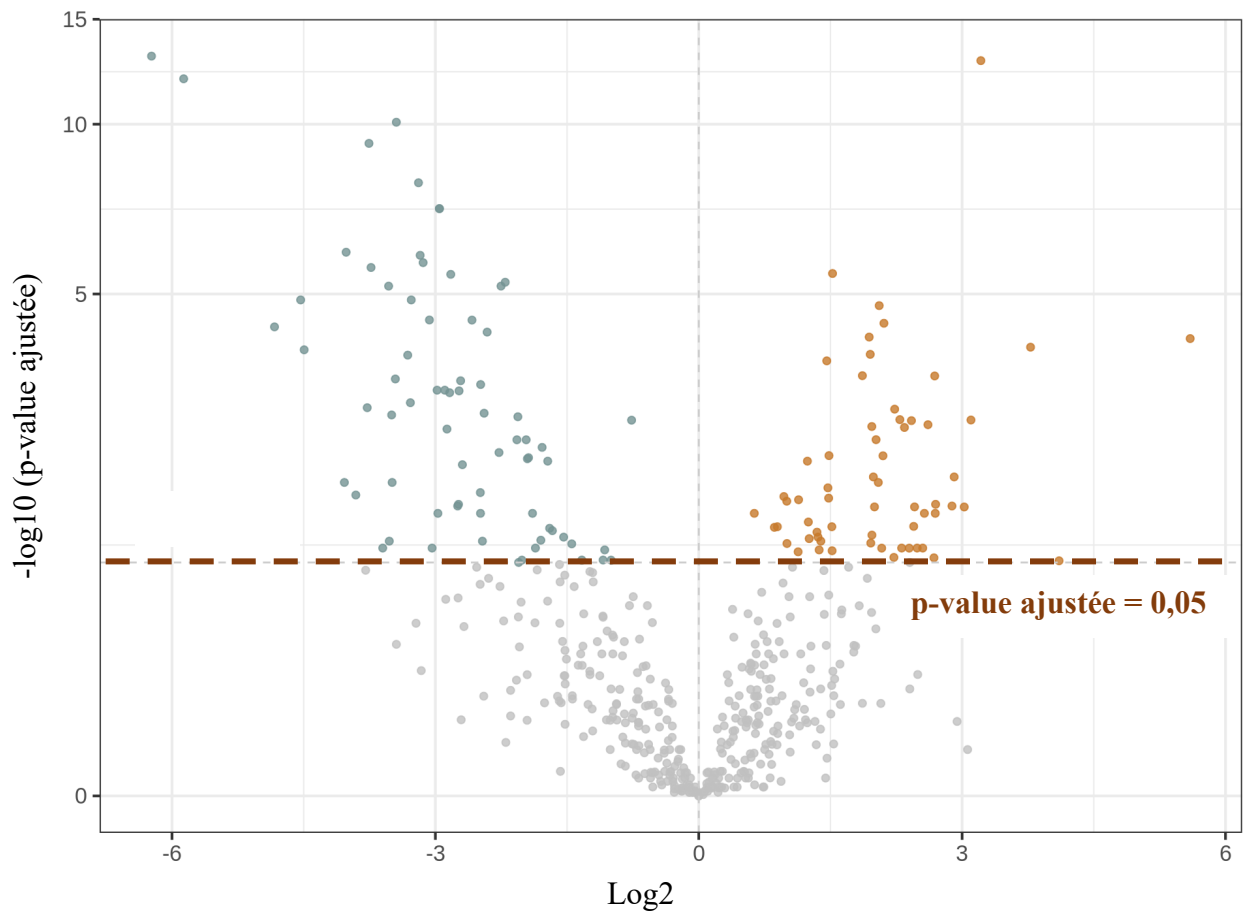


Figure 12: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de $p=0.05$) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la gestation à J56 (points verts) et la mise-bas à P1 (points orange)

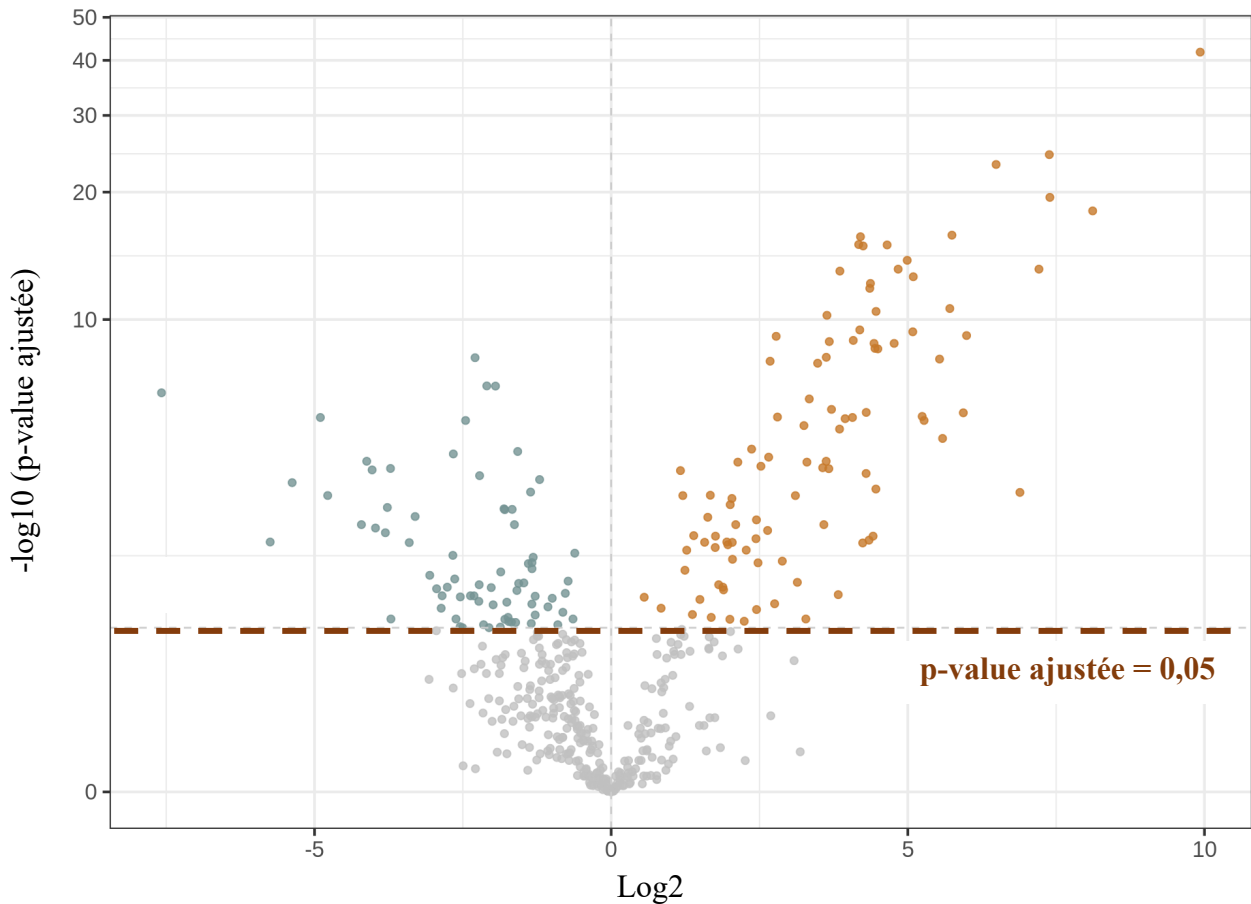


Figure 13: Volcano-Plot représentant les similarités (points gris en dessous de seuil de $p=0.05$) et les dissimilarités des populations microbiennes chez les 36 chiennes lors de la mise-bas à P1 (points verts) et de la lactation à P28 (points orange)

Les Tableaux 6 et 7 représentent les bactéries pour lesquelles on observe les plus grandes variations d'abondance entre deux dates. Les bactéries de la famille *Lactobacillaceae* et des genres *Lactobacillus* et *Ligilactobacillus* ont été identifiées parmi les 5 OTUs les plus abondants à J56 et P28 en comparaison de P1.

Les autres comparaisons sont présentées en Annexe 4, 5, 6 et 7 (J28 VS J56 ; J56 VS P1, P1 VS. P28, P28 VS P56).

Tableau 6: Les bactéries les plus abondantes à J56 (fin de gestation) comparé à P1 (J1 post-partum) chez les 36 chiennes (tests de Student multiples)

Phylum	Famille	Genre
Firmicutes	Lactobacillaceae	Lactobacillus
Firmicutes	Oscillospiraceae	Unknown genus
Firmicutes	Lactobacillaceae	Lactobacillus
Firmicutes	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus
Firmicutes	Lactobacillaceae	Unknown genus

Tableau 7: Les bactéries les plus abondantes à P1 (J1 post-partum) comparé à P28 (J28 de lactation) chez les 36 chiennes (tests de Student multiples)

Phylum	Famille	Genre
Firmicutes	Unknown family	Unknown genus
Firmicutes	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus
Firmicutes	Lactobacillaceae	Lactobacillus
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium
Firmicutes	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus

3.4.3. Principales familles et genres au cours de la gestation et de la lactation

Dans cette partie, ne seront mentionnés que les familles et genres présentant des variations significatives de leur abondance au cours du temps et ayant un intérêt clinique. Les tests statistiques effectués sont présentés en Partie 2 – 2.8.3. Les variations significatives sont représentées directement sur les graphiques par une *.

a. Phylum Firmicutes

Dans notre étude, 25 familles ont été identifiées comme composant le phylum Firmicutes. Elles sont représentées en Annexe 8. Les principales familles (abondance relative) sont : *Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Streptococcaceae* et *Oscillospiraceae*.

Les familles *Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillaceae* et *Streptococcaceae* ont montré une diminution à différents moments de la gestation dont le détail est présenté dans les Figures 14,

15 et 16. Une augmentation significative de leur abondance relative en première partie de lactation a ensuite été observée.

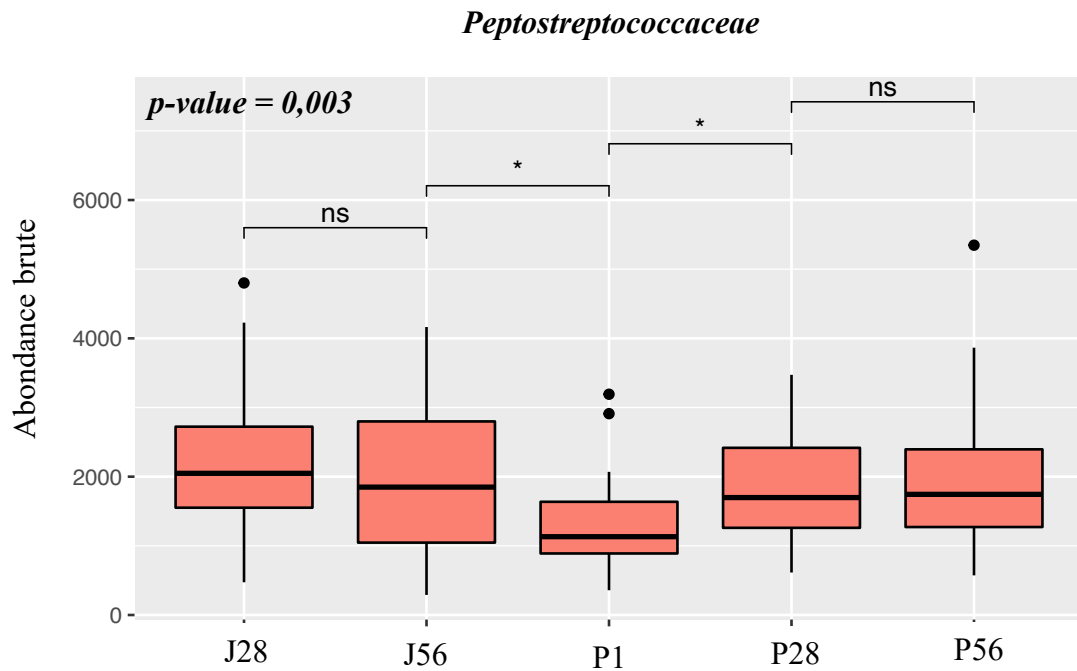


Figure 14: Variations de l'abondance brute de la famille *Peptostreptococcaceae* au cours de la gestation et de la lactation

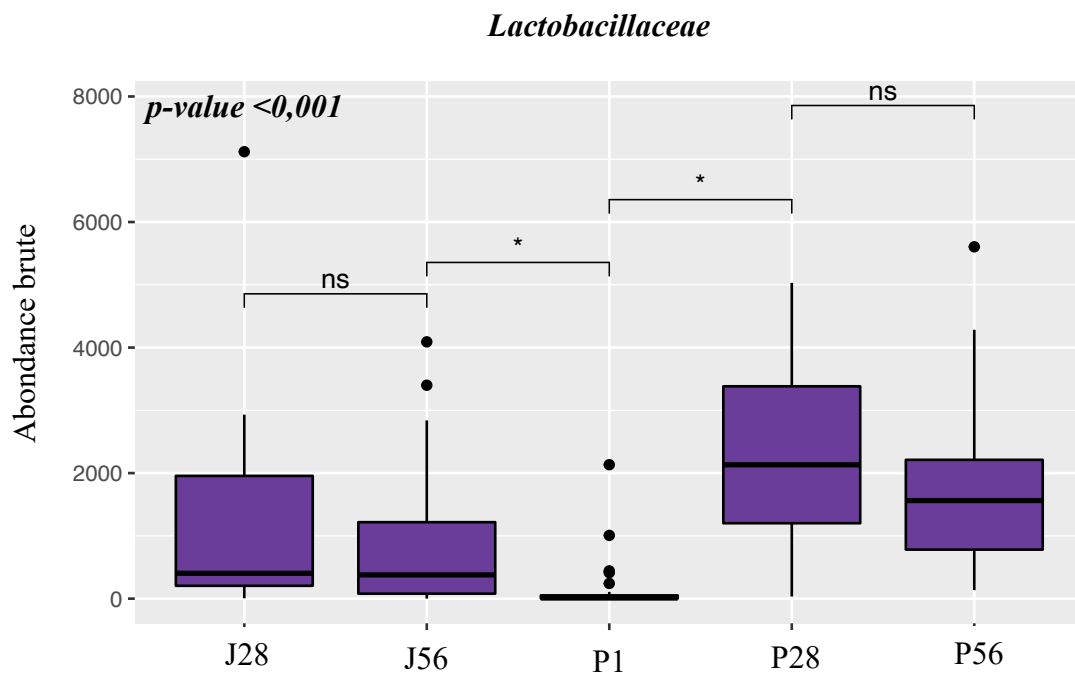


Figure 15: Variations de l'abondance brute de la famille *Lactobacillaceae* au cours de la gestation et de la lactation

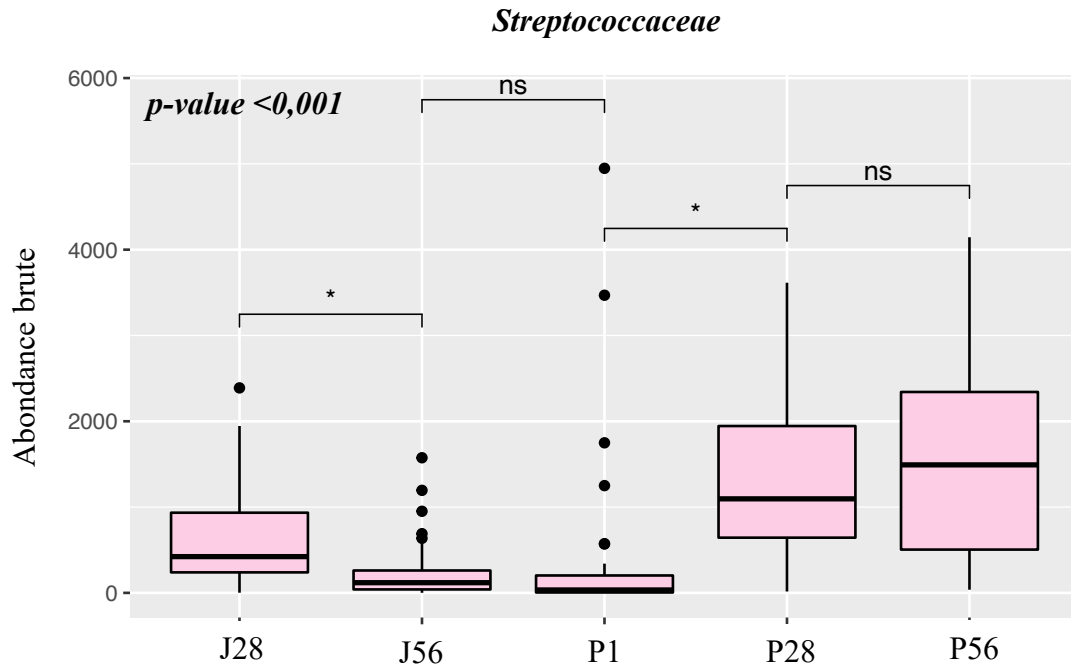


Figure 16: Variations de l'abondance brute de la famille *Streptococcaceae* au cours de la gestation et de la lactation

La famille *Peptostreptococcaceae* est composée en majorité des genres *Peptoclostridium*, *Peptostreptococcus* et *Romboutsia* (Annexe 9). Le genre *Romboutsia* a présenté une diminution significative de son abondance relative dans les jours précédant la mise-bas tandis qu'une augmentation significative du genre *Peptostreptococcus* a été observée au cours de la lactation (Figure 17, 18). Le genre *Peptoclostridium* a présenté une variation significative de son abondance au cours du temps uniquement en seconde partie de lactation (de P28 à P56) (Figure 19).

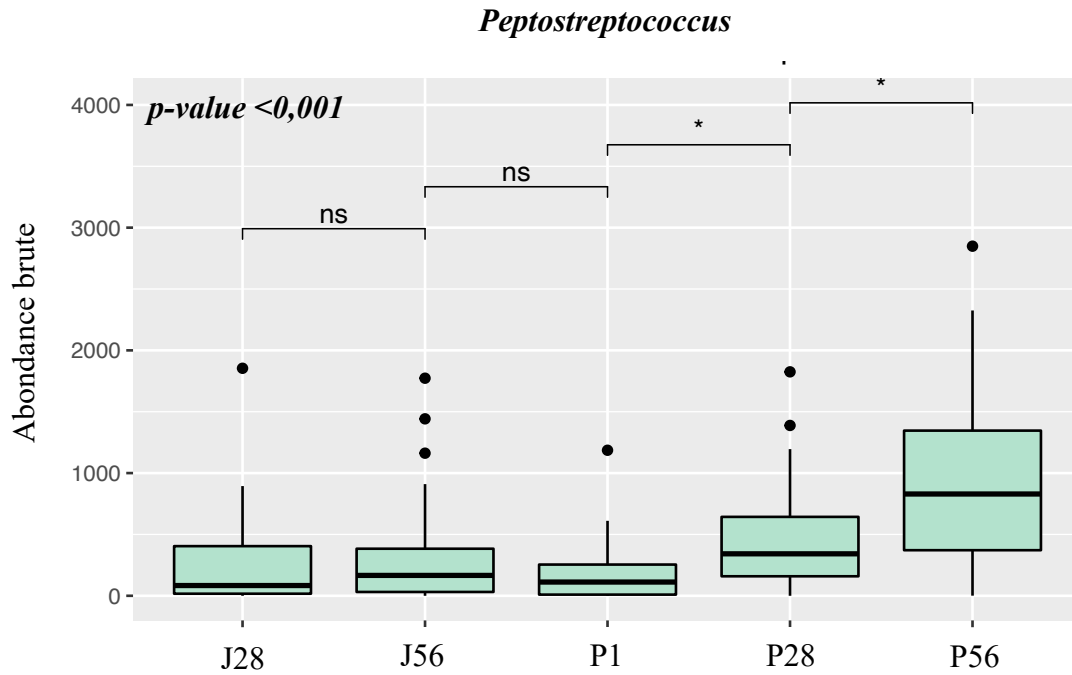


Figure 17: Variations de l'abondance brute du genre *Peptostreptococcus* au cours de la gestation et de la lactation

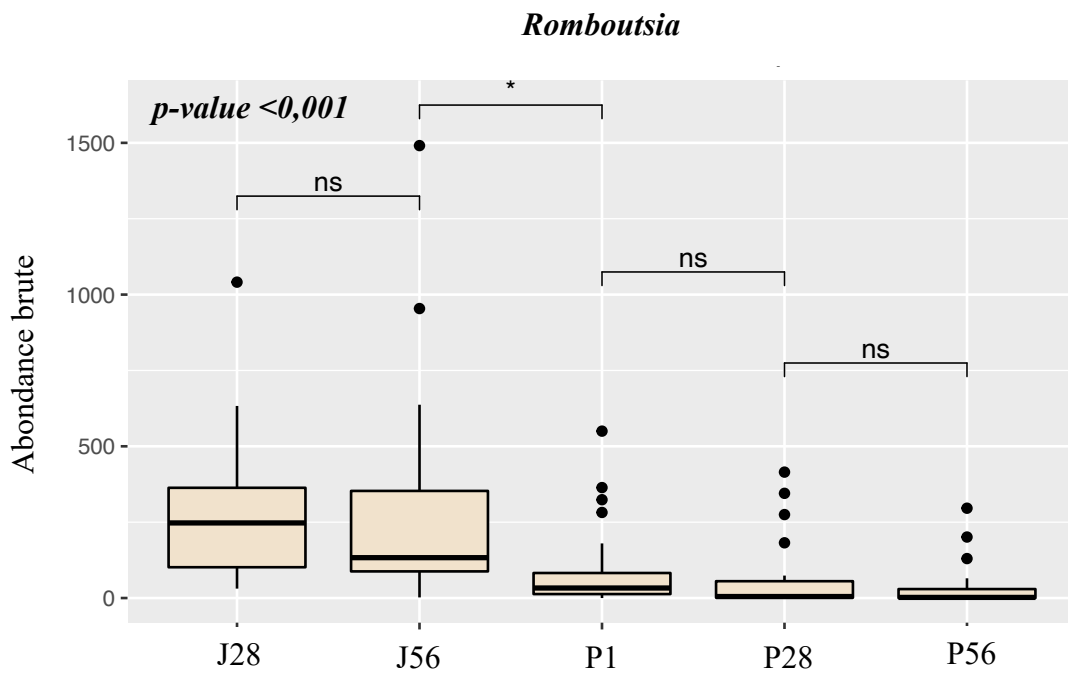


Figure 18: Variations de l'abondance brute du genre *Romboutsia* au cours de la gestation et de la lactation

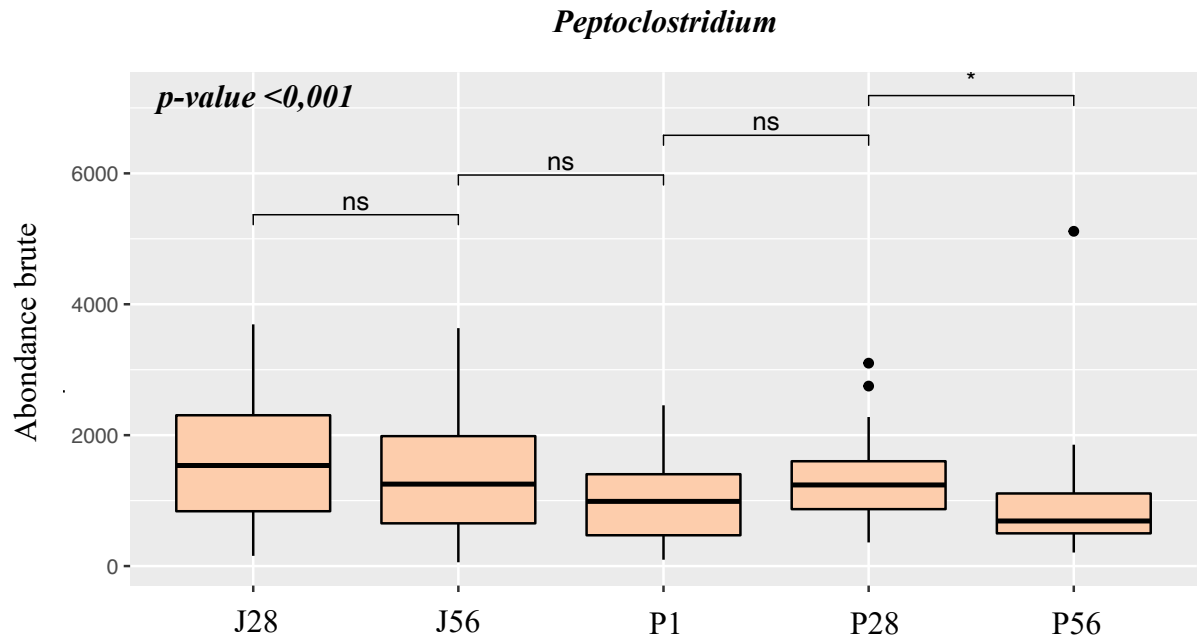


Figure 19: Variations de l'abondance brute du genre *Peptoclostridium* au cours de la gestation et de la lactation

La famille *Lactobacillaceae* est composée en majorité de trois genres : *Ligilactobacillus*, *Lactobacillus* et *Limosilactobacillus* (Annexe 10). Ils ont tous trois présenté la même tendance, soit une diminution avant la mise-bas suivie d'une augmentation en première partie de lactation (variation de l'abondance brute du genre *Ligilactobacillus* au cours du temps présentée en Figure 20, tendance identique pour les genres *Lactobacillus* et *Limosilactobacillus* ; p-value des tests de Friedman correspondants dans le Tableau 8). Le genre *Ligilactobacillus* est le seul à avoir présenté une augmentation en seconde partie de lactation (de P28 à P56).

Ligilactobacillus

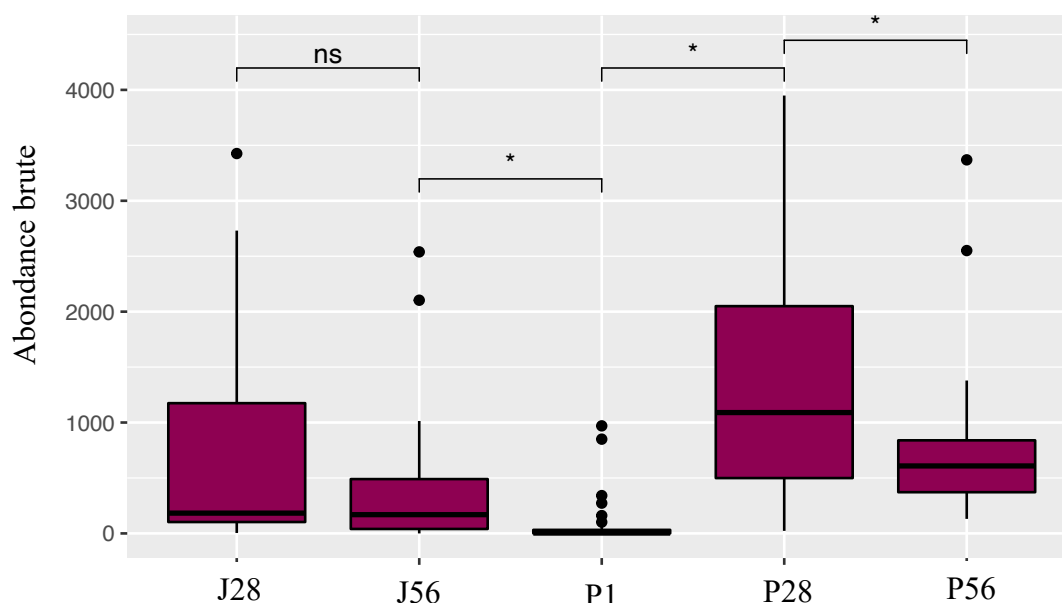


Figure 20: Variations de l’abondance brute du genre *Ligilactobacillus* au cours de la gestation et de la lactation

Tableau 8: Résultats d’analyses d’évolution d’abondance relative des 3 genres de la famille Lactobacillaceae au cours de la gestation et de la lactation

Famille	p-value du test de Friedman
<i>Lactobacillus</i>	<0,001
<i>Ligilactobacillus</i>	<0,001
<i>Limosilactobacillus</i>	<0,001

La famille *Streptococcaceae* était composée d’un seul genre : *Streptococcus*, qui a donc présenté les mêmes variations.

La famille *Oscillospiraceae* a présenté une variation significative de son abondance au cours du temps (p-value du test de Friedman = 0,013) mais les tests deux à deux n’ont pas permis de mettre en évidence le moment de changement significatif. Les genres *Faecalibacterium* et *Ruminococcus* l’ont composé en majorité. Le genre *Faecalibacterium* a présenté une augmentation significative de son abondance en première partie de lactation (de P1 à P28) (Annexe 11).

Dans notre étude, l'abondance de la famille *Clostridiaceae* a varié de manière significative (p -value de test de Friedman = 0,002) mais les comparaisons deux à deux n'ont pas permis de mettre en évidence le moment de changement significatif. Dans notre étude, elle était composée en majorité du genre *Clostridium* (Annexe 12).

b. Phylum Bacteroidetes

Le phylum Bacteroidetes est composé en majorité de trois genres : *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* et *Porphyromonadaceae* (Annexe 13). La famille *Bacteroidaceae* a présenté une augmentation significative de son abondance en seconde partie de gestation suivie d'une diminution en première partie de lactation (Figure 21). Elle est composée uniquement du genre *Bacteroides*.

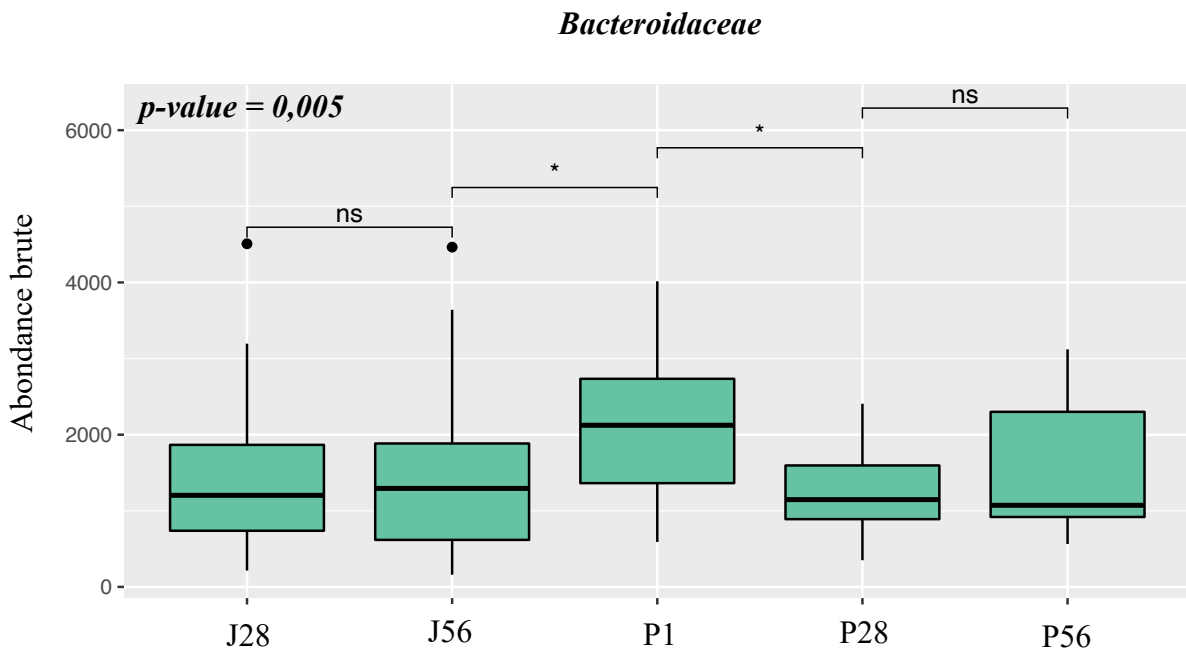


Figure 21: Variations de l'abondance brute de la famille *Bacteroidaceae* au cours de la gestation et de la lactation

La famille *Prevotellaceae* présente une variation significative au cours du temps non identifiée par les tests deux à deux réalisés. Elle est composée majoritairement des genres *Prevotella*, *Alloprevotella* et *Prevotellaceae Ga6A1 group* qui ont un intérêt clinique dans notre étude (Annexe 14). Le genre *Prevotella* a présenté une diminution significative de J56 à P1 puis une

augmentation de P1 à P28 tandis que le genre *Alloprevotella* présente les variations inverses. Les résultats des analyses statistiques correspondantes sont précisés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Résultats d’analyses d’évolution d’abondance relative des 3 genres de la famille Prevotellaceae au cours de la gestation et de la lactation

Famille	p-value du test de Friedman
<i>Prevotella</i>	<0,001
<i>Alloprevotella</i>	<0,001
<i>Prevotellaceae Ga6A1 group</i>	<0,001

Aucune différence significative n’a été mise en évidence lors des comparaisons deux à deux entre les différentes dates étudiées pour l’abondance du genre *Prevotellaceae Ga6A1 group*. Une variation significative de l’abondance de la famille *Porphyromonadaceae* a été observée au cours du temps ($p < 0,001$) mais les comparaisons deux à deux n’ont pas permis de définir le moment de ce changement significatif.

c. Phylum Actinobacteria

Les deux familles majoritaires du phylum Actinobacteria sont *Corynebacteriaceae* et *Bifidobacteriaceae* (Annexe 15). La famille *Corynebacteriaceae* a présenté une diminution significative en *post-partum* comme représenté dans la Figure 22. La famille *Bifidobacteriaceae* a présenté quant à elle une diminution significative dans les jours précédant la mise-bas, suivie d’une augmentation significative en *post-partum*, comme représenté en Figure 23.

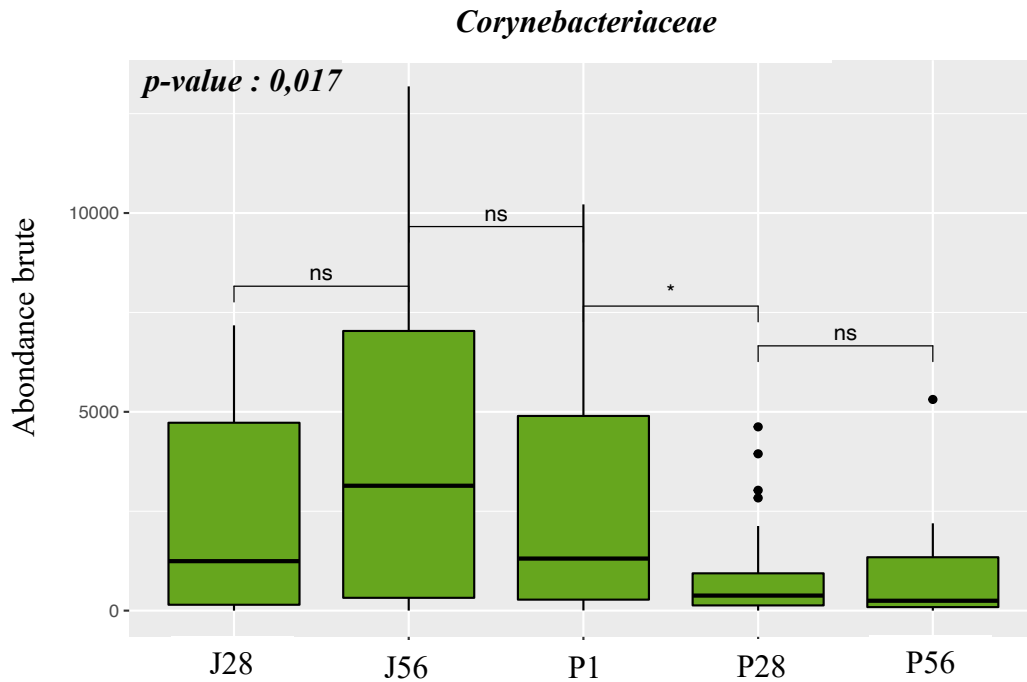


Figure 22: Variations de l'abondance brute de la famille *Corynebacteriaceae* au cours de la gestation et de la lactation

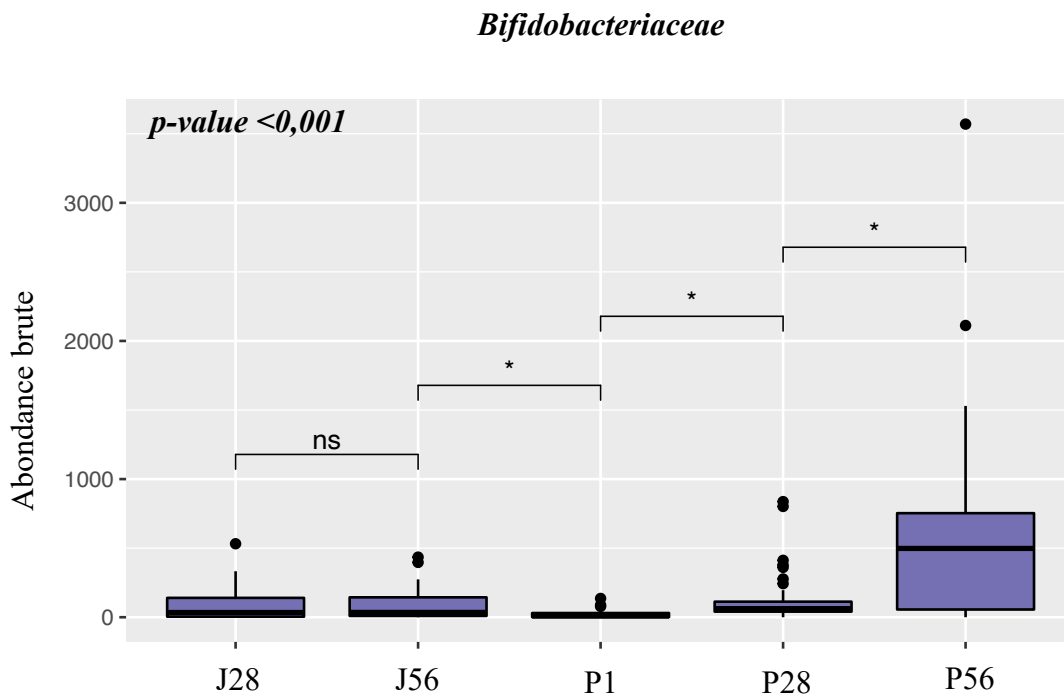


Figure 23: Variations de l'abondance brute de la famille *Bifidobacteriaceae* au cours de la gestation et de la lactation

Dans notre étude, les familles *Corynebacteriaceae* et *Bifidobacteriaceae* sont toutes deux composées d'un seul genre (respectivement *Corynebacterium* et *Bifidobacterium*).

d. Phylum Proteobacteria

Dans notre étude, le phylum Proteobacteria est composé en majorité des familles : *Succinivibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sutterellaceae* et *Enterobacteriaceae* (Annexe 16). Les familles *Succinivibrionaceae* et *Sutterellaceae* ont présenté une augmentation significative de leur abondance relative au cours de la lactation, dont le détail est représenté dans les Figures 24 et 25. D'autre part, la famille *Enterobacteriaceae* a présenté une augmentation significative marquée dans les jours précédant la mise-bas (Figure 26).

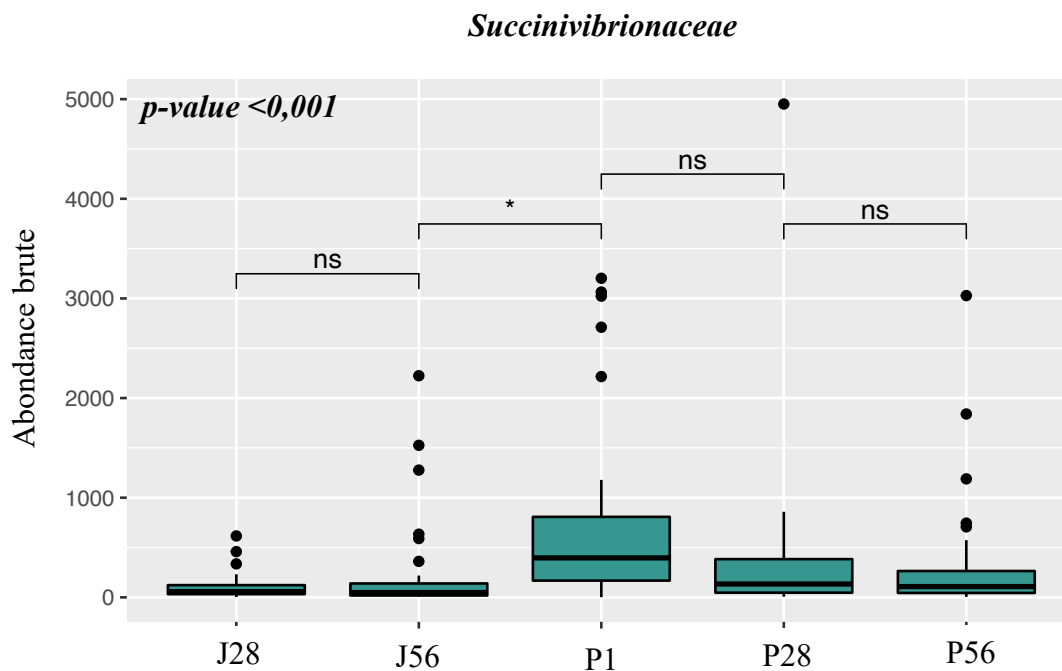


Figure 24: Variations de l'abondance brute de la famille *Succinivibrionaceae* au cours de la gestation et de la lactation

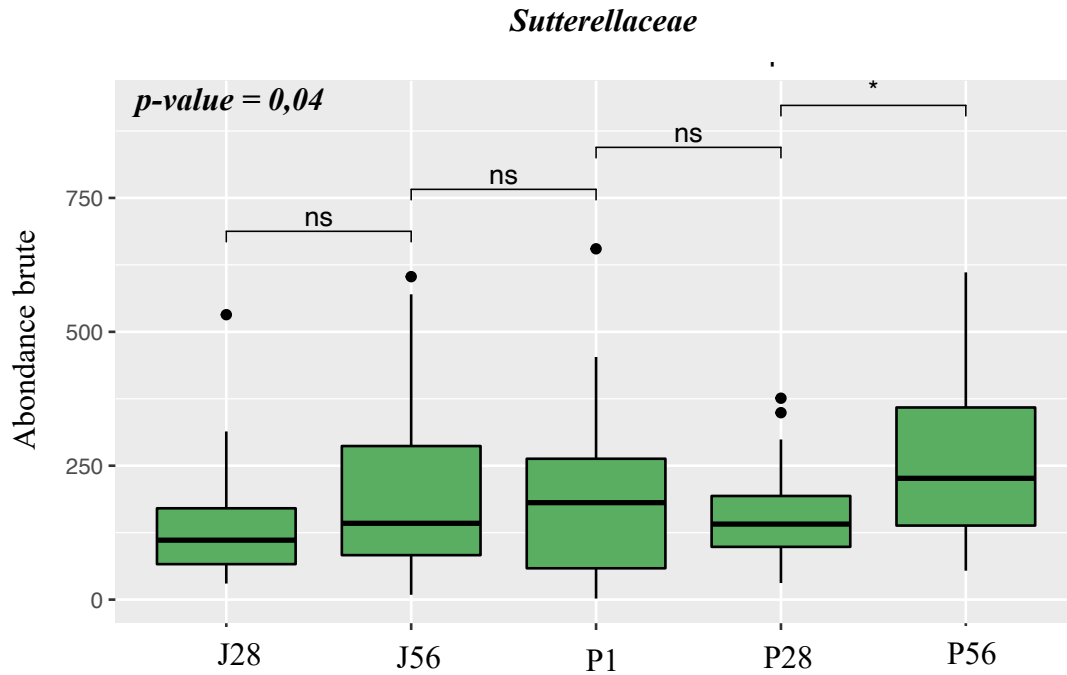


Figure 25: Variations de l'abondance brute de la famille Sutterellaceae au cours de la gestation et de la lactation

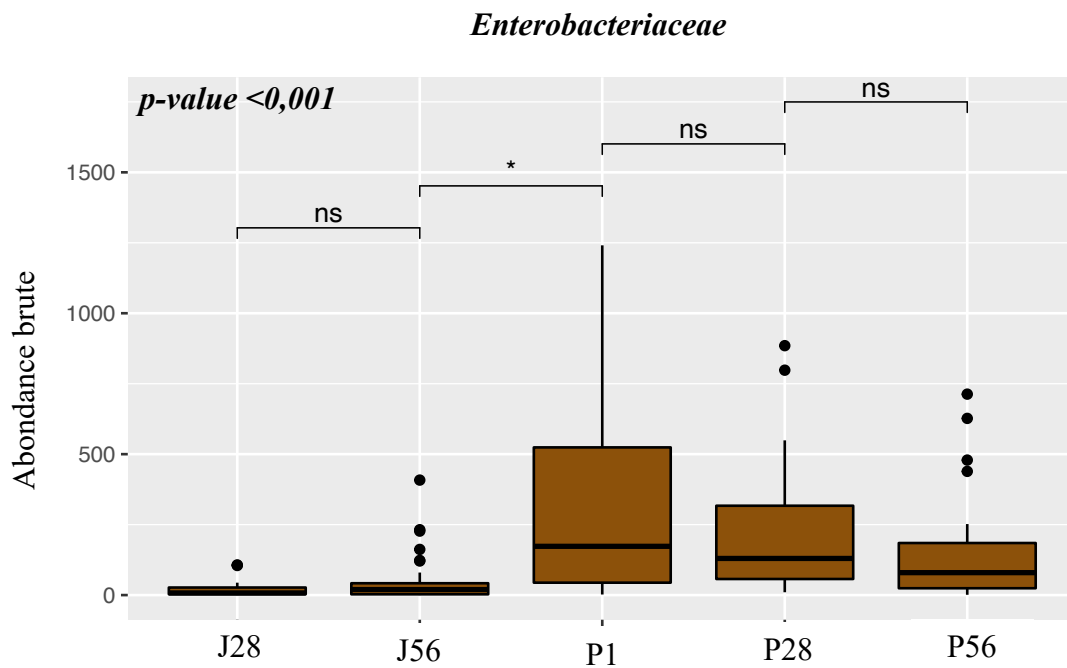


Figure 26: Variations de l'abondance brute de la famille Enterobacteriaceae au cours de la gestation et de la lactation

La famille *Succinivibrionaceae* était composé d'un seul genre : *Anaerobiospirillum*.

La famille *Sutterellaceae* est composée des genres *Sutterella* et *Parasutterella*. Les résultats d'analyses statistiques de l'effet temps sur l'abondance des genres *Sutterella* et *Parasutterella* sont présentés dans le Tableau 10. Les comparaisons deux à deux n'ont pas permis de mettre en évidence le moment de changement significatif d'abondance des bactéries du genre *Sutterella*. Le genre *Parasutterella* présente les mêmes variations que la famille *Sutterellaceae*.

Tableau 10: Résultats d'analyses d'évolution d'abondance relative des 3 genres de la famille *Sutterellaceae* au cours de la gestation et de la lactation

Famille	p-value du test de Friedman
<i>Sutterella</i>	0,004
<i>Parasutterella</i>	<0,001

La famille *Enterobacteriaceae* est composée presque uniquement du genre *Escherichia-Shigella*. Il a présenté les mêmes variations de son abondance que la famille *Enterobacteriaceae*. La famille *Pseudomonadaceae*, ayant un intérêt clinique dans notre étude, a présenté une diminution significative de son abondance au cours de la gestation (de J28 à J56). Dans notre étude, elle est uniquement composée du genre *Pseudomonas*.

4. DISCUSSION

Cette étude a eu pour but d'évaluer l'évolution du microbiote intestinal chez la chienne au cours de la gestation et de la lactation. En effet, ce dernier se révèle crucial pour la santé du fœtus et du chiot nouveau-né. Ce travail présente donc des données originales sur un nombre relativement grand d'animaux, et ayant une importance clinique pour le futur du jeune. Cependant, et comme dans toutes études, ce travail a des limites, qui seront présentées par la suite.

4.1. Les limites de l'étude

Nous avons suivi une cohorte de 36 chiennes appartenant à 9 races de 2 formats raciaux différents : moyen et grand.

Cependant, les proportions entre les différentes races et formats n'ont pu être équilibrées (sous-représentativité des chiennes de taille moyenne ou encore des races telles que Berger Allemand, Boxer ou Dalmatien). Il serait intéressant d'inclure et de comparer dans une étude des femelles des différents formats, y compris de petite taille.

Pour cette étude nous avons travaillé au sein d'un seul élevage afin de contrôler (voire écarter) l'effet majeur de la nourriture et de l'environnement sur le microbiote intestinal (Jayaraman et al., 2019). L'état corporel, ainsi que l'âge, ayant une influence sur la composition du microbiote intestinal, nous avons constitué une population équilibrée sur ces points (Wu et al., 2011 ; Hooda et al., 2012). Cependant, de nombreux facteurs n'ont pas pu être contrôlés du fait de l'aspect clinique de l'étude.

Une des limites principales de cette étude est l'utilisation massive d'antibiotiques et de traitements de soutien digestif qui peuvent avoir un impact direct sur le microbiote intestinal (Lange et al., 2016). En effet, de par le caractère clinique de cette étude, ces événements imprévus étaient difficilement évitables et ont pu introduire un biais. Cependant, la majorité des traitements antimicrobiens a été administrée aux chiennes au cours de la période de lactation. Or, les changements significatifs du microbiote intestinal ont été observés principalement entre la fin de gestation et le jour 1 post mise-bas (P1). Nous pouvons donc considérer que nos observations ne sont pas liées à l'utilisation des antibiotiques.

Une seconde limite de l'étude est le changement de régime alimentaire entre le début de gestation (de J0 à J28), où les chiennes ont reçu un régime de maintenance, et la seconde partie de la gestation et la lactation (de J28 à P56), où elles ont reçu un régime pour chiens en croissance. Cette modification de régime alimentaire était cependant nécessaire afin de préparer la lactation et assurer le bien-être des chiennes et des chiots. Afin de limiter ce biais, les deux régimes alimentaires choisis provenaient du même fournisseur et étaient composés de matières premières identiques. Selon une étude récente, le microbiote intestinal présente des modifications suite à un changement alimentaire 1 à 6 jours après la mise en place de celui-ci (Leeming et al. 2019). Il aurait donc été intéressant d'analyser le microbiote intestinal des chiennes de l'étude une semaine après la mise en place du nouveau régime (J35) afin d'avoir un point de départ une fois le microbiote stabilisé. Cependant, les modifications du microbiote intestinal les plus importantes ont lieu entre la fin de gestation et le jour suivant la mise-bas.

Elles sont donc éloignées du changement alimentaire. Il est donc plus probable que les effets observés soient liés à la mise-bas et non au régime alimentaire.

4.2. Modifications du microbiote intestinal lors de la gestation et de la lactation

Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications majeures du microbiote intestinal chez la chienne en gestation, en particulier au moment de la parturition. Nous avons observé une modification de sa richesse (nombre d'espèces observées) et de sa composition (abondance des différents taxa). Les principales modifications observées, et ayant un intérêt clinique dans notre étude, sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11: Résumé des principales variations observées dans la diversité et la composition du microbiote intestinal au cours de la gestation et de la lactation. Les flèches indiquent une augmentation ou une diminution significative, une case vide signifie l'absence de modifications au cours de la période étudiée.

	Gestation	Mise-bas	Lactation	
	J28-J56	J56-P1	P1-P28	P28-P56
Alpha-diversité	↘	↗	↗	
Bêta-diversité	<i>Profil 1</i>		<i>Profil 2</i>	<i>Profil 3</i>
Phylum Firmicutes			↗	
Famille <i>Lactobacillaceae</i>		↘	↗	
Famille <i>Ruminococcus</i>				
- Genre <i>Faecalibacterium</i>			↗	
Phylum Bacteroidetes		↗	↘	
Famille <i>Bacteroidaceae</i>		↗	↘	
Phylum <i>Proteobacteria</i>		↗	↘	
Famille <i>Enterobacteriaceae</i>		↗		
Phylum <i>Actinobacteria</i>				
Famille <i>Bifidobacteriaceae</i>		↘	↗	↗

4.2.1. Modifications des diversités alpha et bêta

Dans notre étude, une diminution significative de l'alpha-diversité a été observée au cours de la première partie de gestation (de J28 à J56) suivie d'une augmentation dans les jours précédant la mise-bas ainsi qu'en *post-partum* (de J56 à P28). Notre étude a aussi mis en évidence une modification de la bêta-diversité. Trois profils distincts sont observés : pendant la gestation, en *péri-partum* et pendant la lactation. Le profil microbien observé au cours de la gestation a montré le plus de variabilité inter-individus tandis que celui observé au cours de la lactation était le plus homogène.

Des modifications semblables de l'alpha et de la bêta-diversité ont été observées chez la femme (Koren et al. 2012). Ainsi, chez le chien comme chez l'homme, on conclut donc que le nombre d'espèces bactériennes représentées chez la femelle en gestation diminue tandis que les individus présentent une plus grande disparité inter-individuelle.

Ces modifications peuvent être expliquées en partie par les changements hormonaux observés lors de la gestation et de la lactation. Chez la chienne, les concentrations en progestérone augmentent au cours de la gestation puis diminuent uniquement en fin de gestation au moment de la lutéolyse *pré-partum* pour retrouver des valeurs basales en lactation (Kowalewski et al. 2015). En effet, des concentrations élevées en progestérone ont été démontrées comme induisant une diminution de l'alpha-diversité au sein d'une population microbienne (Nuriel-Ohayon et al. 2019)

4.2.2. Modifications des principaux phylums

Notre étude met en évidence des variations d'abondance au cours de la gestation et de la lactation pour trois des principaux phylums (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria). Les variations d'abondance des bactéries appartenant au microbiote intestinal contribuent aux modifications physiologiques observées chez la chienne gestante, notamment pour le métabolisme énergétique et la réponse inflammatoire.

Bactéries avec un profil pro-inflammatoire

On observe une augmentation significative de l'abondance des phylums Bacteroidetes et Proteobacteria dans les jours précédant la mise-bas, suivie d'une diminution en première partie de lactation (de P1 à P28). Une augmentation des bactéries appartenant au phylum Proteobacteria entre le premier et le troisième trimestre de gestation a également été mis en évidence chez la femme (Koren et al. 2012). Les bactéries de ce phylum, ainsi que certaines

espèces appartenant au phylum Bacteroidetes (Wang et al. 2021), possèdent un liposaccharide (LPS) à leur surface. Celui-ci stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (Asarat et al. 2016). La mise-bas étant caractérisée par un état pro-inflammatoire (Fuhler 2020), il pourrait être secondaire à l'augmentation de l'abondance de bactéries porteuses de LPS.

Bactéries avec un profil anti-inflammatoire

Le phylum Firmicutes, phylum dominant dans le microbiote intestinal des chiennes de notre étude toutes dates confondues, ne présente pas de variations significatives de son abondance au cours de la gestation mais il présente une augmentation de son abondance en première partie de lactation (de P1 à P28). De nombreuses familles bactériennes appartenant au phylum Firmicutes produisent du butyrate, à l'origine de la production de cytokines anti-inflammatoires. La gestation et la lactation, contrairement à la période de parturition, sont caractérisées par un état anti-inflammatoire (Fuhler 2020). Ceci peut être mis en relation avec l'abondance forte de bactéries productrices de butyrate, telles que les Firmicutes, mais également avec la diminution des phylums Bacteroidetes et Proteobacteria.

Bactéries prédisposant à l'état d'insulino-résistance

Comme présenté plus haut, les femelles gestantes présentent un état d'insulino-résistance (Balogh et al. 2018) qui peut être associé à une dysbiose. Celle-ci est caractérisée par une augmentation des phylums Actinobacteria et Firmicutes ainsi qu'une diminution du phylum Bacteroidetes (Caricilli, Saad 2013; Connolly et al. 2004; Johnson 2008). Ces modifications d'abondance de bactéries ne sont pas observées de manière significative dans notre étude mais les phylums Actinobacteria et Bacteroidetes présentent des variations relativement similaires. Cette dysbiose observée peut être mise en relation avec l'insulino-résistance retrouvée aussi chez les femelles en gestation (Connolly et al. 2004; Johnson 2008). Pour rappel, l'état d'insulino-résistance permet un apport énergétique suffisant au fœtus au cours de la gestation.

Enfin, la période de lactation est fortement demandeuse en énergie pour la mère. Certaines bactéries appartenant au phylum Firmicutes ont un rôle dans la digestion des polysaccharides et permettent d'augmenter la quantité d'énergie récupérée à partir d'un même régime alimentaire (Gomez-Arango et al. 2016).

4.2.3. Modifications des principales familles

Lactobacillaceae et Bifidobacteriaceae

L'abondance des familles *Lactobacillaceae* et *Bifidobacteriaceae* (respectivement phylums Firmicutes et Actinobacteria) ainsi que les genres les composant (*Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) ont présenté une diminution significative dans les jours précédant la mise-bas (de J56 à P1) suivie d'une augmentation au cours de la lactation.

Les bactéries des familles *Lactobacillaceae* et *Bifidobacteriaceae* sont retrouvées au niveau du lait (Rodríguez 2014) et ont un rôle important pour le nouveau-né. En effet, les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* possèdent des propriétés anti-microbiennes (Zhang et al. 2018). Le genre *Lactobacillus* est associé dans certaines études à une diminution des petits poids de naissance et de la mortalité néonatale (Anukam, Osazuwa, Reid 2005). Le genre *Bifidobacterium* produit des prébiotiques (acétate et butyrate) utilisés par les bactéries productrices de butyrate, à rôle anti-inflammatoire, chez le nouveau-né. L'évolution de ces deux genres au sein du microbiote intestinal dans notre population peut être expliqué grâce au phénomène d' « entero-mammary pathway » au moment de la mise-bas (Perez et al. 2007; de Andrés et al. 2017). La diminution significative de l'abondance de ces deux familles au moment de la mise-bas corrobore l'hypothèse d'un transfert de ces bactéries du tube digestif à un autre site (comme la mamelle).

De plus, les bactéries des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* permettent respectivement d'augmenter la prise alimentaire (Anukam, Osazuwa, Reid 2005) et l'apport d'énergie récupéré à partir d'un même régime alimentaire (Barka et al. 2016) ce qui est intéressant pour la période de lactation.

Enterobacteriaceae

L'abondance de la famille *Enterobacteriaceae* (phylum Proteobacteria), a présenté une augmentation significative dans les jours précédant la mise-bas (de J56 à P1). Elle est composée en partie du genre *Escherichia-Shigella* (la distinction n'ayant pas pu être réalisée entre les deux genres).

Les bactéries appartenant à la famille *Enterobacteriaceae* sont anaérobies et sont primordiales au développement du microbiote intestinal chez le nouveau-né. Chez l'homme, *Escherichia coli* est la première espèce qui colonise le tube digestif (Palmer et al. 2007). Elles consomment

l'oxygène résiduel et permettent un environnement anaérobie strict, nécessaire à certains probiotiques tels que les bactéries des genres *Bifidobacterium*. Cependant, une prévalence trop importante de Proteobacteries peut être néfaste pour le nouveau-né. Certaines souches d'*Esherichia coli* sont peuvent être pathogènes et sont connues pour être le principal agent de septicémie chez le chiot (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022).

4.2.4. Perspectives

Notre étude a mis en évidence des modifications majeures du microbiote intestinal chez la chienne gestante et allaitante. Cependant, les conséquences de ces modifications pour le fœtus ou le chiot nouveau-né restent à explorer.

La présence de certaines bactéries comme *Enterococcus* et *Enterobacter*, ou au contraire une faible abondance des bactéries du genre *Lactobacillus* au niveau du placenta ou du méconium des enfants nouveau-nés, a été associée à un risque augmenté de prématurité et/ou de petits poids de naissances (Mesa et al. 2020).

Il serait pertinent d'identifier certaines bactéries clefs chez le chien qui permettraient le bon développement fœtal et néonatal. Ceci aurait pour but de préserver voire d'améliorer la flore digestive chez la femelle gestante et ce notamment *via* l'utilisation de probiotiques.

Les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, comme partie d'un aliment, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte (Organisation mondiale de la santé, 2001). Au vu de la relation étroite entre le microbiote intestinal maternel et celui du chiot, ils pourraient avoir un impact bénéfique sur le microbiote intestinal du nouveau-né.

A ce jour, il existe différentes souches de probiotiques utilisées pour la supplémentation animale aux effets différents et complémentaires (Rigobelo, 2012, Recart-Conort 2015) :

- Les bactéries des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dont les effets ont été discuté dans notre étude,
- Les bactéries du genre *Enterococcus*, à action antimicrobienne (Marcinakova et al. 2005)
- Les levures du genre *Saccharomyces*, à action antimicrobienne et résistantes aux antibiotiques (Czerucka, Piche, Rampal 2007).

Tout d'abord, plusieurs études mettent en évidence des effets bénéfiques de la supplémentation en probiotique chez la femelle gestante. Chez des vaches, le taux de conception est augmenté et l'intervalle *post-partum*-premier œstrus est diminué (Mostafa et al., 2014) après

administration de levures. Une supplémentation en probiotique du genre *Lactobacillus* augmenterait aussi la prise alimentaire chez des rattes gravides, réduisant ainsi le risque de sous-nutrition en gestation et lactation (Anukam, Osazuwa, Reid 2005).

Le passage d'un microbiote intestinal bien équilibré au chiot, notamment grâce à l'administration de probiotiques chez la mère, peut avoir des conséquences bénéfiques sur le nouveau-né. Grâce à l'amélioration du système immunitaire, le nouveau-né présente une meilleure capacité à lutter contre les pathogènes dans les premiers jours de vie (Betancur et al. 2021; Peng et al. 2020). En effet, l'administration de probiotiques chez des truies a permis de réduire le nombre de diarrhées néonatales dans les portées correspondantes. Le microbiote de ces porcelets présentait une flore commensale de meilleure qualité, ainsi qu'une quantité moindre d'agents pathogènes opportunistes (Hasan et al. 2018).

Ainsi, en raison des nombreux effets bénéfiques constatés de la supplémentation en probiotiques chez la femelle gestante et le nouveau-né, de nouvelles études seraient intéressantes afin d'investiguer d'avantage l'intérêt de son utilisation chez la chienne au cours de la gestation. La supplémentation en probiotiques pourrait aussi s'avérer intéressante en cas d'utilisation d'antibiotiques au cours de la gestation et de la lactation ou en cas de mise-bas par césarienne.

CONCLUSION

Cette étude est la première décrivant les variations du microbiote intestinal chez la chienne gestante et allaitante. Dans notre étude, nous avons caractérisé les évolutions observées au niveau du microbiote intestinal de la mère au cours de la gestation et de la lactation. Ces observations ont permis d'établir de potentiels liens entre microbiote intestinal et gestation, notamment sur les plans du métabolisme hormonal, de l'immunité et de l'inflammation, ou du métabolisme énergétique. Ces résultats ont aussi permis de corroborer l'hypothèse d'un transfert de bactéries du tube digestif vers la mamelle autour de la mise-bas, notamment pour les familles *Bifidobacterium spp.* et *Lactobacillus spp.*. Le microbiote intestinal aurait donc une importance fondamentale pour le bon déroulement de la gestation et de la lactation. De plus, un microbiote intestinal bien équilibré chez la mère serait à l'origine de la mise en place d'un microbiote intestinal bénéfique chez le chiot. Mais le profil bactérien du microbiote intestinal de la femelle gestante, permettant le développement optimal du nouveau-né, reste à définir chez le chien comme chez d'autres espèces.

BIBLIOGRAPHIE

AMON, Protima et SANDERSON, Ian, 2017. What is the microbiome? *Archives of disease in childhood - Education & practice edition*. octobre 2017. Vol. 102, n° 5, pp. 257-260. DOI 10.1136/archdischild-2016-311643.

ANUKAM, Kingsley C., OSAZUWA, Emmanuel O. et REID, Gregor, 2005. Improved appetite of pregnant rats and increased birth weight of newborns following feeding with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14. *Journal of Applied Research* [en ligne]. 2005. Vol. 5, n° 1. [Consulté le 12 juin 2022]. Disponible à l'adresse : https://works.bepress.com/kingsley_anukam/7/

ASARAT, M., APOSTOLOPOULOS, V., VASILJEVIC, T. et DONKOR, O., 2016. Short-Chain Fatty Acids Regulate Cytokines and Th17/Treg Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro. *Immunological Investigations*. 2016. Vol. 45, n° 3, pp. 205-222. DOI 10.3109/08820139.2015.1122613.

BÄCKHED, Fredrik, DING, Hao, WANG, Ting, HOOPER, Lora V., KOH, Gou Young, NAGY, Andras, SEMENKOVICH, Clay F. et GORDON, Jeffrey I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2 novembre 2004. Vol. 101, n° 44, pp. 15718-15723. DOI 10.1073/pnas.0407076101.

BALOGH, Orsolya, BRUCKMAIER, Rupert, KELLER, Stefanie et REICHLER, Iris Margaret, 2018a. Effect of maternal metabolism on fetal supply: Glucose, non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations in canine maternal serum and fetal fluids at term pregnancy. *Animal Reproduction Science*. juin 2018. Vol. 193, pp. 209-216. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.072.

BALOGH, Orsolya, BRUCKMAIER, Rupert, KELLER, Stefanie et REICHLER, Iris Margaret, 2018b. Effect of maternal metabolism on fetal supply: Glucose, non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations in canine maternal serum and fetal fluids at term pregnancy. *Animal Reproduction Science*. juin 2018. Vol. 193, pp. 209-216. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.072.

BARKA, Essaid Ait, VATSA, Parul, SANCHEZ, Lisa, GAVEAU-VAILLANT, Nathalie, JACQUARD, Cedric, MEIER-KOLTHOFF, Jan P., KLENK, Hans-Peter, CLÉMENT, Christophe, OUHDOUCH, Yder et VAN WEZEL, Gilles P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. mars 2016. Vol. 80, n° 1, pp. 1-43. DOI 10.1128/MMBR.00019-15.

BERG, R. D., 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology*. avril 1995. Vol. 3, n° 4, pp. 149-154. DOI 10.1016/s0966-842x(00)88906-4.

BETANCUR, César, MARTÍNEZ, Yordan, TELLEZ-ISAIAS, Guillermo, CASTILLO, Rogel et DING, Xinghua, 2021. Effect of Oral Administration with *Lactobacillus plantarum* CAM6 Strain on Sows during Gestation-Lactation and the Derived Impact on Their Progeny Performance. *Mediators of Inflammation*. 2021. Vol. 2021, pp. 6615960. DOI 10.1155/2021/6615960.

BOURDIEC, Amélie, AHMAD, Syed-Furqan, LACHHAB, Asmaa et AKOUM, Ali, 2016. Regulation of inflammatory and angiogenesis mediators in a functional model of decidualized endometrial stromal cells. *Reproductive Biomedicine Online*. janvier 2016. Vol. 32, n° 1, pp. 85-95. DOI 10.1016/j.rbmo.2015.09.011.

CAPORASO, J. Gregory, LAUBER, Christian L., WALTERS, William A., BERG-LYONS, Donna, LOZUPONE, Catherine A., TURNBAUGH, Peter J., FIERER, Noah et KNIGHT, Rob, 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 mars 2011. Vol. 108, n° supplement_1, pp. 4516-4522. DOI 10.1073/pnas.1000080107.

CARICILLI, Andrea M. et SAAD, Mario J. A., 2013. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients*. 12 mars 2013. Vol. 5, n° 3, pp. 829-851. DOI 10.3390/nu5030829.

CHASSAING, Benoit et GEWIRTZ, Andrew T., 2014. Gut microbiota, low-grade inflammation, and metabolic syndrome. *Toxicologic Pathology*. janvier 2014. Vol. 42, n° 1, pp. 49-53. DOI 10.1177/0192623313508481.

CONCANNON, P. W., 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. juillet 2009. Vol. 44 Suppl 2, pp. 3-15. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x.

CONCANNON, P. W., ISAMAN, L., FRANK, D. A., MICHEL, F. J. et CURRIE, W. B., 1988. Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 alpha in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. septembre 1988. Vol. 84, n° 1, pp. 71-77. DOI 10.1530/jrf.0.0840071.

CONCANNON, P. W., MCCANN, J. P. et TEMPLE, M., 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 1989. Vol. 39, pp. 3-25.

CONG, Ping, PRICOLO, Victor, BIANCANI, Piero et BEHAR, Jose, 2007. Abnormalities of prostaglandins and cyclooxygenase enzymes in female patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology*. août 2007. Vol. 133, n° 2, pp. 445-453. DOI 10.1053/j.gastro.2007.05.021.

CONNOLLY, Cynthia C., AGLIONE, Lisa N., SMITH, Marta S., LACY, D. Brooks et MOORE, Mary Courtney, 2004. Insulin action during late pregnancy in the conscious dog. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. juin 2004. Vol. 286, n° 6, pp. E909-915. DOI 10.1152/ajpendo.00143.2003.

CORDER-RAMOS, Nicole L. B., FLATLAND, Bente, FRY, Michael M., SUN, Xiaocun, FECTEAU, Kellie et GIORI, Luca, 2019. Cortisol, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, and TSH responses in dogs injected with low-dose lipopolysaccharide. *PeerJ*. 8 août 2019. Vol. 7, pp. e7468. DOI 10.7717/peerj.7468.

CRIPPS, A. W. et WILLIAMS, V. J., 1975. The effect of pregnancy and lactation on food intake, gastrointestinal anatomy and the absorptive capacity of the small intestine in the albino rat. *The British Journal of Nutrition*. janvier 1975. Vol. 33, n° 1, pp. 17-32. DOI 10.1079/bjn19750005.

CZERUCKA, D., PICHE, T. et RAMPAL, P., 2007. Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 15 septembre 2007. Vol. 26, n° 6, pp. 767-778. DOI 10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x.

DE ANDRÉS, Javier, JIMÉNEZ, Esther, CHICO-CALERO, Isabel, FRESNO, Manuel, FERNÁNDEZ, Leónides et RODRÍGUEZ, Juan Miguel, 2017. Physiological Translocation of Lactic Acid Bacteria during Pregnancy Contributes to the Composition of the Milk Microbiota in Mice. *Nutrients*. 23 décembre 2017. Vol. 10, n° 1, pp. 14. DOI 10.3390/nu10010014.

DOMINGUEZ-BELLO, Maria G., COSTELLO, Elizabeth K., CONTRERAS, Monica, MAGRIS, Magda, HIDALGO, Glida, FIERER, Noah et KNIGHT, Rob, 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 29 juin 2010. Vol. 107, n° 26, pp. 11971-11975. DOI 10.1073/pnas.1002601107.

DRUCKMANN, René et DRUCKMANN, Marc-Alexandre, 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. décembre 2005. Vol. 97, n° 5, pp. 389-396. DOI 10.1016/j.jsbmb.2005.08.010.

ESCUDIÉ, Frédéric, AUER, Lucas, BERNARD, Maria, MARIADASSOU, Mahendra, CAUQUIL, Laurent, VIDAL, Katia, MAMAN, Sarah, HERNANDEZ-RAQUET, Guillermina, COMBES, Sylvie et PASCAL, Géraldine, 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 15 avril 2018. Vol. 34, n° 8, pp. 1287-1294. DOI 10.1093/bioinformatics/btx791.

FELL, B. F., SMITH, K. A. et CAMPBELL, R. M., 1963. Hypertrophic and hyperplastic changes in the alimentary canal of the lactating rat. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. janvier 1963. Vol. 85, pp. 179-188. DOI 10.1002/path.1700850117.

FERREIRA-HALDER, Carmen Veríssima, FARIA, Alessandra Valéria de Sousa et ANDRADE, Sheila Siqueira, 2017. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*. décembre 2017. Vol. 31, n° 6, pp. 643-648. DOI 10.1016/j.bpg.2017.09.011.

FLAK, Magdalena B., NEVES, Joana F. et BLUMBERG, Richard S., 2013. Immunology. Welcome to the microgenderome. *Science (New York, N.Y.)*. 1 mars 2013. Vol. 339, n° 6123, pp. 1044-1045. DOI 10.1126/science.1236226.

FUHLER, G. M., 2020. The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*. avril 2020. Vol. 44-45, pp. 101671. DOI 10.1016/j.bpg.2020.101671.

GOECKS, Jeremy, NEKRUTENKO, Anton, TAYLOR, James, et THE GALAXY TEAM, 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology*. 25 août 2010. Vol. 11, n° 8, pp. R86. DOI 10.1186/gb-2010-11-8-r86.

GOMEZ-ARANGO, Luisa F., BARRETT, Helen L., MCINTYRE, H. David, CALLAWAY, Leonie K., MORRISON, Mark, DEKKER NITERT, Marloes, et SPRING TRIAL GROUP, 2016. Connections Between the Gut Microbiome and Metabolic Hormones in Early Pregnancy in Overweight and Obese Women. *Diabetes*. août 2016. Vol. 65, n° 8, pp. 2214-2223. DOI 10.2337/db16-0278.

GUARD, Blake C., BARR, James W., REDDIVARI, Lavanya, KLEMASHEVICH, Cory, JAYARAMAN, Arul, STEINER, Jörg M., VANAMALA, Jairam et SUCHODOLSKI, Jan S., 2015. Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PloS One*. 2015. Vol. 10, n° 5, pp. e0127259. DOI 10.1371/journal.pone.0127259.

GUARD, Blake C., MILA, Hanna, STEINER, Jörg M., MARIANI, Claire, SUCHODOLSKI, Jan S. et CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, 2017. Characterization of the fecal microbiome during neonatal and early pediatric development in puppies. *PLoS ONE*. 27 avril 2017. Vol. 12, n° 4, pp. e0175718. DOI 10.1371/journal.pone.0175718.

GUEIMONDE, Miguel, LAITINEN, Kirsi, SALMINEN, Seppo et ISOLAURI, Erika, 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*. 2007. Vol. 92, n° 1, pp. 64-66. DOI 10.1159/000100088.

HAMMOND, K. A., 1997. Adaptation of the maternal intestine during lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. juillet 1997. Vol. 2, n° 3, pp. 243-252. DOI 10.1023/a:1026332304435.

HAMMOND, Kimberly A., KONARZEWSKI, Marek, TORRES, Rosa M. et DIAMOND, Jared, 1994. Metabolic Ceilings under a Combination of Peak Energy Demands. *Physiological Zoology*. 1994. Vol. 67, n° 6, pp. 1479-1506.

HARO, Carmen, GARCIA-CARPINTERO, Sonia, ALCALA-DIAZ, Juan F., GOMEZ-DELGADO, Francisco, DELGADO-LISTA, Javier, PEREZ-MARTINEZ, Pablo, RANGEL ZUÑIGA, Oriol A., QUINTANA-NAVARRO, Gracia M., LANDA, Blanca B., CLEMENTE, Jose C., LOPEZ-MIRANDA, Jose, CAMARGO, Antonio et PEREZ-JIMENEZ, Francisco, 2016. The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. janvier 2016. Vol. 27, pp. 27-31. DOI 10.1016/j.jnutbio.2015.08.011.

HASAN, Shah, JUNNIKKALA, Sami, PELTONIEMI, Olli, PAULIN, Lars, LYYSKI, Annina, VUORENMAA, Juhani et OLIVIERO, Claudio, 2018. Dietary supplementation with yeast hydrolysate in pregnancy influences colostrum yield and gut microbiota of sows and piglets after birth. *PLOS ONE*. 24 mai 2018. Vol. 13, n° 5, pp. e0197586. DOI 10.1371/journal.pone.0197586.

HOFFMANN, B., BÜSGES, F., ENGEL, E., KOWALEWSKI, M. P. et PAPA, P., 2004. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. août 2004. Vol. 39, n° 4, pp. 232-240. DOI 10.1111/j.1439-0531.2004.00508.x.
JOHNSON, C. A., 2008. Glucose homeostasis during canine pregnancy: Insulin resistance, ketosis, and hypoglycemia. *Theriogenology*. décembre 2008. Vol. 70, n° 9, pp. 1418-1423. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.09.008.

JOST, Ted, LACROIX, Christophe, BRAEGGER, Christian P., ROCHAT, Florence et CHASSARD, Christophe, 2014. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology*. septembre 2014. Vol. 16, n° 9, pp. 2891-2904. DOI 10.1111/1462-2920.12238.

KOREN, Omry, GOODRICH, Julia K., CULLENDER, Tyler C., SPOR, Aymé, LAITINEN, Kirsi, BÄCKHED, Helene Kling, GONZALEZ, Antonio, WERNER, Jeffrey J., ANGENENT, Lergus T., KNIGHT, Rob, BÄCKHED, Fredrik, ISOLAURI, Erika, SALMINEN, Seppo et LEY, Ruth E., 2012. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 3 août 2012. Vol. 150, n° 3, pp. 470-480. DOI 10.1016/j.cell.2012.07.008.

KOWALEWSKI, Mariusz P., GRAM, Aykut, KAUTZ, Ewa et GRAUBNER, Felix R., 2015. The Dog: Nonconformist, Not Only in Maternal Recognition Signaling. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*. 2015. Vol. 216, pp. 215-237. DOI 10.1007/978-3-319-15856-3_11.

LEEMING, Emily R., JOHNSON, Abigail J., SPECTOR, Tim D. et LE ROY, Caroline I., 2019. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*. décembre 2019. Vol. 11, n° 12, pp. 2862. DOI 10.3390/nu11122862.

LI, Y., HUANG, C., KLINDT, J. et ANDERSON, L. L., 1993. Stimulation of prolactin secretion in the pig: central effects of relaxin and the antiprogestrone RU 486. *Endocrinology*. septembre 1993. Vol. 133, n° 3, pp. 1205-1212. DOI 10.1210/endo.133.3.8365362.

LOUIS, Petra, DUNCAN, Sylvia H., MCCRAE, Sheila I., MILLAR, Jacqueline, JACKSON, Michelle S. et FLINT, Harry J., 2004. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of Bacteriology*. avril 2004. Vol. 186, n° 7, pp. 2099-2106. DOI 10.1128/JB.186.7.2099-2106.2004.

MARCINAKOVA, M., STROMPFOVA, V., BOLDIZAROVA, K., SIMONOVA, M., LAUKOVA, A. et NAD, P., 2005. Effect of potential probiotic *Enterococcus faecium* strains on selected microflora in turkeys. *Czech Journal of Animal Science - UZPI (Czech Republic)* [en ligne]. 2005. [Consulté le 29 juin 2022]. Disponible à l'adresse : <http://www.cazv.cz>

MCGUIRE, Michelle K. et MCGUIRE, Mark A., 2017. Got bacteria? The astounding, yet not-so-surprising, microbiome of human milk. *Current Opinion in Biotechnology*. avril 2017. Vol. 44, pp. 63-68. DOI 10.1016/j.copbio.2016.11.013.

MESA, María Dolores, LOUREIRO, Begoña, IGLESIA, Iris, FERNANDEZ GONZALEZ, Sergi, LLURBA OLIVÉ, Elisa, GARCÍA ALGAR, Oscar, SOLANA, María José, CABERO PEREZ, M^a Jesús, SAINZ, Talia, MARTINEZ, Leopoldo, ESCUDER-VIECO, Diana, PARRA-LLORCA, Anna, SÁNCHEZ-CAMPILLO, María, RODRIGUEZ MARTINEZ, Gerardo, GÓMEZ ROIG, Dolores, PEREZ GRUZ, Myriam, ANDREU-FERNÁNDEZ, Vicente, CLOTET, Jordi, SAILER, Sebastian, IGLESIAS-PLATAS, Isabel, LÓPEZ-HERCE, Jesús, ARAS, Rosa, PALLÁS-ALONSO, Carmen, DE PIPAON, Miguel Saenz, VENTO, Máximo, GORMAZ, María, LARQUÉ DAZA, Elvira, CALVO, Cristina et CABAÑAS, Fernando, 2020. The Evolving Microbiome from Pregnancy to Early Infancy: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2 janvier 2020. Vol. 12, n° 1, pp. 133. DOI 10.3390/nu12010133.

MINAMOTO, Yasushi, DHANANI, Naila, MARKEL, Melissa E., STEINER, Jörg M. et SUCHODOLSKI, Jan S., 2014. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*. 5 décembre 2014. Vol. 174, n° 3-4, pp. 463-473. DOI 10.1016/j.vetmic.2014.10.005.

MINAMOTO, Yasushi, OTONI, Cristiane C., STEELMAN, Samantha M., BÜYÜKLEBLEBICI, Olga, STEINER, Jörg M., JERGENS, Albert E. et SUCHODOLSKI, Jan S., 2015. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2015. Vol. 6, n° 1, pp. 33-47. DOI 10.1080/19490976.2014.997612.

MOKKALA, K., PUSSINEN, P., HOUTTU, N., KOIVUNIEMI, E., VAHLBERG, T. et LAITINEN, K., 2018. The impact of probiotics and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on intestinal permeability in pregnancy: a randomised clinical trial. *Beneficial Microbes*. 27 février 2018. Vol. 9, n° 2, pp. 199-208. DOI 10.3920/BM2017.0072.

MOKKALA, Kati, PELLONPERÄ, Outi, RÖYTIÖ, Henna, PUSSINEN, Pirkko, RÖNNEMAA, Tapani et LAITINEN, Kirsi, 2017. Increased intestinal permeability, measured by serum zonulin, is associated with metabolic risk markers in overweight pregnant women. *Metabolism: Clinical and Experimental*. avril 2017. Vol. 69, pp. 43-50. DOI 10.1016/j.metabol.2016.12.015.

MUKHOPADHYA, Indrani, HANSEN, Richard, EL-OMAR, Emad M. et HOLD, Georgina L., 2012. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. 21 février 2012. Vol. 9, n° 4, pp. 219-230. DOI 10.1038/nrgastro.2012.14.

MOSTAFA, T. H., ELSAYED, F. A., AHMED, M. A. et ELKHOLANY, M. A., 2014. Effect of using some feed additives (Tw-probiotics) in dairy cow rations on production and reproductive performance. In : *Egyptian Journal of Animal Production*. 31 Janvier 2014. Vol. 15, n°1, pp. 1-11. DOI 10.21608/ejap.2014.93661

MUYZER, G, DE WAAL, E C et UITTERLINDEN, A G, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. mars 1993. Vol. 59, n° 3, pp. 695-700.

NOBRE PACIFICO PEREIRA, Keylla Helena, FUCHS, Kárita da Mata, HIBARU, Viviane Yukari, CRUZ DOS SANTOS CORREIA, Luiz Eduardo, FERREIRA, João Carlos Pinheiro, FERREIRA DE SOUZA, Fabiana, MACHADO, Luiz Henrique de Araújo, CHIACCHIO, Simone Biagio et GOMES LOURENÇO, Maria Lucia, 2022. Neonatal sepsis in dogs: Incidence, clinical aspects and mortality. *Theriogenology*. 1 janvier 2022. Vol. 177, pp. 103-115. DOI 10.1016/j.theriogenology.2021.10.015.

NURIEL-OHAYON, Meital, NEUMAN, Hadar, ZIV, Oren, BELOGOLOVSKI, Anna, BARSHESHET, Yiftah, BLOCH, Naamah, UZAN, Atara, LAHAV, Roey, PERETZ, Avi, FRISHMAN, Sigal, HOD, Moshe, HADAR, Eran, LOUZOUN, Yoram, AVNI, Orly et KOREN, Omry, 2019. Progesterone Increases Bifidobacterium Relative Abundance during Late Pregnancy. *Cell Reports*. 16 avril 2019. Vol. 27, n° 3, pp. 730- 736.e3. DOI 10.1016/j.celrep.2019.03.075.

OFTEDAL, O. T., 1984. Lactation in the dog: milk composition and intake by puppies. *The Journal of Nutrition*. mai 1984. Vol. 114, n° 5, pp. 803-812. DOI 10.1093/jn/114.5.803.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE, 2001. Y6398F : Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes [en ligne]. Cordoba, Argentine. [Consulté le 20 Juin 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.jstor.org/stable/1523706?origin=crossref>.

PALMER, Chana, BIK, Elisabeth M., DIGIULIO, Daniel B., RELMAN, David A. et BROWN, Patrick O., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*. juillet 2007. Vol. 5, n° 7, pp. e177. DOI 10.1371/journal.pbio.0050177.

PAPA, Paula C. et KOWALEWSKI, Mariusz P., 2020. Factors affecting the fate of the canine corpus luteum: Potential contributors to pregnancy and non-pregnancy. *Theriogenology*. 1 juillet 2020. Vol. 150, pp. 339-346. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.01.081.

PELZER, Elise S., ALLAN, John A., THEODOROPOULOS, Christina, ROSS, Tara, BEAGLEY, Kenneth W. et KNOX, Christine L., 2012. Hormone-dependent bacterial growth, persistence and biofilm formation--a pilot study investigating human follicular fluid collected during IVF cycles. *PloS One*. 2012. Vol. 7, n° 12, pp. e49965. DOI 10.1371/journal.pone.0049965.

PENG, Xie, YAN, Chuan, HU, Liang, HUANG, Yingyan, FANG, Zhengfeng, LIN, Yan, XU, Shengyu, FENG, Bin, LI, Jian, ZHUO, Yong, WU, De et CHE, Lianqiang, 2020. Live yeast supplementation during late gestation and lactation affects reproductive performance, colostrum and milk composition, blood biochemical and immunological parameters of sows. *Animal Nutrition*. 1 septembre 2020. Vol. 6, n° 3, pp. 288-292. DOI 10.1016/j.aninu.2020.03.001.

PEREZ, Pablo, DORE, Joel, LECLERC, Marion, FLORENCE, Levenez, BENYACOUB, Jalil, SERRANT, Patrick, SEGURA-ROGGERO, Iris, SCHIFFRIN, Eduardo et DONNET-HUGHES, Anne, 2007. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics*. 1 mars 2007. Vol. 119, pp. e724-32. DOI 10.1542/peds.2006-1649.
PRENTICE, A. M. et PRENTICE, A., 1988. Energy costs of lactation. *Annual Review of Nutrition*. 1988. Vol. 8, pp. 63-79. DOI 10.1146/annurev.nu.08.070188.000431.

PRIETO, R. M., FERRER, M., FE, J. M., RAYÓ, J. M. et TUR, J. A., 1994. Morphological adaptive changes of small intestinal tract regions due to pregnancy and lactation in rats. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 1994. Vol. 38, n° 5, pp. 295-300. DOI 10.1159/000177824.

QI, Xinyu, YUN, Chuyu, PANG, Yanli et QIAO, Jie, 2021. The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. *Gut Microbes*. décembre 2021. Vol. 13, n° 1, pp. 1-21. DOI 10.1080/19490976.2021.1894070.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RAKOFF-NAHOUM, Seth, PAGLINO, Justin, ESLAMI-VARZANEH, Fatima, EDBERG, Stephen et MEDZHITOV, Ruslan, 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 23 juillet 2004. Vol. 118, n° 2, pp. 229-241. DOI 10.1016/j.cell.2004.07.002.

RECART-CONORT, Adèle. Prébiotiques et probiotiques en gastroentérologie des carnivores domestiques : état des preuves. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort – ENVA, 2015, 97p.

RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J. P. et RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*. avril 2001. Vol. 2, n° 4, pp. 361-367. DOI 10.1038/86373.

RIGOBELLO, Everlon, 2010. Probiotic in Animals. S.I. : BoD – Books on Demand. ISBN 978-953-51-0777-4.

ROBERTSON, Sarah A., GUERIN, Leigh R., BROMFIELD, John J., BRANSON, Kim M., AHLSTRÖM, Aisling C. et CARE, Alison S., 2009. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biology of Reproduction*. mai 2009. Vol. 80, n° 5, pp. 1036-1045. DOI 10.1095/biolreprod.108.074658.

RODRIGUEZ, A. V., BAIGORÍ, M. D., ALVAREZ, S., CASTRO, G. R. et OLIVER, G., 2001. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate. *FEMS microbiology letters*. 16 octobre 2001. Vol. 204, n° 1, pp. 33-38. DOI 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10858.x.

RODRÍGUEZ, Juan M., 2014. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*. novembre 2014. Vol. 5, n° 6, pp. 779-784. DOI 10.3945/an.114.007229.

SAITO, Shigeru, NAKASHIMA, Akitoshi, SHIMA, Tomoko et ITO, Mika, 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*. juin 2010. Vol. 63, n° 6, pp. 601-610. DOI 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x.

SENTMAN, Charles L., MEADOWS, Sarah K., WIRA, Charles R. et ERIKSSON, Mikael, 2004. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1 décembre 2004. Vol. 173, n° 11, pp. 6760-6766. DOI 10.4049/jimmunol.173.11.6760.

SHIMA, Tomoko, INADA, Kumiko, NAKASHIMA, Akitoshi, USHIJIMA, Akemi, ITO, Mika, YOSHINO, Osamu et SAITO, Shigeru, 2015. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. avril 2015. Vol. 108, pp. 72-82. DOI 10.1016/j.jri.2015.02.005.

SUCHODOLSKI, Jan S., MARKEL, Melissa E., GARCIA-MAZCORRO, Jose F., UNTERER, Stefan, HEILMANN, Romy M., DOWD, Scot E., KACHROO, Priyanka, IVANOV, Ivan, MINAMOTO, Yasushi, DILLMAN, Enricka M., STEINER, Jörg M., COOK, Audrey K. et TORESSON, Linda, 2012. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PloS One*. 2012. Vol. 7, n° 12, pp. e51907. DOI 10.1371/journal.pone.0051907.

SUCHODOLSKI, Jan S., XENOULIS, Panagiotis G., PADDOCK, Casey G., STEINER, Jörg M. et JERGENS, Albert E., 2010. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*. 19 mai 2010. Vol. 142, n° 3-4, pp. 394-400. DOI 10.1016/j.vetmic.2009.11.002.

SYKES, Lynne, MACINTYRE, David A., YAP, Xiao J., TEOH, Tiong Ghee et BENNETT, Phillip R., 2012. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators of Inflammation*. 2012. Vol. 2012, pp. 967629. DOI 10.1155/2012/967629.

WANG, Chen, ZHAO, Jianxin, ZHANG, Hao, LEE, Yuan-Kun, ZHAI, Qixiao et CHEN, Wei, 2021. Roles of intestinal bacteroides in human health and diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021. Vol. 61, n° 21, pp. 3518-3536. DOI 10.1080/10408398.2020.1802695.

ZHANG, Zhongwang, LV, Jianliang, PAN, Li et ZHANG, Yongguang, 2018. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. octobre 2018. Vol. 102, n° 19, pp. 8135-8143. DOI 10.1007/s00253-018-9217-9.

ANNEXES


Annexe 1: Composition de l'aliment sec complet pour chiens adultes

Aliment complet pour chien adulte	
Composition : Blé, Pois, Protéines de volaille déshydratées (18%), Graisse de volaille, Gluten de maïs, Protéines de volaille hydrolysées, Riz, Hydrolysat de viandes, Protéines d'agneau, Protéines de poissons déshydratées (0.5%).	
Constituants analytiques	Oligo-éléments
Protéines brutes.....30,00 %	Fer (Sulfate de fer monohydraté).....17 mg/kg
Matières grasses brutes.....16,00 %	Iode (Iodate de calcium anhydre).....1,5 mg/kg
Cellulose brute.....3,00 %	Cuivre (Sulfate cuivrique pentahydraté).....15 mg/kg
Cendres brutes.....7,00 %	Manganèse (Sulfate de manganèse monohydraté)..... 25 mg/kg
Vitamine A.....7 200 UI/kg	Zinc (Sulfate de zinc monohydraté).....87 mg/kg
Vitamine D3.....1 000 UI/kg	Sélénium (Sélénite de sodium).....0,13 mg/kg
Vitamines	Antioxygènes
Vitamine A.....12 000 UI/kg	
Vitamine D3.....15 000 UI/kg	

Annexe 2: Composition de l'aliment sec complet pour chiots


Aliment complet pour chiot	
Composition : Protéines de volaille déshydratées (30%), Maïs, Blé, Riz (15%), Graisse de volaille, Hydrolysat de viandes, Gluten de maïs, Pulpe de betterave déshydratée, Minéraux, Huile de poisson.	
Constituants analytiques	Oligo-éléments
Protéines brutes..... 26,00 %	Fer (Sulfate de fer monohydraté).....17 mg/kg
Matières grasses brutes..... 18,00 %	Iode (Iodate de calcium anhydre).....1,5 mg/kg
Cellulose brute..... 2,00 %	Cuivre (Sulfate cuivrique pentahydraté).....15 mg/kg
Cendres brutes.....8,00 %	Manganèse (Sulfate de manganèse monohydraté)..... 25 mg/kg
Humidité..... 10,00 %	Zinc (Sulfate de zinc monohydraté).....87 mg/kg
Vitamines	Sélénium (Sélénite de sodium).....0,13 mg/kg
Vitamine A..... 7 200 UI/kg	Antioxygènes
Vitamine D3.....1 000 UI/kg	
Vitamine E..... 80 mg/kg	










Annexe 3: Grille d'évaluation des Notes d'Etat Corporel des chiennes (NEC)




WEIGHT MANAGEMENT PROGRAMME

**BODY CONDITION SCORE
LARGE DOG**













TOO THIN		
<p>1</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs, lumbar vertebrae, pelvic bones and all bony prominences evident from a distance • No discernible body fat • Obvious loss of muscle mass 	<p>2</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs, lumbar vertebrae, and pelvic bones easily visible • No palpable fat • Some bony prominences visible from a distance • Minimal loss of muscle mass 	<p>3</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs easily palpable and may be visible with no palpable fat • Tops of lumbar vertebrae visible, pelvic bones becoming prominent • Obvious waist and abdominal tuck
IDEAL		
<p>4</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs easily palpable with minimal fat covering • Waist easily noted when viewed from above • Abdominal tuck evident 	<p>5</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs palpable without excess fat covering • Waist observed behind ribs when viewed from above • Abdomen tucked up when viewed from side 	<p>6</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs palpable with slight excess of fat covering • Waist is discernible when viewed from above but is not prominent • Abdominal tuck apparent
OVERWEIGHT		
<p>7</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs palpable with difficulty, heavy fat cover • Noticeable fat deposits over lumbar area and base of tail • Waist absent or barely visible • Abdominal tuck may be absent 	<p>8</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs not palpable under very heavy fat cover or palpable only with significant pressure • Heavy fat deposits over lumbar area and base of tail • Waist absent • No abdominal tuck • Obvious abdominal distension may be present 	<p>9</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Massive fat deposits over thorax, spine, and base of tail • Waist and abdominal tuck absent • Fat deposits on neck and limbs • Obvious abdominal distension



SHAPING UP TO PET OBESITY
SUPPORTED BY ROYAL CANIN

**BODY CONDITION SCORE
MEDIUM DOG**



TOO THIN		
<p>1</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs, lumbar vertebrae, pelvic bones and all bony prominences evident from a distance • No discernible body fat • Obvious loss of muscle mass 	<p>2</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs, lumbar vertebrae, and pelvic bones easily visible • No palpable fat • Some bony prominences visible from a distance • Minimal loss of muscle mass 	<p>3</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs easily palpable and may be visible with no palpable fat • Tops of lumbar vertebrae visible, pelvic bones becoming prominent • Obvious waist and abdominal tuck
IDEAL		
<p>4</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs easily palpable with minimal fat covering • Waist easily noted when viewed from above • Abdominal tuck evident 	<p>5</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs palpable without excess fat covering • Waist observed behind ribs when viewed from above • Abdomen tucked up when viewed from side 	<p>6</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs palpable with slight excess of fat covering • Waist is discernible when viewed from above but is not prominent • Abdominal tuck apparent
OVERWEIGHT		
<p>7</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs palpable with difficulty, heavy fat cover • Noticeable fat deposits over lumbar area and base of tail • Waist absent or barely visible • Abdominal tuck may be absent 	<p>8</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Ribs not palpable under very heavy fat cover or palpable only with significant pressure • Heavy fat deposits over lumbar area and base of tail • Waist absent • No abdominal tuck • Obvious abdominal distension may be present 	<p>9</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Massive fat deposits over thorax, spine, and base of tail • Waist and abdominal tuck absent • Fat deposits on neck and limbs • Obvious abdominal distension

Annexe 4: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre J28 et J56 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)

- OTUs les plus abondants à J28 plutôt qu'à J56

Phylum	Famille	Genre
Firmicutes	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Weissella</i>
Actinobacteria	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>
Deinococcota	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>
Bacteroidetes	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i>

- OTUs les plus abondants à J56 qu'à J28

Phylum	Famille	Genre
Actinobacteria	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
Actinobacteria	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Gleimia</i>
Actinobacteria	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Gleimia</i>
Actinobacteria	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Psychrobacter</i>

Annexe 5: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre J56 et P1 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)

- OTUs les plus abondants à P1 plutôt qu'à J56

Phylum	Famille	Genre
Firmicutes	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Anaerofilum</i>
Firmicutes	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Multi-affiliation</i>
Proteobacteria	<i>Succinivibrionaceae</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>
Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Psychrobacter</i>
Firmicutes	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>

Annexe 6: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre P1 et P28 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)

- OTUs les plus abondants à P28 plutôt qu'à P1

Phylum	Famille	Genre
Firmicutes	<i>Unknown family</i>	<i>Unknown genus</i>
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Ligilactobacillus</i>
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Firmicutes	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Ligilactobacillus</i>

Annexe 7: OTUs dont les variations d'abondance sont les plus importantes entre deux dates : comparaison entre P28 et P56 chez les 36 chiennes de l'étude (test de Student)

- OTUs les plus abondants à P28 plutôt qu'à P56

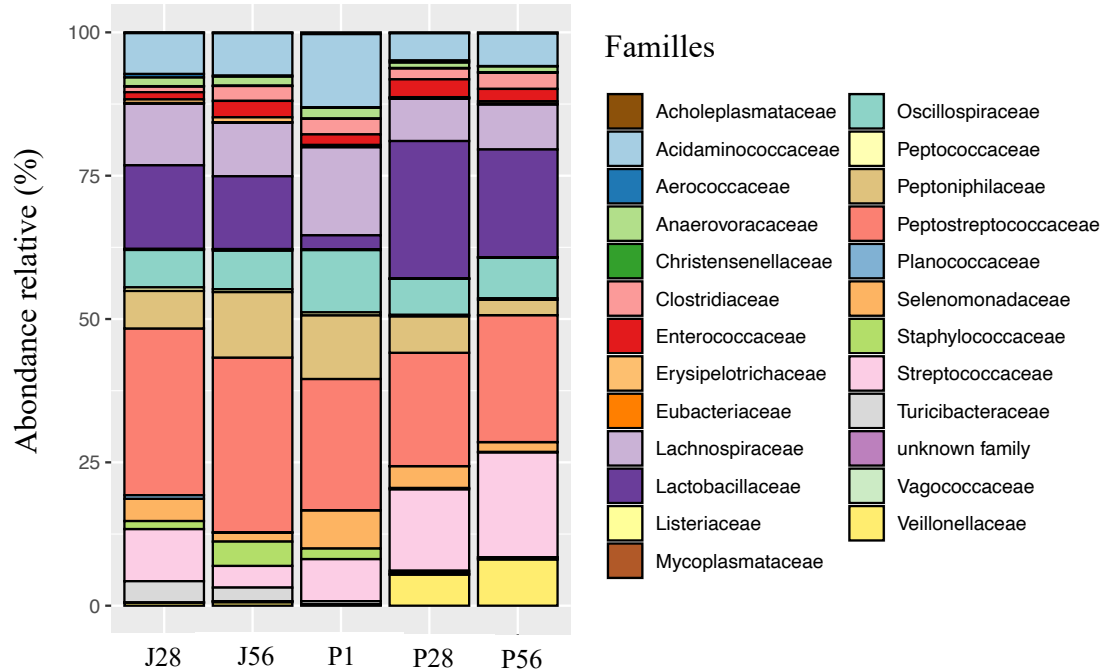
Phylum	Famille	Genre
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>
Firmicutes	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Multi-affiliation</i>
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
Firmicutes	<i>Turicibacteraceae</i>	<i>Turicibacter</i>

- OTUs les plus abondants à P56 plutôt qu'à P28

Phylum	Famille	Genre
Fusobacteria	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Cetobacterium</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Cetobacterium</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Cetobacterium</i>
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>

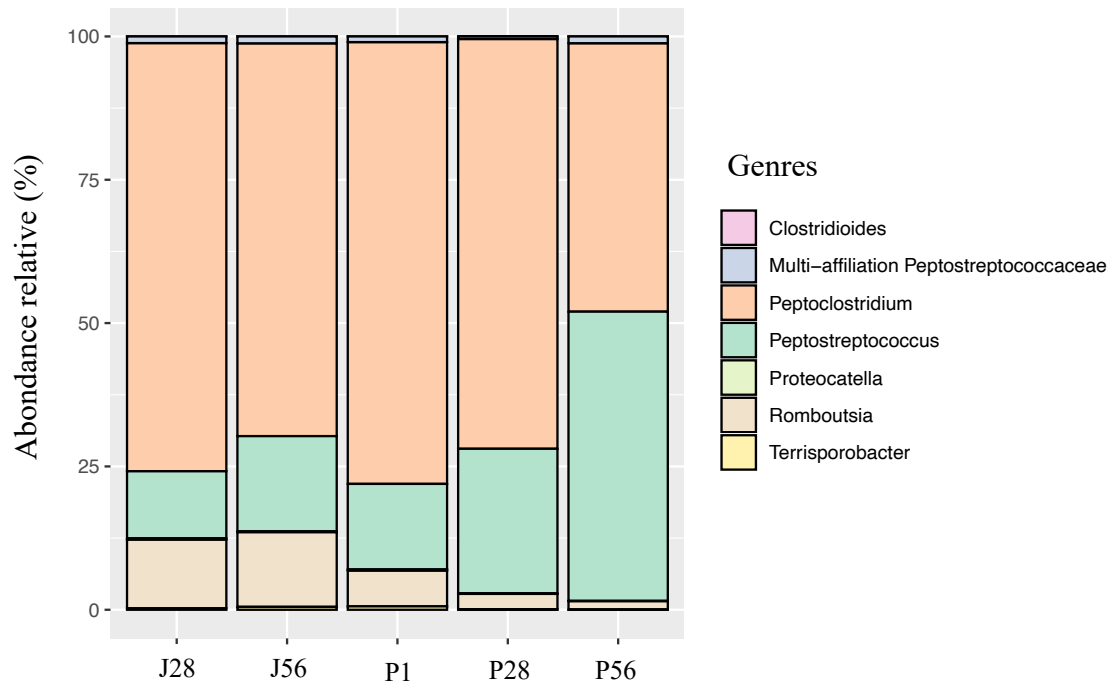
Annexe 8: Composition du phylum Firmicutes au cours de la gestation et de la lactation –
abondance relative (%)

Composition du phylum Firmicutes au cours de la
gestation et de la lactation



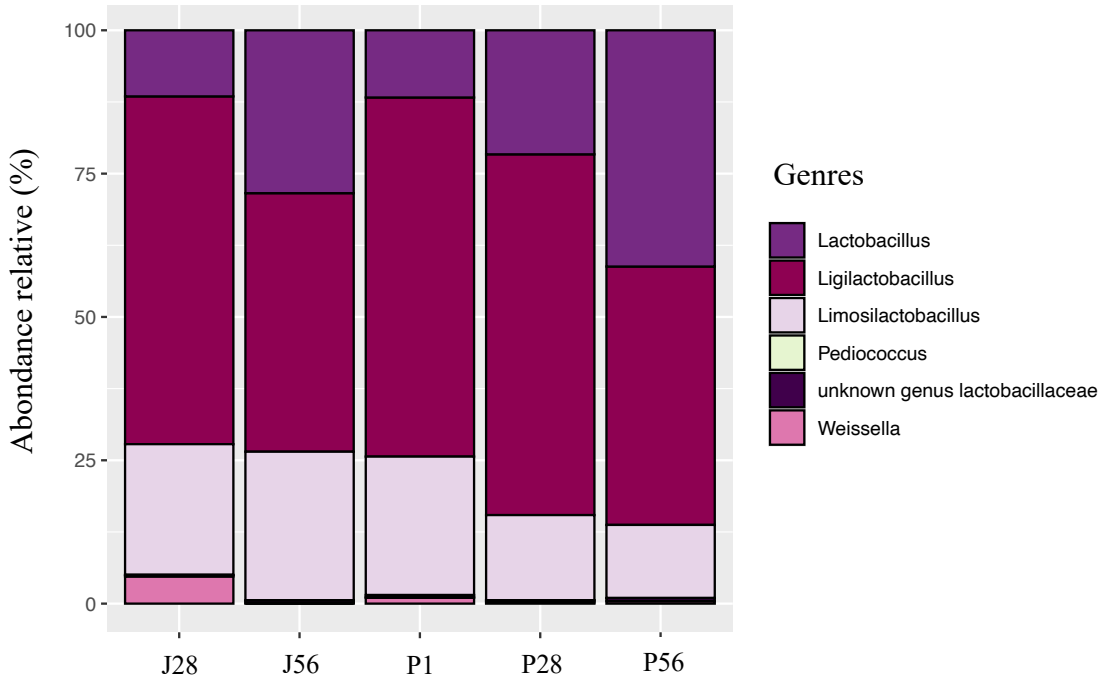
Annexe 9: Composition de la famille *Peptostreptococcaceae* au cours de la gestation et de la
lactation – abondance relative (%)

Composition de la famille *Peptostreptococcaceae* au cours
de la gestation et de la lactation



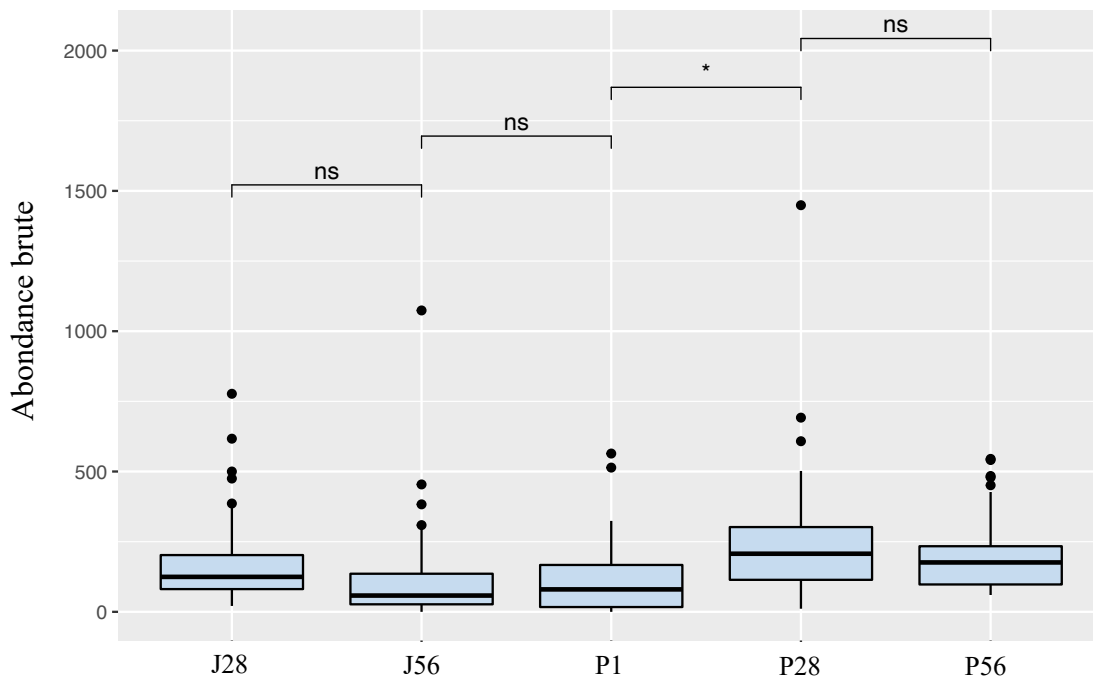
Annexe 10: Composition de la famille *Lactobacillaceae* au cours de la gestation et de la lactation – abondance relative (%)

Composition de la famille *Lactobacillaceae* au cours de la gestation et de la lactation



Annexe 11: Variations de l'abondance du genre *Faecalibacterium* au cours de la gestation et de la lactation – abondance brute

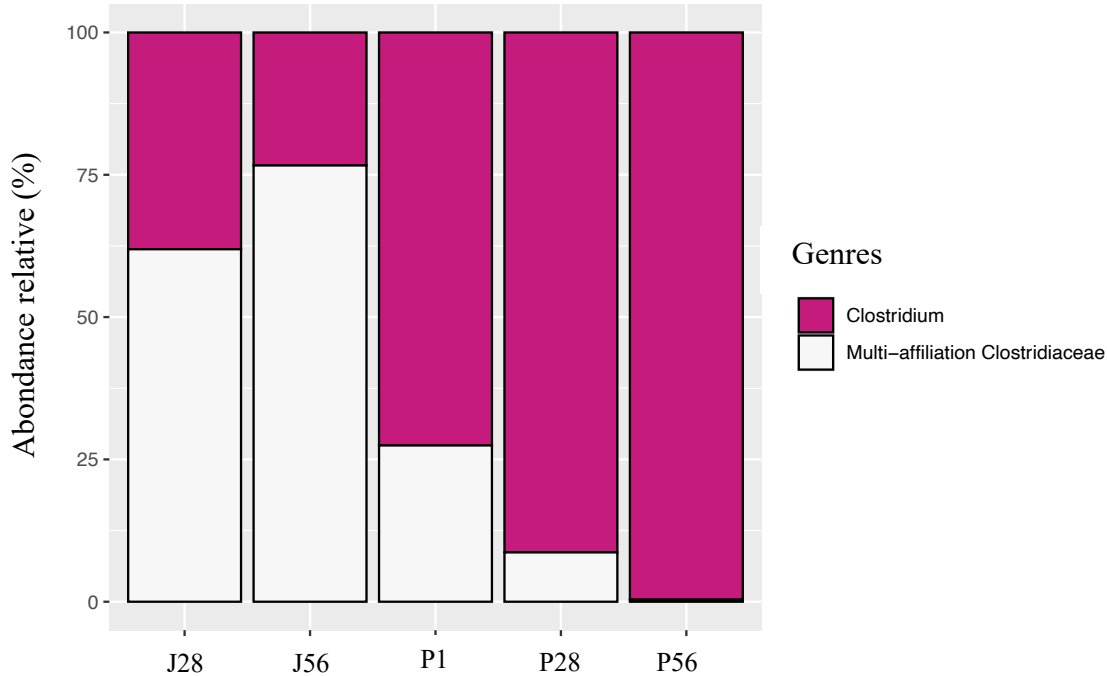
Variations de l'abondance du genre *Faecalibacterium* au cours de la gestation et de la lactation – abondance brute



Annexe 12: Composition de la famille *Clostridiaceae* au cours de la gestation et de la lactation

– abondance relative (%)

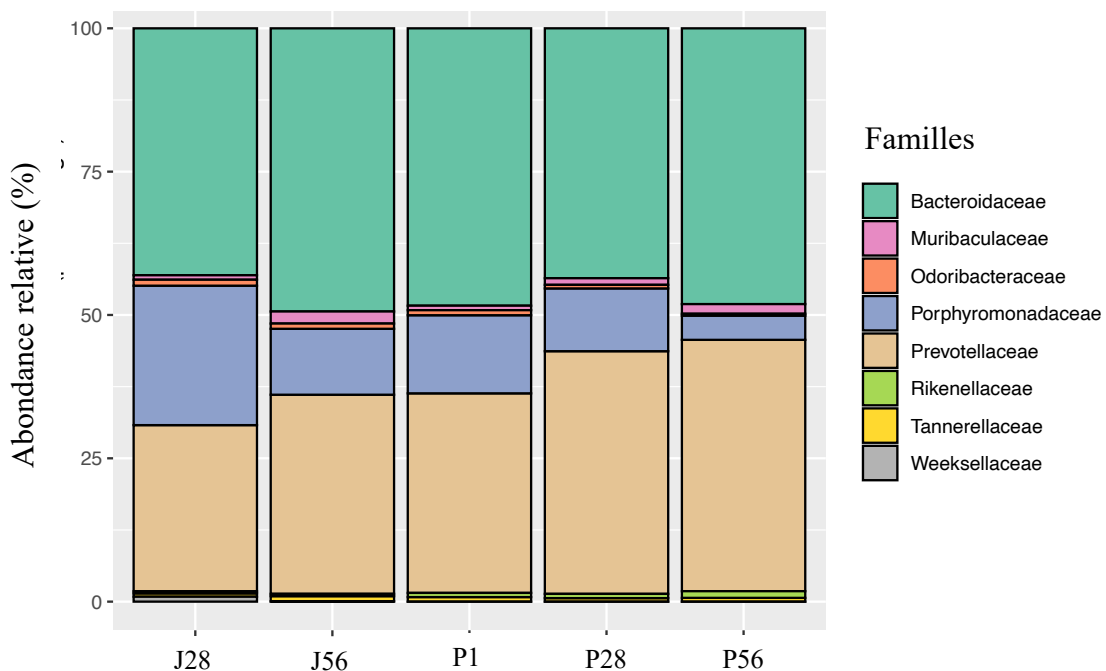
Composition de la famille *Clostridiaceae* au cours de la gestation et de la lactation



Annexe 13: Composition du phylum Bacteroidetes au cours de la gestation et de la lactation –

abondance relative (%)

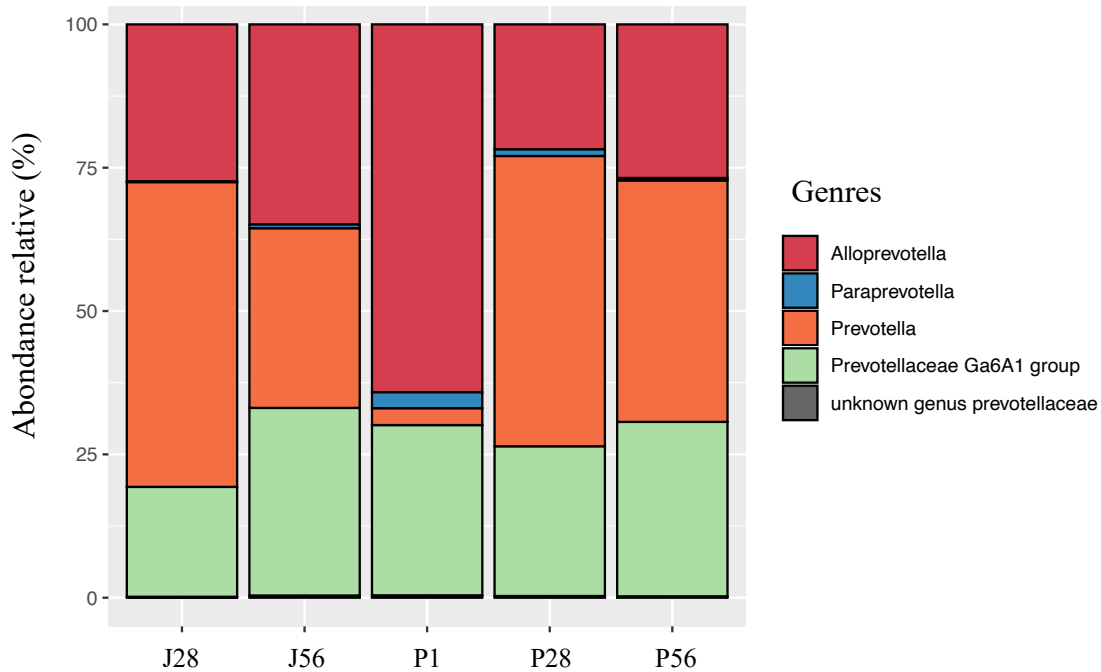
Composition du phylum Bacteroidetes au cours de la gestation et de la lactation



Annexe 14: Composition de la famille *Prevotellaceae* au cours de la gestation et de la lactation

– abondance relative (%)

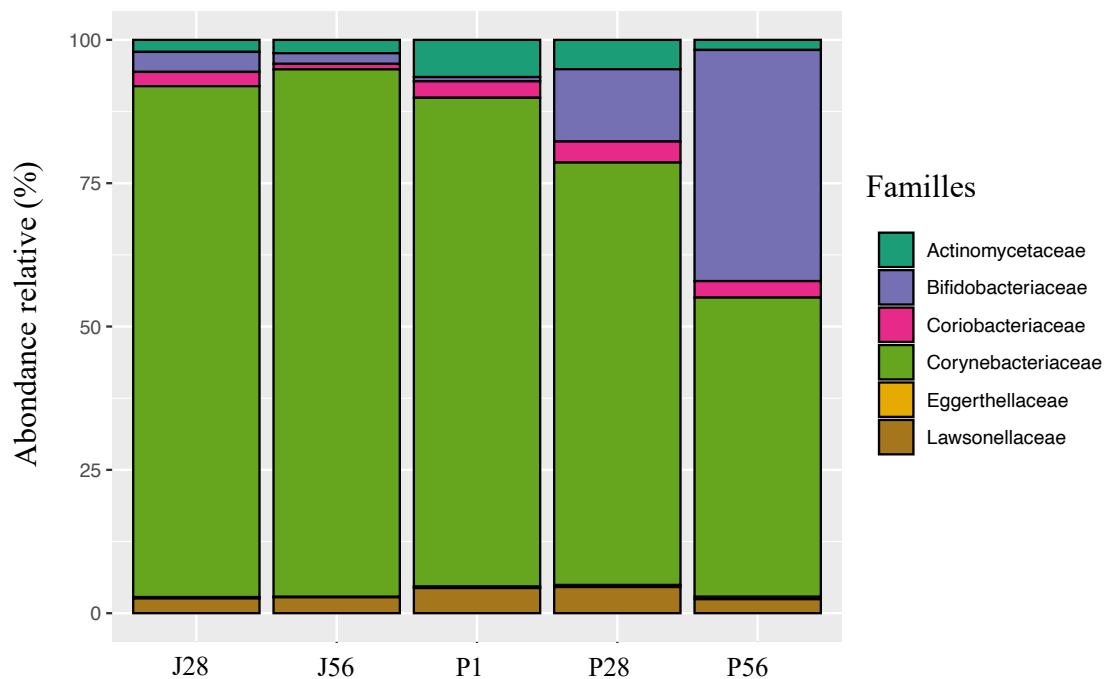
Composition de la famille *Prevotellaceae* au cours de la gestation et de la lactation



Annexe 15: Composition du phylum Actinobacteria au cours de la gestation et de la lactation

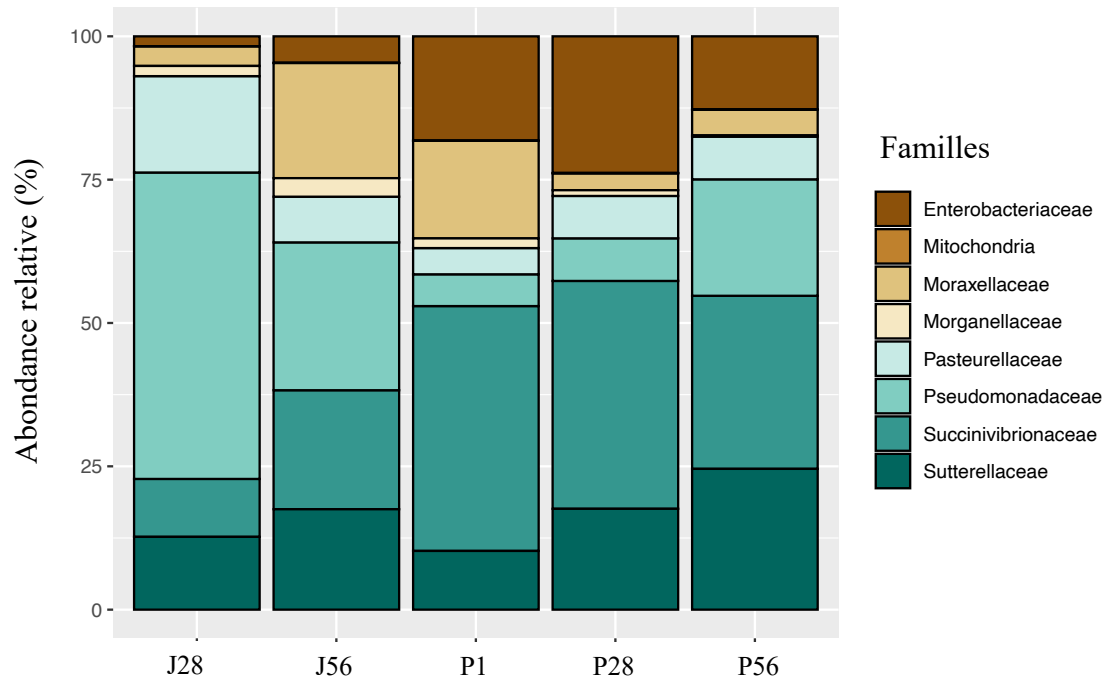
– abondance relative (%)

Composition du phylum Actinobacteria au cours de la gestation et de la lactation



Annexe 16: Composition de la phylum Proteobacteria au cours de la gestation et de la lactation
– abondance relative (%)

Composition du phylum Proteobacteria au cours de la gestation
et de la lactation



Annexe 17 : Poster scientifique "Evolution of the fecal microbiota during gestation, birth and lactation in the canine species" réalisé par Quentin Garrigues (PhD Student – Agricultural engineering MSc)

EVOLUTION OF THE FECAL MICROBIOTA DURING GESTATION, BIRTH AND LACTATION IN THE CANINE SPECIES

Quentin GARRIGUES¹, Emmanuelle APPER², Fanny MERCIER¹, Ana RODILES², Sylvie CHASTANT¹, Hanna MILA¹
¹Neocare, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France ; ²Lallemand SAS, Blagnac, France

INTRODUCTION

- During and after pregnancy, bitches experience physiologic and metabolic changes which may also impact their microbiota composition, as demonstrated in other species^[1].
- Maternal microbiome plays critical roles in maternal and infant health over parturition^[2], but remains elusive in canine species.



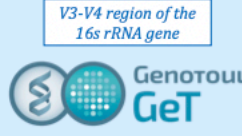
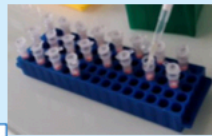
AIM

To analyze shifts in fecal microbiota composition during pregnancy and lactation in the canine species.

MATERIAL AND METHOD

- 36 dams of 9 different breeds within 1 kennel.
- Rectal swabs at 5 key time points for microbiota analysis (180 in total).

DNA Extraction + Illumina Sequencing



V3-V4 region of the 16s rRNA gene
 Illumina MiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA, United States) at GeT-PlaGe INRAE Platform (Toulouse, France)

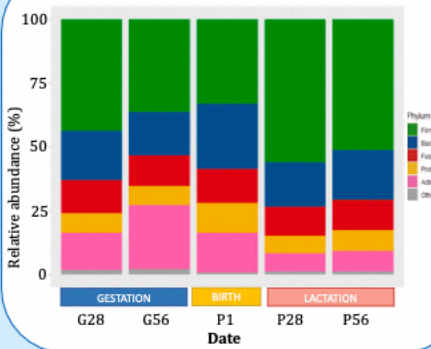
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, USA)

Sequences affiliation and analyses

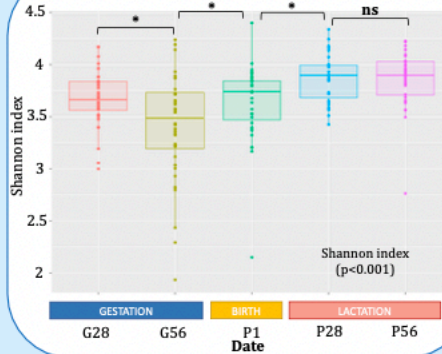
- Demultiplexing, clustering, chimera removal, filtration of sequences and taxonomy assignment against SILVA (v138) database
- Analysis of microbiota composition + Alpha and Beta bacterial diversities
- Use of Deseq2 for differential bacterial abundance analysis between dates.
- All analyses were conducted using FROGS software on Galaxy platform^[3].

RESULTS

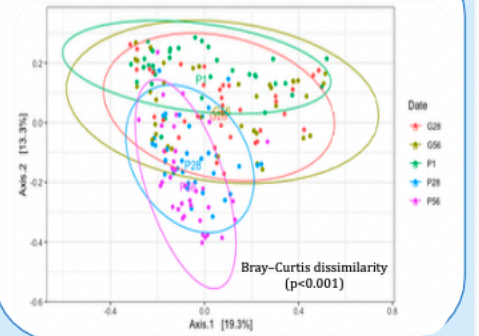
Evolution of the relative abundance of major phyla



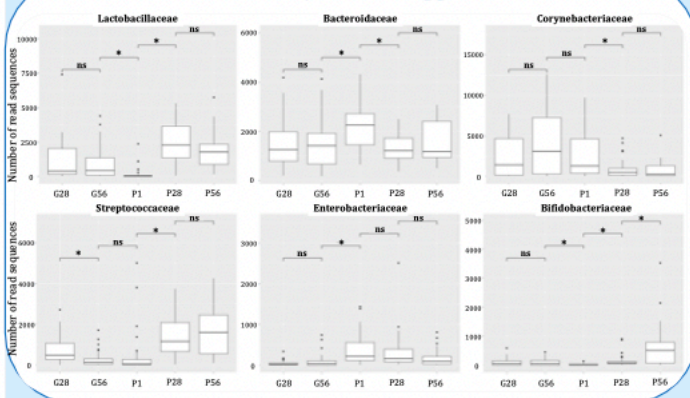
Evolution of the bacterial richness over time



MDS plot showing changes in faecal microbiota community composition over time



6 bacterial families with major shifts during gestation and lactation



DISCUSSION

- Major modifications of the bacterial composition are observed around parturition in the bitch.
- Beta diversity allowed to highlight 3 bacterial profiles : one during gestation, one after birth and one during lactation.
- Bacterial richness decrease over gestation before increasing back after parturition. This evolution might be linked to hormones' concentration, like progesterone^[4].
- The abundance of some key bacteria of milk microbiota (*Bifidobacteria* and *Lactobacilli*) almost disappear at parturition, suggesting a potential bacterial entero-mammary pathway^[5].

[1] Liu H et al. Microbial and metabolic alterations in gut microbiota of sows during pregnancy and lactation. *Faseb* 2019;33:4490-4501.
 [2] DiGiulio D et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2015;112:11060-11065.
 [3] Escudé F et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 2018; 34(8):1287-1294.
 [4] Nuttiel-Ohayon M et al. Progesterone Increases Bifidobacterium Relative Abundance during Late Pregnancy. *Cell Reports* 2019; 27(3):730-736.
 [5] Rodriguez JM et al. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 2014; 5(6):779-784



Quentin GARRIGUES
 PhD Student - Agricultural engineering MSc
 NeoCare, Université de Toulouse, ENVT, Toulouse, France
 quentin.garrigues@envt.fr

NeoCare & LALLEMAND

envt national veterinary school toulouse

NOM : MERCIER Fanny

TITRE : Modifications du microbiote intestinal chez la chienne en gestation et en lactation : Étude expérimentale

RESUME : Le microbiote intestinal est primordial pour une bonne santé digestive mais a aussi un impact sur le fonctionnement hormonal, l'immunité et le métabolisme. La chienne présente de multiples modifications anatomiques et physiologiques au cours de la gestation et cette étude décrit en plus les modifications du microbiote intestinal au cours de cette période. Lors de cette période on observe une diminution de l'alpha-diversité ainsi qu'une augmentation de la bêta-diversité. Certaines espèces microbiennes, bénéfiques pour le nouveau-né, comme *Lactobacillus spp.* et *Bifidobacterium spp.*, sont moins abondantes au moment de la mise-bas, corroborant ainsi les hypothèses de passage de bactéries du tube digestif à la mamelle. On observe aussi une balance entre bactéries à action anti-inflammatoire (phylum Firmicutes) présentes au cours de la gestation et bactéries induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (phylum Proteobacteria) en plus grande quantité au moment de la mise-bas. L'importance de ces modifications sur la santé du nouveau-né reste à explorer.

MOTS CLES : Microbiote Intestinal, Chiennes, Gestation, Lactation

TITLE: Intestinal microbiota alterations of bitches during gestation and lactation: experimental study

ABSTRACT: The intestinal microbiota plays an important role in digestive health but also has an impact on hormonal functioning, immunity and metabolism. Dams present numerous anatomic and physiologic modifications along gestation and lactation and this study demonstrates intestinal microbiota's modifications along those periods. A decrease in alpha-diversity and an increase in bêta-diversity were observed during the studies period. Some bacterial species, benefic for the newborn , such as *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.* are significantly less abundanded at parturition time corroborating with the hypothesis of an entero-mammary bacterial translocation. A balance between anti-inflammatory bacteria (phylum Firmicutes) along the gestation and a higher abundance of bacteria producing pro-inflammatory cytokines (phylum Proteobacteria) at parturition is observed. Importance of the described microbial alterations on the newborn health remain to be investigated.

KEYWORDS : Intestinal microbiota, Bitches, Gestation, Lactation

JURY : Professeur Laurent Alric

Docteur Hanna MILA

Professeur Véronique Gayrard