



HAL
open science

Lien entre le microbiote fécal à la naissance et la mortalité néonatale chez le chiot : étude expérimentale

Jeanne Tastet

► To cite this version:

Jeanne Tastet. Lien entre le microbiote fécal à la naissance et la mortalité néonatale chez le chiot : étude expérimentale. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04711675

HAL Id: dumas-04711675

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04711675v1>

Submitted on 27 Sep 2024

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.

ANNEE 2024 THESE : 2024 – TOU 3 – 4031

LIEN ENTRE LE MICROBIOTE FÉCAL À LA NAISSANCE ET LA MORTALITÉ NÉONATALE CHEZ LE CHIOT – ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

TASTET Jeanne, Paule, Marie

Directrice de thèse : Mme Hanna MILA

PRESIDENTE :
Mme Annabelle MEYNADIER

ASSESEURS :
Mme Hanna MILA
Mme Aude FERRAN

MEMBRE INVITE :
M. Quentin GARRIGUES

JURY

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Docteur en microbiologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- 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*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

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. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
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**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie de santé des bovins*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie pathologique*
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. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
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 **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
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 **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

REMERCIEMENTS

Que soit exprimée toute ma reconnaissance à

Madame le Professeur Annabelle MEYNADIER,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Alimentation Animale,

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

Hommages respectueux.

Madame le Docteur Hanna MILA,

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Élevage des carnivores domestiques,

Pour son soutien et son accompagnement tout au long de ces travaux et cette année. Pour sa bienveillance, sa gentillesse et ses nombreux conseils.

Remerciements très chaleureux.

Madame le Docteur Aude FERRAN

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Physiologie et Thérapeutique,

Qui a très aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Sincères remerciements.

Enfin, j'adresse mes remerciements et toute ma sympathie à

Monsieur le Docteur Quentin GARRIGUES,

Docteur en microbiologie,

Pour son aide considérable à l'aboutissement de cette thèse, sa patience et sa grande disponibilité.

Remerciements très chaleureux.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ANNEXES	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
INTRODUCTION.....	13
PARTIE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE – MICROBIOTE INTESTINAL ET MORTALITÉ NÉONATALE.....	15
1. <i>Le microbiote intestinal chez le jeune : composition, mise en place et évolution...</i>	15
1.1. Définition du microbiote.....	15
1.2. Composition du microbiote intestinal chez le chien.....	16
1.3. Facteurs de variations du microbiote intestinal chez le chiot	19
2. <i>L'importance de la mortalité néonatale chez le chien</i>	21
2.1. Mortalité globale chez le chiot et période néonatale : définitions.....	21
2.2. État des lieux de la mortalité chez le chiot	22
2.3. Les causes de mortalité néonatale	22
2.4. La septicémie chez le chiot.....	23
3. <i>Lien établi entre le microbiote et la santé chez le jeune</i>	25
3.1. Chez l'Homme	25
3.2. Chez le chien.....	25
PARTIE II. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE – LIEN ENTRE LE MICROBIOTE FÉCAL À LA NAISSANCE ET LA MORTALITÉ NÉONATALE CHEZ LE CHIOT.....	28
1. <i>Matériel et méthode</i>	28
1.1. Populations étudiées.....	28
1.2. Prélèvements effectués.....	29
1.3. Méthode d'extraction et de séquençage.....	30
1.4. Méthodes d'analyses et statistiques	32
2. <i>Résultats</i>	33
2.1. Description de la population générale étudiée	33
2.2. Taux de mortalité des chiots en période néonatale précoce.....	34
2.3. Comparaison des paramètres de santé, obtenus lors de la période néonatale, des populations de chiots vivants et de chiots décédés.....	35
2.4. Composition et évolution du microbiote fécal de la cohorte des chiots vivants jusqu'à deux mois d'âge.....	36

2.4.1. Description de la composition au sein de la population des vivants	37
2.4.2. Comparaison de la composition selon l'âge au sein de la population des vivants.....	40
2.4.3. Comparaison des indices de diversité selon l'âge au sein de la population des vivants.....	40
2.5. Comparaison de la composition du microbiote fécal en fonction du statut du chiot (vivant ou décédé) et son évolution entre J0 et J2	42
2.5.1. Comparaison des indices de diversité	42
2.5.2. Comparaison de la composition du microbiote fécal des deux populations de chiots.....	46
3. Discussion	57
3.1. Les limites de l'étude.....	57
3.2. Évolution du microbiote fécal au cours des premiers jours de vie	59
3.3. Comparaison du microbiote fécal entre les chiots vivants et les chiots décédés	62
3.4. Perspectives	65
CONCLUSION.....	67
BIBLIOGRAPHIE.....	68
ANNEXES	80

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1. FACTEURS MAJEURS INFLUENÇANT LE DEVELOPPEMENT DU MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ LE CHIOT, DE LA NAISSANCE A L'AGE ADULTE. LES ENCADRES ORANGE CORRESPONDENT AUX FACTEURS DONT L'EFFET A ETE DEMONTRE, ALORS QUE L'ENCADRE ROSE ILLUSTRE UN IMPACT HYPOTHETIQUE. LES ENCADRES ROUGES CORRESPONDENT A DES FACTEURS FACULTATIFS ASSOCIES AVEC DE LA DYSBIOSE, LES ENCADRES VERTS DES FACTEURS FACULTATIFS AVEC DES EFFETS BENEFIQUES SUR LE MICROBIOTE. (ADAPTE D'APRES (GARRIGUES ET AL. 2022))..... 21
- FIGURE 2. PROPORTION DE CHIOTS INCLUS DANS L'ETUDE PARMIS LES DIFFERENTES RACES SELON LEUR STATUT DE SANTE (LES VIVANTS EN BLEU, N=57 ; LES DECEDES EN ROUGE, N=20) AVANT L'AGE DE DEUX MOIS. 34
- FIGURE 3. NOMBRE DE CHIOTS DECEDES (N=20) SELON L'AGE (EN JOUR)..... 35
- FIGURE 4. COMPOSITION DU MICROBIOTE FECAL DES CHIOTS VIVANTS JUSQU'A 2 MOIS D'AGE (N=57) AU NIVEAU DU PHYLUM (A), DE LA FAMILLE (B) ET DU GENRE (C). LA LEGENDE EST PRESENTEE DE TELLE SORTE QUE LES FAMILLES ET LES GENRES SONT REGROUPES PAR PHYLUMS (BLEU : PROTEOBACTERIA, VERT : FIRMICUTES, ROUGE : FUSOBACTERIA, JAUNE : BACTEROIDETES). 39
- FIGURE 5. COMPARAISONS DE L'ABONDANCE RELATIVE DES PHYLUMS DES FUSOBACTERIA ET DES BACTEROIDETES, AU SEIN DE LA COHORTE DES CHIOTS VIVANTS (N=57), ENTRE LA NAISSANCE (J0) ET LE DEUXIEME JOUR DE VIE (J2). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX DATES, APRES UN TEST DE WILCOXON-MANN-WHITNEY. 40
- FIGURE 6. COMPARAISON DE L'ALPHA DIVERSITE, EN UTILISANT (A) LE NOMBRE D'ASV OBSERVES (RICHESSSE BACTERIENNE) ET (B) L'INDICE DE SHANNON (RICHESSSE BACTERIENNE ET UNIFORMITE), AU SEIN DE LA COHORTE DES CHIOTS VIVANTS (N=57), ENTRE LA NAISSANCE (J0) ET LE DEUXIEME JOUR DE VIE (J2). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX DATES, APRES UN TEST DE WILCOXON-MANN-WHITNEY. 41
- FIGURE 7. DIVERSITE BETA DU MICROBIOTE FECAL EN FONCTION DE L'AGE DE LA COHORTE DES CHIOTS VIVANTS JUSQU'A 2 MOIS D'AGE (N=57) (A LA NAISSANCE (J0) ET AU DEUXIEME JOUR DE VIE (J2)). GRAPHIQUES DE MISE A L'ECHELLE MULTIDIMENSIONNELLE (MDS) MONTRANT L'EVOLUTION ET LES DISSEMBLANCES DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE FECAL DES CHIOTS EN FONCTION DE LEUR AGE CALCULE A L'AIDE DES DISTANCES DE BRAY-CURTIS. CHAQUE POINT REPRESENTE UN ECHANTILLON INDIVIDUEL DE CHIOT, POSITIONNE SUR LA PARCELLE EN FONCTION DE LA SIMILITUDE DE SA COMMUNAUTE DE MICROBIOTE AVEC D'AUTRES ECHANTILLONS. LES ELLIPSES SONT BASEES SUR DES INTERVALLES DE CONFIANCE DE 95 % ET UNE ERREUR TYPE. LA SIMILARITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EST EVALUEE SUR LA BASE DE LA SIMILARITE ET DE L'ABONDANCE DES TAXONS. UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES. 42
- FIGURE 8. ALPHA DIVERSITE DU MICROBIOTE FECAL DES CHIOTS VIVANTS ET DES CHIOTS MOURANT AU COURS DE LA PERIODE NEONATALE, A LA NAISSANCE (J0, PARTIE HAUTE) ET AU DEUXIEME JOUR DE VIE (J2, PARTIE BASSE) EN UTILISANT (A) LE NOMBRE D'ASV OBSERVES (RICHESSSE BACTERIENNE) ET (B) L'INDICE DE SHANNON (RICHESSSE BACTERIENNE ET UNIFORMITE). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) APRES LE TEST D'ANOVA.43

- FIGURE 9. DIVERSITE BETA DU MICROBIOTE FECAL EN FONCTION DU STATUT DU CHIOT (VIVANT OU MORT). GRAPHIQUES DE MISE A L'ECHELLE MULTIDIMENSIONNELLE (MDS) MONTRANT L'EVOLUTION ET LES DISSEMBLANCES DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE FECAL DES CHIOTS EN FONCTION DE LEUR STATUT CALCULE A L'AIDE DES DISTANCES DE BRAY-CURTIS (A) A LA NAISSANCE (J0) ET (B) AU DEUXIEME JOUR (J2). CHAQUE POINT REPRESENTE UN ECHANTILLON INDIVIDUEL DE CHIOT, POSITIONNE SUR LA PARCELLE EN FONCTION DE LA SIMILITUDE DE SA COMMUNAUTE DE MICROBIOTE AVEC D'AUTRES ECHANTILLONS. LES ELLIPSES SONT BASEES SUR DES INTERVALLES DE CONFIANCE DE 95 % ET UNE ERREUR TYPE. LA SIMILARITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EST EVALUEE SUR LA BASE DE LA SIMILARITE ET DE L'ABONDANCE DES TAXONS. UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)). 45
- FIGURE 10. COMPOSITION DU MICROBIOTE FECAL A LA NAISSANCE (J0) CHEZ LES CHIOTS DECEDES (N=20) AU COURS DE LA PERIODE NEONATALE ET CHEZ LES CHIOTS VIVANTS JUSQU'A 2 MOIS (N=57), AU NIVEAU DU PHYLUM (A), DE LA FAMILLE (B) ET DU GENRE (C). LA LEGENDE EST PRESENTEE DE TELLE SORTE QUE LES FAMILLES ET LES GENRES SONT REGROUPES PAR PHYLUMS (BLEU : PROTEOBACTERIA, VERT : FIRMICUTES, ROUGE : FUSOBACTERIA, JAUNE : BACTEROIDETES). 47
- FIGURE 11. ABONDANCES LOG-TRANSFORMEES DE LA FAMILLE DES PASTEURELLACEAE ET DES MORAXELLACEAE A LA NAISSANCE (J0). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) APRES ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE. 48
- FIGURE 12. ABONDANCES LOG-TRANSFORMEES DU GENRE PSYCHROBACTER A LA NAISSANCE (J0). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) APRES ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE. 49
- FIGURE 13. ABONDANCES LOG-TRANSFORMEES DES ESPECES PSYCHROBACTER SANGUINIS A LA NAISSANCE (J0). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) TANDIS QU'UN « T » INDIQUE UNE TENDANCE ($P \leq 0,1$) APRES ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE... 50
- FIGURE 14. COMPOSITION DU MICROBIOTE FECAL AU DEUXIEME JOUR DE VIE (J2) CHEZ LES CHIOTS DECEDES (N=20) AU COURS DE LA PERIODE NEONATALE ET CHEZ LES CHIOTS VIVANTS JUSQU'A 2 MOIS (N=57) AU NIVEAU DU PHYLUM (A), DE LA FAMILLE (B) ET DU GENRE (C). LA LEGENDE EST PRESENTEE DE TELLE SORTE QUE LES FAMILLES ET LES GENRES SONT REGROUPES PAR PHYLUMS (BLEU : PROTEOBACTERIA, VERT : FIRMICUTES, ROUGE : FUSOBACTERIA, JAUNE : BACTEROIDETES). 51
- FIGURE 15. ABONDANCES LOG-TRANSFORMEES DES FAMILLES LACHNOSPIRACEAE, CLOSTRIDIACEAE, SUCCINIVIBRIONACEAE, ENTEROBACTERIACEAE ET ENTEROCOCCACEAE AU DEUXIEME JOUR (J2). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) TANDIS QU'UN « T » INDIQUE UNE TENDANCE ($P \leq 0,1$) APRES ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE. 53
- FIGURE 16. ABONDANCES LOG-TRANSFORMEES DES GENRES DOREA, CLOSTRIDIUM, ANAEROBOSPIRILLUM, ESCHERICHIA ET ENTEROCOCCUS AU DEUXIEME JOUR (J2). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) TANDIS QU'UN « T » INDIQUE UNE TENDANCE ($P \leq 0,1$) APRES ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE. 55

FIGURE 17. ABONDANCES LOG-TRANSFORMEES DES ESPECES CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, CLOSTRIDIUM HIRANONIS, CLOSTRIDIUM PARAPUTRIFICUM ET ESCHERICHIA COLI AU DEUXIEME JOUR (J2). UN ASTERISQUE ROUGE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT EN BLEU (N=57) ET MORT EN ROUGE (N=20)) TANDIS QU'UN « T » INDIQUE UNE TENDANCE ($P \leq 0,1$) APRES ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE. 56

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. FONCTIONS PRINCIPALES DES CINQ PHYLUMS COMPOSANT LE MICROBIOTE INTESTINAL DES CHIENS. (ADAPTE D'APRES (GARRIGUES ET AL. 2022)).	17
TABLEAU 2. RESUME DE L'EVOLUTION DES PRINCIPAUX TAXONS BACTERIENS CHEZ LE CHIOT DE LA NAISSANCE A L'AGE ADULTE. (ADAPTE D'APRES (GARRIGUES ET AL. 2022)).	18
TABLEAU 3. COMPARAISON DES VARIABLES OBTENUES A LA NAISSANCE ET LES PREMIERS JOURS DE VIE DES CHIOTS DECEDES AU COURS DE LA PERIODE NEONATALE ET DES CHIOTS VIVANTS JUSQU'A 2 MOIS D'AGE EXPRIMES EN MOYENNES (\pm ECARTS TYPES) OU POURCENTAGE. LES ANALYSES STATISTIQUES ONT ETE REALISEES AVEC LE TEST DE WILCOXON-MANN-WHITNEY OU LE TEST D'INDEPENDANCE DU χ^2 (*= DIFFERENCE SIGNIFICATIVE, T=TENDANCE).	36
TABLEAU 4. NOMBRE D'ASV OBSERVES MOYEN ET INDICE DE SHANNON MOYEN A LA NAISSANCE (J0) ET AU DEUXIEME JOUR (J2) DE VIE CHEZ LES POPULATIONS DE CHIOTS VIVANTS ET DE CHIOTS DECEDES, ASSOCIES AUX P-VALUE APRES TEST D'ANOVA. UN ASTERISQUE (*) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LES DEUX GROUPES (VIVANT ET MORT), APRES UN TEST ANOVA. UN DOUBLE ASTERISQUE (**) INDIQUE UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ($P \leq 0,05$) ENTRE LE J0 ET LE J2 POUR L'INDICE DE SHANNON ET LE NOMBRE OBSERVE D'ASV, APRES UN TEST DE MANN-WHITNEY-WILCOXON.	44
TABLEAU 5. ABONDANCES ABSOLUES MOYENNES OBTENUES PAR ANALYSE DISCRIMINANTE LINAIRE A L'ECHELLE DE LA FAMILLE, A LA NAISSANCE (J0) (FDR : FALSE DISCOVERY RATE OU TAUX D'ERREUR, LDA SCORE : SCORE D'ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE).	48
TABLEAU 6. ABONDANCES ABSOLUES MOYENNES OBTENUES PAR ANALYSE DISCRIMINANTE LINAIRE A L'ECHELLE DU GENRE, A LA NAISSANCE (J0).	49
TABLEAU 7. ABONDANCES ABSOLUES MOYENNES OBTENUES PAR ANALYSE DISCRIMINANTE LINAIRE A L'ECHELLE DE L'ESPECE, A LA NAISSANCE (J0).	49
TABLEAU 8. ABONDANCES ABSOLUES MOYENNES OBTENUES PAR ANALYSE DISCRIMINANTE LINAIRE A L'ECHELLE DE LA FAMILLE, AU DEUXIEME JOUR (J2).	52
TABLEAU 9. ABONDANCES ABSOLUES MOYENNES OBTENUES PAR ANALYSE DISCRIMINANTE LINAIRE A L'ECHELLE DU GENRE, AU DEUXIEME JOUR (J2).	54
TABLEAU 10. ABONDANCES ABSOLUES MOYENNES OBTENUES PAR ANALYSE DISCRIMINANTE LINAIRE A L'ECHELLE DE L'ESPECE, AU DEUXIEME JOUR (J2).	55

LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE 1. GRAPHIQUES D'ABONDANCES RELATIVES DES TAXONS BACTERIENS, POUR CHAQUE CHIOT VIVANT JUSQU'A DEUX MOIS D'AGE (N=57) A LA NAISSANCE (J0, A GAUCHE) ET AU DEUXIEME JOUR DE VIE (J2, A DROITE), A L'ECHELLE (A) DU PHYLUM, (B) DE LA FAMILLE, (C) DU GENRE, (D) DE L'ESPECE..... 80
- ANNEXE 2. MESURES D'ALPHA DIVERSITE INDIVIDUELLES DU MICROBIOTE FECAL DES CHIOTS VIVANTS JUSQU'A DEUX MOIS D'AGE, A LA NAISSANCE (J0, EN VERT) ET AU DEUXIEME JOUR DE VIE (J2, EN VIOLET) EN UTILISANT (A) LE NOMBRE D'ASV OBSERVES (RICHESSSE BACTERIENNE) ET (B) L'INDICE DE SHANNON (RICHESSSE BACTERIENNE ET UNIFORMITE)..... 82
- ANNEXE 3. GRAPHIQUES D'ABONDANCES RELATIVES DES TAXONS BACTERIENS, POUR CHAQUE CHIOT APPARTENANT AUX POPULATIONS DE CHIOTS VIVANTS (« ALIVE », N=57) ET MORTS (« DEAD », N=20), A L'ECHELLE (A) DU PHYLUM, (B) DE LA FAMILLE, (C) DU GENRE, (D) DE L'ESPECE, A LA NAISSANCE (J0)..... 83
- ANNEXE 4. GRAPHIQUES D'ABONDANCES RELATIVES DES TAXONS BACTERIENS, POUR CHAQUE CHIOT APPARTENANT AUX POPULATIONS DE CHIOTS VIVANTS (« ALIVE », N=57) ET MORTS (« DEAD », N=20), A L'ECHELLE (A) DU PHYLUM, (B) DE LA FAMILLE, (C) DU GENRE, (D) DE L'ESPECE, AU DEUXIEME JOUR (J2)..... 85
- ANNEXE 5. MESURES D'ALPHA DIVERSITE INDIVIDUELLES DU MICROBIOTE FECAL DES CHIOTS VIVANTS (« ALIVE » EN BLEU) ET DECEDES (« DEAD » EN ROUGE), A LA NAISSANCE (J0) ET AU DEUXIEME JOUR DE VIE (J2) EN UTILISANT (A) LE NOMBRE D'ASV OBSERVES (RICHESSSE BACTERIENNE) ET (B) L'INDICE DE SHANNON (RICHESSSE BACTERIENNE ET UNIFORMITE). 87
- ANNEXE 6. REPRESENTATION GRAPHIQUE DU SCORE LDA POUR LES FAMILLES PASTEURELLACEAE ET MORAXELLACEAE, A LA NAISSANCE (J0) ET ABONDANCES (DE « LOW » A « HIGH ») AU SEIN DES POPULATIONS DE CHIOTS (VIVANT= « ALIVE » ET MORT= « DEAD »)..... 88
- ANNEXE 7. REPRESENTATIONS GRAPHIQUES DU SCORE LDA POUR (A) LES FAMILLES, (B) LES GENRES ET (C) LES ESPECES AU DEUXIEME JOUR (J2) ET ABONDANCES (DE « LOW » A « HIGH ») AU SEIN DES POPULATIONS DE CHIOTS (VIVANT= « ALIVE » ET MORT= « DEAD »)..... 89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique Ribosomique

ASV : Variant de Séquence d'Amplicon

CPV2 : ParvoVirus Canin de type 2

FDR : False Discovery Rate

IgG : Immunoglobuline G

LDA : Analyse Discriminante Linaire

MODS : Syndrome de Dysfonctionnement Multi Organique

NEC : Note d'État Corporel

Ns : Non Significatif

PB : Paire de Base

PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne

PPN : Petit Poids de Naissance

SIRS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

T : Tendance

UFC : Unité Formant Colonie

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal, communauté complexe et dynamique constituée de micro-organismes, incluant bactéries, virus, champignons et protozoaires, au sein d'un environnement particulier, participe aux fonctions immunitaires, métaboliques et digestives. De nombreuses études, principalement chez l'Homme, mais aussi chez d'autres Mammifères, mettent en lumière les interactions mutuellement bénéfiques entre l'hôte et son microbiote intestinal. À titre d'exemple de cette dynamique symbiotique, les bactéries du microbiote intestinal fermentent les fibres alimentaires non digestibles afin de produire des acides gras à chaîne courte (AGCC), comme le butyrate, qui fournit une source d'énergie pour les cellules intestinales, renforçant la barrière intestinale et ayant des effets anti-inflammatoires. En échange, l'organisme garantit au microbiote intestinal un environnement propice à son développement (humidité, température, pH ainsi que des nutriments indispensables à sa survie) (Sato et al. 2020).

La recherche sur le microbiote intestinal, que ce soit chez l'Homme, mais également chez l'espèce canine, a suscité un intérêt croissant en raison de son impact profond sur la santé de l'hôte. Ces avancées permettent notamment de comprendre les liens entre des déséquilibres à l'échelle du microbiote, appelés état de dysbiose, et certaines pathologies telles que les maladies auto-immunes, inflammatoires et psychiques.

De plus, ces recherches chez certaines espèces de Mammifères, notamment l'Homme, le cochon et la souris, ont montré l'importance des premières semaines de vie sur le développement du microbiote, et son impact sur la santé à court et long terme (Matamoros et al. 2013) (Guevarra et al. 2019). À ce jour, il est encore complexe d'extrapoler le lien entre le microbiote et les pathologies chez les jeunes individus. En effet, des différences notables ont été mises en évidence entre le microbiote de l'adulte et celui du jeune, notamment chez l'humain ou bien le chat (MASUOKA et al. 2017).

Au sein de l'espèce canine, l'intérêt pour le microbiote intestinal est grandissant, mais les données restent peu nombreuses, notamment chez le jeune, en témoignent les moins de 10 études parues entre 2023 et 2024 chez le chiot contre plus de 800 publiées chez l'enfant (Garrigues et al. 2022). Parmi ces quelques études, certaines

ont permis de mieux comprendre le développement du microbiote chez le chiot dans les premiers jours après la naissance et mettent en évidence les changements importants au sein des communautés bactériennes entre les premiers jours de vie et les semaines qui suivent, en relation avec des événements de santé néonatale (Garrigues et al. 2023).

Un travail de recherche est encore nécessaire afin d'approfondir le lien entre le microbiote dans les premières semaines de vie et son impact sur la santé et le bien-être du chiot.

Ainsi, exploiter et moduler le microbiote intestinal et son lien avec la santé chez le chiot représente un levier prometteur en médecine vétérinaire notamment dans le but de prévenir les risques de mortalité. En effet, la mortalité au sein de l'espèce canine reste élevée avec près d'un chiot né vivant sur dix n'atteignant pas l'âge de deux mois. Ceci représente un enjeu majeur pour les éleveurs et les vétérinaires (Mila 2015) (Chastant-Maillard et al. 2017). La mortalité survient principalement durant la période néonatale, correspondant aux trois premières semaines de vie (Brevaux 2018). La fenêtre temporelle peut même être réduite car les chiots touchés le sont principalement dans les premiers jours, avec une mortalité durant la période néonatale précoce, et plus précisément entre 0-2 jours chez plus de deux tiers d'entre eux (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022).

Parmi les causes identifiées, les infections bactériennes sont les principales responsables (Meloni et al. 2014) (Indrebø, Trangerud, Moe 2007). L'étude des populations bactériennes présentes au sein du microbiote fécal des chiots dans la période néonatale, pourrait apporter des informations cruciales sur un potentiel lien pouvant expliquer la mortalité néonatale observée.

La première partie de ce manuscrit consiste en une revue de la littérature concernant le microbiote intestinal et la mortalité néonatale chez le jeune mammifère et particulièrement chez le chiot.

La seconde partie est une étude expérimentale visant à comparer le microbiote fécal à la naissance et à deux jours d'âge entre une cohorte de chiots vivants et une de chiots décédés pendant la période néonatale.

PARTIE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE – MICROBIOTE INTESTINAL ET MORTALITÉ NÉONATALE

Dans cette première partie, la notion de microbiote intestinal, sa mise en place et sa composition chez le chiot durant la période néonatale sont présentées en parallèle avec la mortalité néonatale importante existant au sein de l'espèce canine. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux causes infectieuses bactériennes et à la septicémie comme cause de forte mortalité néonatale chez le chiot.

1. Le microbiote intestinal chez le jeune : composition, mise en place et évolution

1.1. Définition du microbiote

Le microbiote correspond à l'ensemble des micro-organismes vivant en communauté complexe dans un environnement donné (intestin, peau, muqueuse buccale...) constituée principalement de bactéries mais aussi d'archées, de champignons et de virus. On estime que la charge microbienne totale dans l'intestin de l'Homme se situe entre 10^{12} et 10^{14} organismes, soit environ 10 fois le nombre total de cellules hôtes (Suchodolski 2011). Ce nombre peut varier selon les segments de l'intestin : les études évaluent entre 10^2 à 10^5 UFC/g le nombre de bactéries dans l'intestin grêle, et jusqu'à 10^{11} UFC/g dans le gros intestin chez le chien (German et al. 2003). Les microorganismes de l'intestin entretiennent avec leur hôte une relation à bénéfices mutuels appelée symbiose pour atteindre un état d'équilibre (Kelsen, Wu 2012). En effet, ces micro-organismes offrent des propriétés métaboliques que l'organisme hôte seul ne pourrait pas exercer, telles que l'assimilation des nutriments, le développement du système immunitaire et la production de composés clés contribuant à l'homéostasie générale. En retour, l'organisme permet à ces micro-organismes de se développer et de se nourrir en fournissant des conditions de vie adaptées (température, pH, nutriments essentiels).

1.2. Composition du microbiote intestinal chez le chien

Les micro-organismes sont regroupés en différentes catégories hiérarchiques appelées taxons selon des caractéristiques taxonomiques bien définies. Les abondances des différents taxons varient le long du tractus gastro-intestinal, en fonction de la consommation et de la production de métabolites de manière physiologique (Honneffer et al. 2017).

Que l'on étudie des chiens adultes ou des chiots, le microbiote intestinal canin est composé de cinq phylums principaux : Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria (Tableau 1). Les deux phylums prédominants chez le chien adulte sont les Firmicutes et les Bacteroidetes à l'instar d'autres espèces de mammifères telles que l'Homme, la souris ou le porc (Coelho et al. 2018). Concernant les phylums Proteobacteria et Actinobacteria, les chiens partagent une abondance relative similaire avec les humains et les souris. Cependant, les chiens semblent posséder une forte abondance de Fusobacteria, un phylum à peine présent chez d'autres espèces et qui est même associé à un risque de cancer colorectal chez l'Homme (Gethings-Behncke et al. 2020), mais semble être présent en grande abondance chez les chiens en bonne santé.

Le microbiote peut fortement varier non seulement d'une espèce à l'autre, mais aussi d'un individu à l'autre.

Phylum	Genres principaux	Fonctions intestinales connues	Proportions
Firmicutes	<i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Eubacterium</i>	<ul style="list-style-type: none">○ Fermentation de glucides et production de divers métabolites (vitamines, acides biliaires secondaires).○ Fermentation des oligosaccharides du lait par les lactobacilles et production d'acétate et de lactate.○ Production de butyrate, servant d'énergie aux entérocytes et apportant une protection anti-inflammatoire (Rivera-Chávez et al.	Premier phylum chez le chien. Composé à 10-40% (en fonction de la localisation dans le tractus) par le taxon <i>Clostridia</i> .

		2016) ou limitant la colonisation d'agents pathogènes (Ma et al. 2012).	
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Prevotella</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Consommation de fibres et de polysaccharides complexes pour produire des métabolites (acides biliaires, vitamines, butyrate). ○ Dégradation des glycanes provenant des sécrétions de mucine, aidant l'hôte à obtenir de l'énergie à partir de sources de glucides non utilisables. ○ Réduisent le niveau d'oxygène intestinal et favorisent la croissance de bactéries anaérobies strictes (Beller et al. 2021). 	Deuxième phylum chez le chien.
Proteobacteria	<i>Escherichia</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Proteus</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Maintien d'un environnement anaérobie de l'intestin (Handl et al. 2011) (Bojanić et al. 2017). ○ De nombreuses espèces impliquées dans des dysbioses ou des troubles inflammatoires telles que <i>E.coli</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i> et <i>Helicobacter</i>. 	<i>E.coli</i> est une espèce anaérobie facultative.
Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i> , <i>Cetobacterium</i> , <i>Streptobacillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Certaines sont capables de dégrader les protéines et les acides aminés suggérant un rôle dans la dégradation de protéines animales (Doron et al. 2014a). 	Troisième phylum chez le chien. Représente 20% de l'abondance relative totale.
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Collinsella</i>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Impliquées dans la dégradation des oligosaccharides du lait pour produire du lactate et de l'acétate (O'Callaghan, van Sinderen 2016) (Saturio et al. 2021). 	Plus spécifique de l'intestin des chiots (MASUOKA et al. 2017).

Tableau 1. Fonctions principales des cinq phylums composant le microbiote intestinal des chiens. (Adapté d'après (Garrigues et al. 2022)).

Le développement du microbiote intestinal commence dès la naissance, voire même pendant la vie fœtale, et sa composition continue d'évoluer au fil des différentes étapes de la vie de son hôte. Des changements majeurs sont notamment observés lors de l'arrêt de la consommation de lait (Tableau 2).

Cependant, des recherches chez l'Homme sur le développement néonatal ont révélé qu'à l'âge de trois ans, le profil microbien commence à ressembler à celui d'un adulte, et que par la suite, les principales souches restent stables pendant plusieurs décennies (Yatsunenko et al. 2012). Ainsi, la colonisation précoce semble être une étape cruciale pour le nouveau-né, car les premières bactéries établies peuvent être amenées à façonner les fonctions intestinales de l'hôte pendant la majeure partie de sa vie (Nishino et al. 2018)(Moffa et al. 2019).

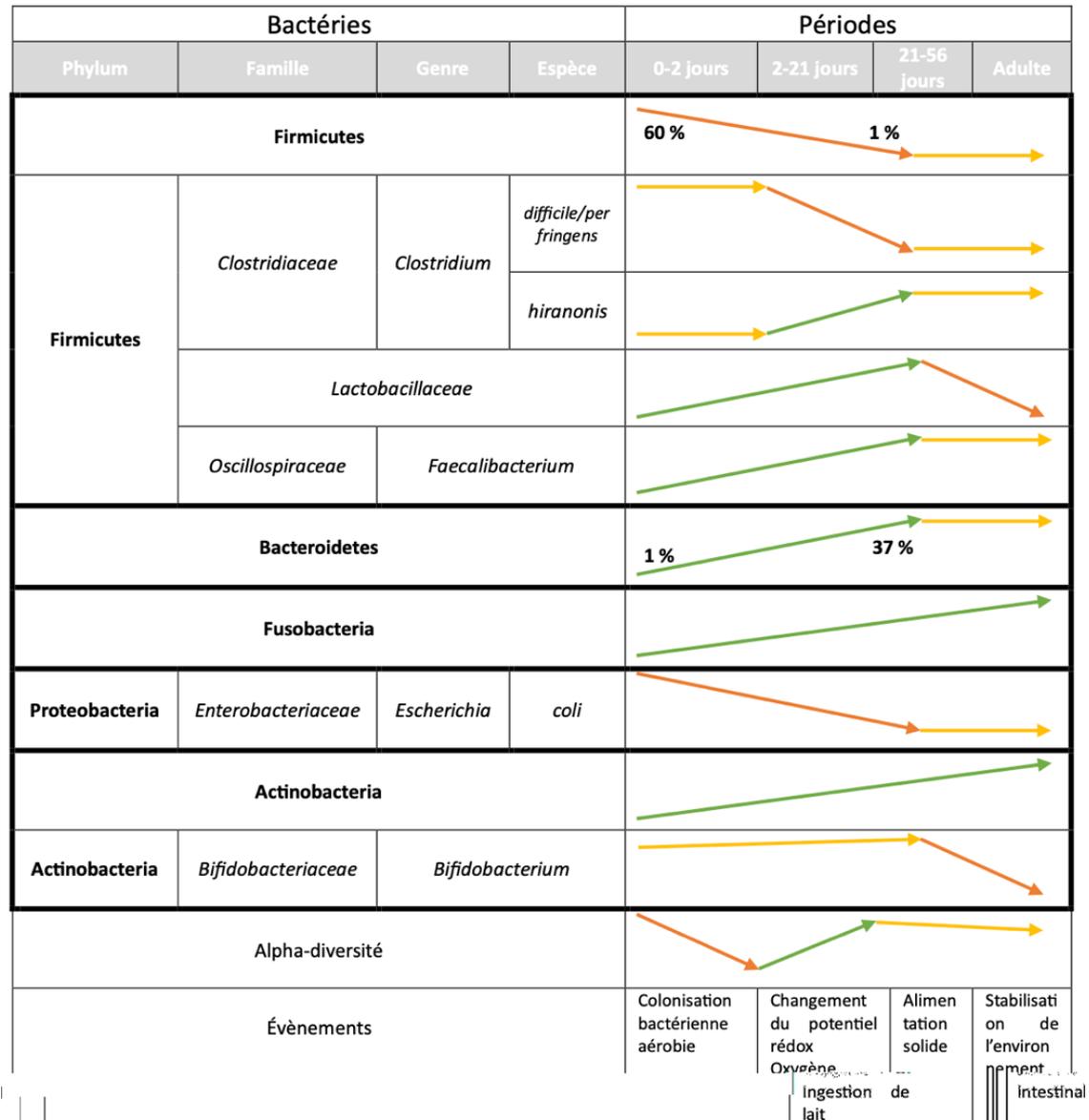


Tableau 2. Résumé de l'évolution des principaux taxons bactériens chez le chiot de la naissance à l'âge adulte. (Adapté d'après (Garrigues et al. 2022)).

1.3. Facteurs de variations du microbiote intestinal chez le chiot

De nombreux facteurs associés à la mise en place du microbiote intestinal des chiots ont été examinés, parmi lesquels l'environnement, le type de mise bas et les interactions sociales sont les plus importants.

Certains facteurs, comme la mise bas naturelle ou l'ingestion de lait, sont plus étudiés et ont montré qu'ils favorisaient un microbiote sain (Balouei et al. 2023).

Chez l'Homme, il a été démontré que le transfert de bactéries de la mère à l'enfant dépend fortement du type de naissance. En effet, chez les bébés nés par voie vaginale, il existe un enrichissement précoce en *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* suivi d'une prolifération de *Bacteroidetes*, constituants microbiens des voies génitales de la mère et des selles. À l'inverse, les bébés nés par césarienne présentent un microbiote altéré, manquant notamment des genres précédemment cités, et un enrichissement des populations microbiennes de la peau, par exemple *Staphylococcus spp.*, avec un risque plus élevé de troubles de santé (Dominguez-Bello et al. 2016) (Mortensen et al. 2021). Chez le chien, des études semblables ont été menées ont révélé une plus faible diversité bactérienne dans le méconium des chiots nés par césarienne comparativement à ceux nés par voie vaginale (Zakošek Pipan et al. 2020).

Il a également été démontré que la composition du microbiote colostrale était influencée par de nombreux facteurs (Drago et al. 2017). Le microbiote du colostrum des mères ayant mis bas par césarienne d'urgence avait une abondance plus importante des genres *Staphylococcus* et *Enterococcus* que le microbiote du colostrum des mères ayant mis bas par césarienne programmée ou par voie basse (Kajdič et al. 2021). Un microbiote maternel modifié peut altérer la mise en place du microbiote du nouveau-né.

En effet, les mères contribuent également à une transmission de leur propre microbiote par contact physique lors de la mise bas en inoculant leur microbiote oral (Saijonmaa-Koulumies, Lloyd 2002). Le chiot nouveau-né est vigoureusement léché par sa mère lors de la naissance afin de le libérer des poches amniotiques mais également pendant les premières semaines de vie afin de stimuler la miction, la défécation ou pour le nettoyer.

Ainsi, le transfert vertical depuis la mère, intervient dès la naissance du chiot, voire même peut-être durant la gestation lors d'une colonisation intra-utérine avec la découverte d'un microbiote placentaire chez certaines chiennes (Zakošek Pipan et al. 2020). Dans l'ensemble, une même portée est exposée aux mêmes bactéries maternelles. Une composition similaire au sein d'une même portée est d'autant plus retrouvée que la portée est d'âge jeune et non encore exposée à des facteurs environnementaux (Vilson et al. 2018).

Par la suite, le sevrage, notamment l'arrêt de l'alimentation lactée, induit de nouveaux échanges microbiens. De la même manière, le fait d'être en contact avec l'espèce humaine conduit à des changements de microbiote. L'Homme et le chiot vont partager principalement des espèces bactériennes telles que *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Acinetobacter iwoffii* (Wipler et al. 2017).

Concernant d'autres facteurs étudiés, la localisation géographique affecte surtout la diversité des populations bactériennes (Vilson et al. 2018). Il a été démontré que les chiots vivants dans les grandes villes sont exposés à une plus grande diversité d'environnements (parc, rue, bâtiments) et sont exposés à une plus grande diversité de bactéries en raison de rencontres potentielles avec d'autres chiens et personnes (Pereira et al. 2020).

Dans les autres facteurs suspectés comme ayant un impact sur la mise en place du microbiote intestinal, la race et la taille de celle-ci sont évoquées. En effet, il a été démontré que le microbiote des chiens adultes avait tendance à se regrouper en fonction de la taille des races (Simpson et al. 2002). Cette tendance a été retrouvée chez les chiots, mais uniquement à partir de 42 jours (Guard et al. 2017). Ceci nécessite une exploration plus approfondie.

La combinaison de tous ces facteurs façonne le microbiote définitif du chiot une fois devenu adulte (Figure 1).

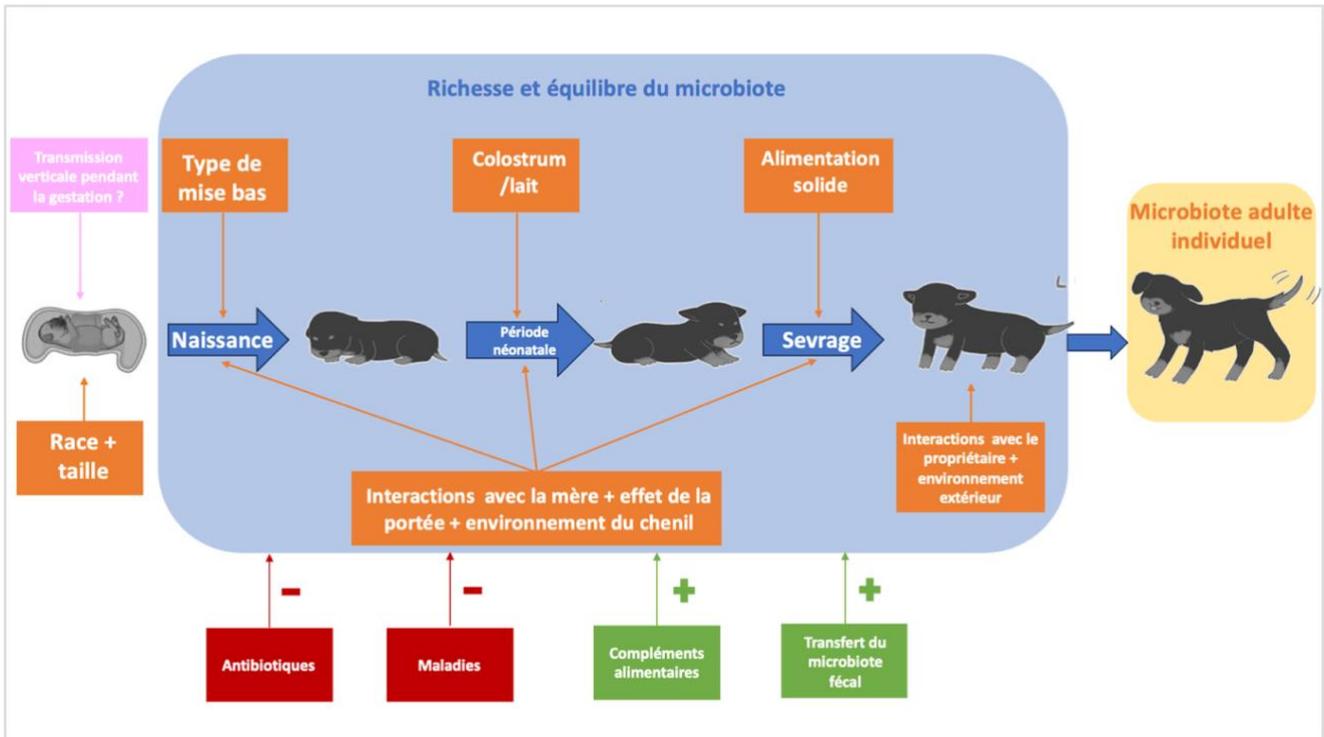


Figure 1. Facteurs majeurs influençant le développement du microbiote intestinal chez le chiot, de la naissance à l'âge adulte. Les encadrés orange correspondent aux facteurs dont l'effet a été démontré, alors que l'encadré rose illustre un impact hypothétique. Les encadrés rouges correspondent à des facteurs facultatifs associés avec de la dysbiose, les encadrés verts des facteurs facultatifs avec des effets bénéfiques sur le microbiote. (Adapté d'après (Garrigues et al. 2022)).

2. L'importance de la mortalité néonatale chez le chien

2.1. Mortalité globale chez le chiot et période néonatale : définitions

La mortalité globale du chiot avant adoption (avant l'âge de deux mois), peut être divisée en trois périodes. La mortinatalité (ou mortalité fœtale) concerne les chiots mort-nés ou mourant à la naissance. La mortalité néonatale regroupe des chiots morts entre la naissance et 3 semaines d'âge. Enfin la mortalité pédiatrique concerne la période entre 3 semaines et 2 mois de vie.

On regroupe sous le terme de mortalité périnatale les chiots mort-nés et ceux morts durant la période néonatale précoce (Brevaux 2018).

2.2. *État des lieux de la mortalité chez le chiot*

Malgré les avancées en médecine vétérinaire, 15,5 % des portées contiennent au moins un cas de mortalité néonatale ou pédiatrique (Chastant-Maillard et al. 2017).

La mortalité néonatale au sein de l'espèce canine reste importante. Selon les études, environ 10 % des chiots nés vivants meurent au cours des deux premiers mois de leur vie (Mila 2015) (Mila et al. 2015).

En s'intéressant plus particulièrement aux trois premières semaines de vie, correspondant à la période néonatale, un total de 17 % à 20% de chiots mourant est décompté dans certaines études (Gill 2001) (Indrebø, Trangerud, Moe 2007) (Mila 2015).

La mortalité périnatale représente à elle seule 90% de la mortalité globale (Gill 2001) (Tønnessen et al. 2012) (Mila 2015). Cette période représente donc une étape clé pour les éleveurs et les vétérinaires. En particulier, la première semaine semble être cruciale, car la majorité de toutes les pertes néonatales se produisent à cette période et peuvent même représenter plus de 80% dans les 48 heures de vie (Mila 2015).

2.3. *Les causes de mortalité néonatale*

D'une part, des facteurs associés à la forte mortalité au sein de l'espèce canine à différentes étapes de développement ont été identifiés et concernent la mère (dystocie, voie de naissance, qualités maternelles, âge de la mère, production de lait), le chiot (petit poids de naissance, faible croissance 0-2 jours, faible immunité passive) et la gestion de l'environnement (localisation et aménagement de la maternité, hygiène, faible température au nid) (Münnich, Küchenmeister 2014)(Keylla Helena Nobre Pacífico Pereira et al. 2022). Les études ont en effet démontré que le petit poids de naissance, définit séparément pour chaque race, un taux de croissance entre la naissance et deux jours de vie inférieur à -4% et un déficit de la prise colostrale (déterminé via une concentration sanguine en IgG inférieure à 230mg/dL à 48h de vie) sont associés à un risque significativement plus grand de mortalité pour les chiots (Mila 2015) (Mila et al. 2015) (Mugnier et al. 2019). D'autres facteurs, tels que la vitalité à la

naissance (évaluée avec le score APGAR (Veronesi et al. 2009), la croissance entre 2 et 21 jours, ou la glycémie et la température lors des premiers jours de vie sont également des déterminants de la santé néonatale couramment cités (Veronesi et al. 2009) (Reyes-Sotelo et al. 2021).

L'ensemble de ces facteurs peuvent conduire au développement de symptômes, couramment référencés sous la dénomination Syndrome des 3H : l'hypoxie, l'hypoglycémie, l'hypothermie en plus de la déshydratation, pouvant conduire à la mort chez le chiot (Indrebø, Trangerud, Moe 2007) (Münnich, Küchenmeister 2014).

D'autre part, des causes directes de mortalité ont été identifiées, telles que l'asphyxie à la naissance, les anomalies congénitales, les traumatismes, les infections et maladies systémiques.

Plus précisément, les maladies infectieuses, notamment les infections bactériennes ont été identifiées comme la seconde cause de mortalité néonatale chez le chien et semblent être dans certaines études, parmi les principales causes de mortalité néonatale précoce, retrouvées dans 40% des cas (Nielen et al. 1998) (Meloni et al. 2014).

2.4. La septicémie chez le chiot

La septicémie, également appelée sepsis, désigne une infection de tout l'organisme, avec la présence d'une bactériémie (un ou plusieurs agents bactériens) dans la circulation sanguine, entraînant une réponse inflammatoire systémique. Elle peut être associée à une défaillance multi organique grave (syndrome de dysfonctionnement multi organique (MODS)), menaçant le pronostic vital, suite à une réponse inadéquate des mécanismes de défense (syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS)) du chiot envers une infection bactérienne aigüe généralisée.

Parmi les maladies infectieuses, les infections bactériennes sont responsables de 40 à 81% des cas de mortalité néonatale selon les études (Meloni et al. 2014) (Indrebø, Trangerud, Moe 2007) et les septicémies qui en résultent sont la cause la plus fréquente de mortalité néonatale au cours des 21 premiers jours (Daniels, Spencer 2011)(Nobre Pacifico Pereira et al. 2022). Les contaminations proviennent

principalement de la flore digestive ou utérine de la mère, de l'environnement et moins fréquemment du lait et se propagent durant la gestation, la mise bas ou lors des premiers échanges entre la mère et les chiots (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022) (Münnich, Lübke-Becker 2004) (Vela et al. 2006) (Schäfer-Somi et al. 2003). La voie majoritaire reste la contamination durant la gestation avec 68% des chiots infectés par cette voie (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022).

À la naissance, les chiots sont quasiment agammaglobulinémiques et sont donc susceptibles de développer une infection à des espèces bactériennes classiquement commensales ou bien à des espèces opportunistes (Daniels, Spencer 2011). Les chiots touchés le sont principalement dans leur première semaine de vie avec une mortalité précoce (0-2 jours) chez 69% d'entre eux (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022). Chez les chiots atteints d'infection bactérienne, les signes cliniques sont rarement présents et la mort intervient brusquement. Lorsqu'ils sont présents, les signes sont néanmoins, peu spécifiques (diarrhée, apathie, perte de poids, déshydratation, hypothermie, hypoglycémie, bradycardie, hématurie, muqueuses congestionnées, érythème, cyanose des extrémités) (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022).

D'après la littérature, les bactéries fréquemment isolées responsables de mortalité néonatale chez le chien sont *Escherichia coli* majoritairement retrouvée chez un chiot sur quatre environ (Nobre Pacifico Pereira et al. 2022), les staphylocoques avec *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus pseudintermedius*, les streptocoques (*Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis*, *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Meloni et al. 2014) (Indrebø, Trangerud, Moe 2007). Dans moins de 10% des cas, plusieurs espèces bactériennes sont isolées et l'on retrouve 11% de co-infections bactériennes responsables de la mort des chiots (Meloni et al. 2014).

Parmi les explications au fait de retrouver *Escherichia coli* en grande majorité chez plus de 40% des chiots morts, figure celle de la perméabilité de l'épithélium entérique accrue, associée à l'abondance de cette espèce bactérienne plus importante chez le chiot nouveau-né que chez l'adulte (Young, Yagel, Towfighi 1983).

En résumé, la gestion du chiot nouveau-né atteint de septicémie est difficile en raison de l'apparition soudaine de symptômes non spécifiques et de l'évolution rapide de la maladie. Le traitement est généralement retardé et le pronostic est mauvais.

3. *Lien établi entre le microbiote et la santé chez le jeune*

Le microbiote intestinal est maintenant reconnu comme jouant un rôle essentiel dans la maturation et la modulation du système immunitaire, l'absorption des nutriments et la régulation métabolique (Henderickx et al. 2021) (Tibbs, Lopez, Arthur 2019). Des travaux de recherches approfondies ces dernières années, se sont penchés sur la relation complexe entre le microbiote intestinal et la santé du jeune.

3.1. *Chez l'Homme*

La majorité des avancées en matière de lien avec la composition microbienne intestinale concerne l'Homme. Chez ce dernier, il est maintenant prouvé qu'une altération du développement du microbiote intestinal peut être associée à un risque plus élevé de mortalité néonatale et de maladies, comme l'entérocolite, ainsi que d'autres conséquences à long terme, telles qu'une part plus importante du diabète de type 1 et une augmentation du stockage des graisses (Cox et al. 2014) (Kostic et al. 2015). Par exemple, parmi les modifications observées, une augmentation des abondances relatives de Proteobacteries ainsi qu'une diminution des abondances relatives des Firmicutes et des Bacteroidetes sont observées chez les nourrissons prématurés atteints d'entérocolite nécrosante (Pammi et al. 2017).

À l'inverse, il a été démontré qu'une colonisation précoce et saine du microbiote intestinal du nourrisson a un effet bénéfique sur la santé ultérieure de l'Homme (Jian et al. 2021) et que l'exploration de la colonisation intestinale depuis la naissance, voire pendant la vie fœtale, pourrait s'avérer prometteuse pour réduire et prévenir la mortalité néonatale et pédiatrique.

3.2. *Chez le chien*

D'autres études s'intéressant aux facteurs de risque de mortalité néonatale et leur association avec le microbiote ont montré chez l'Homme et le porc, que les nouveau-nés à petit poids de naissance possédaient une richesse bactérienne plus

faible, une plus grande abondance d'Entérobactéries et une plus faible abondance de Lactobacilles (Arboleya et al. 2012) (Unger et al. 2015) (Gaukroger et al. 2020). Récemment, une étude a mis en évidence que plusieurs bactéries opportunistes, notamment les Entérobactéries, *Tyzzarella* et certains *Clostridium* sont plus présents chez les chiots de petit poids de naissance (Garrigues et al. 2023). Or ces chiots de petit poids de naissance présentent un risque accru de mortalité néonatale, de morbidité et de certains problèmes de santé à long terme. Cette étude suggèrerait que le poids à la naissance a un impact sur l'établissement initial du microbiote intestinal chez les chiots.

Un déséquilibre dans cette communauté microbienne et sa répartition le long du tractus digestif, appelé dysbiose, peut être associé à diverses pathologies. En effet, une dysbiose microbienne a été identifiée chez les chiens et les chats atteints d'une maladie gastro-intestinale (Xenoulis et al. 2008).

Il a également été démontré que le microbiote fécal des chiots atteint du syndrome de dépérissement du chiot, syndrome qui regroupe les cas de mort d'origine inconnue durant la période néonatale de chiots normaux à la naissance, diffère de celui de chiots sains, associé à une abondance accrue de Protéobactéries et de Pasteurelles chez les chiots atteints (Tal et al. 2021).

Des études ont montré des liens entre le microbiote des chiots de plus de 6 semaines et la présence de virus et parasites tels que le parvovirus canin de type 2 (CPV2) et *Giardia*, et des associations à des états de dysbiose (Pereira et al. 2021) (Boucard et al. 2021).

Il a également été prouvé que le microbiote fécal du chiot semble associé aux évènements ayant lieu entre la naissance et les deux premiers jours de vie. Parmi ces évènements, ceux liés à la prise colostrale (croissance 0-2 jours et qualité du transfert immunitaire) montrent le plus d'associations avec des modifications du microbiote. Dans la même étude, l'abondance relative d'Entérobactéries semble fortement liée au score de santé, avec des abondances plus importantes chez les chiots à faible score (Garrigues et al. 2023).

Cependant, très peu d'études ne se sont encore intéressées au lien potentiel entre la composition initiale du microbiote intestinal des chiots et la mortalité néonatale.

Le but de cette étude est d'identifier des profils bactériens composant le microbiote des chiots durant la période néonatale précoce, notamment entre 0-2 jours, associés à la mortalité avant l'âge de deux mois. Il a donc été décidé de privilégier l'étude de cette période de vie (néonatale précoce 0-2 jours), ainsi que de se concentrer sur la présence de familles bactériennes, pouvant s'avérer un bon outil de détection dans la prévention de mortalité néonatale.

PARTIE II. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE – LIEN ENTRE LE MICROBIOTE FÉCAL À LA NAISSANCE ET LA MORTALITÉ NÉONATALE CHEZ LE CHIOT

L'objectif de notre étude est de comparer le profil du microbiote fécal à la naissance et à deux jours d'âge entre une cohorte de chiots vivants et une de chiots décédés pendant la période néonatale en vue d'identifier un profil microbien associé à la mortalité néonatale.

1. Matériel et méthode

1.1. Populations étudiées

Les données utilisées proviennent du projet dirigé par Quentin Garrigues, basé sur des expérimentations effectuées sur deux populations de chiots recrutés au sein d'un élevage en France (Garrigues et al. 2023).

Au total, 77 chiots, nés de 11 mères différentes ont été inclus (en moyenne $5,2 \pm 2,5$ de chiots par portée avec un minimum de 2 et un maximum de 10 chiots). Tous les chiots sont nés naturellement (aucune césarienne n'a été réalisée au cours de l'étude) et étaient suivis jusqu'à 56 jours après la naissance. La première population de chiots a été constituée uniquement de chiots morts entre 0 et 56 jours (cohorte de chiots décédés). La deuxième population a été constituée uniquement de chiots vivants jusqu'à 56 jours d'âge (cohorte de chiots vivants).

La cohorte de chiots décédés comprend 20 chiots morts entre la naissance et J56 appartenant à 7 races différentes (Berger Australien n=2, Golden Retriever n=2, Labrador Retriever n=5, Berger Blanc Suisse n=1, Berger Allemand n=1, Bouvier Bernois n=6, Dalmatien n=3). Des portées comprenant $7,4 \pm 1,7$ chiots ont été incluses.

Concernant la population de chiots vivants, elle regroupe un total de 57 chiots, sélectionnés de manière à exclure les chiots malades et pour équilibrer la population en termes de poids de naissance et de chiots par portées, appartenant à 4 races différentes (Berger Australien n=23, Golden Retriever n=17, Labrador Retriever n=12 et Berger Blanc Suisse n=5). Des portées comprenant $7,4 \pm 1,6$ chiots ont été incluses.

Toutes les mères ont reçu le même régime sec pour chiots ad libitum (composition : protéines 26 %, matières grasses brutes 18 %, fibres brutes 2 % et cendres 8 %). La même alimentation mélangée à de l'eau a été présentée aux chiots entre la deuxième et la troisième semaine pour permettre la transition du lait vers une alimentation solide.

Ensuite, à partir de l'âge de 3 semaines jusqu'à la fin de l'expérience (âge de deux mois), les chiots ont eu accès à l'alimentation sèche.

Les mères ont mis bas et sont restées avec leurs chiots dans des box individuels d'une maternité jusqu'à J35 environ après la naissance. Ensuite, les mères avec leurs chiots ont été transférés dans des enclos individuels situés dans un bâtiment de pré-sevrage. Tous les chiots sont restés avec leur mère pendant toute la durée de l'expérience et ont été autorisés à téter librement.

Pendant toute la durée de la gestation et de la lactation, les chiennes disposaient de copeaux de bois comme litière.

Aucun chiot n'a reçu de traitement avant J28 (Garrigues et al. 2023).

1.2. *Prélèvements effectués*

Différentes variables ont été mesurées, étudiées et regroupées à différentes périodes de vie : à la naissance, les premiers jours de vie et jusqu'à J21 après la naissance. Parmi les variables considérées, le poids à la naissance et son évolution, le score APGAR à la naissance, la glycémie à J1, la température à J1 sont étudiées.

Dès que possible, et au maximum quatre heures après la mise bas, le score APGAR (indice de vitalité) a été évalué chez les chiots selon Veronesi et al. (Veronesi et al. 2009) prenant en compte les paramètres suivants : la fréquence cardiaque, l'effort respiratoire, le réflexe d'irritabilité, la motilité et la couleur du mucus. Les poids de naissance ont également été enregistrés dès que possible et maximum 8h après la naissance, à l'aide d'une balance numérique (Ohaus, série EB3, Parsippany, NJ, USA, capacité maximale de 5 kg, précision $\pm 0,1$ g). Les quartiles de poids à la naissance pour les races ciblées ont été déterminés sur la base d'un total de 2 719 poids à la naissance enregistrés par l'éleveur auparavant. Le quartile 1 (Q1) comprenait les 25 % de chiots ayant le poids de naissance le plus léger, tandis que le quartile 4 (Q4)

comprenait les 25 % de chiots les plus lourds. Les seuils obtenus ont été utilisés pour classer chacun des 77 chiots dans l'un des quatre groupes quartiles en fonction de la race et du poids à la naissance.

A J1 (entre 24 et 36 heures après la naissance), la température rectale des chiots a été évaluée à l'aide d'un thermomètre numérique DIGIVET (GENIA SA, St. Hilaire de Chaléons, France, plage de réglage de la température de 32°C à 42°C, précision de 0,1°C). Le taux de croissance des chiots entre J0 et J2 est calculé de la manière suivante : $((\text{poids à J2} - \text{poids à J0}) / (\text{poids à J0}) * 100 \text{ en } \%)$. Le poids des mères (balance numérique Soehnle modèle 7859.70.002, Soehnle GmbH, Backnang, Allemagne, capacité maximale de 200kg, précision $\pm 0,1 \text{ kg}$) et la note d'état corporelle (NEC, échelle à 9 points, 1 étant le plus mince et 9 le plus gras (Mongkolsomlit et al. 2012)) ont été enregistrés (notamment à G0 jour de l'ovulation et G56 de gestation).

Des écouvillonnages rectaux ont été réalisés à J0 (la naissance) et à J2 (2 jours après la naissance). Les écouvillons ont été conservés à -20°C pendant 1 mois puis à -80 °C jusqu'aux analyses.

1.3. *Méthode d'extraction et de séquençage*

L'ADN a été extrait des écouvillons rectaux à l'aide du kit Quick-DNA Faecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) en suivant les instructions du fabricant. La quantification de l'ADN dans l'extrait a été vérifiée à l'aide d'une méthode fluorométrique avec le kit de test Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mesurée via le système PCR en temps réel QuantStudio™3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

La région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG) (Muyzer, de Waal, Uitterlinden 1993) et 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (Caporaso et al. 2011). Les amplicons PCR ont été purifiés avec le système PCR HighPrep (Magbio Genomics, Gaithersburg, MD, USA) et utilisés pour la construction de bibliothèques avec le kit de séquençage d'ADN Illumina NEXTflex PCR-Free (Bioo Scientific Corp., Austin, Texas, USA). Les bibliothèques d'amplicons ont été séquencées sur une plate-forme Illumina MiSeq 2500 (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) sur la plate-forme GeT-PlaGe

INRAE (Toulouse, France) pour des tailles de fragments appariés de 250 pb. Tous les réactifs utilisés étaient de qualité moléculaire.

Quatre échantillons ont donné des résultats anormaux et ont été retirés de l'étude : un à J0, deux à J7 et un à J21.

Au total, 708 fichiers fastq bruts ont été importés, démultiplexés, filtrés en qualité et dérépliqués via une inférence d'échantillons haute résolution avec DADA2 (Callahan et al. 2016) dans QIIME 2 (version 2020.2) (Bolyen et al. 2019). Cela a permis l'identification de Variants de Séquence d'Amplicons (ASV) selon des paramètres par défaut excluant la longueur de l'amorce. L'alignement de novo et la phylogénie des ASV ont été réalisés respectivement avec MAFFT et FastTree2 (Kato et al. 2002) (Price, Dehal, Arkin 2010). Les courbes de raréfaction ont été vérifiées pour la profondeur d'échantillonnage complète de la communauté. La taxonomie a été attribuée aux gènes marqueurs d'ARNr 16S résultants contre Greengenes (gg-13-8-99-nb-classifier)/SILVA (v138) en utilisant la méthode de classificateur sklearn selon Bokulich et al. (Bokulich et al. 2018).

Les données brutes ont été raréfiées en supprimant les ASV dans moins de cinq échantillons et représentant moins de 0,005 % du total des séquences.

Les taxons microbiens ont été profilés dans chaque échantillon fécal au niveau taxonomique. Les différents rangs taxonomiques sont : Règne - Phylum - Classe - Famille - Genre - Espèce. Dans l'idéal, une identification du micro-organisme se fait jusqu'au rang d'espèce. Mais dans la majorité, les derniers niveaux de classification taxonomique n'ont pas été accessibles. Dans notre étude, la plupart des micro-organismes ont été identifiés jusqu'au rang de Famille. Lorsque les taxa n'ont pas été reconnus, ceux-ci ont été classés comme « non attribué ».

Après le traitement des données procaryotes (~10 249 528 séquences d'ARNr 16S ; $25\,948 \pm 9\,361$ séquences par échantillon), 157 Variants de Séquence d'Amplicons (ASV) ont été identifiées après nettoyage et filtrage. Les courbes de raréfaction ont presque atteint la saturation pour les ASV observés chez tous les sujets, indiquant que notre inventaire de séquences couvrait la plupart des taxons de ces échantillons.

Dans cette étude, une description de la composition microbienne dans la population saine sera effectuée puis une comparaison avec la population de chiots décédés sera faite.

1.4. Méthodes d'analyses et statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de la plateforme de traitement de données *Microbiome analyst* (Xia Lab @ McGill) et du site de biostatistiques BiostaTVG. L'ensemble des graphiques ont été effectués à l'aide du logiciel Excel 2024® et grâce à la plateforme de traitement de données *Microbiome analyst*.

Pour les données suivant une loi normale, les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type, tandis que les variables discrètes sont présentées sous forme de médiane (min-max).

Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney est utilisé pour comparer les distributions des variables étudiées de chacun des deux groupes (vivants ou décédés). Pour une p-value $\leq 0,05$, le résultat du test est considéré comme significatif. Le test d'indépendance du χ^2 est utilisé pour tester l'indépendance entre variables qualitatives. Pour une p-value $\leq 0,05$, le résultat du test est considéré comme significatif.

L'alpha diversité est explorée à l'aide des ASV observés, qui estime la richesse bactérienne, et l'indice de Shannon, qui tient compte à la fois de la richesse et de l'uniformité. Pour une p-value $\leq 0,05$, le résultat du test est considéré comme significatif. L'alpha diversité s'attache à déterminer la richesse observée (nombre de taxons) et/ou l'uniformité (l'abondance relative de ces taxons) d'un échantillon moyen au sein d'un type d'habitat.

La beta diversité est obtenue grâce à une analyse de variance multivariée par permutation (PERMANOVA) sur la base des distances Bray-Curtis. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est compris entre 0 ($R^2 = 0$, les deux échantillons ont la même composition) et 1 ($R^2 = 1$, les échantillons sont totalement dissemblables).

Des graphiques de mise à l'échelle multidimensionnelle (MDS) sont obtenus. Chaque point représente un échantillon individuel de chiot, positionné sur la parcelle en fonction de la similitude de ses communautés de microbiote avec d'autres échantillons. Les ellipses sont basées sur des intervalles de confiance de 95 % et une erreur type. La similarité des communautés bactériennes est évaluée sur la base de la similarité et de l'abondance des taxons. Pour une p-value $\leq 0,05$, le résultat du test est considéré comme significatif. La beta diversité représente la diversité des espèces inter-individus. Elle correspond à la variabilité de la composition de la communauté (l'identité des taxa observés) parmi les échantillons au sein d'un habitat.

L'outil de sélection par taille d'effet d'analyse discriminante linéaire (LEfSe), avec un seuil d'effet (LDA score fixé à 2,0) utilisant le test Kruskal-Wallis, est appliqué pour mettre en évidence la différence de composition en taxa bactériens en fonction du statut du chiot (vivant ou décédé). Pour une p-value $\leq 0,05$, le résultat du test est considéré comme significatif.

2. Résultats

2.1. Description de la population générale étudiée

Au total, 11 mères ont donné naissance aux 77 chiots suivis dans cette étude. L'âge moyen des mères lors de la mise bas était de $3,1 \pm 1,1$ an et la NEC à G56 de gestation était de $4,8 \pm 1,2$.

Le sex ratio des chiots inclus était de 1,2 (42/35). L'ensemble des chiots dans cette étude appartiennent à 7 races différentes (Berger Australien, Golden Retriever, Labrador Retriever, Berger Blanc Suisse, Bouvier Bernois, Dalmatien, Berger Allemand), regroupés en classes de taille moyenne (M) à large (L) (63% de M et 37% de L parmi tous les chiots, $n=77$). Les chiots vivants jusqu'à la fin de l'étude provenaient de 4 races, tandis que les chiots décédés provenaient de 7 races (Figure 2). La majorité des chiots vivants (40%) étaient des Bergers Australiens, alors que c'est la race Bouvier Bernois qui est la plus représentée dans la population des chiots décédés (30%).

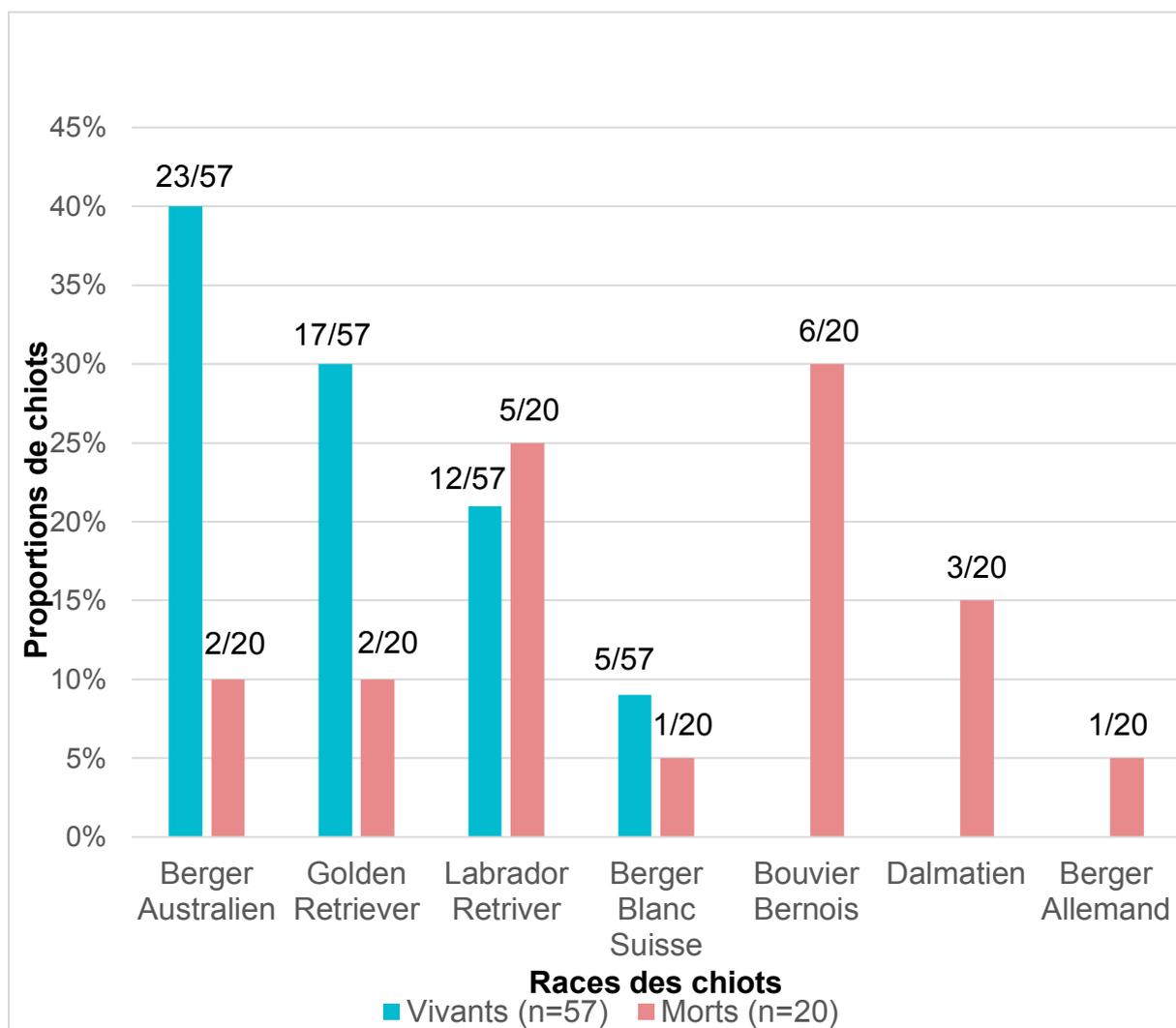


Figure 2. Proportion de chiots inclus dans l'étude parmi les différentes races selon leur statut de santé (les vivants en bleu, n=57 ; les décédés en rouge, n=20) avant l'âge de deux mois.

En moyenne, au sein de la population globale, le poids de naissance des 77 chiots était de $380,6 \pm 82,7$ g avec des variations allant de 173g à 612g, le pourcentage de petits poids de naissance s'élevait à 29% et le score APGAR était de $8,2 \pm 1,1$.

La température à J1 était en moyenne de $36,5 \pm 0,9$ °C et la glycémie à J1 de $122,5 \pm 36,5$ mg/dL.

2.2. Taux de mortalité des chiots en période néonatale précoce

Au cours de cette étude, on observe, parmi les 77 chiots étudiés, une mortalité néonatale globale de 26% avec 80% des décès se concentrant en période néonatale précoce (jusqu'à 7 jours). Parmi ces chiots morts en période néonatale précoce, 25%

(5/20) sont décédés le premier jour (Figure 3). Les chiots meurent en moyenne le 5,25^e jour.

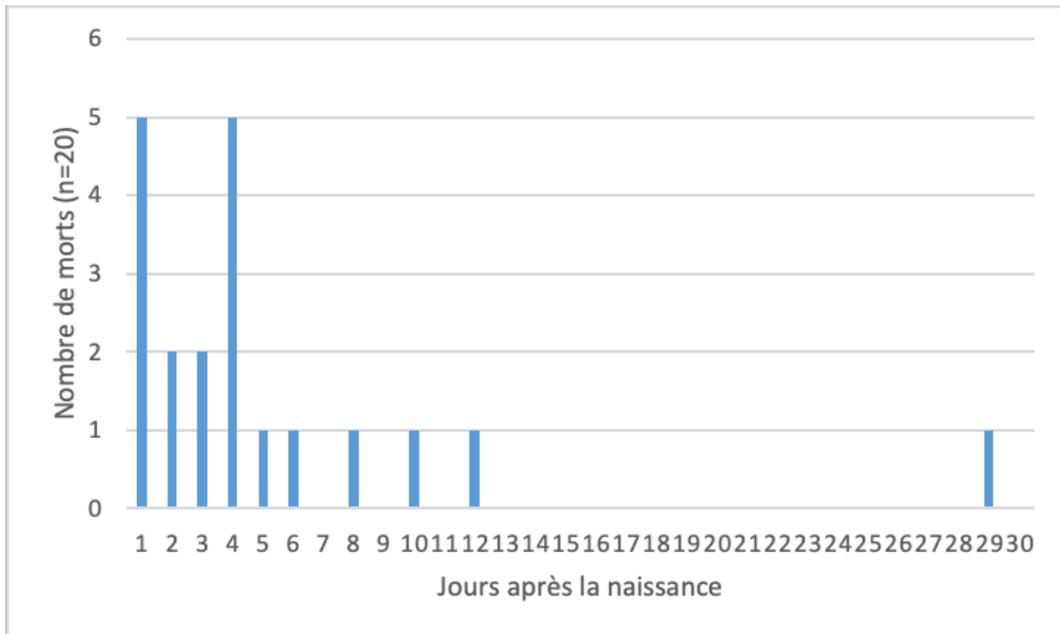


Figure 3. Nombre de chiots décédés (n=20) selon l'âge (en jour).

2.3. Comparaison des paramètres de santé, obtenus lors de la période néonatale, des populations de chiots vivants et de chiots décédés

Aucune différence significative ($p\text{-value} > 0,05$) n'a été retrouvée entre les deux populations quelle que soit la variable étudiée (Tableau 3). Seule une tendance semble se dégager concernant le score APGAR ($p\text{-value} = 0,09$) avec une moyenne chez les chiots vivants de $8,4 \pm 0,9$ contre une moyenne chez les chiots décédés de $7,8 \pm 1,2$. Le statut des chiots (vivant ou décédé) est corrélé au poids de naissance, avec une différence statistiquement significative mise en évidence par un test d'indépendance ($p = 0,007$). En particulier, seulement 12 % (7/57) des chiots vivants présentaient un petit poids de naissance (PPN), comparé à 40 % (8/20) dans la population des chiots décédés (Tableau 3).

Variables	Chiots vivants (n=57)	Chiots décédés (n=20)	p-value
Taille de la portée (nombre de chiots)	7,4 (± 1,6)	7,4 (± 1,7)	0,53
Taille de la race (nombre de chiots de race moyenne (M) ou large (L))	60% L (n=34) 40% M (n=23)	75% L (n=15) 5% M (n=5)	0,22
Sex ratio	1,1 (30/27)	1,5 (12/8)	0,57
Poids moyen à la naissance (g)	382,9 (± 73,3)	374,4 (± 107,4)	0,47
Petit Poids de Naissance (%)	12 (7/57)	40 (8/20)	0,007 (*)
Score APGAR	8,4 (± 0,9)	7,8 (± 1,2)	0,09 (T)
Glycémie moyenne au jour 1 (mg/dL)	124,7 (± 35,9)	115,4 (± 38,9)	0,16
Température moyenne au jour 1 (°C)	36,4 (± 0,9)	36,6 (± 1,1)	0,53

Tableau 3. Comparaison des variables obtenues à la naissance et les premiers jours de vie des chiots décédés au cours de la période néonatale et des chiots vivants jusqu'à 2 mois d'âge exprimés en moyennes (± écarts types) ou pourcentage. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Wilcoxon-Mann-Whitney ou le test d'indépendance du χ^2 (*= différence significative, T=tendance).

2.4. Composition et évolution du microbiote fécal de la cohorte des chiots vivants jusqu'à deux mois d'âge

Cette partie vise à étudier la composition du microbiote fécal et son évolution entre J0 et J2, uniquement au sein de la population des chiots vivants jusqu'à deux mois d'âge.

2.4.1. Description de la composition au sein de la population des vivants

À J0, le microbiote fécal des chiots vivants jusqu'à deux mois d'âge était composé principalement des 4 phylums suivants : les Proteobacteria, les Firmicutes, les Fusobacteria et les Bacteroidetes. Les Firmicutes sont les plus représentées avec une abondance de 51%, suivi par les Proteobacteria avec l'abondance de 38%. Les autres phylums représentaient quant à eux 9% pour les Fusobacteria et 4% pour les Bacteroidetes (Figure 4).

Au sein du phylum des Proteobacteria, la famille la plus représentée est celle des *Moraxellaceae* avec l'abondance de 21%, suivi par celle des *Enterobacteriaceae* avec l'abondance de 8%. Quant au phylum des Firmicutes, la famille retrouvée en plus grande proportion est celle des *Clostridiaceae* avec l'abondance de 17%. Concernant le phylum des Fusobacteria, c'est la famille des *Fusobacteriaceae* qui prédomine avec 9%. Enfin, pour le phylum des Bacteroidetes, la famille des *Bacteroidaceae* est retrouvée avec une abondance de 4%.

Au niveau du genre, le plus retrouvé est *Psychrobacter* (famille des *Moraxellaceae*) représentant 20%, suivi par *Clostridium* (famille des *Clostridiaceae*) obtenu à 16%. Cependant beaucoup n'ont pas pu être attribués.

Lors de l'analyse au niveau des espèces, beaucoup d'entre elles n'ont pas pu être attribuées. Au sein de la famille des *Moraxellaceae*, l'espèce bactérienne retrouvée de façon majoritaire est *Psychrobacter sanguinis* avec l'abondance de 13%. Concernant la famille des *Clostridiaceae*, les deux espèces les plus abondantes sont *Clostridium perfringens* ainsi que *Clostridium hiranonis* avec les abondances respectives de 4 et 7%. Concernant les Firmicutes, c'est l'espèce *Streptococcus alactolyticus* qui prédomine avec l'abondance de 5%.

À J2, les 4 mêmes phylums sont retrouvés. Les Proteobacteries et les Firmicutes sont encore les plus représentés avec un pourcentage de 40% et de 45% respectivement. Les autres phylums représentaient quant à eux 12% pour les Fusobacteria et 3% pour les Bacteroidetes (Figure 4).

Au sein du phylum des Proteobacteria, la famille la plus représentée est celle des *Enterobacteriaceae* avec l'abondance de 33%. Pour le phylum des Firmicutes, la famille retrouvée en plus grande proportion est celle des *Clostridiaceae* suivie par la famille des *Streptococcaceae* avec l'abondance de respectivement 21% et 16%. Pour le phylum des Fusobacteria, c'est la famille des *Fusobacteriaceae* qui prédomine avec l'abondance de 12%. Enfin, pour le phylum des Bacteroidetes, l'on retrouve la famille des *Bacteroidaceae* avec l'abondance de 2%.

Au niveau du genre, *Escherichia* (famille *Enterobacteriaceae*) est le plus retrouvé représentant 33% des genres obtenus, suivi par *Streptococcus* (famille *Streptococcaceae*) avec l'abondance de 16%. Cependant, beaucoup de genres n'ont pas pu être attribués.

Lors de l'analyse au niveau des espèces, beaucoup d'entre elles n'ont pas pu être attribuées. Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, l'espèce bactérienne retrouvée de façon majoritaire est *Escherichia coli* avec l'abondance de 33%. Concernant la famille des *Clostridiaceae*, l'espèce majoritairement présente est *Clostridium perfringens* (14% de l'abondance). Au sein de la famille des *Streptococcaceae*, c'est l'espèce *Streptococcus luteciae* qui prédomine avec 13% des espèces obtenues. La variabilité individuelle est appréciable en annexe 1.

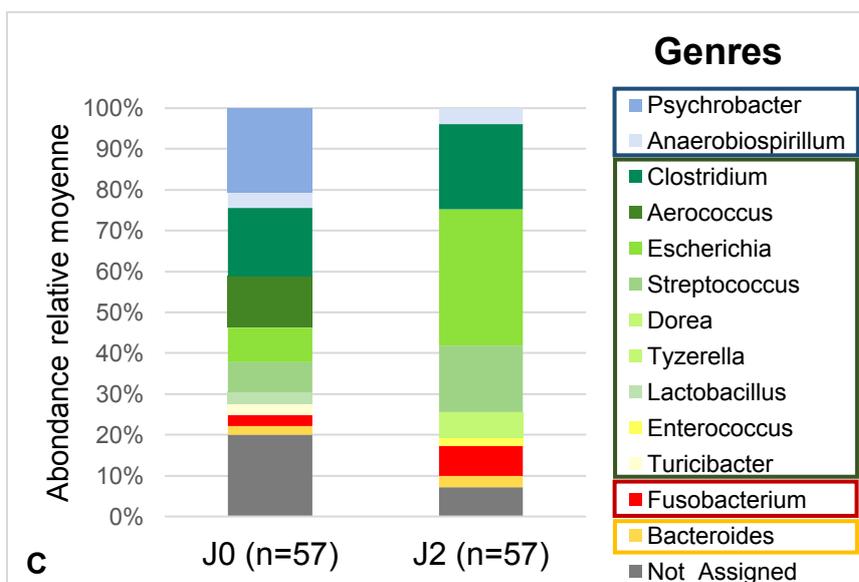
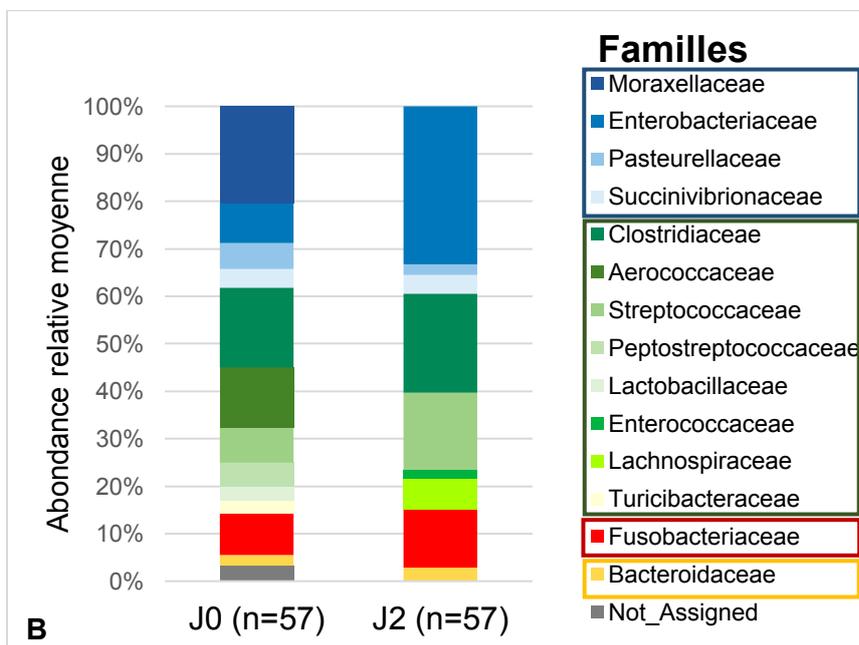
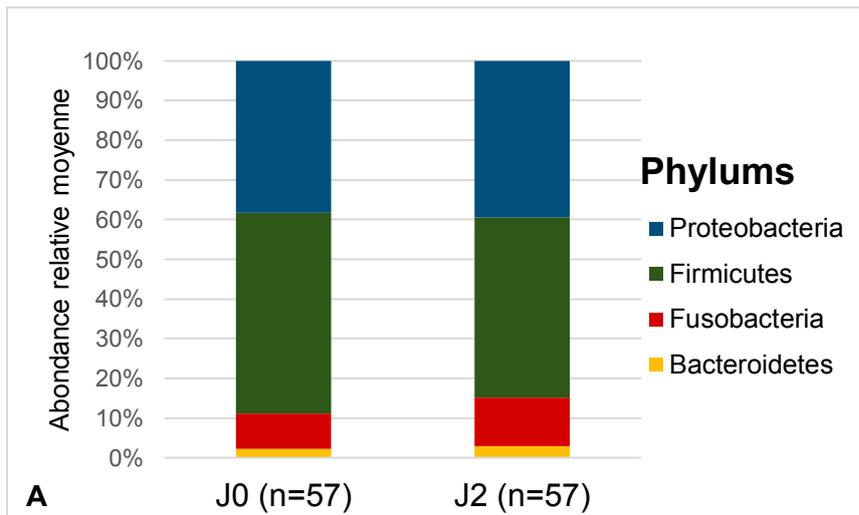


Figure 4. Composition du microbiote fécal des chiots vivants jusqu'à 2 mois d'âge (n=57) au niveau du phylum (A), de la famille (B) et du genre (C). La légende est présentée de telle sorte que les familles et les genres sont regroupés par phylums (bleu : Proteobacteria, vert : Firmicutes, rouge : Fusobacteria, jaune : Bacteroidetes).

2.4.2. Comparaison de la composition selon l'âge au sein de la population des vivants

La composition du microbiote fécal a évolué de manière significative au cours des deux premiers jours de vie des chiots vivants. Notamment, l'abondance des Fusobacteria a augmenté de 9% à J0 à 12% à J2 ($p=0,04$), tandis que l'abondance des Bacteroidetes a diminué de 4% à 2% au cours de la même période ($p=0,01$) (Figure 5). Aucune différence significative en termes de variation d'abondance pour les deux autres phylums n'a été observée.

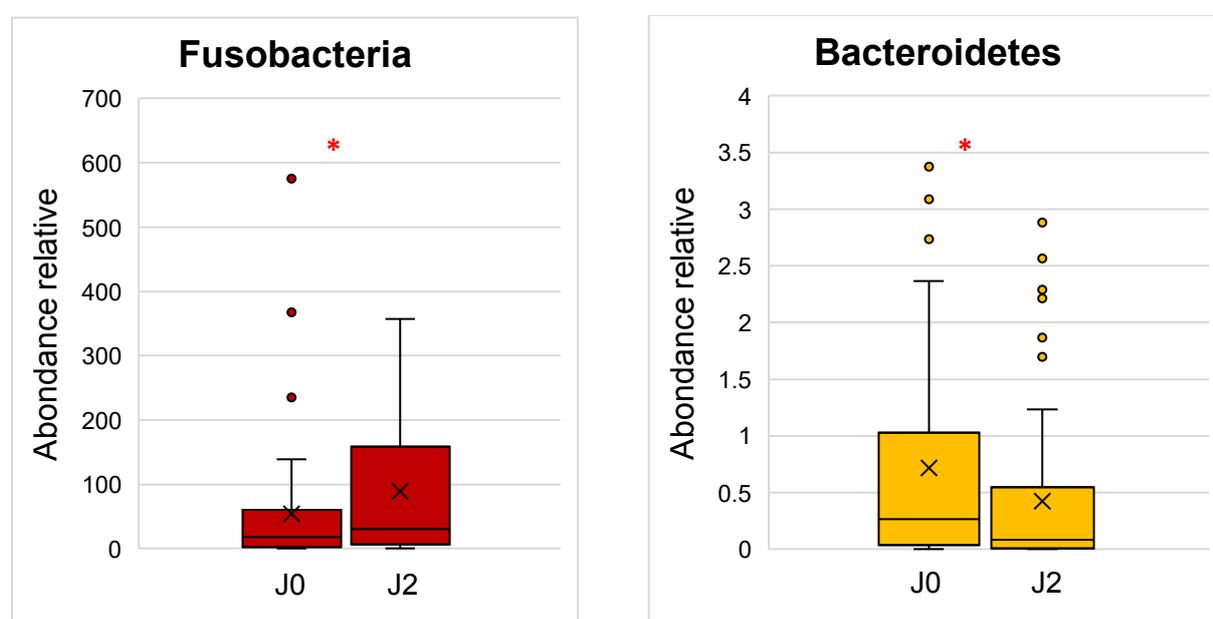


Figure 5. Comparaisons de l'abondance relative des phylums des Fusobacteria et des Bacteroidetes, au sein de la cohorte des chiots vivants ($n=57$), entre la naissance (J0) et le deuxième jour de vie (J2). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux dates, après un test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

2.4.3. Comparaison des indices de diversité selon l'âge au sein de la population des vivants

La richesse et l'homogénéité du microbiote fécal ont significativement diminué entre J0 et le J2 au sein de la cohorte de chiots vivants. Les indices de la diversité alpha (indicateur de la richesse bactérienne), comme le nombre observé d'ASV et l'indice de diversité de Shannon sont passés respectivement de $15,4 \pm 6,3$ à $10,5 \pm 2,8$ et de $2,1 \pm 0,6$ à $1,8 \pm 0,4$ ($p < 0,05$ pour les deux comparaisons ; Figure 6). La variabilité individuelle est appréciable en annexe 2.

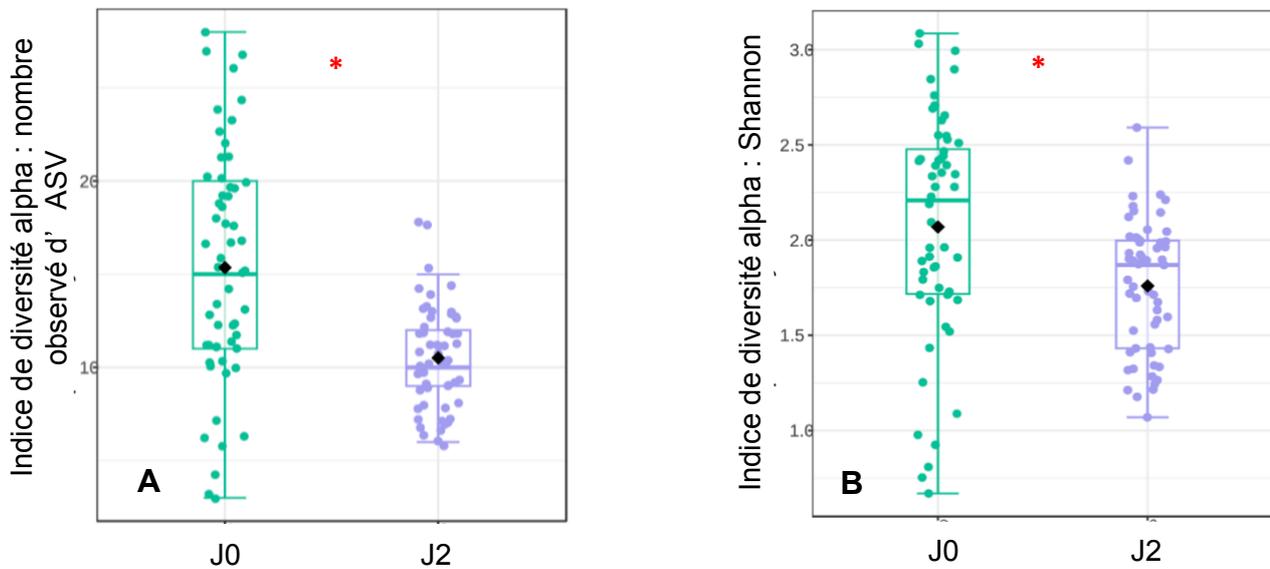


Figure 6. Comparaison de l'alpha diversité, en utilisant (A) le nombre d'ASV observés (richesse bactérienne) et (B) l'indice de Shannon (richesse bactérienne et uniformité), au sein de la cohorte des chiots vivants (n=57), entre la naissance (J0) et le deuxième jour de vie (J2). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux dates, après un test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

La beta diversité a également évolué de manière significative entre J0 et J2 chez les chiots vivants jusqu'à 2 mois d'âge d'après les analyses PerMANOVA utilisant les distances de Bray-Curtis ($p = 0,001$, $R^2 = 0,16$) (Figure 7). D'après les graphiques de mise à l'échelle multidimensionnelle (MDS), à J0, le microbiote fécal des chiots vivants semble plus hétérogène en comparaison avec le microbiote fécal des chiots vivants à J2 qui semble plus homogène, bien que l'indice R^2 soit assez proche de 0.

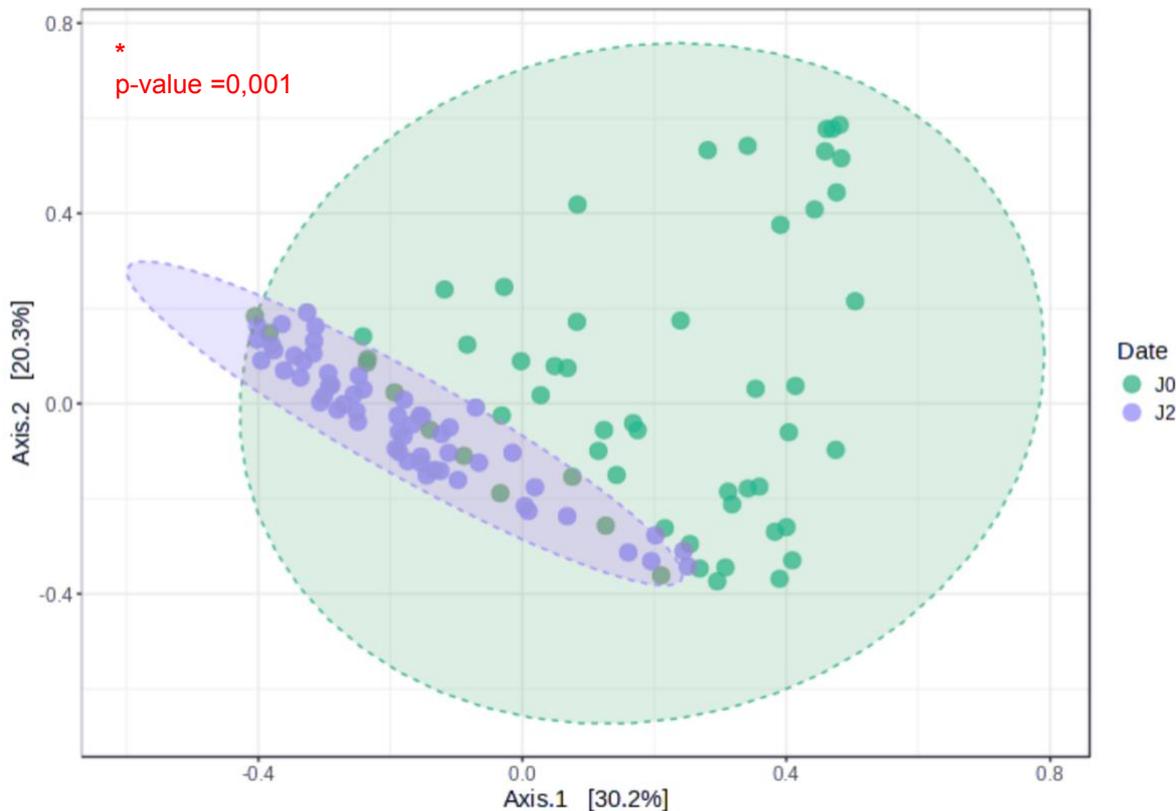


Figure 7. Diversité beta du microbiote fécal en fonction de l'âge de la cohorte des chiots vivants jusqu'à 2 mois d'âge (n=57) (à la naissance (J0) et au deuxième jour de vie (J2)). Graphiques de mise à l'échelle multidimensionnelle (MDS) montrant l'évolution et les dissemblances de la composition du microbiote fécal des chiots en fonction de leur âge calculé à l'aide des distances de Bray–Curtis. Chaque point représente un échantillon individuel de chiot, positionné sur la parcelle en fonction de la similitude de sa communauté de microbiote avec d'autres échantillons. Les ellipses sont basées sur des intervalles de confiance de 95 % et une erreur type. La similarité des communautés bactériennes est évaluée sur la base de la similarité et de l'abondance des taxons. Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes.

2.5. Comparaison de la composition du microbiote fécal en fonction du statut du chiot (vivant ou décédé) et son évolution entre J0 et J2

2.5.1. Comparaison des indices de diversité

Le microbiote fécal des chiots vivants et des chiots décédés ne présente pas de diversité alpha significativement différente à J0.

Cependant, le nombre d'ASV observés et l'indice de diversité de Shannon sont significativement différents ($p < 0,05$) à J2 (Figure 8). En effet, à J2, le microbiote des

chiots vivants présente un nombre significativement plus élevé d'ASV observés (moyenne = $10,5 \pm 2,8$) par rapport au microbiote des chiots décédés (moyenne = $7,5 \pm 3,6$) (Tableau 4). En utilisant l'indice de Shannon, on retrouve ce même résultat (chez les vivants moyenne = $1,8 \pm 0,4$ et les décédés moyenne = $1,3 \pm 0,6$). La variabilité individuelle est appréciable en annexe 5.

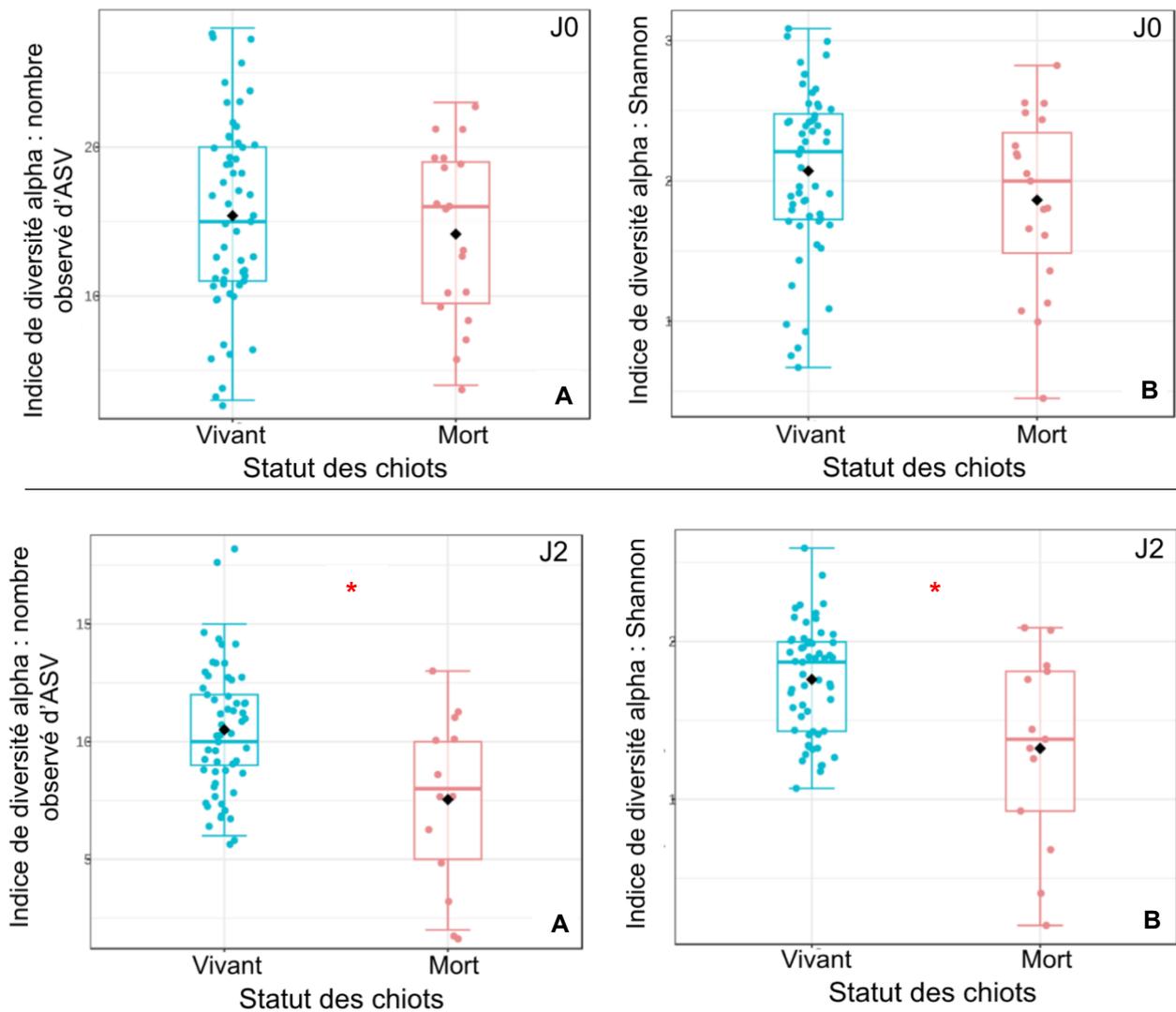


Figure 8. Alpha diversité du microbiote fécal des chiots vivants et des chiots mourant au cours de la période néonatale, à la naissance (J0, partie haute) et au deuxième jour de vie (J2, partie basse) en utilisant (A) le nombre d'ASV observés (richesse bactérienne) et (B) l'indice de Shannon (richesse bactérienne et uniformité). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)) après le test d'ANOVA.

Concernant l'évolution des indices de diversité avec l'âge, comme pour la population de chiots vivants, entre J0 et J2, la richesse et l'homogénéité bactérienne ont significativement diminué ($p < 0,05$) pour la population de chiots décédés (Tableau 4). Les indices obtenus avec le nombre observé d'ASV et de Shannon sont passés respectivement de $14,2 \pm 5,8$ à $7,5 \pm 3,6$ et de $1,9 \pm 0,6$ à $1,3 \pm 0,6$.

	Indice	Statut des chiots		p-value (ANOVA)
		Vivant	Mort	
J0	Nombre d'ASV observés	$15,4 \pm 6,3$	$14,2 \pm 5,8$	0,40
	Indice de Shannon	$2,1 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,6$	0,20
J2	Nombre d'ASV observés	$10,5 \pm 2,8$	$7,5 \pm 3,6$	0,01 (*)
	Indice de Shannon	$1,8 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,6$	0,02 (*)
	p-value (Wilcoxon-Mann-Whitney-)	$< 0,001$ (**)	0,030 (**)	

Tableau 4. Nombre d'ASV observés moyen et indice de Shannon moyen à la naissance (J0) et au deuxième jour (J2) de vie chez les populations de chiots vivants et de chiots décédés, associés aux p-value après test d'ANOVA. Un astérisque (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant et mort), après un test ANOVA. Un double astérisque () indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre le J0 et le J2 pour l'indice de Shannon et le nombre observé d'ASV, après un test de Mann-Whitney-Wilcoxon.**

Une différence significative en terme du profil bactérien (béta diversité) a été observée à J2 entre les chiots vivants et les chiots décédés suite aux analyses PerMANOVA utilisant les distances de Bray-Curtis ($p = 0,02$, $R^2 = 0,04$) (Figure 9).

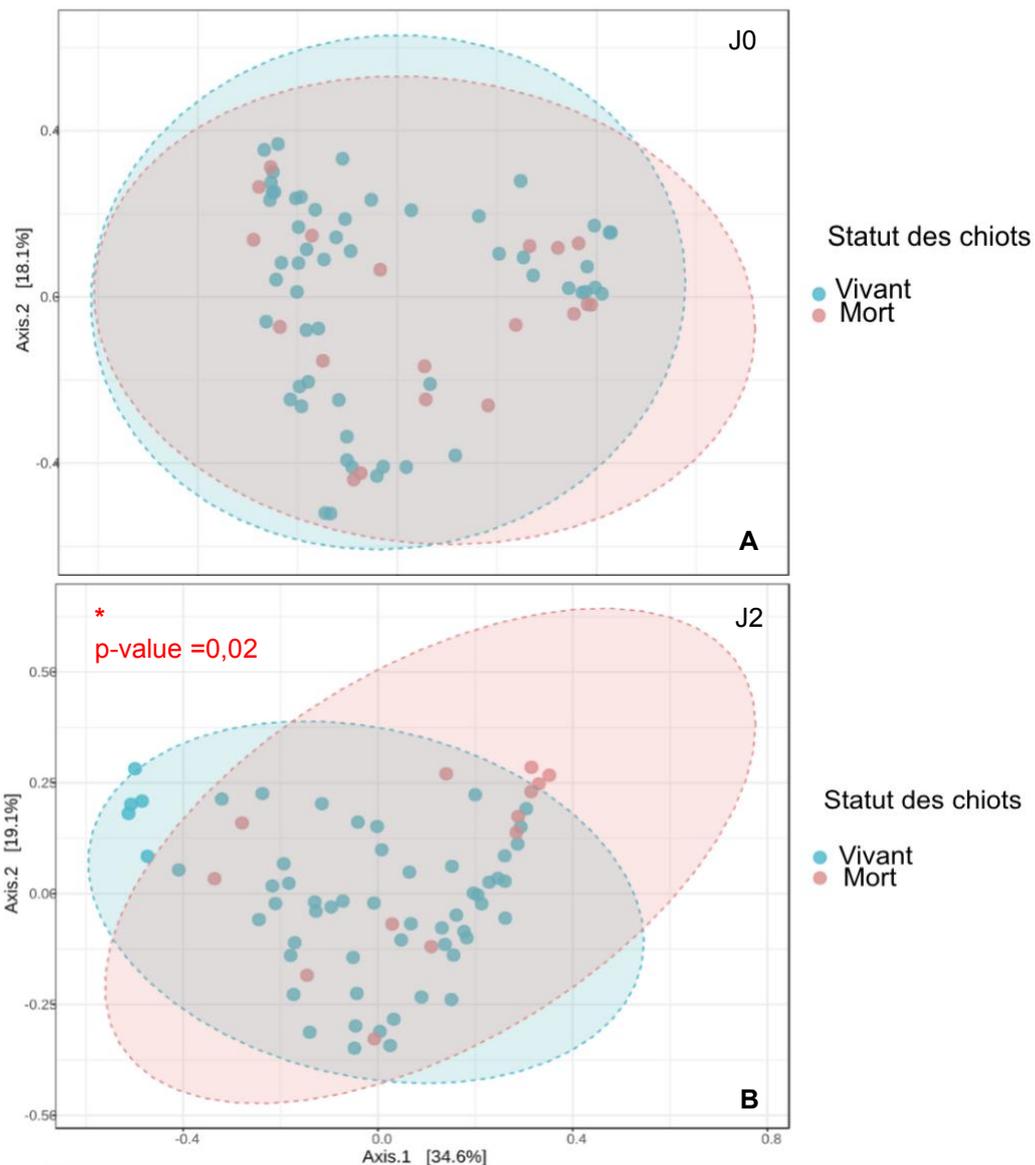


Figure 9. Diversité beta du microbiote fécal en fonction du statut du chiot (vivant ou mort). Graphiques de mise à l'échelle multidimensionnelle (MDS) montrant l'évolution et les dissemblances de la composition du microbiote fécal des chiots en fonction de leur statut calculé à l'aide des distances de Bray–Curtis (A) à la naissance (J0) et (B) au deuxième jour (J2). Chaque point représente un échantillon individuel de chiot, positionné sur la parcelle en fonction de la similitude de sa communauté de microbiote avec d'autres échantillons. Les ellipses sont basées sur des intervalles de confiance de 95 % et une erreur type. La similarité des communautés bactériennes est évaluée sur la base de la similarité et de l'abondance des taxons. Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)).

2.5.2. Comparaison de la composition du microbiote fécal

sont *Clostridium perfringens* ainsi que *Clostridium hiranonis* dans les mêmes proportions. Concernant les Firmicutes, c'est également l'espèce *Streptococcus alactolyticus* qui prédomine dans les mêmes proportions que chez les vivants. La variabilité individuelle est appréciable en annexe 3.

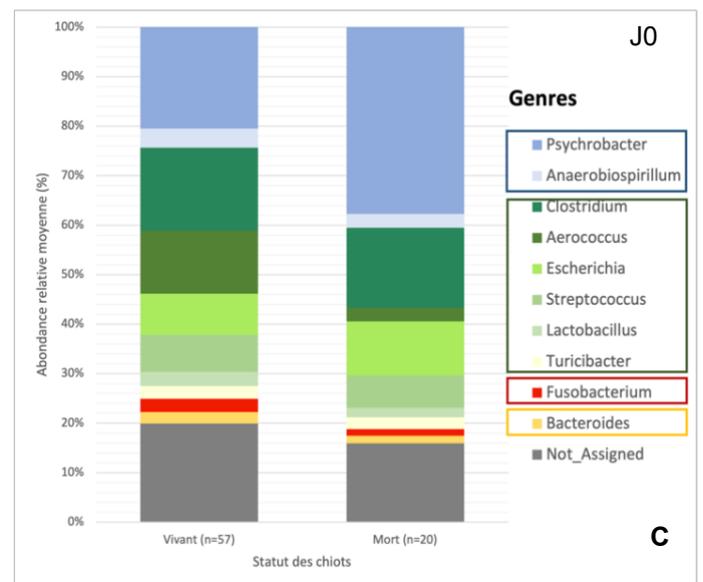
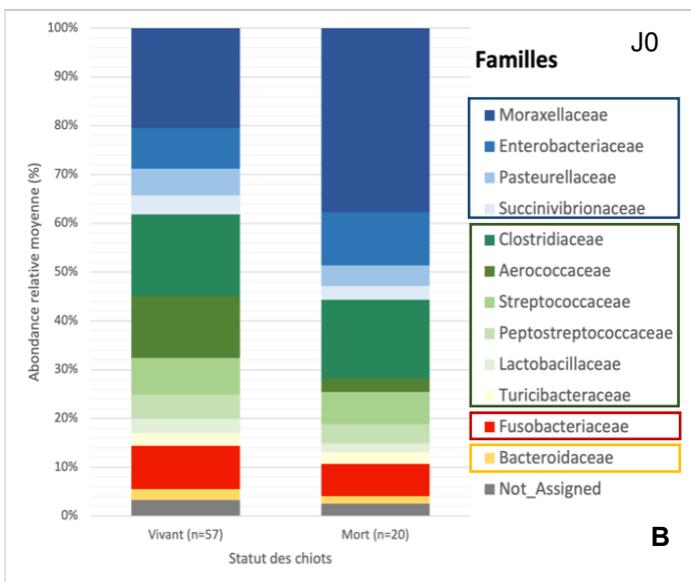
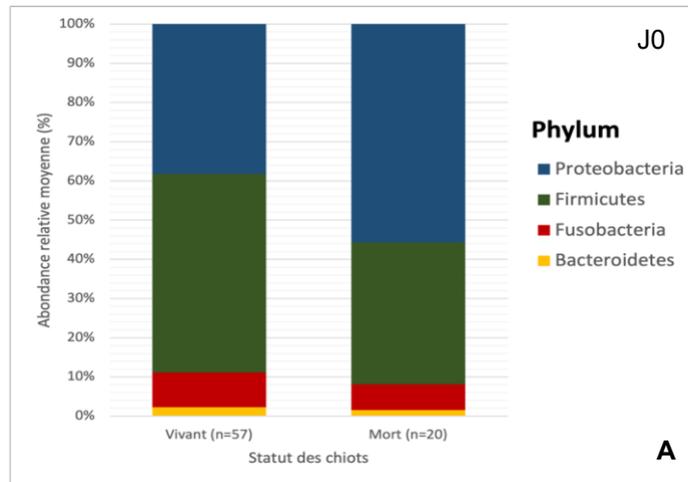


Figure 10. Composition du microbiote fécal à la naissance (J0) chez les chiots décédés (n=20) au cours de la période néonatale et chez les chiots vivants jusqu'à 2 mois (n=57), au niveau du phylum (A), de la famille (B) et du genre (C). La légende est présentée de telle sorte que les familles et les genres sont regroupés par phylums (bleu : Proteobacteria, vert : Firmicutes, rouge : Fusobacteria, jaune : Bacteroidetes).

À J0, l'analyse discriminante linéaire met en évidence une abondance absolue significativement plus élevée de la famille des *Pasteurellaceae* chez les chiots vivants ($p=0,004$). A l'inverse, une abondance absolue significativement plus élevée de la famille des *Moraxellaceae* est observée chez les chiots décédés ($p=0,024$) (Tableau

5 et Figure 11). De la même manière dans cette population, le genre *Psychrobacter* apparaît comme significativement en plus grande abondance chez les décédés par rapport aux vivants ($p=0,024$) (Tableau 6 et Figure 12). Une représentation graphique du score LDA est appréciable en annexe 6.

On observe également une tendance à une abondance absolue plus élevée pour l'espèce *Psychrobacter sanguinis* chez les décédés ($p=0,08$) (Tableau 7 et Figure 13).

Famille	P-value	FDR	Abondance Vivant	Abondance Mort	LDAScore
<i>Pasteurellaceae</i>	0,004 *	0,047896	605380,0	332950,0	5,13
<i>Moraxellaceae</i>	0,024 *	0,15884	1842100,0	3732700,0	-5,98

Tableau 5. Abondances absolues moyennes obtenues par analyse discriminante linéaire à l'échelle de la famille, à la naissance (J0) (FDR : False discovery rate ou taux d'erreur, LDAScore : score d'Analyse Discriminante Linéaire).

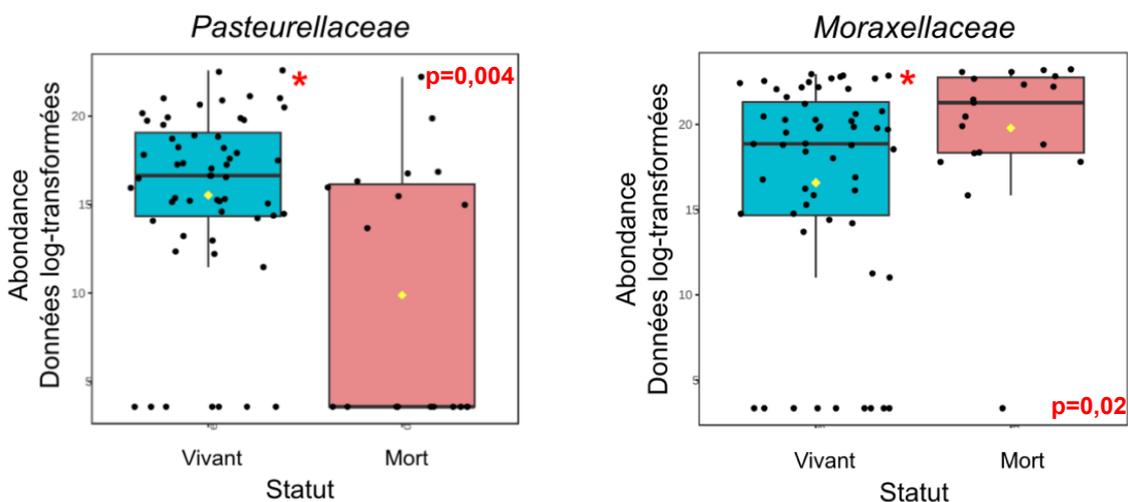


Figure 11. Abondances log-transformées de la famille des Pasteurellaceae et des Moraxellaceae à la naissance (J0). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)) après analyse discriminante linéaire.

Genre	P-value	FDR	Abondance Vivant	Abondance Mort	LDAScore
<i>Psychrobacter</i>	0,024 *	0,2688	1842100,0	3732700,0	-5,98

Tableau 6. Abondances absolues moyennes obtenues par analyse discriminante lineaire à l'échelle du genre, à la naissance (J0).

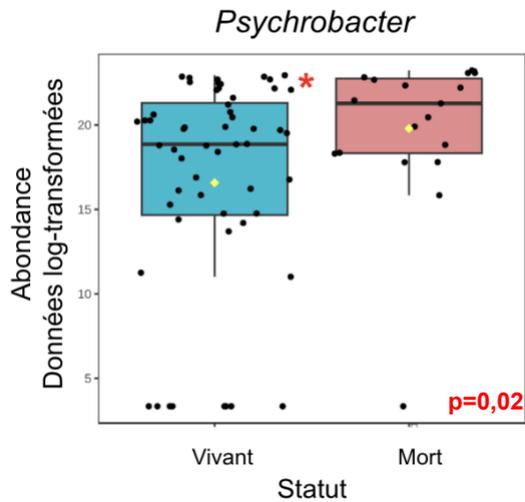


Figure 12. Abondances log-transformées du genre *Psychrobacter* à la naissance (J0). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu (n=57) et mort en rouge (n=20) après analyse discriminante linéaire).

Espèce	P-value	FDR	Abondance Vivant	Abondance Mort	LDAScore
<i>Psychrobacter sanguinis</i>	0.08 T	0.49432	1078900.0	1905600.0	-5.62

Tableau 7. Abondances absolues moyennes obtenues par analyse discriminante lineaire à l'échelle de l'espèce, à la naissance (J0)

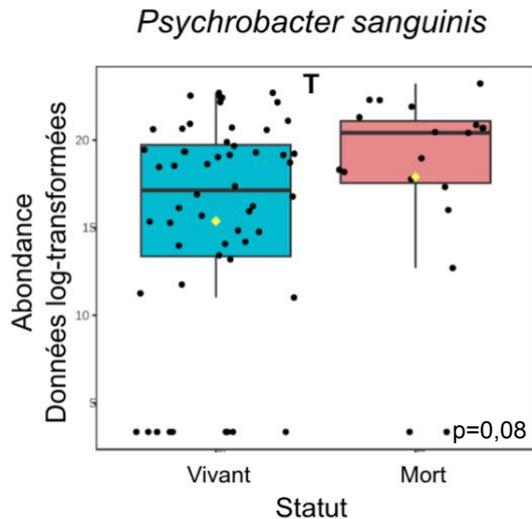


Figure 13. Abondances log-transformées des espèces *Psychrobacter sanguinis* à la naissance (J0). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)) tandis qu'un « T » indique une tendance ($p \leq 0,1$) après analyse discriminante linéaire.

À J2, les mêmes 4 principaux phylums sont retrouvés chez les décédés. Cependant, comme à J0, l'abondance de Proteobacteries est plus importante, avec 55% chez les chiots décédés (contre 40% chez les vivants) (Figure 14). À contrario, l'abondance de Firmicutes est plus faible avec 34% chez les chiots décédés (contre 45% chez les vivants). Les autres phylums sont quant à eux comparables entre les deux groupes, avec 12% et 10% pour les Fusobacteria et 3% et 1% pour les Bacteroidetes.

Au sein du phylum des Proteobacteria, la famille la plus représentée est, comme chez les vivants, celle des *Enterobacteriaceae* avec une abondance de 51% (contre 33% chez les vivants). La famille des *Streptococcaceae* est retrouvée avec une moins grande abondance que chez les vivants, avec 12% contre 21%. Les familles des *Clostridiaceae*, des *Fusobacteriaceae* et des *Bacteroidaceae* sont retrouvées dans les mêmes proportions dans les deux populations.

Au niveau du genre, le plus retrouvé est, comme chez les vivants, *Escherichia* (famille *Enterobacteriaceae*) mais en bien plus grande abondance avec 51% chez les décédés (contre 33%). Le genre *Streptococcus* (famille *Streptococcaceae*) est en

abondance comparable dans les deux populations (16% et 12%). Cependant, beaucoup n'ont pas pu être attribués.

Lors de l'analyse au niveau des espèces, beaucoup d'entre elles n'ont pas pu être attribuées. Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, l'espèce bactérienne retrouvée de façon majoritaire est *Escherichia coli* avec une abondance de 51%, contre 33% chez les vivants. Concernant la famille des *Clostridiaceae*, *Clostridium perfringens* est retrouvée dans les mêmes proportions que chez les vivants (14% et 6%) et au sein de la famille des *Streptococcaceae*, *Streptococcus luteciae* également (13% et 9%). La variabilité individuelle est appréciable en annexe 4.

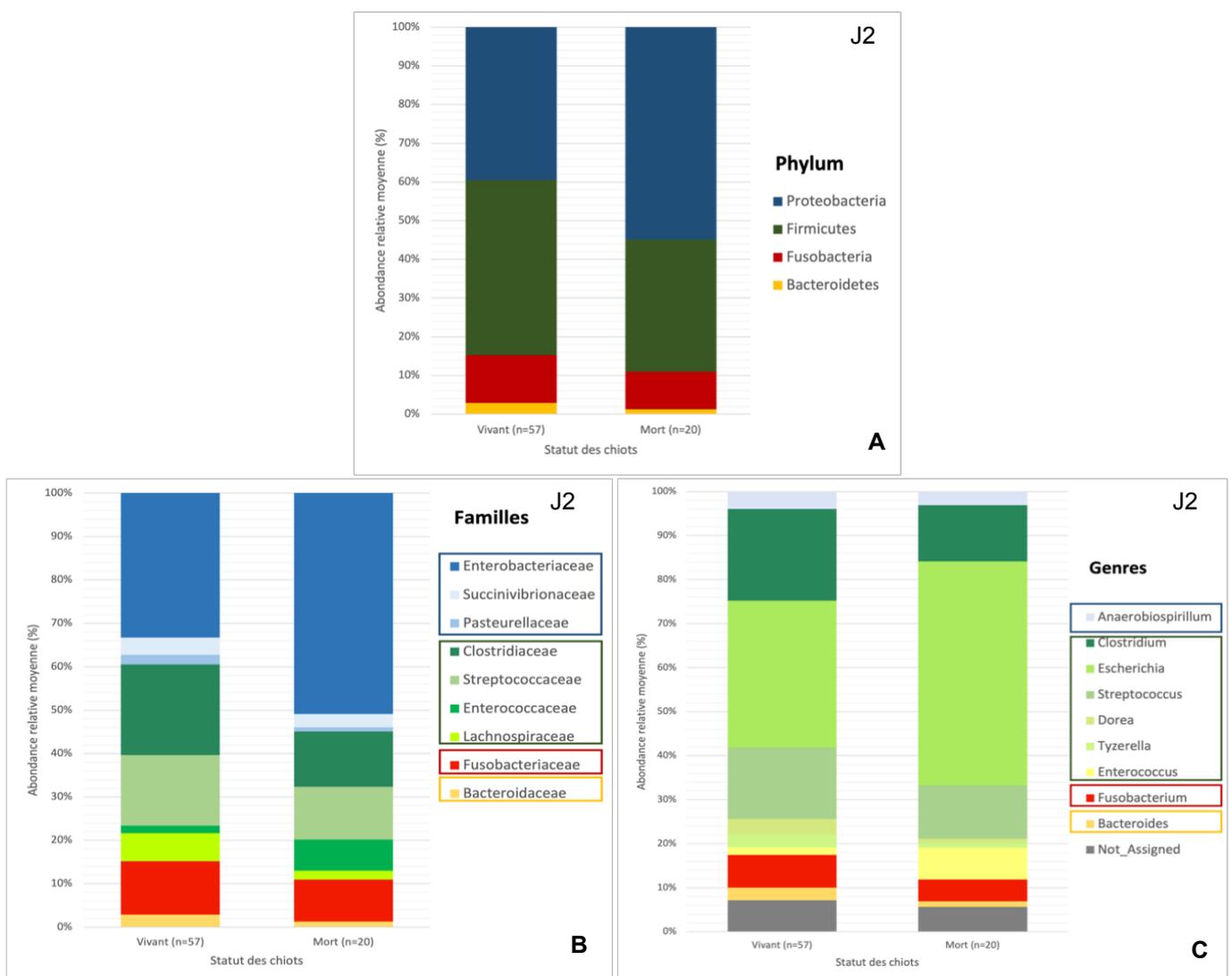


Figure 14. Composition du microbiote fécal au deuxième jour de vie (J2) chez les chiots décédés (n=20) au cours de la période néonatale et chez les chiots vivants jusqu'à 2 mois (n=57) au niveau du phylum (A), de la famille (B) et du genre (C). La légende est présentée de telle sorte que les familles et les genres sont regroupés par phylums (bleu : Proteobacteria, vert : Firmicutes, rouge : Fusobacteria, jaune :

À J2, l'analyse discriminante linéaire met en évidence une abondance absolue significativement plus élevée des familles des *Lachnospiraceae*, des *Clostridiaceae* et des *Succinivibrionaceae* chez les chiots vivants (respectivement $p=0,005$, $p=0,029$, $p=0,038$). Chez les chiots décédés, on observe des tendances à une abondance absolue plus élevée pour les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Enterococcaceae* (respectivement $p=0,09$, $p=0,09$) (Tableau 8 et Figure 15).

A l'échelle du genre, une abondance absolue significativement plus élevée des genres *Dorea*, *Clostridium* et *Anaerobiospirillum* est observée chez les chiots vivants (respectivement $p=0,026$, $p=0,030$, $p=0,038$). Chez les chiots décédés, on observe une tendance à une abondance absolue plus élevée pour le genre *Escherichia* et pour le genre *Enterococcus* (respectivement $p=0,087$ et $p=0,089$) (Tableau 9 et Figure 16).

A J2, les espèces bactériennes avec une abondance absolue significativement plus élevées chez les vivants sont *Clostridium perfringens*, *Clostridium hiranonis* et *Clostridium paraputrificum* (respectivement $p=0,006$, $p=0,012$, $p=0,036$). Une tendance à une abondance absolue plus élevée pour l'espèce *Escherichia coli* est observée chez les morts ($p=0,087$) (Tableau 10 et Figure 17). Des représentations graphiques du score LDA sont appréciables en annexe 7.

Famille	P-value	FDR	Abondance Vivant	Abondance Mort	LDAScore
<i>Lachnospiraceae</i>	0,005 *	0,041633	640990,0	222490,0	5,32
<i>Clostridiaceae</i>	0,029 *	0,11344	20410000,0	1289900,0	5,57
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,038 *	0,11344	405710,0	442350,0	-4,26
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,086 T	0,16074	3343000,0	4898500,0	-5,89
<i>Enterococcaceae</i>	0,089 T	0,16074	170630,0	644780,0	-5,37

Tableau 8. Abondances absolues moyennes obtenues par analyse discriminante linéaire à l'échelle de la famille, au deuxième jour (J2).

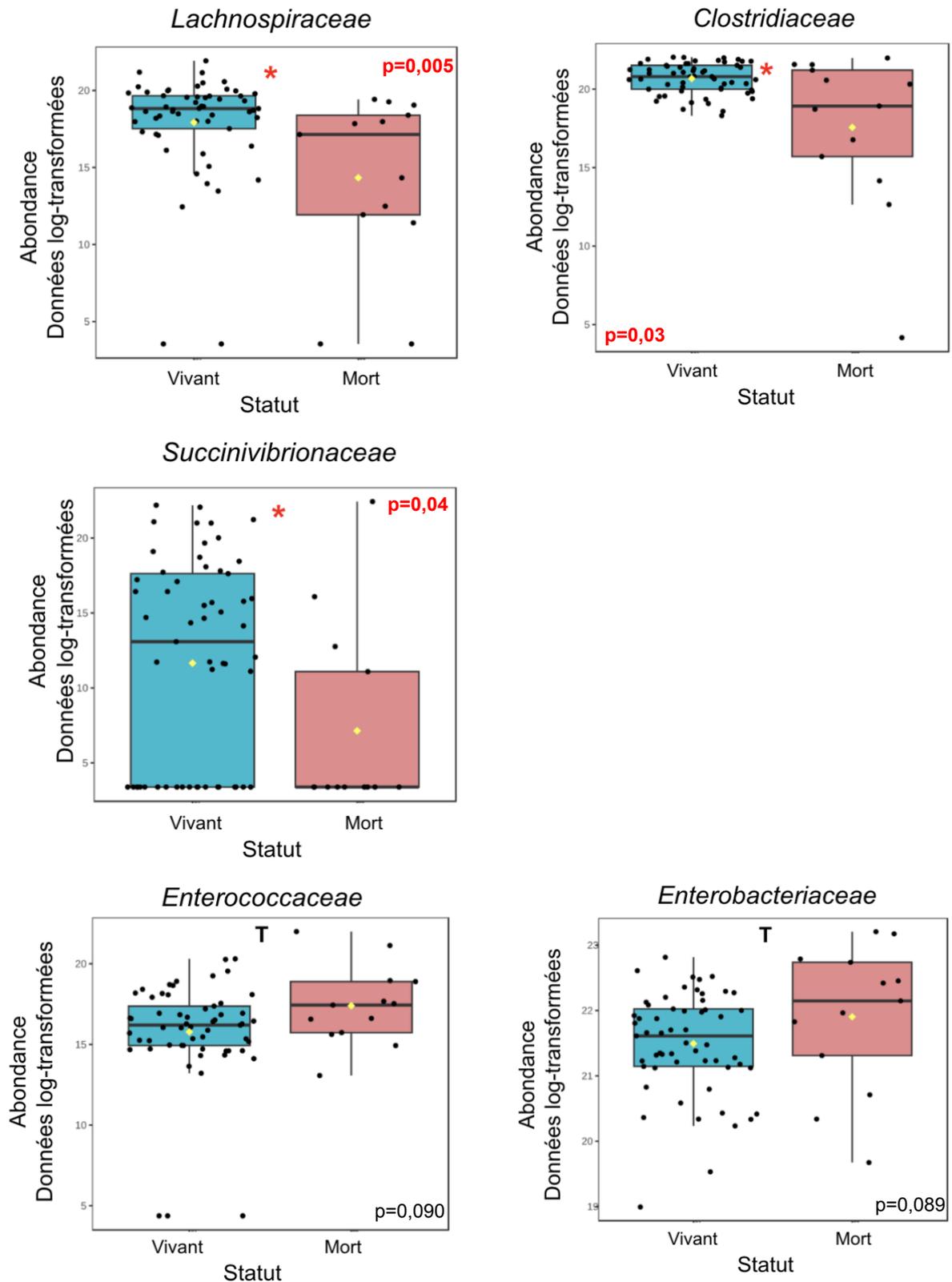
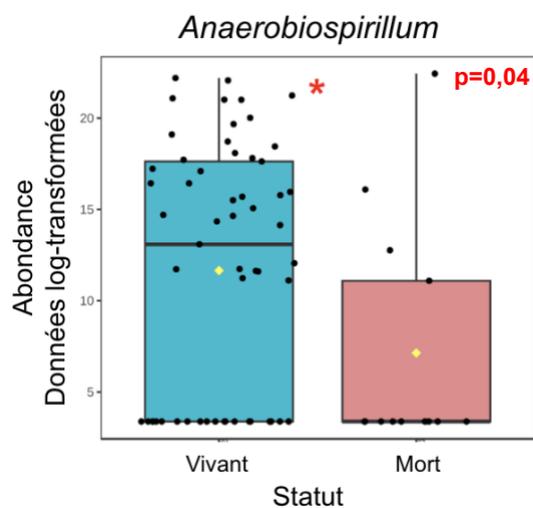
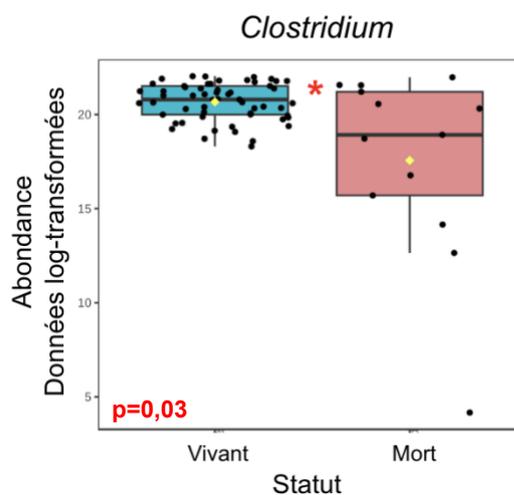
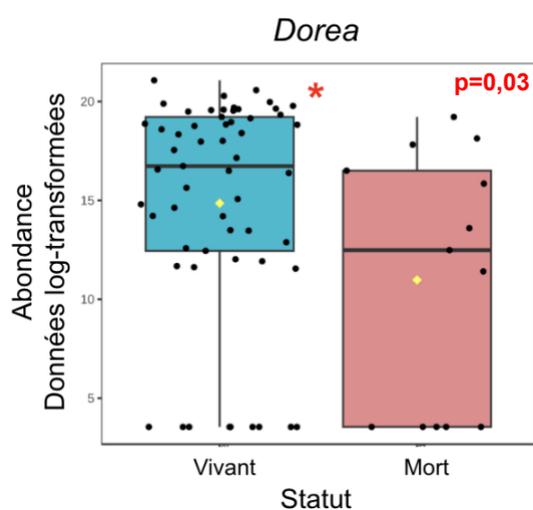


Figure 15. Abondances log-transformées des familles *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Succinivibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Enterococcaceae* au deuxième jour (J2). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)) tandis qu'un « T » indique une tendance ($p \leq 0,1$) après analyse discriminante linéaire.

Genre	P-value	FDR	Abondance Vivant	Abondance Mort	LDAScore
<i>Dorea</i>	0,026 *	0,12604	355180,0	100160,0	5,11
<i>Clostridium</i>	0,030 *	0,12604	20410000,0	1289900,0	5,57
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,038 *	0,12604	405710,0	442350,0	-4,26
<i>Escherichia</i>	0,087 T	0,1786	3343000,0	4898500,0	-5,89
<i>Enterococcus</i>	0,089 T	0,1786	170630,0	644780,0	-5,37

Tableau 9. Abondances absolues moyennes obtenues par analyse discriminante lineaire à l'échelle du genre, au deuxième jour (J2).



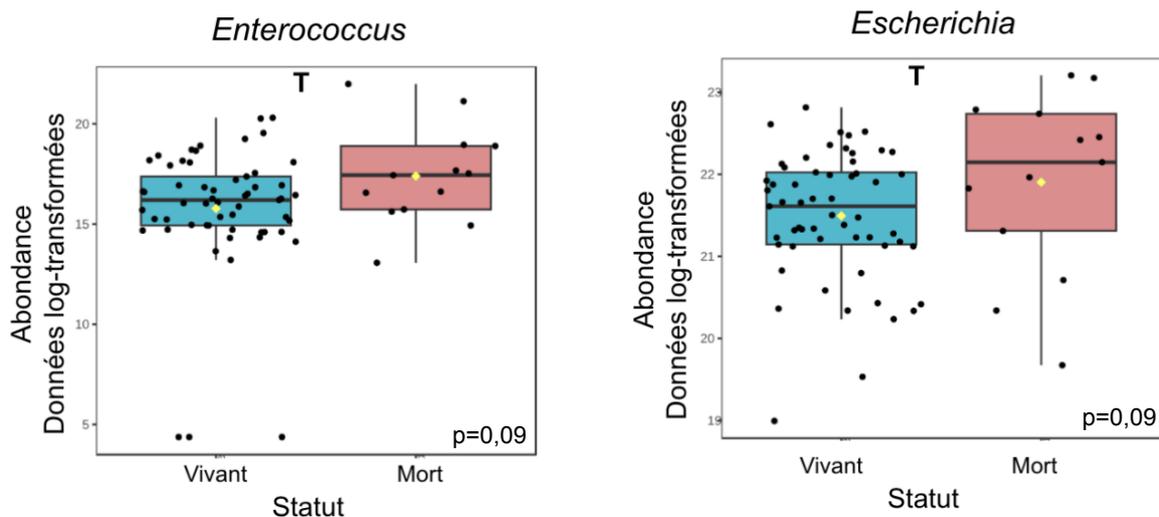


Figure 16. Abondances log-transformées des genres *Dorea*, *Clostridium*, *Anaerobiospirillum*, *Escherichia* et *Enterococcus* au deuxième jour (J2). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)) tandis qu'un « T » indique une tendance ($p \leq 0,1$) après analyse discriminante linéaire.

Espèce	P-value	FDR	Vivant	Mort	LDAScore
<i>Clostridium perfringens</i>	0,006 *	0,052498	1379100,0	656970,0	5,56
<i>Clostridium hiranonis</i>	0,012 *	0,052498	229240,0	48109,0	4,96
<i>Clostridium parapatrificum</i>	0,036 *	0,10781	160580,0	176820,0	-3,91
<i>Escherichia coli</i>	0,087 T	0,17109	3343000,0	4898500,0	-5,89

Tableau 10. Abondances absolues moyennes obtenues par analyse discriminante linéaire à l'échelle de l'espèce, au deuxième jour (J2).

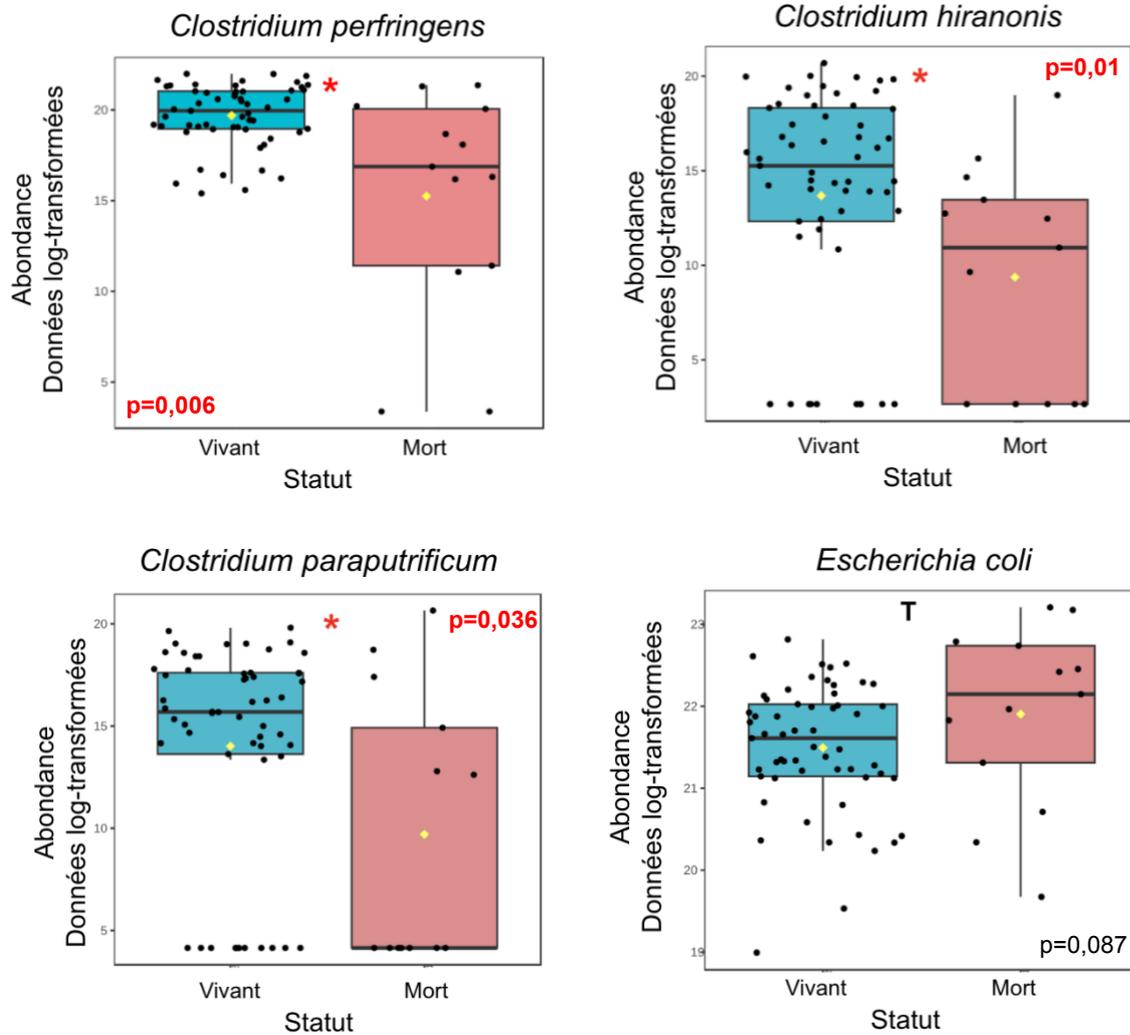


Figure 17. Abondances log-transformées des espèces *Clostridium perfringens*, *Clostridium hiranonis*, *Clostridium parapatrificum* et *Escherichia coli* au deuxième jour (J2). Un astérisque rouge (*) indique une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les deux groupes (vivant en bleu ($n=57$) et mort en rouge ($n=20$)) tandis qu'un « T » indique une tendance ($p \leq 0,1$) après analyse discriminante linéaire.

3. Discussion

Le but de cette étude expérimentale était de comparer le profil du microbiote fécal à la naissance et 48h après la naissance entre une cohorte de chiots vivants tout au long de l'étude (jusqu'à 2 mois d'âge) et une cohorte de chiots décédés avant la fin de l'étude. Ce travail présente donc des données originales sur un nombre relativement grand d'animaux, et ayant une importance sur la compréhension du microbiote chez le jeune de l'espèce canine. Cependant, et comme dans toutes études, ce travail a des limites, qui seront présentées par la suite.

3.1. Les limites de l'étude

L'échantillonnage, regroupant 57 chiots vivants et 20 chiots décédés, pourrait être considéré comme relativement petit dans le cadre d'une recherche sur le microbiote. En effet, ce sujet nécessite que l'on s'intéresse à la variabilité interindividuelle. Cependant, la taille d'échantillon de cette étude égale ou dépasse celle de la majorité des investigations concernant le microbiote des chiots retrouvées dans la littérature (Boucard et al. 2021) (Chun et al. 2020) (n=18 et n=24 respectivement pour ces deux études).

De plus, des résultats statistiquement significatifs et cohérents semblent nous assurer que la taille de l'échantillon était adéquate et que la puissance statistique était suffisante.

Ensuite, nous avons choisi d'étudier une cohorte de chiots vivants et de la comparer à une cohorte de chiots décédés durant la période néonatale. Les conditions de naissance et d'élevage étaient les mêmes pour tous les individus (rations, soins prophylactiques...), cependant la population n'est pas totalement homogène notamment en termes de race, de taille de race et d'état de santé, ce qui freine l'extrapolation à l'ensemble de l'espèce canine. Il serait alors intéressant de collecter des données dans plusieurs élevages et sur un grand nombre de chiens pour vérifier la reproductibilité de nos résultats. Néanmoins, nos prélèvements étaient suffisants pour observer des différences significatives entre les deux populations.

A propos de la méthode d'identification employée, certaines espèces bactériennes ont échappé à l'identification du fait de leur très faible proportion dans les échantillons. Cependant, la méthode moléculaire utilisant l'ARN 16S pour identifier les bactéries reste celle qui permet d'obtenir de manière la plus représentative, le plus rapidement la composition bactérienne dans un échantillon et est la moins influencée par les conditions de prélèvement. Bien qu'efficace pour l'identification taxonomique au niveau du genre, la méthode présente des limites pour distinguer les espèces étroitement apparentées et ne permet pas l'étude des fonctions génomiques. Certains taxa rares échappent donc à l'identification bien qu'ils puissent avoir une forte influence sur la santé. Pour cela, des amorces plus spécifiques seraient nécessaires pour détecter avec plus de précision les espèces bactériennes minoritaires ou différencier les espèces étroitement apparentées.

En comparaison, à partir du même ADN total extrait, la technique métagénomique Shotgun consiste à fragmenter l'ADN entier et à séquencer de manière aléatoire les fragments obtenus. Cette méthode permet l'identification de tous les types de micro-organismes contenant de l'ADN dans un échantillon avec une résolution taxonomique plus fine, permettant une identification jusqu'au niveau de l'espèce, voire de la souche et également permet de fournir des informations sur des gènes fonctionnels. Cependant, cette méthode reste techniquement plus complexe et nécessite des capacités de séquençage à haut débit.

Concernant la période de prélèvement des échantillon, elle a été réduite à la période néonatale et compare des échantillons prélevés dans les deux premiers jours de la vie, période clé pour la capacité de survie du chiot (Mila et al. 2015).

En effet, cette période est critique pour le chiot en raison des nombreux changements physiologiques et métaboliques qui surviennent sur un court laps de temps, avec des effets potentiels à long terme sur la santé du chiot. Il a été démontré chez d'autres espèces, comme l'Homme et le porc, que le microbiote intestinal subit également des changements brusques au cours de cette période et pourrait être impacté par des événements précoces avec des conséquences potentielles sur la composition du microbiote adulte et le bon développement du système immunitaire de l'hôte (Guard et al. 2017) (Isolauri 2012) (Nowland, Kirkwood, Pluske 2022). Au sein de l'espèce canine, il a également été prouvé que la santé du chiot au cours des deux premiers jours de sa vie et les événements s'y déroulant, peuvent avoir un impact sur la

composition du microbiote jusqu'à deux mois plus tard (Garrigues et al. 2023). En outre, les résultats obtenus dans notre étude confirment l'importance cruciale de la période néonatale précoce, avec la majorité des décès des chiots s'y regroupant.

3.2. *Évolution du microbiote fécal au cours des premiers jours de vie*

On observe qu'entre la naissance et le deuxième jour de vie, la richesse et l'homogénéité bactérienne ont significativement diminué ($p < 0,05$) que ce soit pour la population de chiots vivants comme pour celle des chiots décédés. Ce résultat correspond à ce qui a déjà été publié, et met en avant que l'âge des chiots affecte de manière significative la diversité alpha, évaluée par l'indice de Shannon notamment (Guard et al. 2017) (Ala et al. 2024). Des études chez le porcelet ont mis en évidence que la diversité alpha était fortement affectée par l'âge, avec une richesse accrue des espèces au fil du temps. La diversité bêta quant à elle diminuait après le sevrage, suggérant une évolution convergente entre les individus (Saladrigas-García et al. 2022). Cela pourrait suggérer que le microbiote des chiots à la naissance est diversifié et évolue très rapidement au cours de la première semaine de vie. Il diminue très précocement, pour ensuite augmenter pendant la période postnatale, et enfin se stabiliser quelques mois après le sevrage pour finalement diminuer lentement une fois seniors (Garrigues et al. 2022). En résumé, les mesures de diversité alpha peuvent être considérées comme une statistique récapitulative d'une seule population (diversité au sein de l'échantillon), tandis que les mesures de diversité beta sont des estimations de similarité ou de dissemblance entre populations

Que ce soit à la naissance ou bien au deuxième jour de vie, les Proteobacteria, les Firmicutes, les Fusobacteria et les Bacteroidetes étaient les 4 principaux phylums composant le microbiote des chiots nouveau-nés dans cette étude comme tel est le cas dans la bibliographie (Buddington 2003) (Zakošek Pipan et al. 2020).

D'après les différentes études, si les phylums principaux sont les mêmes entre adultes et chiots, leur répartition est différente. Les Protéobactéries sont plus abondantes dans le microbiote fécal des chiots tandis que les Bacteroidetes et les Fusobacteria sont plus abondantes chez les adultes. Ceci s'explique par le fait que les Proteobacteria maintiennent un environnement anaérobie nécessaire à la mise en place du microbiote en post natal, dont les mécanismes sont détaillés plus tard (Moon et al.

2018). À contrario, le phylum des Bacteroidetes est connu comme ayant une fonction de digestion des fibres et des polysaccharides complexes pour la production de métabolites, dans un contexte d'alimentation solide chez l'adulte de la même manière que les Fusobacteria dont un rôle est supposé dans la dégradation des protéines animales (Doron et al. 2014b).

En ce qui concerne les taxons spécifiques, de manière générale, les chiots ont des abondances plus élevées de *Bifidobacterium*, d'*Enterobacteriaceae* (principalement *E. coli*), de *Lactobacillaceae* (principalement *L. johnsonii*) et de certaines *Clostridiaceae* (*C. perfringens* et *C. difficile*) (Garrigues et al. 2022). La présence des *Bifidobacterium* et des *Lactobacillaceae* s'explique du fait de leur fonction de dégradation des oligosaccharides du lait en lactate et en acétate (Alipour et al. 2018).

Dans notre étude, que ce soit à la naissance ou au deuxième jour, la composition globale des phylums est conservée avec une majorité de Firmicutes (48% \pm 4,24) chez les chiots vivants contre une majorité de Proteobacteria (55,5% \pm 0,71) chez les chiots décédés. Au niveau de la famille, on retrouve majoritairement les *Moraxellaceae* à la naissance dans les deux populations, puis les *Enterobacteriaceae* au deuxième jour dans les deux populations, mais en bien plus grande importance dans la population de chiots décédés aux deux dates pour ces deux familles.

Au niveau du genre, on retrouve *Psychrobacter* à la naissance dans les deux populations mais en bien plus grande importance chez les chiots décédés. Au deuxième jour c'est le genre *Escherichia* qui prédomine dans les deux populations, mais en plus grande importance chez les chiots décédés.

En affinant au niveau de l'espèce, cette fois encore, *Escherichia coli* est en plus grande importance chez les chiots décédés aux deux dates bien qu'une grande partie des espèces ne soient pas attribuées. Une hypothèse à ces associations de taxa avec la mortalité est que par exemple *E.coli* est connue comme pouvant induire une dysbiose et est associée à des désordres inflammatoires.

Concernant la composition du microbiote chez le chiot et à la différence du chien adulte, le phylum Bacteroidetes est retrouvé en très faible proportion, quel que soit la population étudiée (2,5% \pm 0,71 chez les vivants et 1,5% \pm 0,71 chez les décédés).

Lorsque l'on s'intéresse à la mortalité néonatale chez le chiot, de nombreux facteurs entrent en jeu et peuvent impacter la santé globale et celle du microbiote. Des changements importants se produisent au cours de la période néonatale, comme le soulignent l'évolution de la composition bactérienne et la dynamique de la diversité alpha et beta dans notre étude. La même dynamique après la période néonatale précoce (de J2 à J28) a été observée chez les porcelets, où l'âge était significativement associé à une augmentation de la diversité alpha, une diminution des *Enterobacteriaceae* et des *Clostridiaceae* et une augmentation des *Prevotellaceae*, tout comme dans l'étude de Garrigues et al (Garrigues et al. 2023). Cependant, outre l'âge, la variation du microbiote fécal des chiots s'est également avérée être associée à des paramètres de santé clés de la période néonatale. Parmi ces variables, il a été démontré que la mère du chiot a la plus forte influence sur la variation du microbiote, expliquant jusqu'à 50 % de celle-ci (Garrigues et al. 2023). Rappelons que le facteur « mère » dans cette étude englobait de nombreux sous-facteurs qui peuvent tous influencer la composition du microbiote, tels que la race, la génétique, la composition du lait, l'allaitement et son propre microbiote (fécal, vaginal, oral, lait, etc.) (Vilson et al. 2018) (Mu et al. 2019).

Il a été démontré de la même manière, chez d'autres espèces de mammifères que le microbiote à la naissance est principalement façonné par le microbiote de la mère, notamment lors du contact du nouveau-né avec le microbiote vaginal et des activités d'allaitement après la naissance (Jašarević, Bale 2019) (Mortensen et al. 2021). De plus, l'émergence de l'intestin du nouveau-né en tant que nouvel environnement, rempli d'oxygène, conduit à une colonisation importante de diverses bactéries facultatives qui dominent l'intestin pendant les premiers jours de la vie, créant ainsi un environnement riche (Adlerberth, Wold 2009). Cette grande richesse en bactéries de faible abondance rend plus difficile la détection de différences significatives entre les groupes, d'autant plus que le facteur le plus important à cette date, comme rappelé précédemment, est celui de la mère.

3.3. Comparaison du microbiote fécal entre les chiots vivants et les chiots décédés

Lorsque l'on s'intéresse à la diversité alpha des deux cohortes, au deuxième jour de vie, le microbiote fécal des chiots vivants présentait une richesse plus élevée et une structure différente, notamment une forte diversité bactérienne (indice de Shannon élevé) par rapport à la population de chiots décédés. Ces résultats sont enrichis par ceux obtenus concernant la beta diversité qui confirment que les chiots vivants et les chiots décédés ont des compositions bactériennes significativement différentes au deuxième jour de vie.

Pour expliquer ces différences de composition microbienne, des études ont démontré que chez la plupart des mammifères, à la naissance, le tractus gastro-intestinal était rempli d'oxygène. Par la suite, la maturation se traduit par l'établissement d'un milieu anaérobie via l'action à la fois de bactéries consommatrices d'oxygène, nommées anaérobies facultatives, mais aussi grâce au métabolisme colonocytaire qui réalise la beta-oxydation des acides gras (Litvak, Byndloss, Bäumlér 2018). En effet, ceci est illustré par le fait que le potentiel redox positif au sein de l'intestin constitue l'environnement idéal pour l'installation des bactéries aérobies strictes et facultatives, qui appartiennent principalement aux phylums des Proteobacteria et des Firmicutes (Sanidad, Zeng 2020), comme c'est le cas dans notre étude sur les chiots. Ces bactéries et les colonocytes consommant de l'oxygène, un remplacement des bactéries aérobies strictes par des bactéries aérobies facultatives opportunistes est rapidement observé en quelques jours par la suite (Buddington 2003). Nos résultats semblent confirmer le fait que les conditions environnementales sont favorables aux aérobies (*Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae*) et aux anaérobies facultatifs (*Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*).

Plus précisément, dans notre étude, la famille des *Pasteurellaceae* est retrouvée majoritairement dans la population des chiots vivants à la naissance. Appartenant au phylum des Proteobacteria, elle est parmi les premières colonisatrices de l'intestin néonatal rempli d'oxygène comme évoqué précédemment. La famille des *Pasteurellaceae* (principalement du genre *Haemophilus*) a également été l'un des taxa prédominants mis en évidence lors de la mise bas dans l'espèce canine mais aussi

celui retrouvé en plus grande abondance dans l'environnement vaginal des mères (Baba et al. 1983) (Garrigues et al. 2023). De la même manière, cette famille représente un taxon typique du colostrum d'échantillons sains. Il a même été démontré que dans le microbiote du colostrum, les *Pasteurellaceae* étaient négativement corrélées à la perte de poids chez le chiot (Garrigues et al. 2023). Chez l'Homme, les bactéries appartenant à la famille des *Pasteurellaceae* se sont révélées plus abondantes dans les microbiotes intestinaux des nourrissons allaités en comparaison avec ceux nourris avec du lait maternisé (Khan et al. 2021). En conclusion, il apparaît que l'ensemble des précédentes études associées à ce travail de recherche semblent en faveur d'un rôle clé de la famille des *Pasteurellaceae* et de son association à la bonne santé néonatale.

À J2, la famille des *Lachnospiraceae* a été obtenue majoritairement au sein de la population des chiots vivants. Elle regroupe des bactéries obligatoirement anaérobies non originaires de la flore vaginale ou du lait maternel. Dans une étude menée chez l'Homme, il a été démontré que les *Lachnospiraceae* sont des taxons essentiels connus du microbiote adulte, jouant un rôle dans la recherche de nourriture des glycanes alimentaires, la production de métabolites bénéfiques et l'immunité, et il a été prouvé que leur intégration dans le microbiote intestinal doit avoir lieu tôt pour un développement neurologique optimal de l'enfant (Oliphant et al. 2021). Cependant, le rôle de cette famille de bactéries reste inconnu chez le chiot nouveau-né actuellement.

L'autre famille retrouvée au deuxième jour de vie au sein de la population de chiots vivants en plus forte abondance que chez les chiots décédés, est celle des *Clostridiaceae*. Notre étude laisse apparaître trois principales espèces au sein de la population de chiots vivants : *Clostridium hiranonis*, particulièrement plus abondante chez les vivants, mais également *Clostridium perfringens* et *Clostridium paraputrificum*. Les membres des *Clostridiaceae* sont variés et peuvent être potentiellement pathogènes ou bénéfiques pour leur hôte. *Clostridium hiranonis* est un producteur secondaire d'acide biliaire qui inhibe également la croissance de bactéries pathogènes telles que *Clostridium perfringens* (Pavlidis et al. 2015). De plus, un certain nombre d'études mettent en évidence que des niveaux réduits de *Clostridium hiranonis* et une diminution de la conversion des acides biliaires sont fortement corrélés à une dysbiose intestinale et à une croissance excessive des enteropathogènes chez le chien (Li et al. 2017)(AlShawaqfeh et al. 2017). En outre, *Clostridium perfringens* a d'ailleurs été

isolée en plus grande abondance chez les enfants prématurés et les porcelets ce qui a été corrélé à un risque plus élevé d'entérococolite nécrosante (Arboleya et al. 2012)(Cilieborg et al. 2011). Dans notre cas, nous pouvons supposer que l'équilibre qui règne entre ces espèces et le reste des taxa bactériens restreint les actions pathogènes des espèces de *Clostridium*. En résumé, les espèces de Clostridies ne semblent pas être particulièrement associées à de la pathogénicité chez le chiot nouveau-né. La présence de *Clostridium hiranonis*, en plus grande abondance chez les chiots vivants, suggère d'ailleurs que cette espèce est associée au bon développement et à la santé du chiot.

La famille des *Succinivibrionaceae*, composée d'anaérobies strictes, est également un des taxa obtenus majoritairement chez les chiots vivants. Les bactéries anaérobies strictes sont liées à la maturité du système immunitaire. Dans l'étude de Garrigues et.al, les chiots avec un faible score de santé présentaient une abondance plus faible de bactéries anaérobies strictes dont ce taxon, ce qui pouvait laisser supposer un retard dans leur maturation (Garrigues et al. 2023). De la même manière, une plus forte abondance de la famille des *Bacteroidaceae* est observée dans la population de chiots vivants, regroupant des bactéries connues pour leur rôle dans la maturation du microbiote des chiens (Bermingham et al. 2017). L'autre famille retrouvée est celle des *Streptococcaceae*, qui est également une des familles les plus fréquemment retrouvée dans le lait maternel (Ge et al. 2021). La présence de *Streptococcaceae* mais également de *Pasteurellaceae*, pourrait suggérer que les chiots vivants jusqu'à la fin de la période, sont restés en bonne santé grâce à l'ingestion optimale de colostrum et puis de lait.

Concernant la cohorte des chiots décédés, la famille des *Moraxellaceae*, composée d'aérobies strictes, est quant à elle retrouvée en plus grande abondance à la naissance. Cependant, dans une autre étude, il a été démontré que les chiots de faible poids de naissance présentaient une abondance plus faible de *Moraxellaceae* à la naissance (Garrigues et al. 2023). Il semble donc difficile de conclure quant au rôle et à l'association de cette famille avec la santé néonatale. Dans ce contexte, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre ces éléments.

Au sein de la population de chiots décédés, au deuxième jour de vie, une tendance est observée avec une plus forte abondance d'*Enterobacteriaceae* et d'*Enterococcaceae*, comme c'est le cas dans l'étude de Garrigues et al à J2 chez les individus de faible poids corporel, avec notamment l'espèce *Escherichia coli*. Ces taxons sont connus pour être des bactéries opportunistes et associées à des conditions favorables aux maladies et spécifiquement aux maladies inflammatoires de l'intestin chez l'espèce canine (Minamoto et al. 2015). Plus précisément, il a été démontré que *E.coli* est impliquée dans les maladies intestinales et les septicémies chez les chiots nouveau-nés (Münnich, Lübke-Becker 2004). Il a été démontré que lors d'entéropathies, l'inflammation s'accompagne de la destruction du mucus et de la structure de la muqueuse intestinale ce qui entraîne une oxygénation accrue de la surface de la muqueuse, une augmentation de bactéries aérobies, telles qu'*E.coli*, et une diminution de la flore anaérobie normale (AlShawaqfeh et al. 2017).

De manière comparative, lors d'exams bactériologiques effectués sur cadavres, *Streptococcus spp.* est le plus souvent identifié (quel que soit l'âge et la cause de la mort), suivi par *E.coli*, et sont retrouvés chez plus de 40% des chiots morts pour les deux taxa (Meloni et al. 2014)(Indrebø, Trangerud, Moe 2007). Notre étude confirme donc le rôle pathogène d'*E.coli* chez les chiots nouveau-nés. Cependant, il reste à investiguer quels facteurs prédisposeraient les chiots à cette dérive de mise en place de microbiote les premiers jours après la naissance.

3.4. Perspectives

Notre étude a mis en évidence des modifications majeures du microbiote intestinal chez le chiot lors des deux premiers jours de vie. En examinant les différences dans les communautés bactériennes, dans l'ensemble, il a été observé une tendance à une abondance plus élevée de bactéries pathogènes opportunistes, telles que les *Enterobacteriaceae* au sein de la population de chiots décédés. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature et les études déjà menées chez l'Homme, le porcelet ou le chiot. À l'inverse, les chiots vivants avaient une abondance plus élevée de *Succinivibrionaceae*, aérobies strictes, et de *Bacteroidaceae* liées à la maturité du système immunitaire.

Ainsi, cette étude a donné un meilleur aperçu des taxons bactériens que l'on peut retrouver chez le chiot vivant en comparaison à des individus décédés lors de la période néonatale.

Cependant, des analyses supplémentaires sur une population à plus grande échelle, de chiots grandissant dans des conditions différentes seraient nécessaires pour explorer le lien entre le microbiote fécal dans la période néonatale précoce et la mortalité. La relation causale entre les événements de la période néonatale et le microbiote reste floue, il est donc essentiel de les contrôler tous deux pour prévenir les troubles de santé. Les éleveurs doivent veiller à ce que l'apport de colostrum des chiots soit suffisant pour éviter une potentielle dysbiose et les problèmes qui peuvent en découler. D'autres stratégies préventives visant à protéger l'équilibre du microbiote intestinal, qui sont en progression, seraient le transfert du microbiote fécal ou l'utilisation de probiotiques dans un biofilm, notamment chez la femelle gestante (Burton et al. 2016) (Olson et al. 2016).

Plus précisément, il a été démontré que 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. Ce dernier présenterait une meilleure capacité de lutte contre les pathogènes dans les premiers jours de vie grâce à un système immunitaire renforcé, comme le prouvent des études chez la truie (Wellison A. Pereira et al. 2022). Il a été prouvé que le microbiote des porcelets issus de truies complémentées en probiotiques, avaient un nombre de diarrhées néonatales réduit, présentaient une flore commensale de meilleure qualité ainsi qu'une quantité moindre d'agents pathogènes opportunistes. Dernièrement, chez le chien, il a été mis en évidence que supplémenter les chiennes avec une souche de *Saccharomyces cerevisiae* est une approche prometteuse pour optimiser la santé et la nutrition des chiots (Garrigues et al. 2023).

CONCLUSION

En conclusion, cette étude expérimentale a permis d'enrichir notre compréhension du microbiote des chiots lors des premiers jours de vie, notamment des deux premiers, et s'est attelée à élucider une partie des causes relatives à la mortalité néonatale chez cette espèce. Il en résulte que l'analyse et l'interprétation du microbiote s'avèrent être des éléments complexes. Il semblait jusqu'alors difficile d'assurer si le microbiote était une cause ou une conséquence de la mortalité observée chez le chiot. Néanmoins, il apparaît clairement que la mortalité néonatale est en relation avec une richesse bactérienne plus faible et des profils microbiens précis durant les deux premiers jours de vie. Cette étude place alors le microbiote comme facteur de prédisposition à une mortalité accrue.

Au-delà du détail de la composition microbienne pouvant exister et évoluer durant les premiers jours de vie, cette étude a souligné l'importance du développement du microbiote fécal dès la naissance et son implication pour la santé future du chiot.

Cependant, du fait de l'existence de nombreux facteurs pouvant influencer le développement du microbiote intestinal pendant la période néonatale ainsi que de la variabilité individuelle, l'intégration d'autres variables semble nécessaire afin d'identifier les éléments cruciaux dans la gestion des chiots et la mise en place optimale de leur microbiote. De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre l'origine de ces dérives du microbiote chez les nouveau-nés mais également afin de connaître les conséquences sur la santé à long-terme chez les chiots qui ont survécus.

BIBLIOGRAPHIE

ADLERBERTH, I. et WOLD, A. E., 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*. février 2009. Vol. 98, n° 2, pp. 229-238. DOI 10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x.

ALA, Ugo, DEL CARRO, Angela, GIACOBINI, Mario, COLITTI, Barbara, ROTA, Ada et BERTOLOTTI, Luigi, 2024. Microbiome studies in veterinary field: communities' diversity measurements pitfalls. *Acta IMEKO*. 28 mars 2024. Vol. 13, pp. 1-5. DOI 10.21014/actaimeko.v13i1.1743.

ALIPOUR, Mohammad Jaber, JALANKA, Jonna, PESSA-MORIKAWA, Tiina, KOKKONEN, Tuomo, SATOKARI, Reetta, HYNÖNEN, Ulla, IIVANAINEN, Antti et NIKU, Mikael, 2018. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports*. 11 juillet 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 10437. DOI 10.1038/s41598-018-28733-y.

ALSHAWAQFEH, M. K., WAJID, B., MINAMOTO, Y., MARKEL, M., LIDBURY, J. A., STEINER, J. M., SERPEDIN, E. et SUCHODOLSKI, J. S., 2017. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS microbiology ecology*. 1 novembre 2017. Vol. 93, n° 11. DOI 10.1093/femsec/fix136.

ALVES, Isabel, 2020. A model of puppy growth during the first three weeks. *Veterinary Medicine and Science*. novembre 2020. Vol. 6, n° 4, pp. 946-957. DOI 10.1002/vms3.322.

ARBOLEYA, Silvia, BINETTI, Ana, SALAZAR, Nuria, FERNÁNDEZ, Nuria, SOLÍS, Gonzalo, HERNÁNDEZ-BARRANCO, Ana, MARGOLLES, Abelardo, DE LOS REYES-GAVILÁN, Clara G. et GUEIMONDE, Miguel, 2012. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS microbiology ecology*. mars 2012. Vol. 79, n° 3, pp. 763-772. DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x.

BABA, E., HATA, H., FUKATA, T. et ARAKAWA, A., 1983. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *American Journal of Veterinary Research*. avril 1983. Vol. 44, n° 4, pp. 606-609.

BALOUEI, Fatemeh, STEFANON, Bruno, SGORLON, Sandy et SANDRI, Misa, 2023. Factors Affecting Gut Microbiota of Puppies from Birth to Weaning. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*. 6 février 2023. Vol. 13, n° 4, pp. 578. DOI 10.3390/ani13040578.

BELLER, Leen, DEBOUTTE, Ward, FALONY, Gwen, VIEIRA-SILVA, Sara, TITO, Raul Yhossef, VALLES-COLOMER, Mireia, RYMENANS, Leen, JANSEN, Daan, VAN ESPEN, Lore, PAPADAKI, Maria Ioanna, SHI, Chenyan, YINDA, Claude Kwe, ZELLER, Mark, FAUST, Karoline, VAN RANST, Marc, RAES, Jeroen et MATTHIJNSSENS, Jelle, 2021. Successional Stages in Infant Gut Microbiota Maturation. *mBio*. 21 décembre 2021. Vol. 12, n° 6, pp. e0185721. DOI 10.1128/mBio.01857-21.

BERMINGHAM, Emma N., MACLEAN, Paul, THOMAS, David G., CAVE, Nicholas J. et YOUNG, Wayne, 2017. Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs. *PeerJ*. 2017. Vol. 5, pp. e3019. DOI 10.7717/peerj.3019.

BOJANIĆ, K., MIDWINTER, A. C., MARSHALL, J. C., ROGERS, L. E., BIGGS, P. J. et ACKE, E., 2017. Isolation of *Campylobacter* spp. from Client-Owned Dogs and Cats, and Retail Raw Meat Pet Food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses and Public Health*. septembre 2017. Vol. 64, n° 6, pp. 438-449. DOI 10.1111/zph.12323.

BOKULICH, Nicholas A., DILLON, Matthew R., ZHANG, Yilong, RIDEOUT, Jai Ram, BOLYEN, Evan, LI, Huilin, ALBERT, Paul S. et CAPORASO, J. Gregory, 2018. q2-longitudinal: Longitudinal and Paired-Sample Analyses of Microbiome Data. *mSystems*. 2018. Vol. 3, n° 6, pp. e00219-18. DOI 10.1128/mSystems.00219-18.

BOLYEN, Evan, RIDEOUT, Jai Ram, DILLON, Matthew R., BOKULICH, Nicholas A., ABNET, Christian C., AL-GHALITH, Gabriel A., ALEXANDER, Harriet, ALM, Eric J., ARUMUGAM, Manimozhian, ASNICAR, Francesco, BAI, Yang, BISANZ, Jordan E., BITTINGER, Kyle, BREJNROD, Asker, BRISLAWN, Colin J., BROWN, C. Titus, CALLAHAN, Benjamin J., CARABALLO-RODRÍGUEZ, Andrés Mauricio, CHASE, John, COPE, Emily K., DA SILVA, Ricardo, DIENER, Christian, DORRESTEIN, Pieter C., DOUGLAS, Gavin M., DURALL, Daniel M., DUVALLET, Claire, EDWARDSON, Christian F., ERNST, Madeleine, ESTAKI, Mehrbod, FOUQUIER, Jennifer, GAUGLITZ, Julia M., GIBBONS, Sean M., GIBSON, Deanna L., GONZALEZ, Antonio, GORLICK, Kestrel, GUO, Jiarong, HILLMANN, Benjamin, HOLMES, Susan, HOLSTE, Hannes, HUTTENHOWER, Curtis, HUTTLEY, Gavin A., JANSSEN, Stefan, JARMUSCH, Alan K., JIANG, Lingjing, KAEHLER, Benjamin D., KANG, Kyo Bin, KEEFE, Christopher R., KEIM, Paul, KELLEY, Scott T., KNIGHTS, Dan, KOESTER, Irina, KOSCIOLEK, Tomasz, KREPS, Jorden, LANGILLE, Morgan G. I., LEE, Joslynn, LEY, Ruth, LIU, Yong-Xin, LOFTFIELD, Erikka, LOZUPONE, Catherine, MAHER, Massoud, MAROTZ, Clarisse, MARTIN, Bryan D., MCDONALD, Daniel, MCIVER, Lauren J., MELNIK, Alexey V., METCALF, Jessica L., MORGAN, Sydney C., MORTON, Jamie T., NAIMEY, Ahmad Turan, NAVAS-MOLINA, Jose A., NOTHIAS, Louis Felix, ORCHANIAN, Stephanie B., PEARSON, Talima, PEOPLES, Samuel L., PETRAS, Daniel, PREUSS, Mary Lai, PRUESSE, Elmar, RASMUSSEN, Lasse Buur, RIVERS, Adam, ROBESON, Michael S., ROSENTHAL, Patrick, SEGATA, Nicola, SHAFFER, Michael, SHIFFER, Arron, SINHA, Rashmi, SONG, Se Jin, SPEAR, John R., SWAFFORD, Austin D., THOMPSON, Luke R., TORRES, Pedro J., TRINH, Pauline, TRIPATHI, Anupriya, TURNBAUGH, Peter J., UL-HASAN, Sabah, VAN DER HOOFT, Justin J. J., VARGAS, Fernando, VÁZQUEZ-BAEZA, Yoshiki, VOGTMANN, Emily, VON HIPPEL, Max, WALTERS, William, WAN, Yunhu, WANG, Mingxun, WARREN, Jonathan, WEBER, Kyle C., WILLIAMSON, Charles H. D., WILLIS, Amy D., XU, Zhenjiang Zech, ZANEVELD, Jesse R., ZHANG, Yilong, ZHU, Qiyun, KNIGHT, Rob et CAPORASO, J. Gregory, 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. août 2019. Vol. 37, n° 8, pp. 852-857. DOI 10.1038/s41587-019-0209-9.

BOUCARD, Anne-Sophie, THOMAS, Myriam, LEBON, Wilfried, POLACK, Bruno, FLORENT, Isabelle, LANGELLA, Philippe et BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G., 2021. Age and *Giardia intestinalis* Infection Impact Canine Gut Microbiota. *Microorganisms*.

- septembre 2021. Vol. 9, n° 9, pp. 1862. DOI 10.3390/microorganisms9091862.
- BREVAUX, Julie, 2018. *Relation entre le poids de naissance, la croissance précoce, l'hétérogénéité du poids de naissance au sein de la portée et le risque de mortalité néonatale et pédiatrique* [en ligne]. other. [Consulté le 23 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://oatao.univ-toulouse.fr/21643/>
- BUDDINGTON, Randal K., 2003. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. mai 2003. Vol. 64, n° 5, pp. 646-651. DOI 10.2460/ajvr.2003.64.646.
- BURTON, Erin N, O'CONNOR, Erin, ERICSSON, Aaron C et FRANKLIN, Craig L, 2016. Evaluation of Fecal Microbiota Transfer as Treatment for Postweaning Diarrhea in Research-Colony Puppies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. septembre 2016. Vol. 55, n° 5, pp. 582-587.
- CALLAHAN, Benjamin J., MCMURDIE, Paul J., ROSEN, Michael J., HAN, Andrew W., JOHNSON, Amy Jo A. et HOLMES, Susan P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. juillet 2016. Vol. 13, n° 7, pp. 581-583. DOI 10.1038/nmeth.3869.
- CAPORASO, J. Gregory, LAUBER, Christian L., WALTERS, William A., BERGLYONS, 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 of the United States of America*. 15 mars 2011. Vol. 108 Suppl 1, n° Suppl 1, pp. 4516-4522. DOI 10.1073/pnas.1000080107.
- CHASTANT-MAILLARD, S., GUILLEMOT, C., FEUGIER, A., MARIANI, C., GRELLET, A. et MILA, H., 2017. Reproductive performance and pre-weaning mortality: Preliminary analysis of 27,221 purebred female dogs and 204,537 puppies in France. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2017. Vol. 52 Suppl 2, pp. 158-162. DOI 10.1111/rda.12845.
- CHUN, Ju Lan, JI, Sang Yun, LEE, Sung Dae, LEE, Yoo Kyung, KIM, Byeonghyeon et KIM, Ki Hyun, 2020. Difference of gut microbiota composition based on the body condition scores in dogs. *Journal of Animal Science and Technology*. mars 2020. Vol. 62, n° 2, pp. 239-246. DOI 10.5187/jast.2020.62.2.239.
- CILIEBORG, Malene S., BOYE, Mette, MØLBAK, Lars, THYMAN, Thomas et SANGILD, Per T., 2011. Preterm birth and necrotizing enterocolitis alter gut colonization in pigs. *Pediatric Research*. janvier 2011. Vol. 69, n° 1, pp. 10-16. DOI 10.1203/PDR.0b013e3181ff2a89.
- COELHO, Luis Pedro, KULTIMA, Jens Roat, COSTEA, Paul Igor, FOURNIER, Coralie, PAN, Yuanlong, CZARNECKI-MAULDEN, Gail, HAYWARD, Matthew Robert, FORSLUND, Sofia K., SCHMIDT, Thomas Sebastian Benedikt, DESCOMBES, Patrick, JACKSON, Janet R., LI, Qinghong et BORK, Peer, 2018. Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. *Microbiome*. 19 avril 2018. Vol. 6, n° 1, pp. 72. DOI 10.1186/s40168-018-0450-3.

COX, Laura M., YAMANISHI, Shingo, SOHN, Jiho, ALEKSEYENKO, Alexander V., LEUNG, Jacqueline M., CHO, Ilseung, KIM, Sungheon G., LI, Huilin, GAO, Zhan, MAHANA, Douglas, ZÁRATE RODRIGUEZ, Jorge G., ROGERS, Arlin B., ROBINE, Nicolas, LOKE, P'ng et BLASER, Martin J., 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*. 14 août 2014. Vol. 158, n° 4, pp. 705-721. DOI 10.1016/j.cell.2014.05.052.

DANIELS, Joshua et SPENCER, Erick, 2011. Chapter 15 - Bacterial Infections. In : PETERSON, Michael E. et KUTZLER, Michelle Anne (éd.), *Small Animal Pediatrics* [en ligne]. Saint Louis : W.B. Saunders. pp. 113-118. [Consulté le 23 avril 2024]. ISBN 978-1-4160-4889-3. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416048893000152>

DOMINGUEZ-BELLO, Maria G., DE JESUS-LABOY, Kassandra M., SHEN, Nan, COX, Laura M., AMIR, Amnon, GONZALEZ, Antonio, BOKULICH, Nicholas A., SONG, Se Jin, HOASHI, Marina, RIVERA-VINAS, Juana I., MENDEZ, Keimari, KNIGHT, Rob et CLEMENTE, Jose C., 2016. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature Medicine*. mars 2016. Vol. 22, n° 3, pp. 250-253. DOI 10.1038/nm.4039.

DORON, Lior, COPPENHAGEN-GLAZER, Shunit, IBRAHIM, Yara, EINI, Amir, NAOR, Ronit, ROSEN, Graciela et BACHRACH, Gilad, 2014a. Identification and characterization of fusolisins, the *Fusobacterium nucleatum* autotransporter serine protease. *PloS One*. 2014. Vol. 9, n° 10, pp. e111329. DOI 10.1371/journal.pone.0111329.

DORON, Lior, COPPENHAGEN-GLAZER, Shunit, IBRAHIM, Yara, EINI, Amir, NAOR, Ronit, ROSEN, Graciela et BACHRACH, Gilad, 2014b. Identification and Characterization of Fusolisins, the *Fusobacterium nucleatum* Autotransporter Serine Protease. *PLOS ONE*. 30 octobre 2014. Vol. 9, n° 10, pp. e111329. DOI 10.1371/journal.pone.0111329.

DRAGO, Lorenzo, TOSCANO, Marco, DE GRANDI, Roberta, GROSSI, Enzo, PADOVANI, Ezio M et PERONI, Diego G, 2017. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. *The ISME Journal*. avril 2017. Vol. 11, n° 4, pp. 875-884. DOI 10.1038/ismej.2016.183.

GARRIGUES, Quentin, APPER, Emmanuelle, CHASTANT, Sylvie et MILA, Hanna, 2022. Gut microbiota development in the growing dog: A dynamic process influenced by maternal, environmental and host factors. *Frontiers in Veterinary Science* [en ligne]. 2 septembre 2022. Vol. 9. [Consulté le 22 avril 2024]. DOI 10.3389/fvets.2022.964649. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.964649>

GARRIGUES, Quentin, APPER, Emmanuelle, RODILES, Ana, ROVERE, Nicoletta, CHASTANT, Sylvie et MILA, Hanna, 2023. Composition and evolution of the gut microbiota of growing puppies is impacted by their birth weight. *Scientific Reports*. 7 septembre 2023. Vol. 13, n° 1, pp. 14717. DOI 10.1038/s41598-023-41422-9.

GAUKROGER, Clare H., STEWART, Christopher J., EDWARDS, Sandra A., WALSHAW, John, ADAMS, Ian P. et KYRIAZAKIS, Ilias, 2020. Changes in Faecal Microbiota Profiles Associated With Performance and Birthweight of Piglets. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11, pp. 917. DOI 10.3389/fmicb.2020.00917.

GE, Yile, ZHU, Wei, CHEN, Lu, LI, Diyan, LI, Qingqing et JIE, Hang, 2021. The Maternal Milk Microbiome in Mammals of Different Types and Its Potential Role in the Neonatal Gut Microbiota Composition. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*. 23 novembre 2021. Vol. 11, n° 12, pp. 3349. DOI 10.3390/ani11123349.

GERMAN, A. J., DAY, M. J., RUAUX, C. G., STEINER, J. M., WILLIAMS, D. A. et HALL, E. J., 2003. Comparison of direct and indirect tests for small intestinal bacterial overgrowth and antibiotic-responsive diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003. Vol. 17, n° 1, pp. 33-43. DOI 10.1892/0891-6640(2003)017<0033:codait>2.3.co;2.

GETHINGS-BEHNCKE, Christian, COLEMAN, Helen G., JORDAO, Haydee W. T., LONGLEY, Daniel B., CRAWFORD, Nyree, MURRAY, Liam J. et KUNZMANN, Andrew T., 2020. Fusobacterium nucleatum in the Colorectum and Its Association with Cancer Risk and Survival: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. mars 2020. Vol. 29, n° 3, pp. 539-548. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-18-1295.

GILL, Marilyn Ann, 2001. Perinatal and late neonatal mortality in the dog. [en ligne]. 1 mars 2001. [Consulté le 25 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://ses.library.usyd.edu.au/handle/2123/4137>

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.

GUEVARRA, Robin B., LEE, Jun Hyung, LEE, Sun Hee, SEOK, Min-Jae, KIM, Doo Wan, KANG, Bit Na, JOHNSON, Timothy J., ISAACSON, Richard E. et KIM, Hyeun Bum, 2019. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 14 janvier 2019. Vol. 10, n° 1, pp. 1. DOI 10.1186/s40104-018-0308-3.

HANDL, Stefanie, DOWD, Scot E., GARCIA-MAZCORRO, Jose F., STEINER, Jörg M. et SUCHODOLSKI, Jan S., 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology*. mai 2011. Vol. 76, n° 2, pp. 301-310. DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x.

HENDERICKX, Jannie G. E., ZWITTINK, Romy D., RENES, Ingrid B., VAN LINGEN, Richard A., VAN ZOEREN-GROBBEN, Diny, JEBBINK, Liesbeth J. Groot, BOEREN, Sjef, VAN ELBURG, Ruurd M., KNOL, Jan et BELZER, Clara, 2021. Maturation of the preterm gastrointestinal tract can be defined by host and microbial markers for

digestion and barrier defense. *Scientific Reports*. 17 juin 2021. Vol. 11, n° 1, pp. 12808. DOI 10.1038/s41598-021-92222-y.

HONNEFFER, Julia, STEINER, Joerg, LIDBURY, Jonathan et SUCHODOLSKI, Jan, 2017. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*. 2 février 2017. Vol. 13. DOI 10.1007/s11306-017-1165-3.

INDREBØ, Astrid, TRANGERUD, Cathrine et MOE, Lars, 2007. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1 décembre 2007. Vol. 49. DOI 10.1186/1751-0147-49-S1-S2.

ISOLAURI, Erika, 2012. Development of healthy gut microbiota early in life. *Journal of Paediatrics and Child Health*. juin 2012. Vol. 48 Suppl 3, pp. 1-6. DOI 10.1111/j.1440-1754.2012.02489.x.

JAŠAREVIĆ, Eldin et BALE, Tracy L., 2019. Prenatal and postnatal contributions of the maternal microbiome on offspring programming. *Frontiers in Neuroendocrinology*. octobre 2019. Vol. 55, pp. 100797. DOI 10.1016/j.yfrne.2019.100797.

JIAN, Ching, CARPÉN, Noora, HELVE, Otto, DE VOS, Willem M., KORPELA, Katri et SALONEN, Anne, 2021. Early-life gut microbiota and its connection to metabolic health in children: Perspective on ecological drivers and need for quantitative approach. *EBioMedicine*. 10 juillet 2021. Vol. 69, pp. 103475. DOI 10.1016/j.ebiom.2021.103475.
KAJDIČ, Leonida, PLAVEC, Tanja, ZDOVC, Irena, KALIN, Anja et ZAKOŠEK PIPAN, Maja, 2021. Impact of Type of Parturition on Colostrum Microbiota Composition and Puppy Survival. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*. 25 juin 2021. Vol. 11, n° 7, pp. 1897. DOI 10.3390/ani11071897.

KATOH, Kazutaka, MISAWA, Kazuharu, KUMA, Kei-ichi et MIYATA, Takashi, 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*. 15 juillet 2002. Vol. 30, n° 14, pp. 3059-3066. DOI 10.1093/nar/gkf436.

KELSEN, Judith R. et WU, Gary D., 2012. The gut microbiota, environment and diseases of modern society. *Gut Microbes*. 2012. Vol. 3, n° 4, pp. 374-382. DOI 10.4161/gmic.21333.

KHAN, Nabeel, LEE, Soomin, WONG, Brandon et XU, Helen, 2021. Infant gut microbiome shows resilience against mode of delivery but is susceptible to feed type. *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology* [en ligne]. 6 septembre 2021. Vol. 26. [Consulté le 5 juillet 2024]. Disponible à l'adresse : <https://ojs.library.ubc.ca/index.php/UJEMI/article/view/195421>

KOSTIC, Aleksandar D., GEVERS, Dirk, SILJANDER, Heli, VATANEN, Tommi, HYÖTYLÄINEN, Tuulia, HÄMÄLÄINEN, Anu-Maaria, PEET, Aleksandr, TILLMANN, Vallo, PÖHÖ, Päivi, MATTILA, Ismo, LÄHDESMÄKI, Harri, FRANZOSA, Eric A., VAARALA, Outi, DE GOFFAU, Marcus, HARMSSEN, Hermie, ILONEN, Jorma, VIRTANEN, Suvi M., CLISH, Clary B., OREŠIČ, Matej, HUTTENHOWER, Curtis, KNIP, Mikael, DIABIMMUNE STUDY GROUP et XAVIER, Ramnik J., 2015. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1

diabetes. *Cell Host & Microbe*. 11 février 2015. Vol. 17, n° 2, pp. 260-273. DOI 10.1016/j.chom.2015.01.001.

LI, Qinghong, LAUBER, Christian L., CZARNECKI-MAULDEN, Gail, PAN, Yuanlong et HANNAH, Steven S., 2017. Effects of the Dietary Protein and Carbohydrate Ratio on Gut Microbiomes in Dogs of Different Body Conditions. *mBio*. 24 janvier 2017. Vol. 8, n° 1, pp. e01703-16. DOI 10.1128/mBio.01703-16.

LITVAK, Yael, BYNDLOSS, Mariana X. et BÄUMLER, Andreas J., 2018. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*. 30 novembre 2018. Vol. 362, n° 6418, pp. eaat9076. DOI 10.1126/science.aat9076.

MA, X., FAN, P. X., LI, L. S., QIAO, S. Y., ZHANG, G. L. et LI, D. F., 2012. Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions. *Journal of Animal Science*. décembre 2012. Vol. 90 Suppl 4, pp. 266-268. DOI 10.2527/jas.50965.

MASUOKA, Hiroaki, SHIMADA, Kouya, KIYOSUE-YASUDA, Tomoyo, KIYOSUE, Masaharu, OISHI, Yukie, KIMURA, Seiji, YAMADA, Akio et HIRAYAMA, Kazuhiro, 2017. Transition of the intestinal microbiota of dogs with age. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2017. Vol. 36, n° 1, pp. 27-31. DOI 10.12938/bmfh.BMFH-2016-021.

MATAMOROS, Sebastien, GRAS-LEGUEN, Christele, LE VACON, Françoise, POTEL, Gilles et DE LA COCHETIERE, Marie-France, 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*. avril 2013. Vol. 21, n° 4, pp. 167-173. DOI 10.1016/j.tim.2012.12.001.

MELONI, Tea, MARTINO, Piera A., GRIECO, Valeria, PISU, Maria C., BANCO, Barbara, ROTA, Alessandro et VERONESI, Maria C., 2014. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. *Veterinaria Italiana*. 29 décembre 2014. Vol. 50, n° 4, pp. 293-299. DOI 10.12834/VetIt.45.2244.2.

MILA, H., GRELLET, A., FEUGIER, A. et CHASTANT-MAILLARD, S., 2015. Differential impact of birth weight and early growth on neonatal mortality in puppies. *Journal of Animal Science*. septembre 2015. Vol. 93, n° 9, pp. 4436-4442. DOI 10.2527/jas.2015-8971.

MILA, Hanna, 2015. *Neonatal period in the dog: Immunological and nutritional determinants for survival* [en ligne]. phd. [Consulté le 25 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <https://oatao.univ-toulouse.fr/15972/>

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.

MOFFA, Simona, MEZZA, Teresa, CEFALO, Chiara M. A., CINTI, Francesca, IMPRONTA, Flavia, SORICE, Gian Pio, SANTORO, Antonio, DI GIUSEPPE, Gianfranco, PONTECORVI, Alfredo et GIACCARI, Andrea, 2019. The Interplay between Immune System and Microbiota in Diabetes. *Mediators of Inflammation*. 2019.

Vol. 2019, pp. 9367404. DOI 10.1155/2019/9367404.

MONGKOLSOMLIT, Sirima, RAWDAREE, Petch, KOMOLTRI, Chulalux, TAWICHASRI, Chamaiporn et PATUMANOND, Jayanton, 2012. The development and validation of a risk score for predicting microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes Mellitus*. 2012. Vol. 02, n° 02, pp. 227-233. DOI 10.4236/jdm.2012.22036.

MOON, Christina D., YOUNG, Wayne, MACLEAN, Paul H., COOKSON, Adrian L. et BIRMINGHAM, Emma N., 2018. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *MicrobiologyOpen*. 2018. Vol. 7, n° 5, pp. e00677. DOI 10.1002/mbo3.677.

MORTENSEN, Martin Steen, RASMUSSEN, Morten Arendt, STOKHOLM, Jakob, BREJNROD, Asker Daniel, BALLE, Christina, THORSEN, Jonathan, KROGFELT, Karen Angeliki, BISGAARD, Hans et SØRENSEN, Søren Johannes, 2021. Modeling transfer of vaginal microbiota from mother to infant in early life. *eLife*. 15 janvier 2021. Vol. 10, pp. e57051. DOI 10.7554/eLife.57051.

MU, Chunlong, BIAN, Gaorui, SU, Yong et ZHU, Weiyun, 2019. Differential Effects of Breed and Nursing on Early-Life Colonic Microbiota and Immune Status as Revealed in a Cross-Fostering Piglet Model. *Applied and Environmental Microbiology*. 18 avril 2019. Vol. 85, n° 9, pp. e02510-18. DOI 10.1128/AEM.02510-18.

MUGNIER, Amélie, MILA, Hanna, GUIRAUD, Florine, BRÉVAUX, Julie, LECARPENTIER, Manon, MARTINEZ, Clara, MARIANI, Claire, ADIB-LESAUX, Achraf, CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, SAEGERMAN, Claude et GRELLET, Aurélien, 2019. Birth weight as a risk factor for neonatal mortality: Breed-specific approach to identify at-risk puppies. *Preventive Veterinary Medicine*. 1 novembre 2019. Vol. 171, pp. 104746. DOI 10.1016/j.prevetmed.2019.104746.

MÜNNICH, A. et KÜCHENMEISTER, U., 2014. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. juin 2014. Vol. 49 Suppl 2, pp. 64-74. DOI 10.1111/rda.12329.

MÜNNICH, A. et LÜBKE-BECKER, A., 2004. Escherichia coli infections in newborn puppies--clinical and epidemiological investigations. *Theriogenology*. août 2004. Vol. 62, n° 3-4, pp. 562-575. DOI 10.1016/j.theriogenology.2003.11.012.

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.

NIELEN, A. L., VAN DER GAAG, I., KNOL, B. W. et SCHUKKEN, Y. H., 1998. Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. *The Veterinary Record*. 30 mai 1998. Vol. 142, n° 22, pp. 602-606. DOI 10.1136/vr.142.22.602.

NISHINO, Kyohei, NISHIDA, Atsushi, INOUE, Ryo, KAWADA, Yuki, OHNO, Masashi, SAKAI, Shigeki, INATOMI, Osamu, BAMBÁ, Shigeki, SUGIMOTO, Mitsushige, KAWAHARA, Masahiro, NAITO, Yuji et ANDOH, Akira, 2018. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*. janvier 2018. Vol. 53, n° 1, pp. 95-106. DOI 10.1007/s00535-017-1384-4.

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.

NOWLAND, T. L., KIRKWOOD, R. N. et PLUSKE, J. R., 2022. Review: Can early-life establishment of the piglet intestinal microbiota influence production outcomes? *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*. juin 2022. Vol. 16 Suppl 2, pp. 100368. DOI 10.1016/j.animal.2021.100368.

O'CALLAGHAN, Amy et VAN SINDEREN, Douwe, 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7, pp. 925. DOI 10.3389/fmicb.2016.00925.

OLIPHANT, Kaitlyn, ALI, Mehneez, D'SOUZA, Mark, HUGHES, Patrick D., SULAKHE, Dinanath, WANG, Annie Z., XIE, Bingqing, YEASIN, Rummanu, MSALL, Michael E., ANDREWS, Bree et CLAUD, Erika C., 2021. Bacteroidota and Lachnospiraceae integration into the gut microbiome at key time points in early life are linked to infant neurodevelopment. *Gut Microbes*. 2021. Vol. 13, n° 1, pp. 1997560. DOI 10.1080/19490976.2021.1997560.

OLSON, Jacob K., RAGER, Terrence M., NAVARRO, Jason B., MASHBURN-WARREN, Lauren, GOODMAN, Steven D. et BESNER, Gail E., 2016. Harvesting the benefits of biofilms: A novel probiotic delivery system for the prevention of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*. juin 2016. Vol. 51, n° 6, pp. 936-941. DOI 10.1016/j.jpedsurg.2016.02.062.

PAMMI, Mohan, COPE, Julia, TARR, Phillip I., WARNER, Barbara B., MORROW, Ardythe L., MAI, Volker, GREGORY, Katherine E., KROLL, J. Simon, MCMURTRY, Valerie, FERRIS, Michael J., ENGSTRAND, Lars, LILJA, Helene Engstrand, HOLLISTER, Emily B., VERSALOVIC, James et NEU, Josef, 2017. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*. 9 mars 2017. Vol. 5, n° 1, pp. 31. DOI 10.1186/s40168-017-0248-8.

PAVLIDIS, P., POWELL, N., VINCENT, R. P., EHRlich, D., BJARNASON, I. et HAYEE, B., 2015. Systematic review: bile acids and intestinal inflammation-luminal aggressors or regulators of mucosal defence? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. octobre 2015. Vol. 42, n° 7, pp. 802-817. DOI 10.1111/apt.13333.

PEREIRA, Ana Margarida, PINNA, Carlo, BIAGI, Giacomo, STEFANELLI, Claudio,

MAIA, Margarida R. G., MATOS, Elisabete, SEGUNDO, Marcela A., FONSECA, António J. M. et CABRITA, Ana Rita J., 2020. Supplemental selenium source on gut health: insights on fecal microbiome and fermentation products of growing puppies. *FEMS microbiology ecology*. 21 octobre 2020. Vol. 96, n° 11, pp. f1aa212. DOI 10.1093/femsec/f1aa212.

PEREIRA, André, TEIXEIRA, Joana, SOUSA, Sofia, PARREIRA, Ricardo, CAMPINO, Lenea, MEIRELES, José et MAIA, Carla, 2021. Giardia duodenalis infection in dogs from the metropolitan area of Lisbon, Portugal: prevalence, genotyping and associated risk factors. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*. juin 2021. Vol. 45, n° 2, pp. 372-379. DOI 10.1007/s12639-020-01307-4.

PEREIRA, Keylla Helena Nobre Pacifico, FUCHS, Kárita da Mata, CORRÊA, Jaqueline Valença, CHIACCHIO, Simone Biagio et LOURENÇO, Maria Lucia Gomes, 2022. Neonatology: Topics on Puppies and Kittens Neonatal Management to Improve Neonatal Outcome. *Animals: an open access journal from MDPI*. 5 décembre 2022. Vol. 12, n° 23, pp. 3426. DOI 10.3390/ani12233426.

PEREIRA, Wellison A., FRANCO, Sara M., REIS, Iara L., MENDONÇA, Carlos M. N., PIAZENTIN, Anna C. M., AZEVEDO, Pamela O. S., TSE, Marcos L. P., DE MARTINIS, Elaine C. P., GIERUS, Martin et OLIVEIRA, Ricardo P. S., 2022. Beneficial effects of probiotics on the pig production cycle: An overview of clinical impacts and performance. *Veterinary Microbiology*. 1 juin 2022. Vol. 269, pp. 109431. DOI 10.1016/j.vetmic.2022.109431.

PRICE, Morgan N., DEHAL, Paramvir S. et ARKIN, Adam P., 2010. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*. 10 mars 2010. Vol. 5, n° 3, pp. e9490. DOI 10.1371/journal.pone.0009490.

REYES-SOTELO, Brenda, MOTA-ROJAS, Daniel, MARTINEZ-BURNES, Julio, OLMOS-HERNANDEZ, Adriana, HERNÁNDEZ AVALOS, Ismael, JOSÉ PÉREZ, Nancy, CASAS ALVARADO, Alejandro, GÓMEZ-PRADO, Jocelyn et MORA-MEDINA, Patricia, 2021. Thermal homeostasis in the newborn puppy: Behavioral and physiological responses. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*. 1 janvier 2021. Vol. 9, pp. 1-25. DOI 10.31893/jabb.21012.

RIVERA-CHÁVEZ, Fabian, ZHANG, Lillian F., FABER, Franziska, LOPEZ, Christopher A., BYNDLOSS, Mariana X., OLSAN, Erin E., XU, Gege, VELAZQUEZ, Eric M., LEBRILLA, Carlito B., WINTER, Sebastian E. et BÄUMLER, Andreas J., 2016. Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host & Microbe*. 13 avril 2016. Vol. 19, n° 4, pp. 443-454. DOI 10.1016/j.chom.2016.03.004.

SAIJONMAA-KOULUMIES, Leena E. et LLOYD, David H., 2002. Colonization of neonatal puppies by Staphylococcus intermedius. *Veterinary Dermatology*. juin 2002. Vol. 13, n° 3, pp. 123-130. DOI 10.1046/j.1365-3164.2002.00290.x.

SALADRIGAS-GARCÍA, Mireia, DURÁN, Mario, D'ANGELO, Matilde, COMA, Jaume, PÉREZ, José Francisco et MARTÍN-ORÚE, Susana María, 2022. An insight into the commercial piglet's microbial gut colonization: from birth towards weaning. *Animal Microbiome*. 26 décembre 2022. Vol. 4, n° 1, pp. 68. DOI 10.1186/s42523-022-00221-

9.

SANIDAD, Katherine Z. et ZENG, Melody Y., 2020. Neonatal gut microbiome and immunity. *Current Opinion in Microbiology*. août 2020. Vol. 56, pp. 30-37. DOI 10.1016/j.mib.2020.05.011.

SATO, Masahiro, KAJIKAWA, Kanta, KUMON, Tomoya, WATANABE, Daisuke, TAKASE, Ryuichi et HASHIMOTO, Wataru, 2020. *Mutually Beneficial Symbiosis Between Human and Gut-Dominant Bacteroides Species Through Bacterial Assimilation of Host Mucosubstances* [en ligne]. 22 août 2020. bioRxiv. [Consulté le 29 juillet 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.21.262261v1>

SATURIO, Silvia, NOGACKA, Alicja M., ALVARADO-JASSO, Guadalupe M., SALAZAR, Nuria, DE LOS REYES-GAVILÁN, Clara G., GUEIMONDE, Miguel et ARBOLEYA, Silvia, 2021. Role of Bifidobacteria on Infant Health. *Microorganisms*. 23 novembre 2021. Vol. 9, n° 12, pp. 2415. DOI 10.3390/microorganisms9122415.

SCHÄFER-SOMI, S., SPERGSE, J., BREITENFELLNER, J. et AURICH, J. E., 2003. Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies--a retrospective study. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. septembre 2003. Vol. 50, n° 7, pp. 343-346. DOI 10.1046/j.1439-0450.2003.00672.x.

SIMPSON, J. M., MARTINEAU, B., JONES, W. E., BALLAM, J. M. et MACKIE, R. I., 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial Ecology*. août 2002. Vol. 44, n° 2, pp. 186-197. DOI 10.1007/s00248-002-0001-z.

SUCHODOLSKI, Jan S., 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. mars 2011. Vol. 41, n° 2, pp. 261-272. DOI 10.1016/j.cvsm.2010.12.006.

TAL, Smadar, TIKHONOV, Evgenii, AROCH, Itamar, HEFETZ, Lior, TURJEMAN, Sondra, KOREN, Omry et KUZU, Sharon, 2021. Developmental intestinal microbiome alterations in canine fading puppy syndrome: a prospective observational study. *npj Biofilms and Microbiomes*. 23 juin 2021. Vol. 7, n° 1, pp. 1-10. DOI 10.1038/s41522-021-00222-7.

TIBBS, Taylor N., LOPEZ, Lacey R. et ARTHUR, Janelle C., 2019. The influence of the microbiota on immune development, chronic inflammation, and cancer in the context of aging. *Microbial Cell (Graz, Austria)*. 13 mai 2019. Vol. 6, n° 8, pp. 324-334. DOI 10.15698/mic2019.08.685.

TØNNESEN, R., BORGE, K. Sverdrup, NØDTVEDT, A. et INDREBØ, A., 2012. Canine perinatal mortality: a cohort study of 224 breeds. *Theriogenology*. juin 2012. Vol. 77, n° 9, pp. 1788-1801. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.12.023.

UNGER, Sharon, STINTZI, Alain, SHAH, Prakeshkumar, MACK, David et O'CONNOR, Deborah L., 2015. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatric*

Research. janvier 2015. Vol. 77, n° 1, pp. 205-213. DOI 10.1038/pr.2014.162.

VELA, Ana I., FALSEN, Enevold, SIMARRO, Isabel, ROLLAN, Eduardo, COLLINS, Matthew D., DOMÍNGUEZ, Lucas et FERNANDEZ-GARAYZABAL, Jose F., 2006. Neonatal mortality in puppies due to bacteremia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *Journal of Clinical Microbiology*. février 2006. Vol. 44, n° 2, pp. 666-668. DOI 10.1128/JCM.44.2.666-668.2006.

VERONESI, M. C., PANZANI, S., FAUSTINI, M. et ROTA, A., 2009. An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*. août 2009. Vol. 72, n° 3, pp. 401-407. DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.03.010.

VILSON, Åsa, RAMADAN, Ziad, LI, Qinghong, HEDHAMMAR, Åke, REYNOLDS, Arleigh, SPEARS, Julie, LABUDA, Jeff, PELKER, Robyn, BJÖRKSTÉN, Bengt, DICKSVED, Johan et HANSSON-HAMLIN, Helene, 2018. Disentangling factors that shape the gut microbiota in German Shepherd dogs. *PloS One*. 2018. Vol. 13, n° 3, pp. e0193507. DOI 10.1371/journal.pone.0193507.

WIPLER, Jan, ČERMÁKOVÁ, Zuzana, HANZÁLEK, Tomáš, HORÁKOVÁ, Hana et ŽEMLIČKOVÁ, Helena, 2017. [Sharing bacterial microbiota between owners and their pets (dogs, cats)]. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lekarství*. juin 2017. Vol. 23, n° 2, pp. 48-57.

XENOULIS, Panagiotis G., PALCULICT, Blake, ALLENSPACH, Karin, STEINER, Jörg M., VAN HOUSE, Angela M. et SUCHODOLSKI, Jan S., 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS microbiology ecology*. décembre 2008. Vol. 66, n° 3, pp. 579-589. DOI 10.1111/j.1574-6941.2008.00556.x.

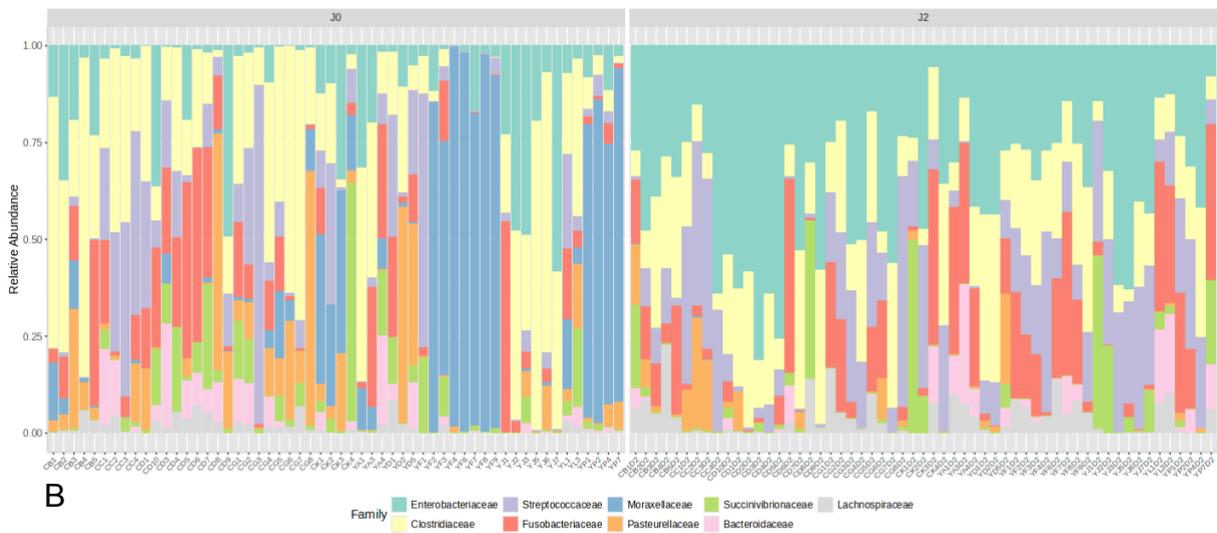
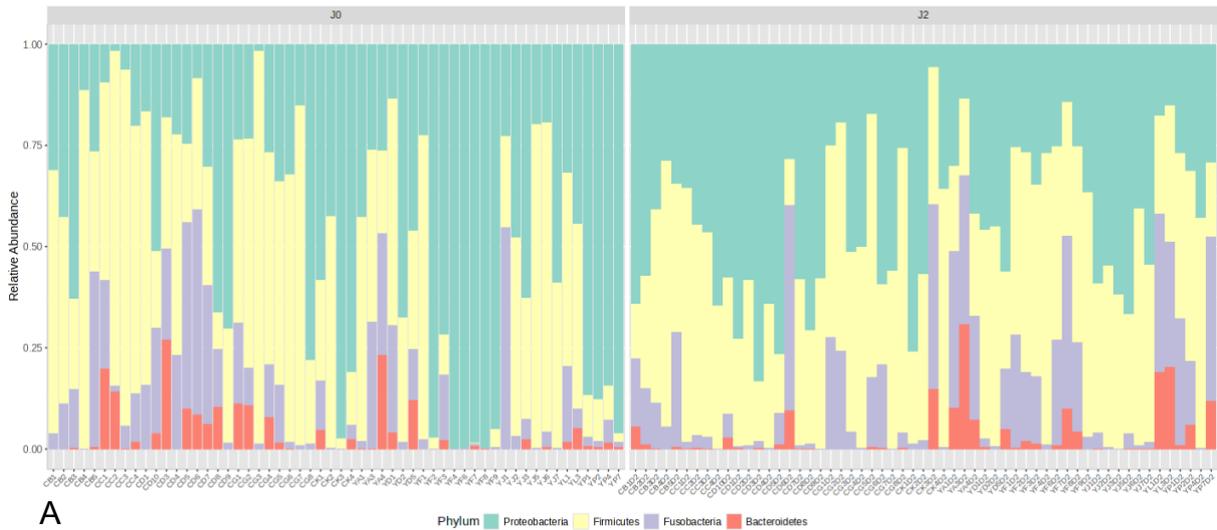
YATSUNENKO, Tanya, REY, Federico E., MANARY, Mark J., TREHAN, Indi, DOMINGUEZ-BELLO, Maria Gloria, CONTRERAS, Monica, MAGRIS, Magda, HIDALGO, Glida, BALDASSANO, Robert N., ANOKHIN, Andrey P., HEATH, Andrew C., WARNER, Barbara, REEDER, Jens, KUCZYNSKI, Justin, CAPORASO, J. Gregory, LOZUPONE, Catherine A., LAUBER, Christian, CLEMENTE, Jose Carlos, KNIGHTS, Dan, KNIGHT, Rob et GORDON, Jeffrey I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 9 mai 2012. Vol. 486, n° 7402, pp. 222-227. DOI 10.1038/nature11053.

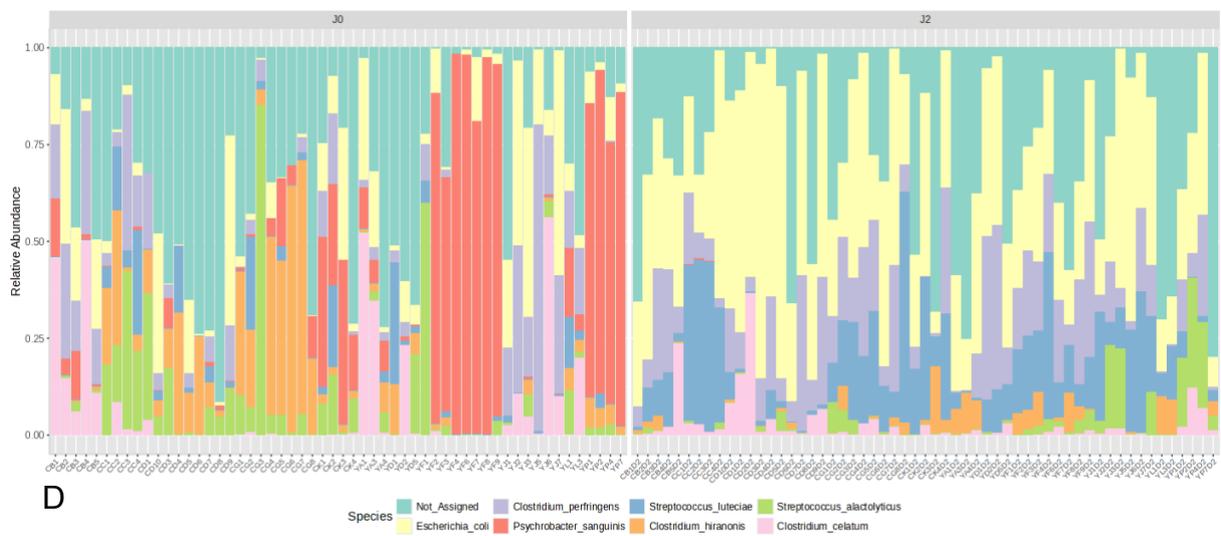
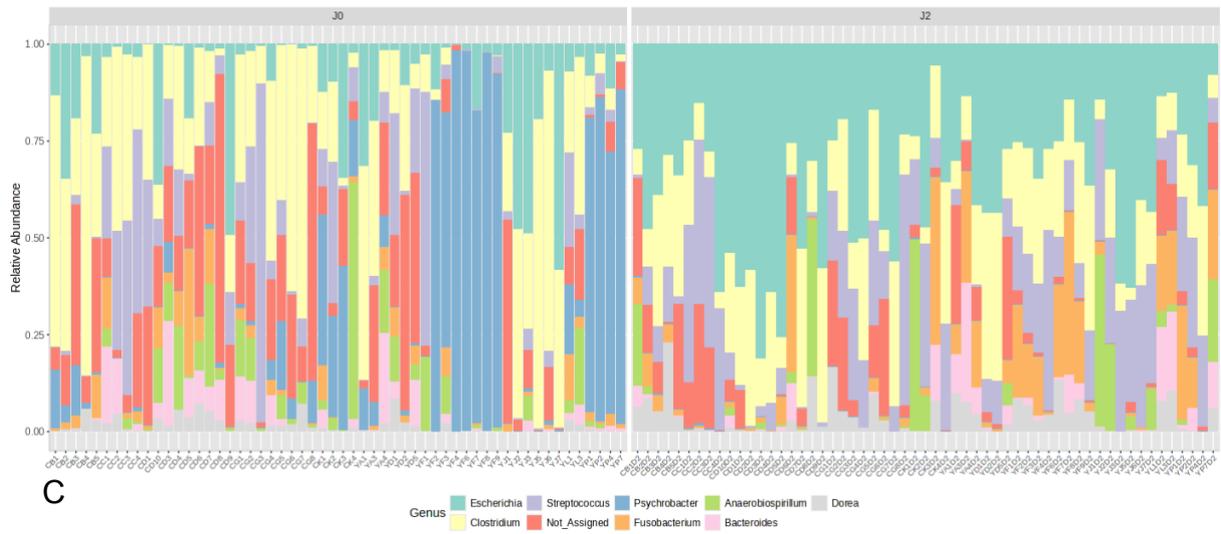
YOUNG, R. S., YAGEL, S. K. et TOWFIGHI, J., 1983. Systemic and neuropathologic effects of *E. coli* endotoxin in neonatal dogs. *Pediatric Research*. mai 1983. Vol. 17, n° 5, pp. 349-353. DOI 10.1203/00006450-198305000-00008.

ZAKOŠEK PIPAN, Maja, KAJDIČ, Leonida, KALIN, Anja, PLAVEC, Tanja et ZDOVC, Irena, 2020. Do newborn puppies have their own microbiota at birth? Influence of type of birth on newborn puppy microbiota. *Theriogenology*. août 2020. Vol. 152, pp. 18-28. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.04.014.

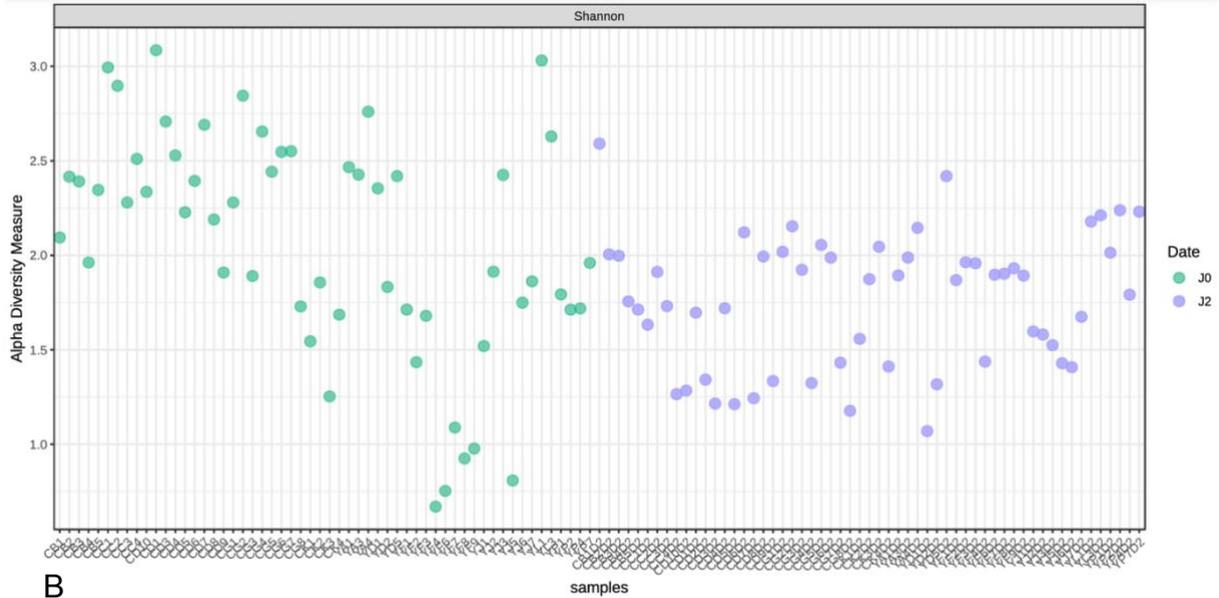
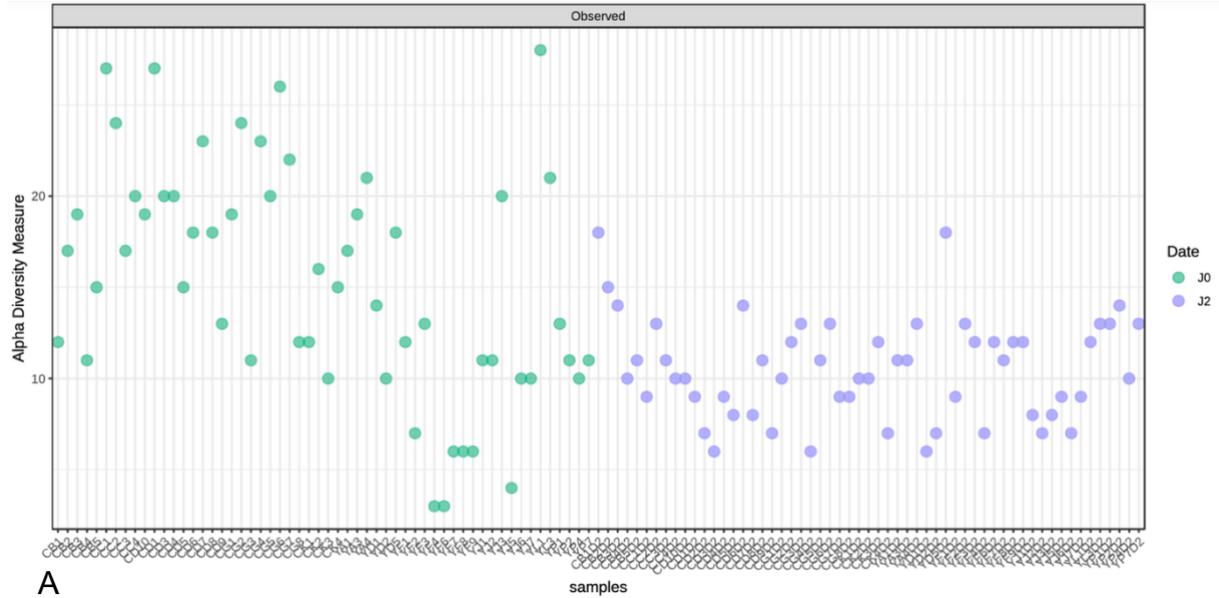
ANNEXES

Annexe 1. Graphiques d'abondances relatives des taxons bactériens, pour chaque chiot vivant jusqu'à deux mois d'âge (n=57) à la naissance (J0, à gauche) et au deuxième jour de vie (J2, à droite), à l'échelle (A) du phylum, (B) de la famille, (C) du genre, (D) de l'espèce.

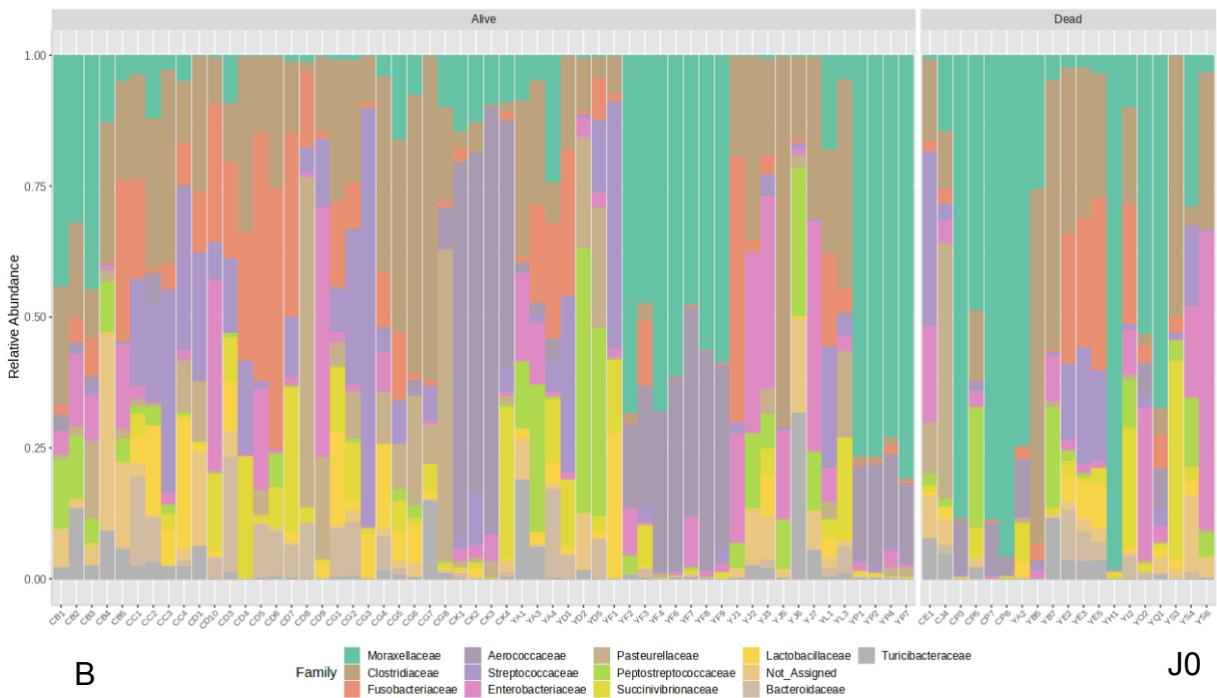
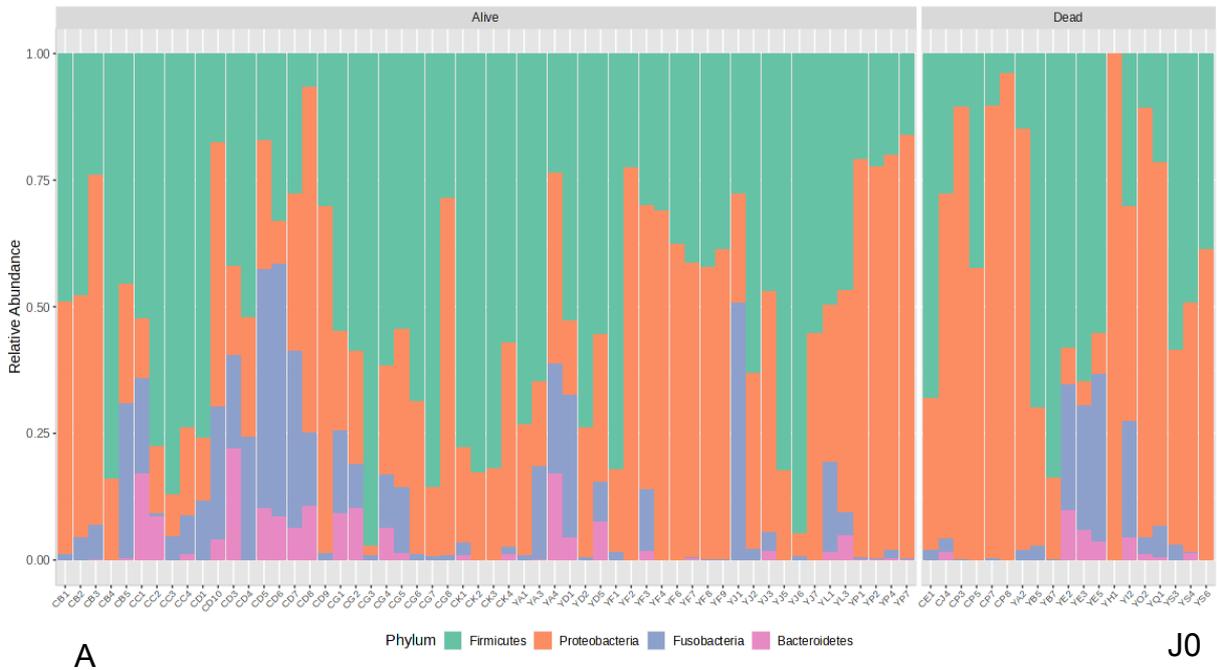


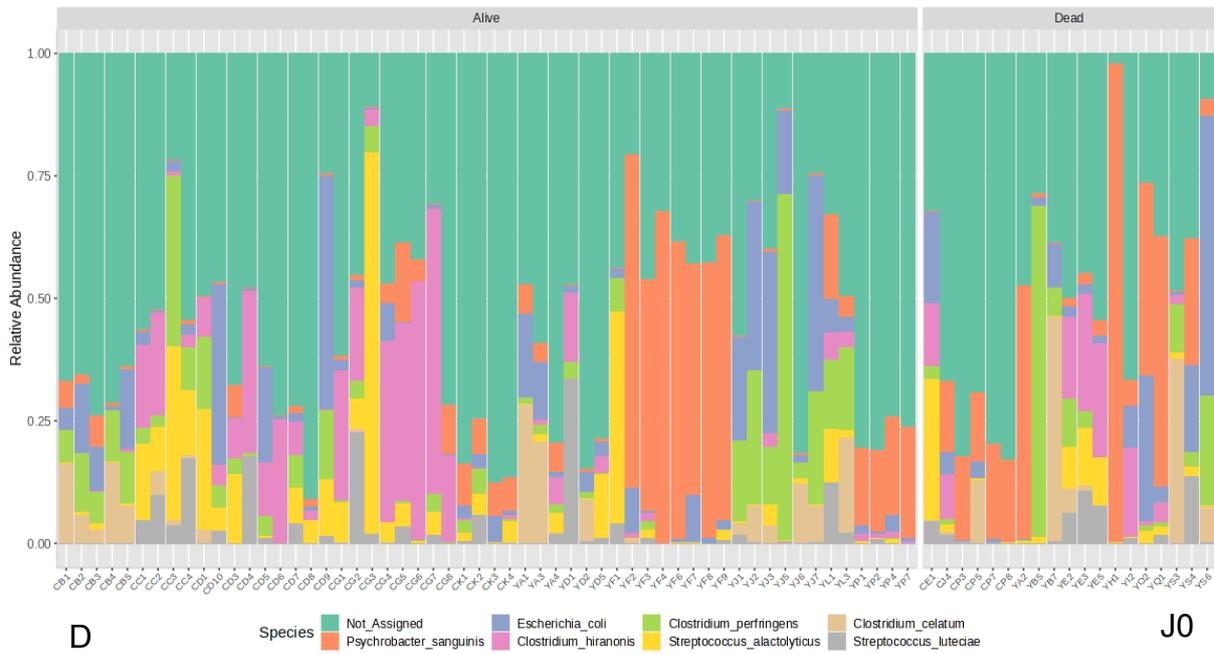


Annexe 1. Mesures d'alpha diversité individuelles du microbiote fécal des chiots vivants jusqu'à deux mois d'âge, à la naissance (J0, en vert) et au deuxième jour de vie (J2, en violet) en utilisant (A) le nombre d'ASV observés (richesse bactérienne) et (B) l'indice de Shannon (richesse bactérienne et uniformité).

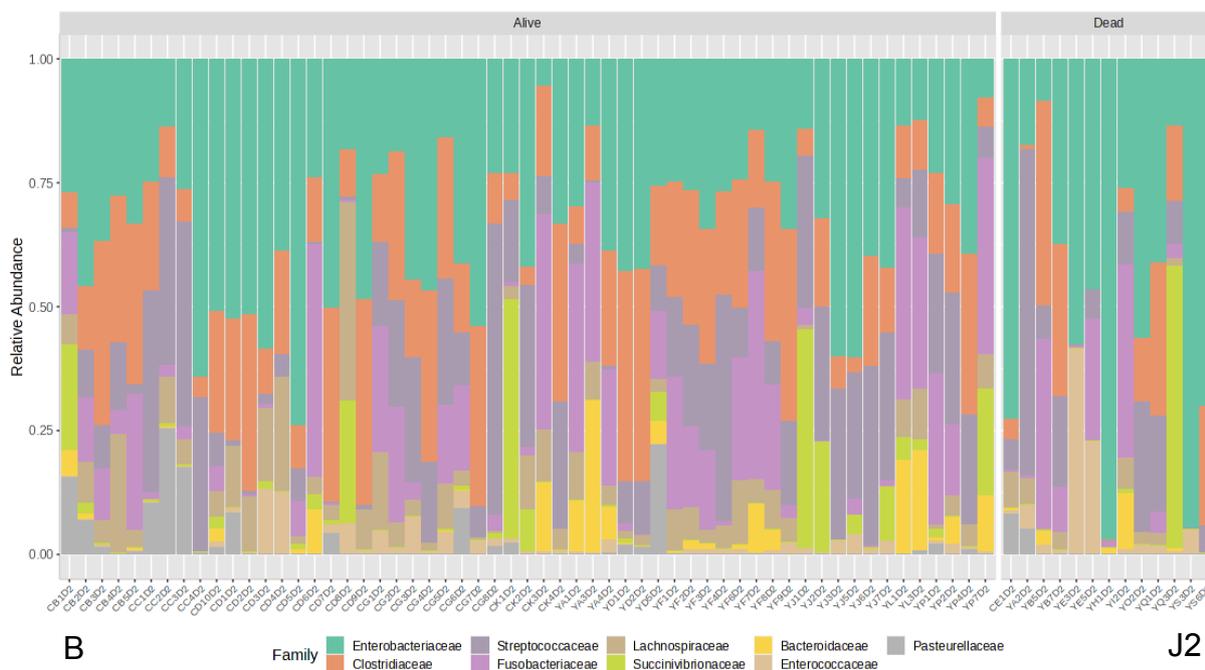
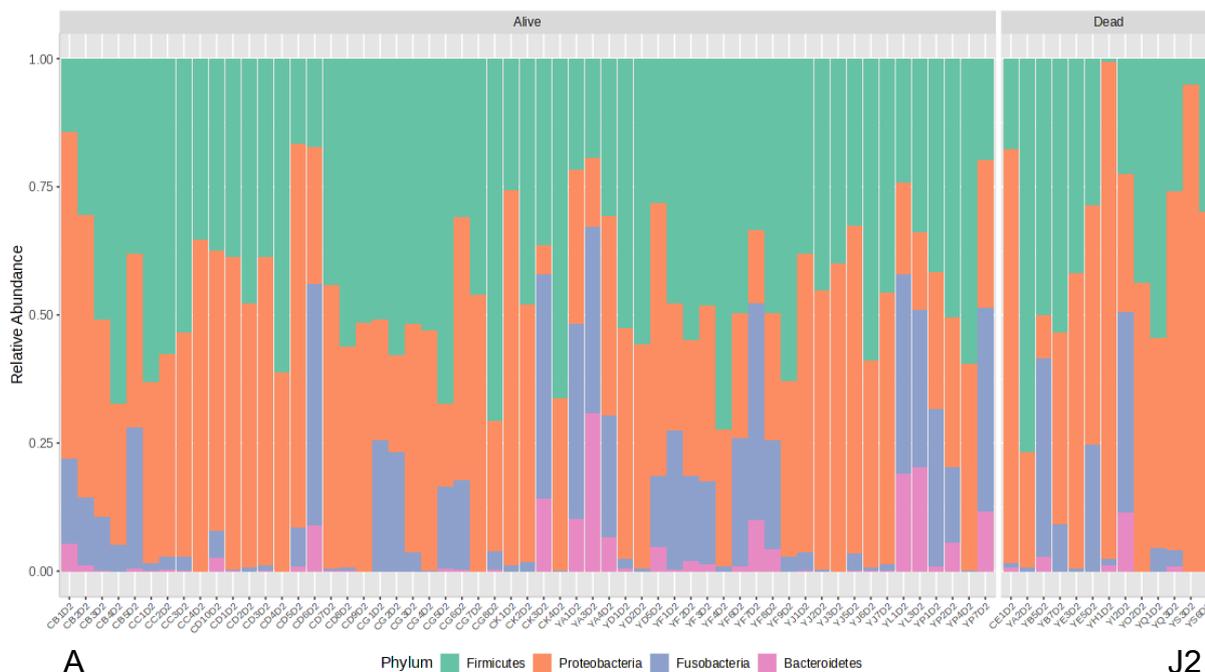


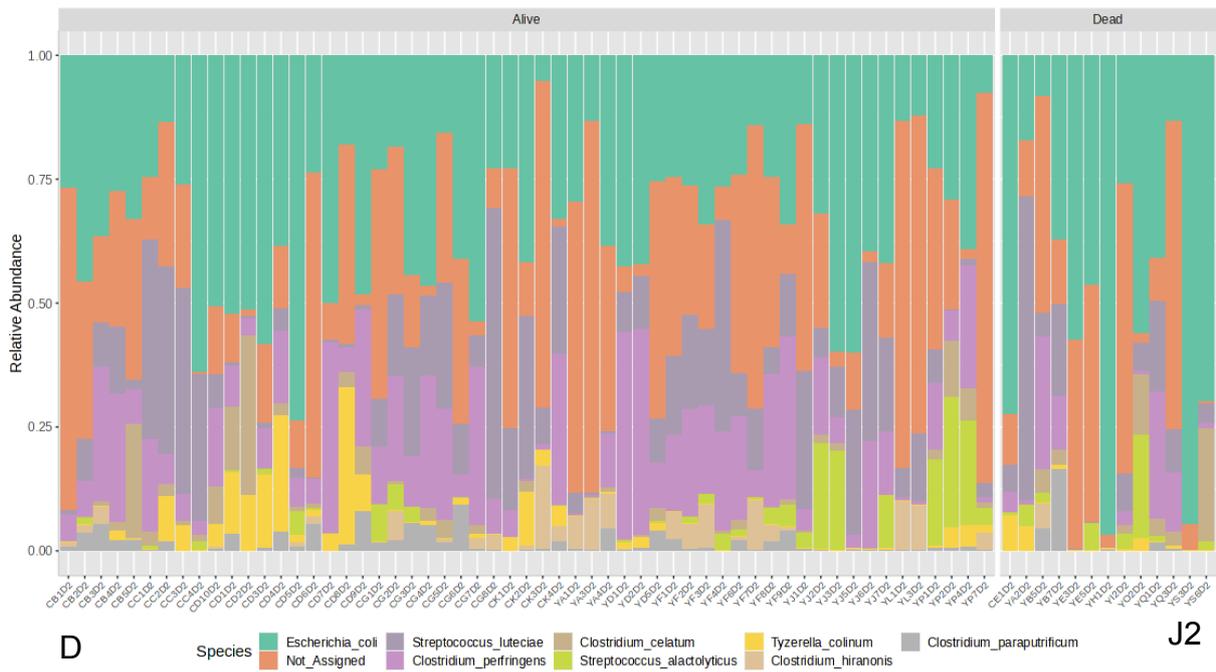
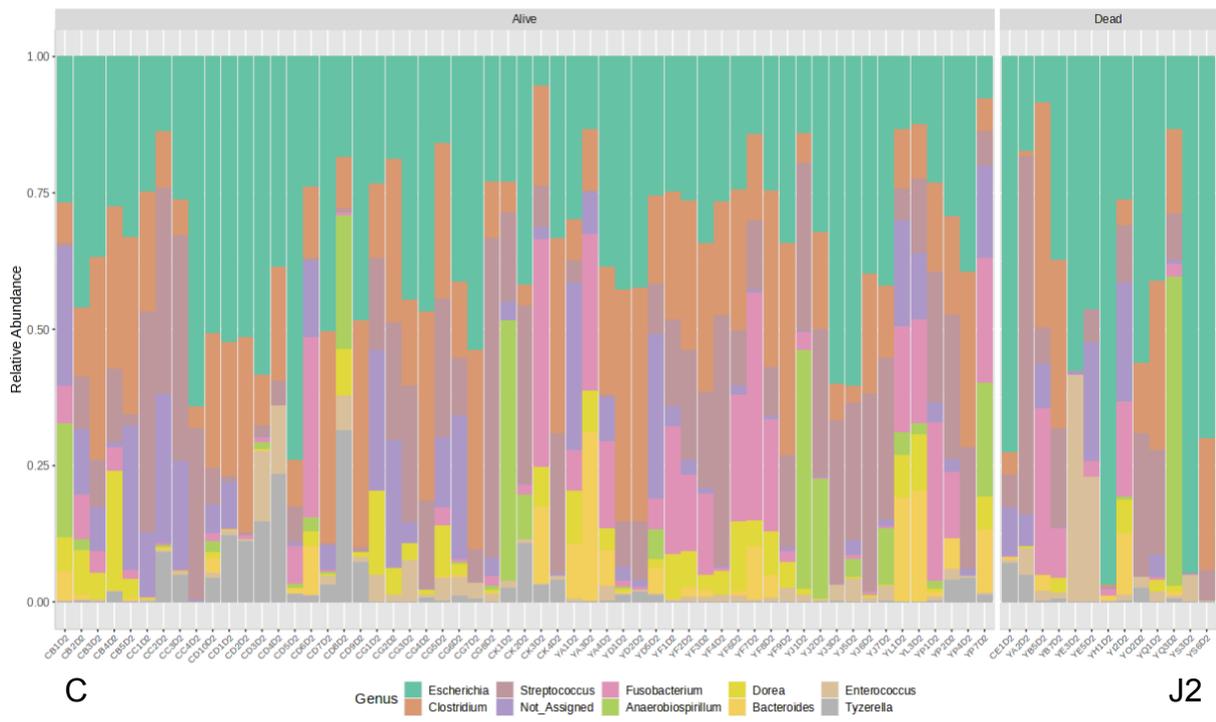
Annexe 2. Graphiques d'abondances relatives des taxons bactériens, pour chaque chiot appartenant aux populations de chiots vivants (« Alive », n=57) et morts (« Dead », n=20), à l'échelle (A) du phylum, (B) de la famille, (C) du genre, (D) de l'espèce, à la naissance (J0).



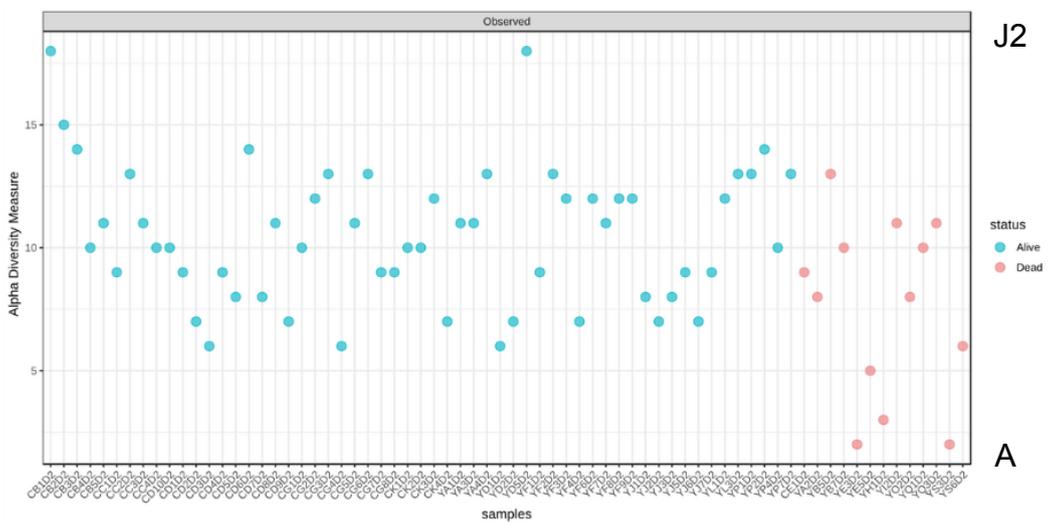
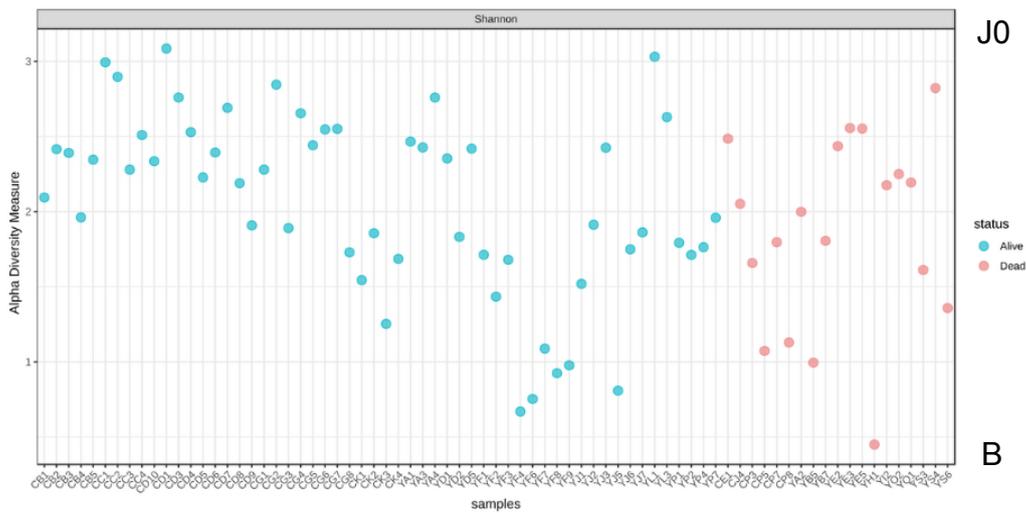
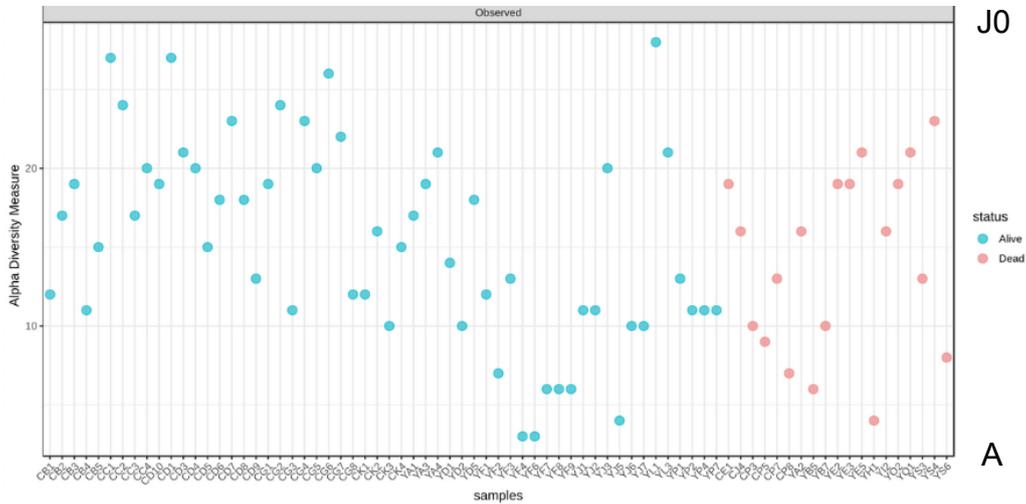


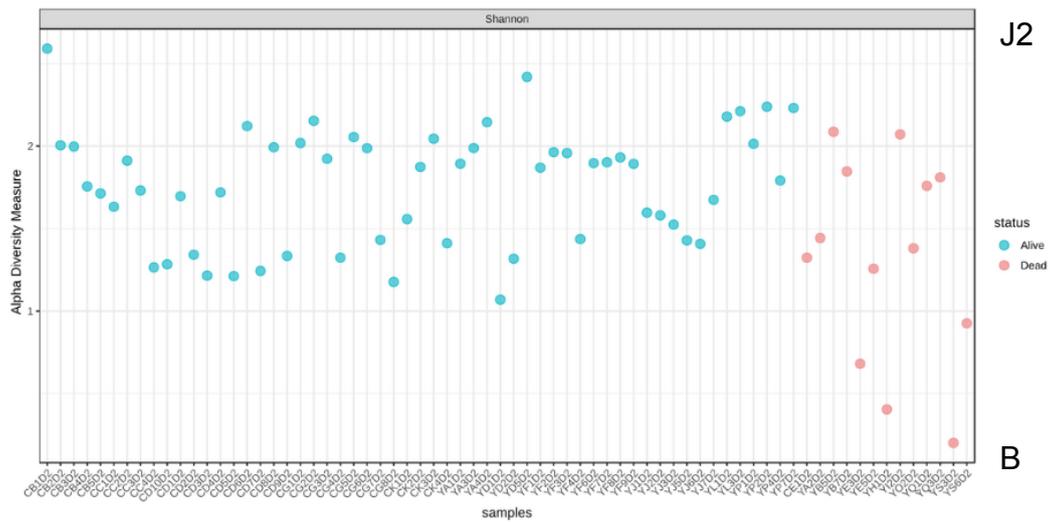
Annexe 3. Graphiques d'abondances relatives des taxons bactériens, pour chaque chiot appartenant aux populations de chiots vivants (« Alive », n=57) et morts (« Dead », n=20), à l'échelle (A) du phylum, (B) de la famille, (C) du genre, (D) de l'espèce, au deuxième jour (J2).



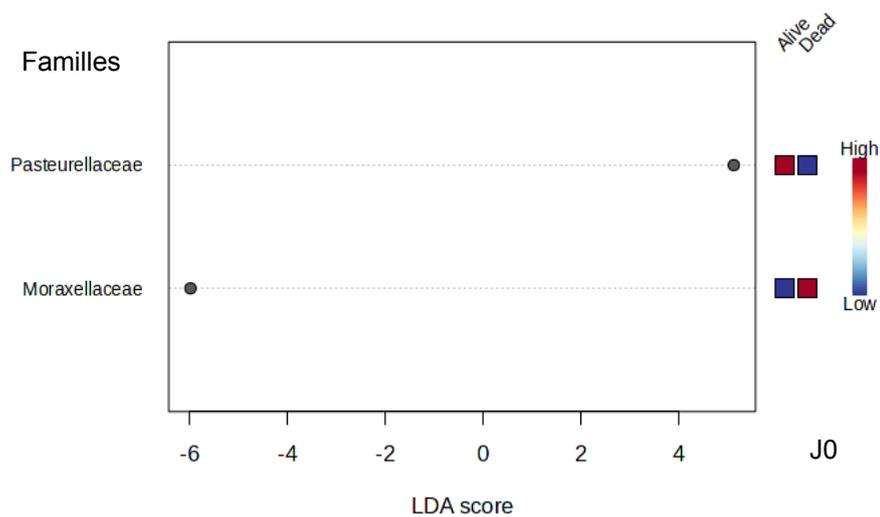


Annexe 4. Mesures d'alpha diversité individuelles du microbiote fécal des chiots vivants (« Alive » en bleu) et décédés (« Dead » en rouge), à la naissance (J0) et au deuxième jour de vie (J2) en utilisant (A) le nombre d'ASV observés (richesse bactérienne) et (B) l'indice de Shannon (richesse bactérienne et uniformité).

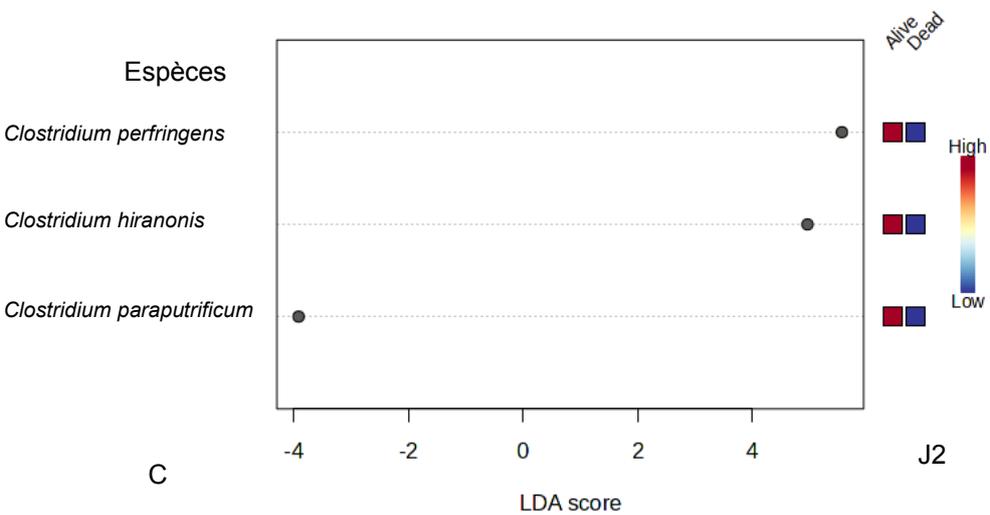
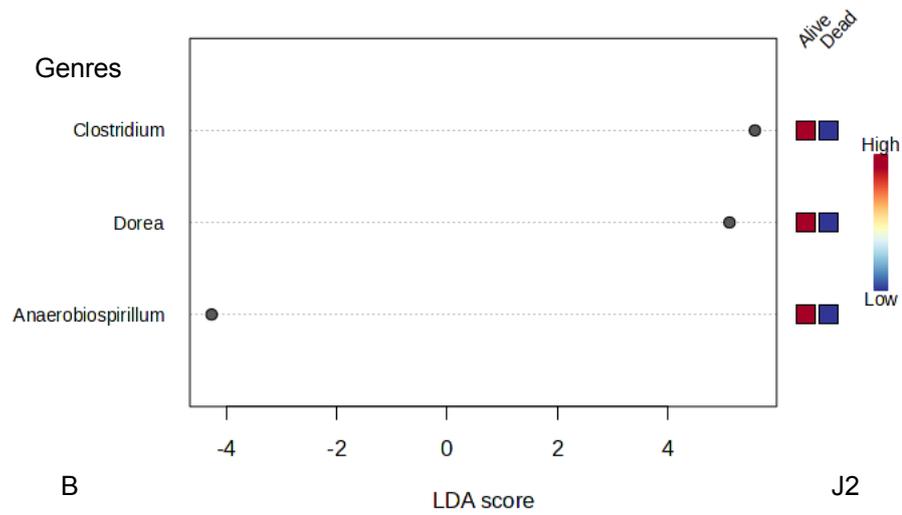
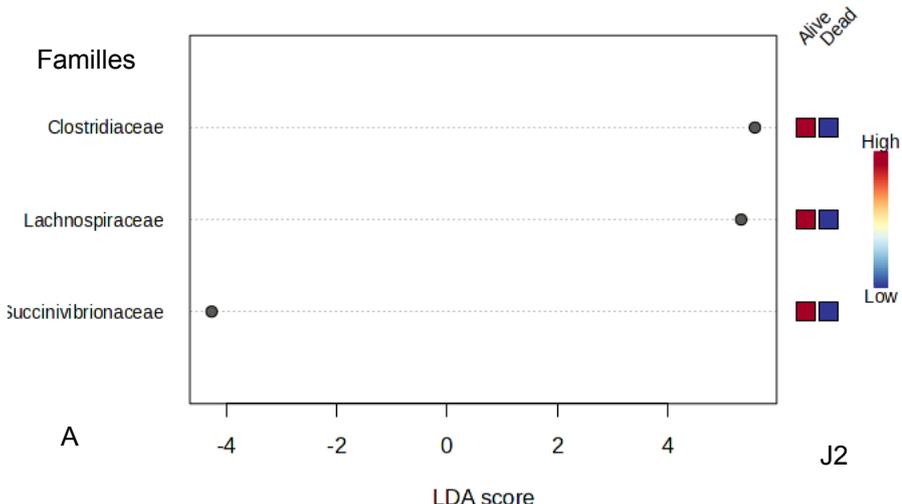




Annexe 5. Représentation graphique du score LDA pour les familles Pasteurellaceae et Moraxellaceae, à la naissance (J0) et abondances (de « Low » à « High ») au sein des populations de chiots (vivant= « Alive » et mort= « Dead »).



Annexe 6. Représentations graphiques du score LDA pour (A) les familles, (B) les genres et (C) les espèces au deuxième jour (J2) et abondances (de « Low » à « High ») au sein des populations de chiots (vivant= « Alive » et mort= « Dead »).



Nom : TASTET **Prénom :** Jeanne

LIEN ENTRE LE MICROBIOTE FÉCAL À LA NAISSANCE ET LA MORTALITÉ NÉONATALE CHEZ LE CHIOT – ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Résumé : Avec environ 10 % des chiots mourant au cours des trois premières semaines de leur vie, la période néonatale représente une période critique chez le chiot.

Si de nombreuses études se sont concentrées sur le microbiote des jeunes enfants, il existe encore un manque de connaissances concernant la constitution et la composition du microbiote intestinal chez le chiot. Cette étude a donc pour objectif de comprendre si une différence dans la composition des microbiotes fécaux des chiots est en lien avec la mortalité néonatale.

Ce travail expérimental a été réalisé sur un échantillon de 77 chiots pour lesquels des séquençages du gène de l'ARNr 16S a été réalisé à partir de prélèvements fécaux au cours de la période néonatale précoce. La population de chiots vivants avait une richesse bactérienne ainsi qu'une abondance de familles bactériennes significativement plus élevées que la population de chiots morts. Aussi, la bêta diversité était significativement différente entre les deux populations deux jours après la naissance. Enfin, des abondances variables de bactéries lactiques et de bactéries potentiellement pathogènes ont été trouvées dans les groupes des chiots vivants et des chiots décédés.

Mots clés : Microbiote - Chiot – Mortalité - Néonatale - Bactérie

LINK BETWEEN FECAL MICROBIOTA AT BIRTH AND NEONATAL MORTALITY IN PUPPIES – EXPERIMENTAL STUDY

Abstract: With approximately 10% of puppies dying within the first three weeks of life, the neonatal period represents a critical phase in their development. While numerous studies have focused on the microbiota of young children, there is still a lack of knowledge regarding the constitution and composition of the intestinal microbiota in puppies. Therefore, this study aims to investigate whether differences in the composition of the fecal microbiota in puppies are associated with neonatal mortality.

This experimental work was conducted on a sample of 77 puppies, for which 16S rRNA gene sequencing was performed using fecal samples collected during the early neonatal period. The surviving puppies exhibited significantly higher bacterial richness and abundance of bacterial families compared to the deceased puppies. Additionally, beta diversity was significantly different between the two populations two days after birth. Finally, varying abundances of lactic acid bacteria and potentially pathogenic bacteria were found between the groups of surviving and deceased puppies.

Keywords: Microbiota – Puppy – Mortality – Neonatal – Bacteria