



**HAL**  
open science

# Effets d'une supplémentation en *Saccharomyces boulardii* chez la chienne en gestation et en lactation sur la concentration en immunoglobulines dans les sécrétions lactées et sur le transfert de l'immunité passive du chiot

Laurine Michaud

## ► To cite this version:

Laurine Michaud. Effets d'une supplémentation en *Saccharomyces boulardii* chez la chienne en gestation et en lactation sur la concentration en immunoglobulines dans les sécrétions lactées et sur le transfert de l'immunité passive du chiot. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04818285

**HAL Id: dumas-04818285**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04818285v1>

Submitted on 4 Dec 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.

# EFFETS D'UNE SUPPLÉMENTATION EN SACCHAROMYCES BOULARDII CHEZ LA CHIENNE EN GESTATION ET EN LACTATION SUR LA CONCENTRATION EN IMMUNOGLOBULINES DANS LES SÉCRÉTIONS LACTÉES ET SUR LE TRANSFERT DE L'IMMUNITÉ PASSIVE DU CHIOT

---

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*

**MICHAUD Laurine, Eva**

**Directrice de thèse : Mme Hanna MILA**

---

## JURY

PRESIDENTE :

**Mme Séverine BOULLIER**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Hanna MILA**

**M. Laurent-Xavier NOUVEL**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

**M. Quentin GARRIGUES**

**Mme Amélie MUGNIER**

Technical Communication Scientist au sein de la société Affinity Petcare

Ingénieure de recherche au sein de la société LALLEMAND



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

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- 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*
- 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. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- 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*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie-Thérapeutique*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- 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*  
Mme LALLEMAND Elodie, *Chirurgie des équidés*  
M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
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*  
Mme DÛUET Jean-Yves, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
M. FERCHIOU Ahmed, *Economie et gestion des entreprises vétérinaires agricoles*  
Mme FUSADE-BOYER, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme GRANAT Fariny, *Biologie médicale animale*  
Mme JOURDAN Géraldine, *Anesthésie, analgésie comparée*  
Mme JOUSSERAND Nicolas, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme LAVOUE Rachel, *Médecine Interne*  
Mme LE GRAVERAND Quentin, *Alimentation animale*  
Mme LE LOC'H Guillaume, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie chirurgicale*  
Mme MILA Hanna, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. OTAVIANO DO REGO Renato, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme PIERRON Alix, *Pharmacie-Toxicologie*  
Mme VERGNE Timothée, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*  
Mme WARET-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 GEFRE 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**  
— AUX MEMBRES DU JURY —

**A Madame la Professeure Séverine BOULLIER**  
Professeure de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Immunologie générale et médicale*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,  
*Hommage respectueux.*

**A Monsieur le Professeur Xavier NOUVEL**  
Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pathologie de la reproduction*

Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse,  
*Sincères remerciements.*

**A Madame la Docteure Hanna MILA**  
Maître de conférence de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Élevage des carnivores domestiques*

Qui nous a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,  
*Pour sa patience, sa gentillesse, son soutien et sa bonne humeur,*  
*Qu'elle trouve ici la marque de ma reconnaissance,*  
*Remerciements très chaleureux.*

**A Monsieur le Docteur Quentin GARRIGUES**  
Technical Communication Scientist au sein de la société Affinity Petcare

Qui a très aimablement accepté d'assister à notre soutenance de thèse,  
*Pour ses conseils avisés et son encadrement,*  
*Sincères remerciements.*

**A Madame la Docteure Amélie MUGNIER**  
Ingénieure de recherche au sein de la société LALLEMAND

*Pour son aide précieuse, ses conseils et sa disponibilité,*  
*Sincères remerciements.*



## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
<b>PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>18</b>
<b>I. Composition en immunoglobulines des sécrétions lactées.....</b>	<b>18</b>
A- Définition du colostrum et du lait.....	18
B- Immunoglobulines contenues dans les sécrétions lactées.....	18
1. Les IgG.....	18
2. Les IgA.....	19
3. Évolution des concentrations en immunoglobulines pendant la lactation.....	20
<b>II. Rôles immunitaires des sécrétions lactées chez le chiot.....</b>	<b>21</b>
A- La protection immunitaire locale.....	21
B- La protection immunitaire systémique : le transfert d'immunité passive.....	22
1. Enjeux du transfert d'immunité passive.....	22
2. Modalités du transfert d'immunité passive.....	23
a) Mécanismes d'absorption des IgG.....	23
b) Fermeture de la barrière intestinale.....	23
3. Facteurs de variation du transfert d'immunité passive.....	24
<b>III. Intérêts de la levure <i>Saccharomyces boulardii</i> dans l'espèce canine.....</b>	<b>25</b>
A- Présentation de la levure <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	25
B- Intérêts pour la santé digestive.....	25
C- Intérêts pour les performances reproductrices.....	26
<b>PARTIE 2 : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>27</b>
<b>I. Objectifs de l'étude.....</b>	<b>27</b>
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>27</b>
A- Population.....	27
1. Chiennes.....	27
2. Chiots.....	28
B- Supplémentation en levure.....	28
C- Données cliniques.....	28
1. Chiennes.....	29

2. Chiots.....	30
D- Prélèvements.....	30
E- Dosage des immunoglobulines.....	31
1. Protocole de dosage.....	32
2. Répétabilité de la méthode.....	35
F- Analyses statistiques.....	35
1. Analyse statistique univariée.....	35
2. Analyse statistique multivariée.....	36
a) Choix des variables d'intérêt.....	36
b) Modèles statistiques.....	36
<b>III. Résultats.....</b>	<b>40</b>
A- Description de la population.....	40
1. Chiennes.....	40
2. Chiots.....	43
B- Concentration en immunoglobulines.....	45
1. IgG dans le sérum des chiennes.....	45
a) À 28 jours de gestation.....	45
b) À 56 jours de gestation.....	45
c) Évolution de la concentration sérique en IgG.....	46
2. Immunoglobulines dans le colostrum.....	47
a) IgG.....	47
b) IgA.....	47
3. IgA dans le lait.....	48
4. Évolution de la concentration en IgA dans les sécrétions lactées.....	48
5. IgG dans le sérum des chiots.....	49
C- Corrélations entre les concentrations en immunoglobulines.....	50
D- Effets de la supplémentation en levure sur les concentrations en immunoglobulines.....	51
1. IgG dans le sérum des chiennes.....	51
a) À 28 jours de gestation.....	51
b) À 56 jours de gestation.....	52
c) Évolution de la concentration sérique en IgG.....	54
2. Immunoglobulines dans le colostrum.....	57
a) IgG.....	57
b) IgA.....	59

3. IgA dans le lait.....	60
4. IgG dans le sérum des chiots.....	63
<b>IV. Discussion et perspectives.....</b>	<b>67</b>
A- Limites de l'étude.....	67
1. La population.....	67
2. Le délai de prélèvements après la mise-bas.....	67
3. Les immunoglobulines non dosées.....	68
4. Posologie de la supplémentation en levure.....	68
B- Résultats.....	69
1. Concentration en immunoglobulines.....	69
a) IgG dans le sérum des chiennes.....	69
b) Immunoglobulines dans les sécrétions lactées.....	69
i. IgG.....	69
ii. IgA.....	70
c) IgG dans le sérum des chiots.....	71
2. Liens entre les concentrations en immunoglobulines.....	71
a) IgG dans le sérum des chiennes et dans le colostrum.....	71
b) IgG et IgA dans le colostrum.....	72
c) IgA dans le colostrum et dans le lait.....	72
d) IgG dans le colostrum et dans le sérum des chiots.....	73
e) IgG dans le sérum des chiennes et des chiots.....	73
3. Facteurs de variation des concentrations en immunoglobulines.....	74
a) Le format racial.....	74
b) La taille de portée.....	75
c) L'âge de la chienne.....	75
d) La note d'état corporel.....	76
4. La supplémentation en levure.....	76
C- Perspectives.....	78
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>90</b>

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE 1</b> : Article de Garrigues et al. (2024).....	90
<b>ANNEXE 2</b> : Protocole d'alimentation des chiennes et des chiots.....	108
<b>ANNEXE 3</b> : Conditions d'hébergement des chiennes et des chiots.....	109
<b>ANNEXE 4</b> : Protocole de vaccination et de vermifugation.....	110
<b>ANNEXE 5</b> : Protocole rédigé des dosages ELISA.....	111
<b>ANNEXE 6</b> : Exemple de courbe-étalon obtenue avec le kit ELISA IgA de chez Bethyl Lab., Montgomery, USA.....	120
<b>ANNEXE 7</b> : Récapitulatif des résultats des modèles statistiques .....	121

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Proportions moyennes des différentes classes d'immunoglobulines contenues dans le colostrum (24 heures après la mise-bas) et dans le lait (7 jours après la mise-bas) de la chienne d'après les données disponibles dans la littérature .....	18
<b>Figure 2</b> : Évolution de la concentration en IgG au cours de la lactation (d'après Albaret, 2016).....	20
<b>Figure 3</b> : Proportions d'IgG et d'IgA dans les sécrétions lactées de la chienne au cours de la lactation (d'après Albaret, 2016).....	21
<b>Figure 4</b> : Placentation endothéliochoriale dans l'espèce canine (d'après Senger, 2012).....	22
<b>Figure 5</b> : Schéma des réactions moléculaire lors d'ELISA « sandwich ».....	31
<b>Figure 6</b> : Photographie d'une plaque ELISA au début du temps de révélation.....	34
<b>Figure 7</b> : Photographie d'une plaque ELISA à la fin du temps de révélation.....	34
<b>Figure 8</b> : Photographie d'une plaque ELISA après arrêt de la révélation à l'acide sulfurique .....	34
<b>Figure 9</b> : Répartition des chiennes selon leur âge (en années) au moment de l'ovulation (N=36).....	40
<b>Figure 10</b> : Corrélation linéaire entre l'âge (en années) et la parité des chiennes (N=36).....	41
<b>Figure 11</b> : Diagramme de flux de la population des chiots.....	43
<b>Figure 12</b> : Répartition des chiennes selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum à 28 jours de gestation (N=36).....	45
<b>Figure 13</b> : Répartition des chiennes selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum à 56 jours de gestation (N=36).....	45
<b>Figure 14</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes au 28ème (J28) (N=36) et au 56ème (J56) (N=36) jour de gestation.....	46
<b>Figure 15</b> : Répartition des chiennes selon la différence de concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum entre le 28ème (J28) et le 56ème (J56) jour de gestation (N=36).....	46
<b>Figure 16</b> : Répartition des chiennes selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur colostrum (N=36).....	47
<b>Figure 17</b> : Répartition des chiennes selon la concentration en IgA (en g/L) dans leur colostrum (N=36).....	47
<b>Figure 18</b> : Répartition des chiennes selon la concentration en IgA (en g/L) dans leur lait (N=34).....	48

<b>Figure 19</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum (N=34) et le lait (N=34) des chiennes.....	48
<b>Figure 20</b> : Répartition des chiots selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum (N=240).....	49
<b>Figure 21</b> : Corrélation linéaire entre la concentration en IgG (log, en g/L) et la concentration en IgA (log, en g/L) dans le colostrum (N=35).....	51
<b>Figure 22</b> : Corrélation linéaire entre la concentration en IgA (log, en g/L) dans le colostrum et la concentration en IgA (log, en g/L) dans le lait (N=34).....	51
<b>Figure 23</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 28 jours de gestation selon qu'elles seront supplémentées en levure ou non (N=36).....	52
<b>Figure 24</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 28 jours de gestation selon leur format racial (N=36).....	52
<b>Figure 25</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 56 jours de gestation selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=36).....	53
<b>Figure 26</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 56 jours de gestation selon la taille de la portée et la supplémentation en levure (N=36).....	53
<b>Figure 27</b> : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=36).....	54
<b>Figure 28</b> : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon leur format racial et la supplémentation en levure (N=36).....	55
<b>Figure 29</b> : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon la variation d'état corporel et la supplémentation en levure (N=36).....	56
<b>Figure 30</b> : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon la taille de la portée (N=36).....	57
<b>Figure 31</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=35).....	57
<b>Figure 32</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur format racial (N=35).....	58
<b>Figure 33</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur âge (N=35).....	58

<b>Figure 34</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon la supplémentation en levure (N=36).....	59
<b>Figure 35</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur format racial (N=36).....	59
<b>Figure 36</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur âge (N=36).....	60
<b>Figure 37</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=34).....	60
<b>Figure 38</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon leur âge (N=34).....	61
<b>Figure 39</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon leur format racial (N=34).....	61
<b>Figure 40</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon leur état corporel au 56ème jour (J56) de gestation (N=34).....	62
<b>Figure 41</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiots selon que leur mère est supplémentée en levure ou non (N=240).....	63
<b>Figure 42</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiots selon que leur mère est supplémentée en levure ou non et selon leur format racial (N=240).....	64
<b>Figure 43</b> : Proportion de chiots (en %) en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) selon que leur mère est supplémentée en levure ou non (N=235).....	65
<b>Figure 44</b> : Proportion de chiots (en %) en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) selon que leur mère est supplémentée en levure ou non et selon leur format racial (N=235).....	65
<b>Figure 45</b> : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon que leurs chiots sont en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) ou non (N=235).....	66

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Origine des immunoglobulines dans les sécrétions lactées (d'après Tizard, 2018) .....	19
<b>Tableau 2</b> : Nombre de chiots nés définissant les catégories de taille de portée rapportée au format racial des chiennes.....	29
<b>Tableau 3</b> : Dilutions des échantillons appliquées dans notre étude.....	32
<b>Tableau 4</b> : Répartition des échantillons et des standards sur une plaque ELISA.....	33
<b>Tableau 5</b> : Coefficients de variation des plaques ELISA.....	35
<b>Tableau 6</b> : Modèles statistiques appliqués aux concentrations en IgG dans le sérum des chiennes.....	37
<b>Tableau 7</b> : Modèles statistiques appliqués aux concentrations en Ig dans les sécrétions lactées des chiennes.....	38
<b>Tableau 8</b> : Modèles statistiques appliqués aux concentrations en IgG dans le sérum des chiots.....	39
<b>Tableau 9</b> : Caractéristiques des groupes de chiennes « Témoin » et « Levure » (N=36) .....	42
<b>Tableau 10</b> : Caractéristiques des groupes de chiots « Témoin » et « Levure » (N=240).....	44
<b>Tableau 11</b> : Corrélations entre les concentrations en immunoglobulines dans les différentes matrices.....	50
<b>Tableau 12</b> : Effectifs et races inclus dans différentes études s'intéressant à la supplémentation en pré- ou probiotiques et aux facteurs de variation du transfert d'immunité passive ou des concentrations en immunoglobulines dans les sécrétions lactées – Synthèse bibliographique.....	67
<b>Tableau 13</b> : Variabilité inter-individuelle de la concentration moyenne en IgG dans le colostrum de différentes études – Synthèse bibliographique.....	70
<b>Tableau 14</b> : Concentration en IgA (en g/L, moyenne $\pm$ écart-type) dans les sécrétions lactées de chiennes – Synthèse bibliographique.....	70
<b>Tableau 15</b> : Concentration en IgG (en g/L, moyenne $\pm$ écart-type) dans le sérum des chiots à 2 jours de vie – Synthèse bibliographique.....	71
<b>Tableau 16</b> : Prévalence de chiots en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) (en %) – Synthèse bibliographique.....	71

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ELISA** : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **FcRn** : neonatal FcReceptor
- **GALT**: Gut Associated Lymphoid Tissue
- **Ig** : immunoglobulines
- **IgA** : immunoglobulines de classe A
- **IgG** : immunoglobulines de classe G
- **IgM** : immunoglobulines de classe M
- **IgY** : immunoglobulines de classe Y
- **NEC** : Note d'État Corporel
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **SB** : *Saccharomyces boulardii*
- **TIP** : Transfert d'Immunité Passive
- **UFC** : Unité Formant Colonie

## INTRODUCTION

Malgré les progrès considérables faits en médecine vétérinaire et notamment dans le domaine de la néonatalogie, le taux de mortalité néonatale demeure élevé dans l'espèce canine avec près de 1 chiot sur 10 né-vivant mourant avant ses 21 jours (Mugnier et al., 2018). La survie des chiots pendant la période néonatale (de la naissance à 21 jours de vie) est notamment conditionnée par la prise du colostrum (défini comme les sécrétions lactées produites pendant les deux premiers jours post-partum (Chastant et Mila, 2019)) puis du lait. Ces sécrétions lactées contenant des immunoglobulines majoritairement de classe G (IgG) et de classe A (IgA) sont primordiales pour assurer la protection immunitaire des chiots.

Ces derniers naissant quasiment agammaglobulinémiques, l'ingestion du colostrum permet tout d'abord d'y remédier en transférant les IgG de la mère au chiot. Ce dernier acquiert une immunité humorale systémique transitoire le temps que son système immunitaire devienne efficace : on parle de transfert de l'immunité passive (TIP). Ce transfert s'achève lorsque la muqueuse intestinale du chiot devient imperméable aux immunoglobulines soit entre 12 et 16 heures après la mise-bas (Chastant-Maillard et al., 2012).

Ensuite, même si les immunoglobulines du lait ne passent pas la barrière intestinale, elles jouent tout de même un rôle immunitaire local (dans le tube digestif) et participent donc à la protection immunitaire du nouveau-né. Ainsi, une partie des immunoglobulines de classe A ingérée par le chiot participe à l'immunité mucosale de la sphère oropharyngée (Salmon et al., 1999) tandis que l'autre partie est responsable de la protection intestinale du chiot. Les IgG assurent également une immunité intestinale locale (Quigley et al., 2004) mais elles sont davantage sensibles à la protéolyse (Heddle & Rowley, 1975).

Sachant que la teneur en immunoglobulines du colostrum et du lait est primordiale pour la santé du nouveau-né, une stratégie pour diminuer la mortalité néonatale dans l'espèce canine consisterait à améliorer la qualité immunologique des sécrétions lactées et le TIP chez le chiot. Une des pistes possible pour augmenter ces concentrations en immunoglobulines est la supplémentation maternelle avec des pré- ou probiotiques : les résultats sont encourageants (Adogony et al., 2007, Alonge et al., 2020) mais la recherche sur ce point précis est encore trop peu développée. Cette thèse a donc pour objectif d'étudier les effets d'une supplémentation en levure *Saccharomyces boulardii* (SB) chez la chienne durant la gestation et la lactation, sur la concentration en immunoglobulines dans le colostrum et dans le lait et sur le TIP du chiot.

La première partie de ce travail repose sur une synthèse bibliographique permettant de rappeler la composition en immunoglobulines des sécrétions lactées ainsi que le processus de

TIP. Nous nous intéresserons également aux principaux intérêts actuels de l'usage de SB dans l'espèce canine.

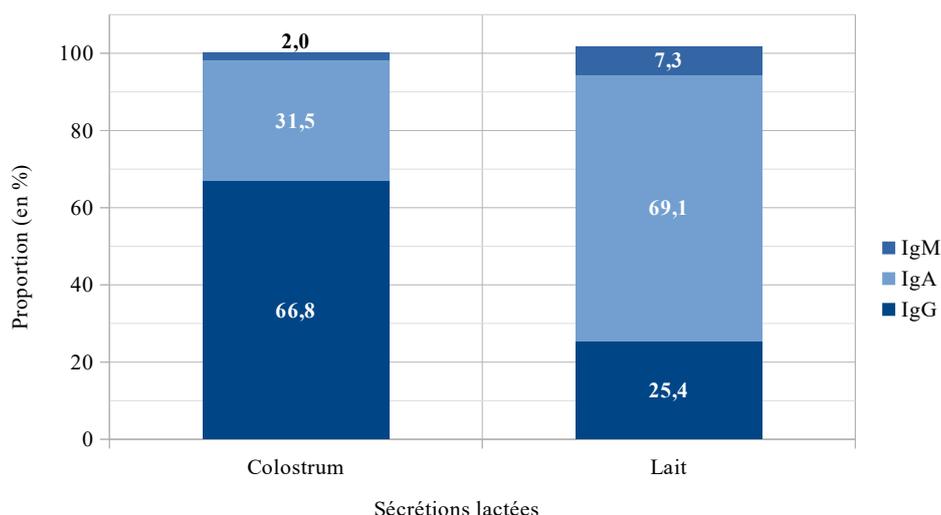
La deuxième partie est consacrée à une étude expérimentale menée sur 36 chiennes supplémentées ou non en levure SB dont nous avons comparé les concentrations sériques en IgG à deux moments de la gestation ainsi que les concentrations en IgG dans le colostrum et les concentrations en IgA dans le colostrum et dans le lait. La qualité du TIP de 240 chiots issus de ces chiennes a également été analysée en dosant leur concentration sérique en IgG à deux jours de vie. L'influence d'autres facteurs que la supplémentation en probiotiques (la taille de portée, le format racial, l'âge des chiennes...) sur les concentrations en immunoglobulines a été prise en compte dans notre étude.

## PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Composition en immunoglobulines des sécrétions lactées

#### A- Définition du colostrum et du lait

Le colostrum est la première sécrétion lactée produite par la glande mammaire de la chienne après la mise-bas et plus précisément pendant les deux premiers jours post-partum (Chastant et Mila, 2019). D'un point de vue physique, le colostrum est décrit comme jaunâtre et plus dense, plus visqueux et plus épais que le lait (Serieys, 1993). Si la différence de composition nutritionnelle avec le lait ne fait pas consensus (Adkins et al., 2001, Chastant et Mila, 2016 ; Martin, 2024), le profil immunologique du colostrum est bien caractéristique : il est particulièrement riche en immunoglobulines qui représentent entre 20 et 37% des protéines qu'il contient (Norcross, 1982 ; Bebiak et al., 1987 ; Schäfer-Somi et al., 2005, Chastant-Maillard et al., 2010). De plus, la proportion des classes d'immunoglobulines diffère entre les deux sécrétions mammaires (*figure 1*).



**Figure 1 : Proportions moyennes des différentes classes d'immunoglobulines contenues dans le colostrum (24 heures après la mise-bas) et dans le lait (7 jours après la mise-bas) de la chienne d'après les données disponibles dans la littérature (Heddle et Rowley, 1975 ; Schäfer-Somi et al., 2005 ; Bertieri, 2012 ; Albaret, 2016 ; Alonge et al., 2020)**

#### B- Immunoglobulines contenues dans les sécrétions lactées

Dans les sécrétions lactées de la chienne, seules les IgG, les IgA et les IgM sont dosables (Chastant-Maillard et al., 2017). La proportion en IgM étant faible dans le colostrum et dans le lait (*figure 1*), nous allons nous intéresser uniquement aux IgG et aux IgA.

##### 1. Les IgG

Les IgG sont les immunoglobulines majoritaires dans le sérum canin dans lequel leur concentration varie entre 8 et 25 g/L chez un individu adulte (Bouchard et al., 1992 ;

Poffenbarger et al., 1991). Elles constituent également la majorité des immunoglobulines présentes dans le colostrum (*figure 1*).

Sous l'influence de la progestérone et des œstrogènes en fin de gestation, les IgG sont activement transférées du sérum de la mère vers les glandes mammaires (*tableau 1*) grâce aux récepteurs FcRn (neonatal FcReceptor) localisés sur les cellules épithéliales de ces glandes. Ils captent les IgG de la circulation sanguine au niveau du pôle basal de la cellule puis les IgG sont internalisées et rélarguées au niveau du pôle apical dans la lumière alvéolaire de la glande mammaire (Tizard, 2018). Le colostrum se retrouve alors fortement concentré en IgG atteignant des teneurs 3 à 4 fois supérieures aux concentrations sériques maternelles (Claus et al., 2006 ; Mila et al., 2015). En toute fin de gestation lorsque les jonctions serrées se relâchent, les IgG passent également par voie para-cellulaire, entre les cellules épithéliales (Klopfenstein et al., 2002 ; Abdou et al., 2012) mais ce mécanisme de sécrétion reste minime.

A la différence du colostrum, les IgG du lait sont principalement issues d'une synthèse locale par le tissu lymphoïde mammaire (*tableau 1*) (Tizard, 2018).

**Tableau 1 : Origine des immunoglobulines dans les sécrétions lactées (d'après Tizard, 2018)**

Origine	IgG		IgA	
	Colostrum	Lait	Colostrum	Lait
Circulation sanguine	100 %	30 %	50 %	10 %
Synthèse locale	0 %	70 %	50 %	90 %

## **2. Les IgA**

Bien que présentes en petite quantité dans le sérum des chiennes à raison de 0,2-1,5 g/L (Tizard, 2018), les IgA constituent la deuxième population d'immunoglobulines dans le colostrum et la première dans le lait en terme de concentration (*figure 1*).

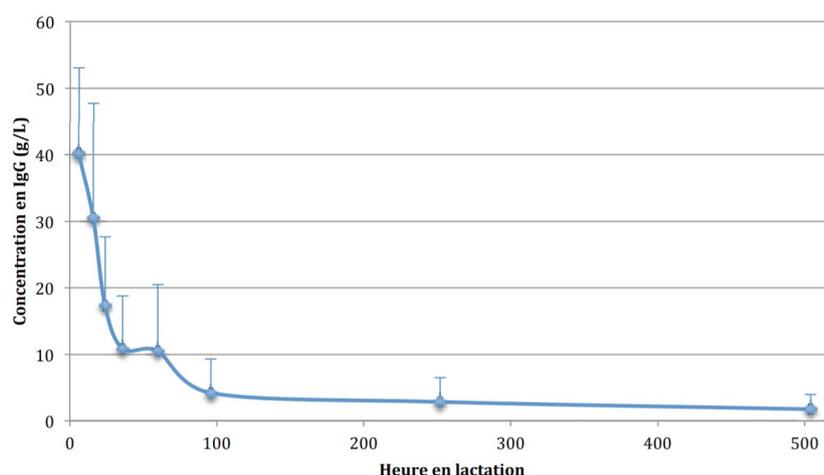
La moitié des IgA contenue dans le colostrum provient de la circulation sanguine selon un mécanisme analogue à celui des IgG. Néanmoins, contrairement aux IgG, les IgA se lient à un récepteur polymérique spécifique, également appelé composant sécrétoire : elles deviennent alors des IgA sécrétoires qui sont protégées de l'action des protéases intestinales du chiot (Tizard, 2018).

L'autre moitié des IgA est issue d'une synthèse intra-mammaire effectuée par les cellules « IgA producing plasma cell population » situées sous la couche épithéliale de la glande mammaire (Spencer et al., 2007). Ce sont ces mêmes « plasma cells » qui assurent la majorité de la synthèse des IgA (et des IgG) présentes dans le lait (*tableau 1*).

### **3. Évolution des concentrations en immunoglobulines pendant la lactation**

Comme nous l'avons vu, pendant les quarante-huit premières heures après la mise-bas, les IgG constituent les immunoglobulines dominantes des sécrétions lactées produites par la chienne. Puis, à partir du troisième jour de lactation, la composition des sécrétions mammaires est drastiquement modifiée : nous ne parlons alors plus de colostrum mais de lait.

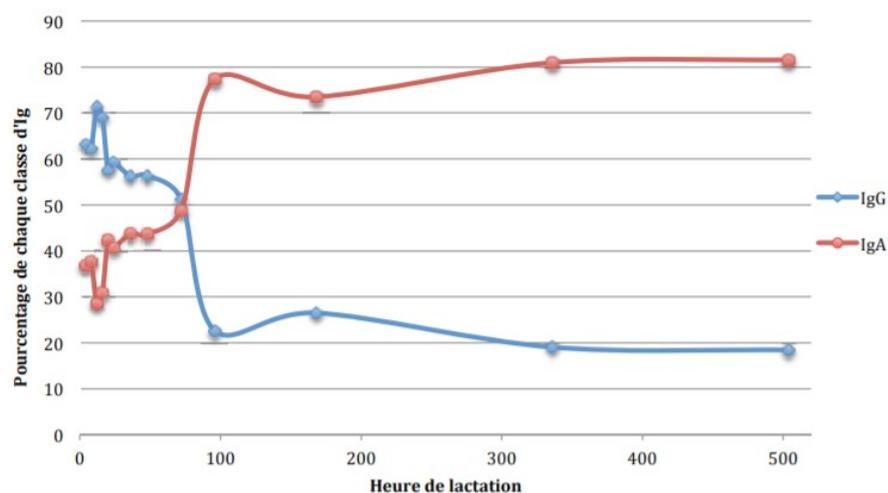
En effet, au cours de la lactation, la concentration en IgG dans les sécrétions lactées chute considérablement : une diminution de près de 75% est observée entre les heures suivant la mise-bas et le troisième jour de lactation (*figure 2*) (Albaret, 2016). Ce passage de la phase colostrale à la phase lactée s'explique par une diminution de l'expression du récepteur FcRn au niveau de l'épithélium mammaire et par une translocation de ces récepteurs vers le pôle apical des cellules épithéliales entraînant une réabsorption des IgG depuis le colostrum (Kuo et al., 2010). Enfin, la fermeture des jonctions serrées bloque le transfert para-cellulaire des IgG (Jones et Spencer, 2007)



**Figure 2 : Évolution de la concentration en IgG au cours de la lactation (d'après Albaret, 2016)**

753 échantillons appartenant à 53 chiennes ont été analysés.

Quant à la concentration en IgA, elle demeure stable au cours de la lactation (Bertieri, 2012). Néanmoins, la proportion d'IgA augmente au détriment des IgG : à partir du troisième jour post-partum, les IgA dominent dans le lait (Heddle et Rowley, 1975 ; Albaret, 2016 ; Schäfer-Somi et al., 2005) (*figure 3*).



**Figure 3 : Proportions d'IgG et d'IgA dans les sécrétions lactées de la chienne au cours de la lactation (d'après Albaret, 2016)**

753 échantillons de colostrum et de lait appartenant à 53 chiennes ont été analysés.

Les IgG et les IgA présentes dans les sécrétions lactées sont d'une importance cruciale pour assurer la survie des chiots : elles sont le socle de leur immunité systémique (IgG) et locale (IgG et IgA).

## **II. Rôles immunitaires des sécrétions lactées chez le chiot**

### **A- La protection immunitaire locale**

Le chiot nouveau-né ne dispose pas de barrières physiologiques fonctionnelles contrairement au chien adulte. D'un point de vue digestif, son microbiote intestinal est pauvre et la production d'acide gastrique est quasi-nulle ce qui diminue grandement la protection face aux agents infectieux du tractus gastro-intestinal (Pereira et al., 2023).

Les IgG et les IgA ingérées avec les sécrétions lactées permettent de pallier ce défaut de défense immunitaire digestive. En effet, dans la lumière intestinale du chiot, elles participent à l'opsonisation des bactéries pathogènes, à la neutralisation virale et contribuent à la présentation d'antigènes aux globules blancs (Tizard, 2018).

Les IgA et les IgG n'ont pas le même poids dans l'immunité locale : associées à leur composant sécrétoire, les IgA subissent moins l'effet des protéases digestives que les IgG (Heddle & Rowley, 1975). De plus, les IgA absorbées par l'intestin du chiot tant qu'il est perméable, se retrouvent rapidement excrétées au niveau des muqueuses respiratoires. Elles protègent ainsi à la fois les sphères digestive et respiratoire du nouveau-né (Salmon et al.,

2009). Les IgG ont, quant à elles, un rôle primordial dans l'immunité systémique du chiot que nous allons maintenant décrire.

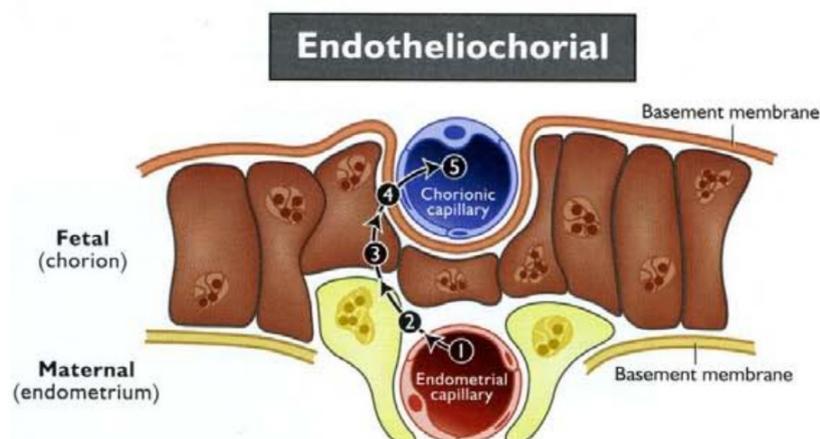
## **B- La protection immunitaire systémique : le transfert d'immunité passive**

### **1. Enjeux du transfert d'immunité passive**

La période néonatale, s'étendant entre la naissance et les trois premières semaines de vie (Indrebø et al. 2007), est une phase critique pour le chiot. En effet, le taux de mortalité néonatale en prenant en compte la mortinatalité (les chiots morts-nés) atteint près de 20 % dans l'espèce canine (Mila, 2015). La grande majorité des décès se produit pendant les sept premiers jours de vie (Brévaux, 2018).

La première cause de mortalité néonatale identifiée chez le chien sont les maladies infectieuses (Nielen et al., 1998). L'efficacité de la lutte du système immunitaire du nouveau-né contre ces maladies est directement soumise à la prise colostrale. En effet, les chiots ne disposant pas assez d'IgG dans leur sérum à deux jours de vie (en-dessous de 2,3 g/L) ont un risque de mortalité néonatale plus élevé (Mila et al., 2014) car ils ne sont pas capables de lutter efficacement contre les infections.

Le nouveau-né possède un système immunitaire immature. La concentration sérique en immunoglobulines d'environ 0,3 g/L est notamment infime et fait du chiot un individu agammaglobulinémique à la naissance (Chastant et al., 2012). Cela s'explique par un transfert limité, de l'ordre de 5%-10%, des immunoglobulines de la chienne à travers le placenta pendant la gestation (Chappuis, 1998 ; Dall'Ara et al., 2015). Les quatre couches cellulaires formant la placentation zonaire endothéliochoriale de la chienne limitent fortement le passage des anticorps maternels dans le système vasculaire foetal (*figure 4*).



**Figure 4 : Placentation endothéliochoriale dans l'espèce canine (d'après Senger, 2012)**

1 : capillaire endométrial, 2 : interstitium endométrial, 3 : épithélium chorionique,  
4 : interstitium chorionique, 5 : capillaire chorionique

Ainsi, la survie du chiot nouveau-né dépend de l'immunité maternelle qu'il acquiert en ingérant le colostrum. Ce transfert de l'immunité passive permet d'obtenir une concentration sérique en IgG de l'ordre de 6-16 g/L chez le chiot à deux jours de vie, dont 85 à 95% sont d'origine colostrale (Pollock & Carmichael, 1982 ; Poffenbarger et al., 1991 ; Schäfer-Somi et al., 2005 ; Greene & Schultz ; 2006 ; Day, 2007 ; Chastant-Maillard et al., 2012).

## **2. Modalités du transfert d'immunité passive**

### **a) Mécanismes d'absorption des IgG**

Une fois ingérées par le chiot, les IgG sont d'abord soumises à l'action des protéases digestives. Néanmoins, ces protéases sont encore peu efficaces et les IgG en sont protégées grâce aux antitrypsines présentes en grande quantité dans le colostrum (Levieux & Ollier, 1999). Elles sont ensuite absorbées au niveau de l'intestin grêle selon trois mécanismes.

Le premier est spécifique et fait appel aux récepteurs FcRn exprimés à la surface des entérocytes (Tizard, 2018) : les IgG, après s'être fixées sur ces récepteurs, sont vacuolisées par pinocytose puis relarguées depuis le pôle basal des entérocytes directement dans les capillaires intestinaux ou dans les canaux lymphatiques intestinaux avant de rejoindre la circulation sanguine générale.

La deuxième voie d'absorption des IgG est non spécifique : elles peuvent traverser librement l'épithélium intestinal en passant entre les entérocytes dont les jonctions sont encore lâches chez le chiot nouveau-né (Chastant-Maillard et al., 2017).

Enfin, elles sont également internalisées par les entérocytes avec d'autres macromolécules présentes dans la lumière intestinale grâce à un processus de macropinocytose. C'est ce dernier mécanisme non-spécifique d'absorption qui serait dominant chez le chiot (Weström et al., 2020).

### **b) Fermeture de la barrière intestinale**

Le TIP n'est possible que pendant une courte fenêtre de temps après la naissance. En effet, dès la mise-bas, le tractus digestif du chiot commence sa maturation : la bordure en brosse de l'épithélium intestinal se développe et les entérocytes aux propriétés d'endocytose ultra-développées sont remplacés par des entérocytes davantage imperméables et n'exprimant plus le récepteur FcRn, les jonctions serrées se mettent en place entre les cellules épithéliales intestinales et, enfin, les enzymes digestives deviennent fonctionnelles (Weström et al., 2020 ; Chastant-Maillard et al., 2017).

Ainsi, la capacité d'absorption intestinale des IgG se retrouve divisée par deux 4 heures post-partum alors qu'elle n'est déjà que de 40 % à la naissance. Puis, c'est entre 12 et 16 heures après la mise-bas, que l'intestin du chiot devient entièrement imperméable (Chastant-Maillard et al., 2012).

### **3. Facteurs de variation du transfert d'immunité passive**

Le TIP est primordial pour le nouveau-né mais une grande variabilité des concentrations sériques en IgG est observée chez des chiots appartenant pourtant à une même portée (Mila et al., 2015). Ces disparités dans le transfert d'immunité passif s'expliquent par trois grands facteurs.

#### ***Facteur de variation temporel***

Tout d'abord, le moment auquel s'effectue l'ingestion du colostrum est déterminant : d'une part, l'absorption intestinale des IgG doit être possible avec une barrière intestinale ouverte et, d'autre part, la quantité d'IgG dans le colostrum doit être suffisante sachant que leur concentration chute très rapidement post-partum (voir le paragraphe I.B-3, page 20).

#### ***Facteur de variation quantitatif***

De plus, la quantité de colostrum ingérée influe sur le TIP. Elle dépend entre autres du comportement de tétée du chiot notamment du nombre de tétées pendant le premier jour de vie et de la durée des tétées (Viaud, 2018).

#### ***Facteur de variation qualitatif***

Enfin, le TIP est conditionné par la qualité immunologique du colostrum produit par la mère. La concentration colostrale en IgG varie grandement d'une mamelle à une autre (Mila et al. 2015), et d'une chienne à une autre : selon les études, un facteur 4 à 20 sépare les concentrations extrêmes en IgG dans le colostrum (Aggouni, 2016 ; Viaud, 2018).

Afin d'améliorer la qualité immunologique du colostrum et, par conséquent, le TIP, des pistes sont explorées chez d'autres espèces que le chien : la vaccination chez la truie a notamment fait ses preuves en augmentant la concentration colostrale en IgG spécifiques des pathogènes visés par la vaccination (Ayshpur et al. 2021 ; Lopez-Serrano et al., 2021 ; Yang et al., 2021). Optimiser les paramètres environnementaux lors de la mise-bas et de la lactation serait également intéressant pour favoriser un colostrum riche en IgG : Machado-Neto et al. (1987) ont montré qu'en soumettant des truies à un stress thermique modéré, la qualité immunologique du colostrum diminuait. Aucune étude sur ce sujet n'est disponible chez l'espèce canine. L'influence de la nutrition sur la qualité colostrale est au contraire un sujet étudié dans cette espèce : l'ajout de prébiotiques (Adogony et al., 2007) et/ou de probiotiques

(Alonge et al., 2020) dans la ration de chiennes gestantes fait l'objet d'un intérêt grandissant du fait de résultats encourageants que nous allons désormais détailler.

### **III. Intérêts de la levure *Saccharomyces boulardii* dans l'espèce canine**

#### **A- Présentation de la levure *Saccharomyces boulardii***

La levure SB a été découverte en 1920 par le microbiologiste français Henri Boulard qui l'a isolée de la peau de litchis et de mangoustans (McFarland, 2010). Depuis sa découverte, elle fait l'objet de nombreuses études du fait de ses propriétés probiotiques. La Food and Agriculture Organization (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définissent les probiotiques comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001).

Bien que génétiquement proche de *Saccharomyces cerevisiae* (Khatri et al., 2017), elle s'en distingue par une température de croissance optimale plus élevée à 37°C, une résistance au pH acide et une tolérance aux acides biliaires (Fietto et al., 2004 ; Graff et al., 2008 ; Pardo et al., 2009) qui font de SB une levure particulièrement intéressante chez les espèces monogastriques telles que le chien. Elle présente par ailleurs une bonne palatabilité (Baroncello et al., 2020) qui facilite son observance dans l'espèce canine.

#### **B- Intérêts pour la santé digestive**

Les produits contenant des levures du genre *Saccharomyces* ou leurs dérivés sont classés par l'autorité européenne de sécurité des aliments comme des additifs zootechniques « ayant un effet positif sur la production, le rendement ou le bien-être des animaux, ou sur les conséquences environnementales de la production animale » (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, 2023).

Chez les animaux d'élevage, ils agissent en effet sur le microbiote intestinal en favorisant le développement de populations bactériennes bénéfiques pour la santé digestive (Elghandour et al., 2020 ; Perricone et al., 2022). Dans l'espèce canine, de nombreuses études ont également montré l'impact positif d'une supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae* sur la flore intestinale (Stercova et al., 2016 ; Bastos et al., 2023a et 2023b).

La levure SB est même reconnue chez le chien pour prévenir et traiter les troubles gastro-intestinaux provoqués par l'administration d'antibiotiques (Aktas et al., 2007) ou consécutifs à une entéropathie chronique (D'Angelo et al., 2018). Elle permet de stabiliser le microbiote intestinal notamment chez la chienne autour de la mise-bas (Garrigues et al., 2024) et influence plus généralement les performances reproductrices des animaux.

### **C- Intérêts pour les performances reproductrices**

La levure SB a d'abord fait ses preuves dans l'amélioration des performances reproductrices de la truie en augmentant, entre autres, la production des sécrétions lactées et leur richesse en acides gras (Domingos et al., 2021). De plus en plus d'études confirment ces effets bénéfiques y compris dans l'espèce canine : Garrigues et al. (2024) ont montré une amélioration de la qualité nutritionnelle du colostrum et du lait associée à une réduction du risque de chiots à petit poids de naissance.

L'intérêt d'une supplémentation en SB au cours de la gestation et de la lactation réside également dans sa capacité à pouvoir influencer sur la composition immunologique des sécrétions lactées. En effet, cette levure, tout comme d'autres probiotiques (Alonge et al., 2020) ou des prébiotiques (Adogony et al., 2007), pourrait modifier les concentrations en immunoglobulines dans le colostrum et dans le lait selon différents processus. Une hypothèse est la stimulation de la réponse humorale de la chienne par les probiotiques en activant le « Gut Associated Lymphoid Tissue » (GALT) (Alonge et al., 2020). Un autre mécanisme serait la stimulation des plaques de Peyer par le microbiote intestinal façonné par les probiotiques : ces plaques faisant partie du GALT produisent en effet les précurseurs des « plasma cell » synthétisant les IgG et IgA dans les glandes mammaires (Salmon, 2003 ; Usami et al., 2021).

Aucune étude ne s'est encore penchée sur la possibilité qu'une supplémentation en SB chez la chienne en gestation et en lactation améliore les concentrations en immunoglobulines dans les sécrétions lactées et le TIP. Ce sujet constitue ainsi notre objet d'étude expérimentale.

## **PARTIE 2 : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**

### **I. Objectifs de l'étude**

Nous avons explicité dans notre synthèse bibliographique l'intérêt d'améliorer le TIP et les concentrations en immunoglobulines du colostrum et du lait afin de réduire la mortalité néonatale des chiots. Dans un contexte où les probiotiques font de plus en plus leurs preuves en médecine humaine et vétérinaire, il est légitime de se demander si une supplémentation maternelle, pendant la gestation et la lactation, avec la levure SB influence voire améliore les concentrations sériques en IgG de chiennes, les concentrations en IgG et en IgA des sécrétions lactées ainsi que le TIP, et plus précisément les concentrations sériques en IgG de chiots.

Pour cela, nous avons mené une étude sur une population de chiennes séparée en deux groupes : l'un supplémenté en levure SB, et l'autre recevant un placebo. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le centre de recherche de la société LALLEMAND basé à Blagnac, en France. La levure utilisée dans notre protocole a été fournie par ce laboratoire afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché pour l'espèce canine. Son innocuité chez les chiennes et les chiots a d'ores et déjà été vérifiée dans la thèse vétérinaire de David et Mansalier (2021). De plus, notre étude a contribué à la thèse de doctorat de Garrigues (2024) s'intéressant aux effets de SB sur le microbiote intestinal et les performances reproductrices des chiennes, ainsi que sur le phénotype immuno-métabolique des chiots (*annexe 1*).

A travers notre travail, nous avons donc souhaité explorer les effets de SB sur les concentrations en immunoglobulines dans le sérum, le colostrum et le lait de chiennes supplémentées, ainsi que dans le sérum de leurs chiots, tout en prenant en compte les facteurs de variation (le format racial, l'âge, l'état corporel, la taille de portée...) susceptibles de s'ajouter à l'influence de SB.

### **II. Matériel et méthodes**

#### **A- Population**

##### **1. Chiennes**

L'étude a été menée sur 36 chiennes provenant d'un même élevage entre novembre 2020 et avril 2021. Elles ont été sélectionnées après un diagnostic de gestation échographique positif réalisé par un vétérinaire praticien vingt-huit jours après la date d'ovulation (déterminée par un dosage de progestérone supérieur à 8 ng/ml).

Elles ont été nourries suivant le même protocole (*annexe 2*) respectant les recommandations du National Research Council qui spécifient les besoins physiologiques des

chiennes au cours de la gestation et de la lactation. L'eau était disponible à volonté. Les conditions d'hébergement (*annexe 3*) ainsi que les protocoles vaccinaux et de vermifugation (*annexe 4*) ont été identiques pour toutes les chiennes sauf exceptions (*annexe 3*).

## **2. Chiots**

Les chiennes ont donné naissance naturellement (c'est-à-dire sans césarienne) à 284 chiots dont 30 sont nés morts. Les 254 chiots vivants sont restés auprès de leur mère jusqu'à la fin de l'étude (à 56 jours post-partum) afin de pouvoir téter librement. Pendant les 48 premières heures de vie, des séances de tétée et de pesée ont été effectuées par l'éleveur afin de surveiller la prise colostrale. Si celle-ci était jugée insuffisante, un sondage avec du lait maternisé Royal Canin® Puppy Protech (Royal Canin, Aimargues, France) était réalisé de manière non contrôlée (quantité ingérée et identification des chiots non renseignées) et non systématique par manque de temps. Néanmoins, cet aliment de substitution contient seulement des immunoglobulines Y (IgY) et non pas des IgG : il ne représente donc pas un biais dans notre étude.

### **B- Supplémentation en levure**

Les chiennes ont été divisées en deux groupes de 18 individus en fonction de leur âge, de leur parité, de leur format racial et de leur note d'état corporel (NEC) à 28 jours de gestation.

Les 18 premières chiennes ont reçu une supplémentation à base de levure vivante *Saccharomyces boulardii* CNCM I-1079 (Levucell SB®, Lallemand SAS, Blagnac, France ; SB-1079) (groupe « Levure »). Ce probiotique a été distribué sous forme de gélules contenant  $6,4 \times 10^8$  unité formant colonie (UFC) de levure, deux fois par jour (matin et soir) (soit  $1,3 \times 10^9$  UFC de levure par chienne par jour) à partir de 30 jours de gestation (*i.e* 30 jours après l'ovulation de la chienne) jusqu'à la fin de la période de lactation (56 jours post-partum). Afin qu'elles soient entièrement consommées, les gélules ont été administrées dans une friandise façonnée à partir de croquettes (*annexe 3*) trempées dans de l'eau chaude. Les 18 chiennes restantes (groupe « Témoin ») ont reçu des gélules contenant un placebo dans les mêmes friandises et à la même fréquence.

### **C- Données cliniques**

Afin d'évaluer l'influence de la supplémentation en levure sur les concentrations en immunoglobulines dans le sérum maternel, le colostrum et le lait, et sur le TIP des chiots, nous nous sommes intéressés à plusieurs paramètres.

## **1. Chiennes**

En fonction de leur poids mesuré le jour de l'ovulation, les chiennes ont été classées en 2 formats raciaux : les chiennes de taille Medium (M) pesaient entre 15 et 25 kg et les chiennes de taille Large (L) avaient un poids strictement supérieur à 25 kg.

La NEC a été étudiée en divisant la population de chiennes en deux groupes selon qu'elles étaient « en surpoids » ( $NEC \geq 6$ ) ou non ( $NEC < 6$ ) à 28 (J28) et à 56 jours (J56) de gestation (Laflamme, 1997). Cette catégorisation nous a paru biologiquement cohérente dans la mesure où un score corporel de 5 ou 4 est optimal selon le gabarit de la chienne tandis qu'à partir de 6, un excès pondéral est considéré. La variation de NEC au cours de la gestation a également été prise en compte en différenciant les chiennes ayant perdu en état corporel entre 28 et 56 jours de gestation (« Perte d'état corporel ») et celles étant restées stables ou ayant gagné en état corporel (« État corporel stable ou augmenté »). Aucune recommandation n'est disponible concernant l'évolution de la NEC de la chienne pendant la gestation et la lactation contrairement au poids (Smith, 2011). Celui-ci a été relevé chez les chiennes le jour de l'ovulation, à 28 jours de gestation, à 56 jours de gestation et au premier jour post-partum. Néanmoins, la redondance avec l'information apportée par le format racial et l'effectif de notre population ont justifié l'abandon de cette variable dans notre étude.

Concernant la taille de portée (c'est-à-dire le nombre de chiots nés), trois catégories de chiots ont été distinguées en rapportant la taille de portée au format racial des chiennes de l'élevage (*tableau 2*). Les seuils de nombre de chiots correspondent aux premier et quatrième quartiles des tailles de portée pour chaque format.

**Tableau 2 : Nombre de chiots nés définissant les catégories de taille de portée rapportée au format racial des chiennes**

Format racial	Petite portée	Moyenne portée	Grande portée
M	$\leq 5$ chiots	$> 5$ et $\leq 8$ chiots	$> 8$ chiots
L	$\leq 6$ chiots	$> 6$ et $\leq 9$ chiots	$> 9$ chiots

M = format racial Medium ; L = format racial Large

De plus, trois groupes de chiennes ont été formés selon leur âge au moment de l'ovulation : celles ayant strictement « moins de 3 ans », celles « entre 3 et 4 ans » et celles de « plus de 4 ans ». La parité des chiennes a été relevée mais du fait d'une corrélation forte avec l'âge, elle n'a pas été étudiée.

Enfin, la durée de gestation des chiennes a également été collectée mais elle a ensuite été délaissée dans notre analyse statistique, l'effectif de notre population et les différences de durée de gestation étant trop faibles.

## **2. Chiots**

Concernant les chiots, leur sexe a été enregistré à la naissance.

Leur viabilité a été étudiée à travers le poids de naissance mesuré dans les 12 premières heures après la mise-bas grâce à une balance digitale (EB3 Series, Ohaus, Parsippany, NJ, États-Unis, capacité maximale de 5 kg, précision  $\pm 0,1$  gramme). Afin de pallier la variabilité du poids de naissance entre les races (Mugnier et al., 2019), les chiots ont été classés en 3 groupes selon le premier et le quatrième quartiles des poids de naissance rapportés à la race. Ainsi, les chiots à « petit poids de naissance » sont ceux dont le poids de naissance est inférieur ou égal au premier quartile de la race. Les chiots à « moyen poids de naissance » ont un poids de naissance compris entre le premier quartile et le quatrième quartile inclus. Enfin, les chiots à « grand poids de naissance » pèsent plus lourd que le quatrième quartile exclu. Les valeurs de quartiles pour chaque race ont été définies sur la base de 4010 poids de naissance enregistrés dans l'élevage sur sept ans. Une corrélation forte entre la supplémentation en SB et le poids de naissance a justifié que ce paramètre ne soit pas étudié par la suite.

Grâce à une pesée journalière des nouveaux-nés, le taux de croissance de chaque chiot entre 0 (JPP0) et 2 (JPP2) jours de vie (Croissance<sub>0-2</sub>) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Croissance}_{0-2} (\%) = (\text{Poids (kg)} \text{ à JPP2} - \text{Poids (kg)} \text{ à JPP0}) / \text{JPP0 (kg)} \times 100$$

Ce paramètre est une approximation de la quantité de colostrum ingérée par chaque chiot.

### **D- Prélèvements**

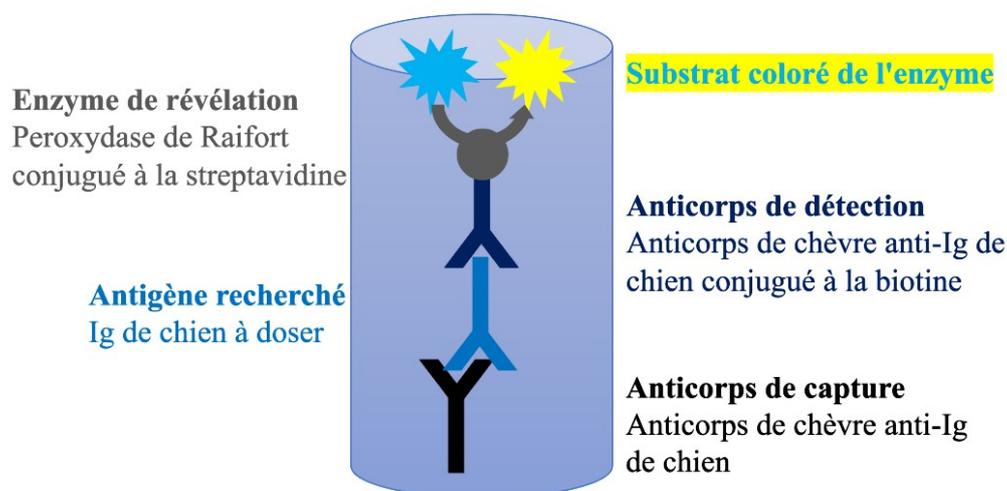
Le sang des chiennes (4 mL) a été prélevé à J28 et à J56 de gestation au niveau de la veine céphalique et collecté dans un tube sec. Dans les 30 minutes suivant le prélèvement, le tube a été centrifugé (16 000 RCF pendant 10 minutes) pour isoler le sérum. Ensuite, 500  $\mu$ L de sérum ont été transférés dans un tube Eppendorf® conservé à - 20°C jusqu'à la date des analyses.

Le sérum des chiots a été recueilli selon le même procédé 2 jours après la mise-bas. Le sang (1 mL) a cette fois-ci été prélevé à la veine jugulaire puis 100  $\mu$ L de sérum ont été conservés à - 20°C dans un tube Eppendorf®.

Concernant les sécrétions lactées, elles ont été prélevées entre 24 et 48 heures (colostrum) après la parturition dont l'heure est fixée au moment d'expulsion du premier chiot et 7 jours après la mise-bas (lait). Les échantillons de lait de 2 chiennes n'ont pas été disponibles du fait d'une quantité de lait insuffisante. Ainsi, le lait de 34 chiennes a été étudié. Tous les prélèvements ont été précédés d'une injection d'ocytocine (OCYTOVEM®, 10 UI/mL, (CEVA Santé animale, Libourne, France)) de 0,3-0,6 mL en intramusculaire dans la cuisse pour faciliter la collecte des sécrétions lactées. En attendant que l'ocytocine fasse effet, chaque mamelle a été lavée et désinfectée à la chlorhexidine savon. Afin que les échantillons soient représentatifs des sécrétions lactées produites par une chienne donnée, 0,2 mL de sécrétions ont été récupérés dans un tube Eppendorf® pour chacune des 10 mamelles afin d'avoir un total de 2 mL de sécrétions lactées par chienne. Les tubes ont été ensuite identifiés puis congelés à - 20°C jusqu'aux analyses.

### **E- Dosage des immunoglobulines**

Les immunoglobulines des sécrétions lactées et du sérum des chiennes et des chiots ont été dosées grâce à la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) « sandwich » (figure 5) au sein de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.



**Figure 5 : Schéma des réactions moléculaires lors d'ELISA « sandwich »**  
Ig = immunoglobuline

Seules les IgG ont été dosées dans le sérum des chiennes et de leurs chiots. Les dosages d'IgG et d'IgA ont été réalisés dans le colostrum et uniquement les IgA ont été dosées dans le lait. Ce choix de doser uniquement les IgA du lait a été motivé par la très faible concentration en IgG dans le lait mature de chienne (Schäfer-Somi et al., 2005 ; Chastant-Maillard et al., 2010).

Deux kits ELISA ont été utilisés dans notre étude : « Dog IgG ELISA Kit », Bethyl Laboratories (Montgomery, USA) et « Dog IgA ELISA Kit » (même fournisseur).

Le protocole complet des dosages est fourni en annexe 5.

### **1. Protocole de dosage**

#### **◆ Préparation des échantillons et de la gamme-étalon**

Les échantillons de sérum, de colostrum et de lait ont d'abord été décongelés pendant 30 minutes à température ambiante. Chaque tube de colostrum et de lait a ensuite nécessité une centrifugation de 30 minutes à 2000G à 4°C pour permettre une bonne séparation des phases. Puis, selon la matrice à analyser, les échantillons ont été dilués grâce au dilueur disponible dans le kit (*tableau 3*). Si après la lecture de la plaque ELISA, certains échantillons ont été trop ou pas assez dilués, un nouveau dosage est effectué avec une dilution adaptée.

**Tableau 3 : Dilutions des échantillons appliquées dans notre étude**

Nature des échantillons	Dilution IgG	Dilution IgA
Colostrum	1/500 000	1/25 000
Lait		1/25 000
Sérum des chiennes	1/100 000*	
Sérum des chiots	1/50 000**	

\* sauf un échantillon dilué au 1/500 000

\*\* sauf deux échantillons dilués au 1/25 000

En parallèle, la gamme-étalon a été réalisée à partir d'un sérum de référence dont la concentration en immunoglobulines est de 1000 ng/mL. Sept tubes ont ensuite été préparés en diluant au tiers jusqu'à 0 ng/mL.

◆ **Dépôt des échantillons et des standards sur la plaque**

Chaque échantillon a été déposé sur la plaque ELISA et dosé en duplicata. Deux colonnes ont été réservées pour le standard (*tableau 4*). La plaque a incubé ensuite 1 heure à 22°C.

**Tableau 4 : Répartition des échantillons et des standards sur une plaque ELISA**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Ech 1	Ech 1	Ech 9	Ech 9	Ech 17	Ech 17	Ech 25	Ech 25	Ech 33	Ech 33	1000 ng/ml	1000 ng/ml
<b>B</b>	Ech 2	Ech 2	Ech 10	Ech 10	Ech 18	Ech 18	Ech 26	Ech 26	Ech 34	Ech 34	333,3 ng/ml	333,3 ng/ml
<b>C</b>	Ech 3	Ech 3	Ech 11	Ech 11	Ech 19	Ech 19	Ech 27	Ech 27	Ech 35	Ech 35	111,1 ng/ml	111,1 ng/ml
<b>D</b>	Ech 4	Ech 4	Ech 12	Ech 12	Ech 20	Ech 20	Ech 28	Ech 28	Ech 36	Ech 36	37,0 ng/ml	37,0 ng/ml
<b>E</b>	Ech 5	Ech 5	Ech 13	Ech 13	Ech 21	Ech 21	Ech 29	Ech 29	Ech 37	Ech 37	12,3 ng/ml	12,3 ng/ml
<b>F</b>	Ech 6	Ech 6	Ech 14	Ech 14	Ech 22	Ech 22	Ech 30	Ech 30	Ech 38	Ech 38	4,11 ng/ml	4,11 ng/ml
<b>G</b>	Ech 7	Ech 7	Ech 15	Ech 15	Ech 23	Ech 23	Ech 31	Ech 31	Ech 39	Ech 39	1,37 ng/ml	1,37 ng/ml
<b>H</b>	Ech 8	Ech 8	Ech 16	Ech 16	Ech 24	Ech 24	Ech 32	Ech 32	Ech 40	Ech 40	0 ng/ml	0 ng/ml

Ech = échantillon

Les colonnes 11 et 12 sont réservées à la gamme-étalon.

◆ **Lavage**

Après avoir vidé la plaque, quatre lavages ont été effectués grâce à un automate laveur de microplaques 50™ TS Washer (BioTek® ; Winooski, USA). La solution utilisée pour le lavage a été celle reconstituée à partir du kit ELISA fourni par Bethyl®. Enfin, la plaque a été tapotée sur du papier absorbant pour éliminer les gouttes restantes. Toutes les étapes de lavage ont été identiques.

◆ **Dépôt des anticorps de détection**

La solution d'anticorps de détection fournie dans le kit ELISA Bethyl® a été déposée dans chaque puits. L'incubation a duré 1 heure à 22°C.

◆ **Lavage**

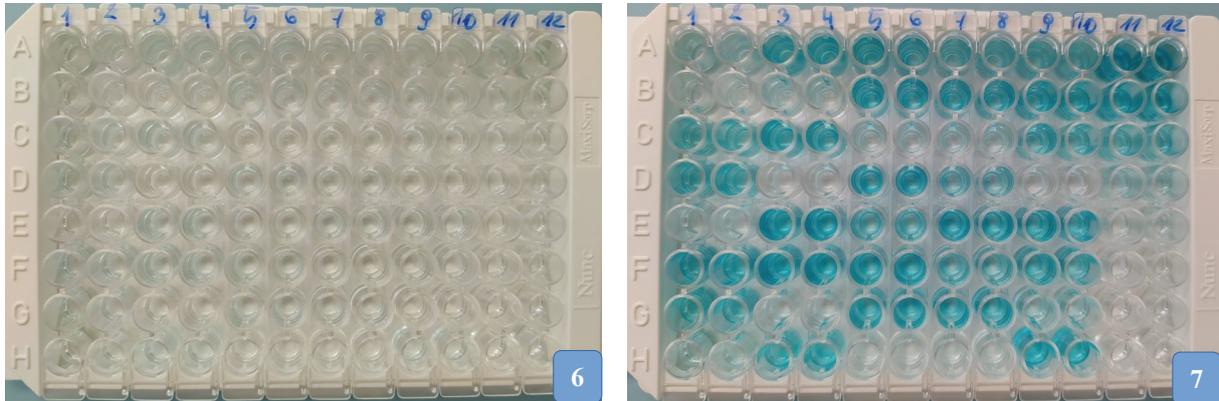
◆ **Dépôt de l'enzyme de révélation**

La solution A HRP (horseradish peroxidase) fournie dans le kit a été déposée sur la plaque et laissée à incuber 30 minutes à 22°C.

◆ **Lavage**

### ◆ Révélation

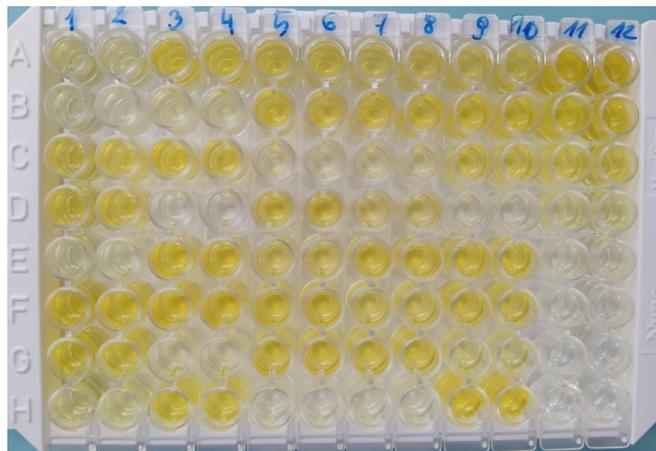
La solution TMB a été déposée dans chaque puits. La révélation a duré 30 minutes, à 22°C, dans le noir. Les figures 6 et 7 montrent une plaque ELISA au début et à la fin du temps de révélation.



**Figures 6 et 7 : Photographies d'une plaque ELISA au début (6) et à la fin (7) du temps de révélation**

### ◆ Arrêt de la révélation

La réaction enzymatique a été stoppée par ajout de 100  $\mu$ L d'acide sulfurique dans chaque puits (*figure 8*).



**Figure 8 : Photographie d'une plaque ELISA après arrêt de la révélation à l'acide sulfurique**

### ◆ Lecture des résultats

L'absorbance de chaque puits a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre (VersaMax™ ELISA Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) dont le laser émet à une longueur d'onde de 450 nm.

Le logiciel Softmax® (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) a permis d'établir l'équation reliant les densités optiques obtenues par le spectrophotomètre aux concentrations en immunoglobulines des échantillons. La gamme-étalon dont la concentration est connue a permis de calculer cette équation (*annexe 6*).

## 2. Répétabilité de la méthode

Le coefficient de variation (CV) intraplaque (la moyenne des coefficients de variation d'une même plaque) et le coefficient de variation interplaque pour une immunoglobuline dosée donnée (la moyenne des coefficients de variation du standard des différentes plaques utilisées pour doser les IgA ou les IgG) ont été calculés grâce au logiciel LibreOffice Calc® (The Document Foundation, Berlin, Allemagne) afin de s'assurer de la répétabilité de la méthode (tableau 5).

**Tableau 5 : Coefficients de variation des plaques ELISA**

Coefficients de variation	Echantillon	IgG	IgA
CV intraplaque (%)	Colostrum	4,5	3,7
	Lait		4,8
	Sérum chiennes J28	11,3 <sup>1</sup>	
	Sérum chiennes J56	13,5 <sup>2</sup>	
	Sérum chiots	Entre 4,1 et 17,4 <sup>3</sup>	
CV interplaque (%)		14,1 <sup>4</sup>	10,7 <sup>4</sup>

<sup>1</sup> : Ce coefficient correspond à la moyenne des CV des standards allant de 1000 ng/mL à 111,1 ng/mL de la plaque ayant permis de doser les IgG dans le sérum des chiots. Les CV des standards inférieurs n'ont pas été pris en compte car trop élevés. Néanmoins, toutes les valeurs d'IgG dans le sérum des chiots sont supérieures à 111,1 ng/mL.

<sup>2</sup> : Une seule moyenne de standard (12,3 ng/mL) est disponible sur cette plaque.

<sup>3</sup> : 6 plaques ont été nécessaires pour doser les IgG dans le sérum des 254 chiots.

<sup>4</sup> : Ces coefficients correspondent à la moyenne des CV des standards allant de 1000 ng/mL à 4,11 ng/mL des plaques ayant permis de doser les IgA et les IgG dans les différentes matrices. Le CV du dernier standard (1,37 ng/mL) n'a pas été pris en compte car trop élevé. Néanmoins, toutes les valeurs dans notre étude sont comprises dans la gamme de concentrations [4,11 - 1000] ng/mL.

## E- Analyses statistiques

Chaque échantillon étant dosé deux fois, la concentration en immunoglobulines pour un animal donné correspond à la moyenne des deux concentrations calculées. Elle est exprimée sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type et a été calculée grâce au logiciel LibreOffice Calc®. Toutes les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés grâce à la version 4.1.0 du logiciel RStudio (Boston, USA).

### 1. Analyse statistique univariée

L'homogénéité des deux groupes de chiennes « Témoin » et « Levure » en terme de concentration sérique en IgG à J28, avant le début de la supplémentation au 30ème jour de

gestation, a été vérifiée avec un test paramétrique de Student. Au préalable, la normalité de la distribution des données et l'homogénéité des variances ont été analysées respectivement à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk et d'un test F. Un test de Student apparié a été effectué afin de comparer les concentrations en IgG dans le sérum des chiennes entre le 28ème jour et le 56ème jour de gestation. Les concentrations en IgA entre le colostrum et le lait ont, quant à elles, été comparées par un test de Wilcoxon apparié, la normalité n'étant pas respectée.

Les corrélations entre les concentrations en immunoglobulines revêtant un intérêt biologique ont été évaluées grâce au coefficient de Kendall ( $\tau$ ) et au coefficient de Pearson ( $r$ ), seule la valeur la plus élevée entre ces deux coefficients a été conservée.

## **2. Analyse statistique multivariée**

### **a) Choix des variables d'intérêt**

Afin d'étudier l'influence de la supplémentation en levure sur les concentrations en immunoglobulines dans le sérum, le colostrum et le lait des chiennes, et dans le sérum des chiots, plusieurs variables d'intérêt ont été prises en compte. Avant de construire nos modèles statistiques, il a fallu vérifier l'indépendance entre ces paramètres. Les corrélations entre des variables quantitatives ont ainsi été évaluées grâce au tau de Kendall ( $\tau$ ) et au coefficient de Pearson ( $r$ ), en conservant le coefficient le plus élevé. De plus, des tests du Chi<sup>2</sup>, de Student et des ANOVA ont été effectués selon la nature des variables confrontées (facteur/facteur ou facteur/régresseur) et selon le nombre de niveaux des facteurs.

### **b) Modèles statistiques**

Pour les chiennes comme pour les chiots, la construction des modèles a d'abord été faite avec des effets simples, selon une approche en avant et pas à pas en s'appuyant sur le Critère d'Information d'Akaike (AIC) afin de sélectionner le modèle le plus parcimonieux. Les interactions biologiquement intéressantes ont ensuite été testées : si elles étaient significatives ou si les effets simples inclus dans les termes de l'interaction étaient significatifs, alors elles étaient conservées.

Six modèles statistiques s'appuyant sur des analyses de covariance (ANCOVA) (package *car*) ont été réalisés pour observer les effets de la supplémentation en SB et des autres variables d'intérêt biologiques sur les concentrations en immunoglobulines dans les différents échantillons prélevés chez les chiennes. Trois modèles ont été construits afin d'étudier la concentration en IgG dans le sérum des chiennes à J28 de gestation, à J56 de gestation et la cinétique de la concentration sérique en IgG entre ces deux dates (*tableau 6*).

**Tableau 6 : Modèles statistiques appliqués aux concentrations en IgG dans le sérum des chiennes**

Population	Variables de sortie	Variables explicatives	Variables explicatives du modèle final
Chiennes	IgG sériques J28	<b>Facteurs :</b> - Format racial - Taille de la portée - NEC J28  <b>Régresseur :</b> - Âge	<b>Facteurs :</b> - Format racial - Taille de la portée  <b>Régresseur :</b> - Âge
	IgG sériques J56	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J56  <b>Régresseur :</b> - Âge	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée  <b>Régresseur :</b> - Âge  <b>Interaction :</b> - Supplémentation et taille de portée
	Différence IgG sériques entre J28 et J56	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J28 - Différence de NEC entre J28 et J56  <b>Régresseur :</b> - Âge	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - Différence de NEC entre J28 et J56  <b>Régresseur :</b> - Âge  <b>Interactions :</b> - Supplémentation et format racial - Supplémentation et différence de NEC entre J28 et J56 - Supplémentation et taille de portée

Les trois autres modèles s'intéressent aux concentrations en IgG dans le colostrum, et en IgA dans le colostrum et dans le lait (*tableau 7*). Une transformation au logarithme a été nécessaire pour obtenir une distribution normale des concentrations en IgG et en IgA dans le colostrum.

**Tableau 7 : Modèles statistiques appliqués aux concentrations en immunoglobulines dans les sécrétions lactées des chiennes**

Population	Variables de sortie	Variables explicatives	Variables explicatives du modèle final
Chiennes	IgG colostrum (log)	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J56  <b>Régresseur :</b> - Âge	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial  <b>Régresseur :</b> - Âge
	IgA colostrum (log)	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J56  <b>Régresseur :</b> - Âge	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial  <b>Régresseur :</b> - Âge
	IgA lait	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J56  <b>Régresseur :</b> - Âge	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - NEC J56  <b>Régresseur :</b> - Âge

Concernant les chiots, notre analyse statistique a porté sur les facteurs de variation (la supplémentation en levure comprise) d'une variable quantitative continue, en l'occurrence la concentration sérique en IgG à 2 jours de vie, et d'une variable qualitative à deux niveaux qu'est la mise en évidence d'un déficit de TIP (c'est-à-dire une concentration sérique en IgG inférieure à 2,3 g/L deux jours post-partum (Mila et al., 2014)) ou non (*tableau 8*). Un modèle linéaire mixte a donc été réalisé pour étudier la concentration sérique en IgG des chiots tandis qu'un modèle linéaire mixte généralisé a été nécessaire pour analyser le déficit de TIP. Dans les deux cas, le package *lmerTest* sur RStudio a été employé avec l'identification de la chienne en tant qu'effet aléatoire. Le taux de croissance entre 0 et 2 jours étant corrélé à la concentration en IgG dans le sérum des chiots, le modèle linéaire mixte a été pondéré par ce paramètre. Enfin, une transformation au logarithme a été requise pour respecter la normalité de la distribution des concentrations en IgG dans le sérum des nouveaux-nés.

**Tableau 8 : Modèles statistiques appliqués aux concentrations en IgG dans le sérum des chiots**

Population	Variables de sortie	Variables explicatives	Variables explicatives du modèle final	
Chiots	IgG sérique (log)	<b>Effets fixes</b>	<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial  <b>Interaction :</b> - Supplémentation et format racial	
		<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J56 - Sexe  <b>Régresseur :</b> - Âge - IgG colostrum - IgG sériques J56		
		<b>Effets aléatoires</b>		
		- Mère - Croissance <sub>0_2</sub>		
	Déficit de TIP ou non	<b>Effets fixes</b>		<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial  <b>Régresseur :</b> - IgG colostrum - IgG sériques J56  <b>Interaction :</b> - Supplémentation et format
		<b>Facteurs :</b> - Supplémentation - Format racial - Taille de la portée - NEC J56 - Sexe  <b>Régresseur :</b> - Âge - IgG colostrum - IgG sériques J56		
		<b>Effet aléatoire</b>		
		- Mère		

Les hypothèses de normalité et d’homoscédasticité des modèles statistiques de notre étude ont été vérifiées par des graphiques représentant la normalité et les nuages de points des résidus excepté pour le modèle généralisé linéaire mixte pour lequel les vérifications ont été effectuées grâce au package *DHARMA*.

Un résultat est considéré comme significatif lorsque la *p-value* (p) est inférieure à 0,05. En cas de différences significatives entre des groupes, les valeurs sont comparées avec un test de Tuckey (package *multcompView*) sauf pour les comparaisons de moyennes du modèle linéaire mixte généralisé pour lesquelles la fonction *emmeans* du package *emmeans* a été utilisée. Les tendances avec une *p-value* inférieure à 0,1 ont été conservées dans notre étude.

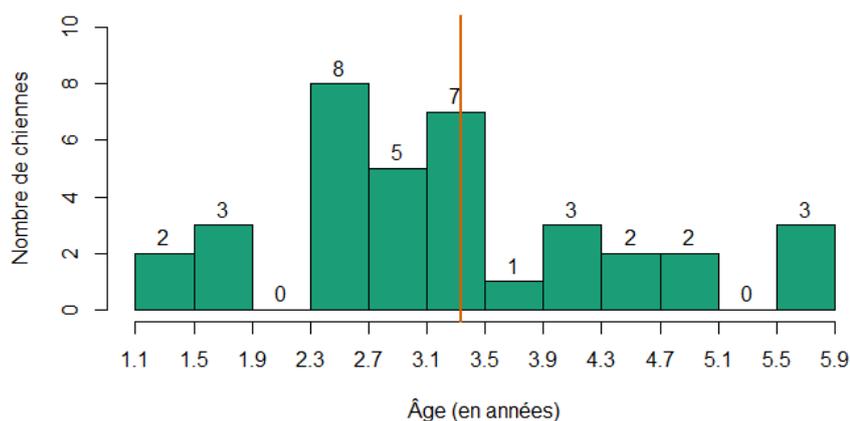
### **III. Résultats**

#### **A- Description de la population**

##### **1. Chiennes**

Parmi les 36 chiennes faisant partie de notre étude, 27 étaient de format racial L et 9 de format racial M. Les chiennes appartenaient à 9 races différentes : Berger Allemand, Berger Australien, Berger Blanc Suisse, Bouvier Bernois, Boxer, Dalmatien, Golden Retriever, Labrador Retriever et Montagne des Pyrénées.

L’âge moyen était de  $3,3 \pm 1,2$  ans, avec la plus jeune chienne âgée de 1,1 an et la plus vieille de 5,9 ans (*figure 9*).

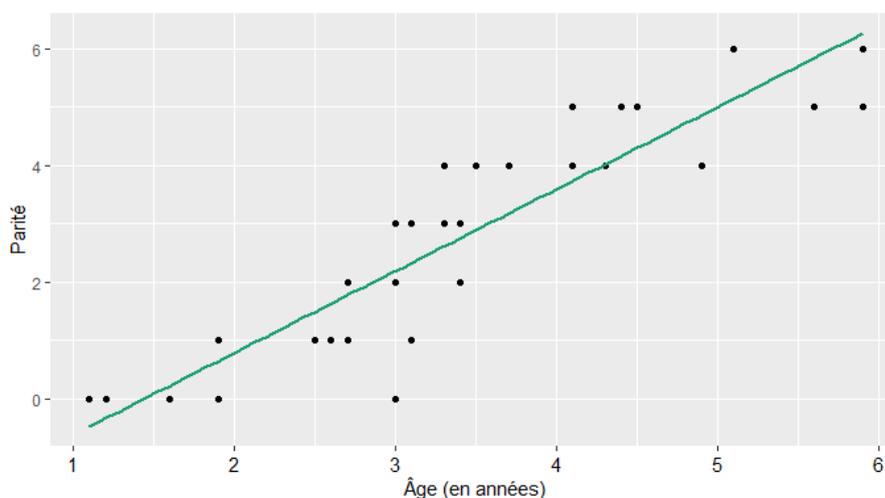


**Figure 9 : Répartition des chiennes selon leur âge (en années) au moment de l’ovulation (N=36)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

La parité moyenne était de  $2,7 \pm 1,9$  avec 5 chiennes nullipares et 31 chiennes multipares.

Une corrélation linéaire forte entre l'âge et la parité des chiennes a été observée dans notre population ( $r = 0,9$  ;  $p < 0,001$ ) (figure 10). Ainsi, nous avons décidé de nous intéresser uniquement à l'influence de l'âge sur les concentrations en immunoglobulines.



**Figure 10 : Corrélation linéaire entre l'âge (en années) et la parité des chiennes (N=36)**  
( $r = 0,9$  ;  $p < 0,001$ )

A 28 jours de gestation, les chiennes avaient une NEC moyenne de  $5,1 \pm 1,1$  contre une NEC moyenne de  $4,9 \pm 1,2$  à 56 jours de gestation. Douze d'entre elles ont perdu en état corporel entre J28 et J56 de gestation, 19 sont restées stables et un gain d'état corporel a été constaté pour 5 d'entre elles.

En moyenne  $7,9$  chiots  $\pm 1,9$  composaient les portées, avec un intervalle allant de 4 à 11 chiots par portée. Au total, 16,7% (6/36) des chiennes avaient donné naissance à une portée de petite taille, 61,1% (22/36) à une portée de taille moyenne, et 22,2 % (8/36) à une portée de grande taille.

La moitié des chiennes (50,0 % ; 18/36) était allouée au groupe « Levure », et l'autre moitié au groupe « Témoin ». Au moment de l'inclusion dans l'étude (J28 de gestation), les deux groupes avaient été équilibrés en fonction du format racial, de la NEC et de l'âge (tableau 9).

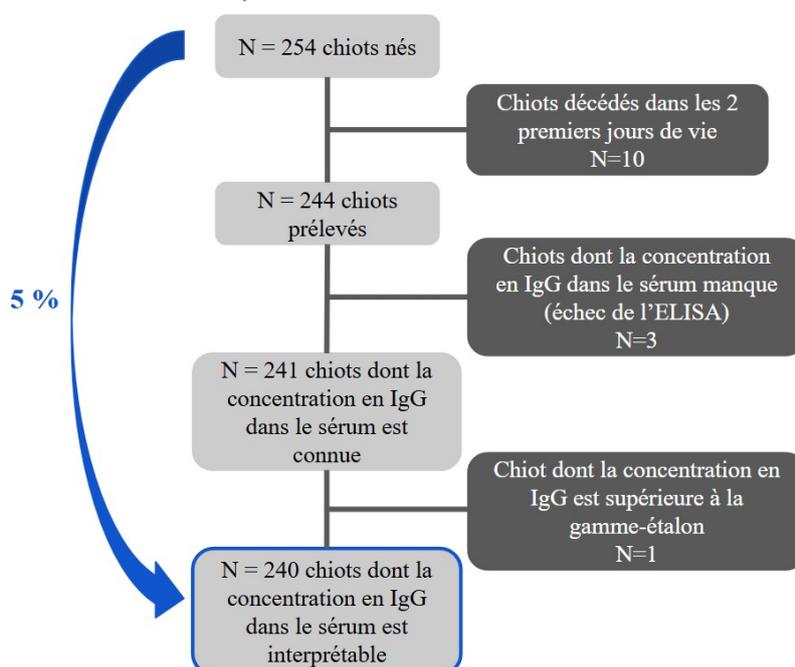
**Tableau 9 : Caractéristiques des groupes de chiennes « Témoin » et « Levure » (N=36)**

		Témoin (N=18)	Levure (N=18)	
<b>Format racial</b>	M (N=9)	N=4 Berger Australien (N=4)	N=5 Berger Australien (N=4), Dalmatien (N=1)	
	L (N=27)	N=14 Berger Allemand (N=1), Berger Blanc Suisse (N=1), Bouvier Bernois (N=4), Golden Retriever (N=2), Labrador Retriever (N=4), Montagne des Pyrénées (N=2)	N=13 Berger Blanc Suisse (N=2), Bouvier Bernois (N=2), Boxer (N=1), Golden Retriever (N=6), Labrador Retriever (N=2)	
<b>NEC</b>	J28	En surpoids (N=12)	N=6 NEC 6 (N=4), NEC 7 (N=1), NEC 8 (N=1)	N=6 NEC 6 (N=5), NEC 7 (N=1)
		Absence de surpoids (N=24)	N=12 NEC 4 (N=5), NEC 5 (N=7)	N=12 NEC 3 (N=3), NEC 4 (N=3), NEC 5 (N=6)
	J56	En surpoids (N=9)	N=4 NEC 6 (N=2), NEC 7 (N=1), NEC 8 (N=1)	N=5 NEC 6 (N=4), NEC 7 (N=1)
		Absence de surpoids (N=27)	N=14 NEC 4 (N=5), NEC 5 (N=9)	N=13 NEC 3 (N=5), NEC 4 (N=3), NEC 5 (N=5)
	J28-J56	Perte d'état corporel (N=12)	N=5 (NEC -1)	N=7 (NEC -1)
		Etat corporel stable ou augmenté (N=24)	N=13 NEC stable (N=10), NEC +1 (N=3)	N=11 NEC stable (N=9), NEC +1 (N=2)
<b>Taille de la portée</b>	Petite (N=6)	N=3 5 chiots (N=3)	N=3 4 chiots (N=2), 5 chiots (N=1)	
	Moyenne (N=22)	N=13 7 chiots (N=3), 8 chiots (N=5), 9 chiots (N=5)	N=9 6 chiots (N=1), 7 chiots (N=4), 8 chiots (N=1), 9 chiots (N=3)	
	Grande (N=8)	N=2 10 chiots (N=1), 11 chiots (N=1)	N=6 9 chiots (N=1), 10 chiots (N=4), 11 chiots (N=1)	
<b>Âge</b>	Moins de 3 ans (N=13)	N=5 1.2 (N=1), 2.5 (N=1), 2.6 (N=2), 2.7 (N=1)	N=8 1.1 (N=1), 1.6 (N=1), 1.9 (N=2), 2.5 (N=1), 2.7 (N=3)	
	Entre 3 et 4 ans (N=12)	N=7 3.0 (N=2), 3.3 (N=2), 3.4 (N=2), 3.7 (N=1)	N=6 3.0 (N=1), 3.1 (N=2), 3.4 (N=1), 3.5 (N=2)	
	Plus de 4 ans (N=10)	N=6 4.3 (N=1), 4.4 (N=1), 4.5 (N=1), 4.9 (N=1), 5.6 (N=1), 5.9 (N=1)	N=4 4.1 (N=2), 5.1 (N=1), 5.9 (N=1)	

N = effectif

## 2. Chiots

Sur les 254 chiots nés vivants, 240 ont été étudiés dans la suite de notre travail (*figure 11*).



**Figure 11 : Diagramme de flux de la population des chiots**

Environ 25% des chiots étaient de format racial M (61/240), le reste des chiots appartenant à des chiennes de format racial L (179/240).

Plus d'un quart des chiots (26,3 % ; 63/240) étaient nés de chiennes « en surpoids » à 56 jours de gestation alors que près de trois quarts d'entre eux (73,8 % ; 177/240) étaient issus de chiennes avec une NEC strictement inférieure à 6 à cette date.

Au total, 14,2 % des nouveaux-nés (34/240) faisaient partie d'une petite portée, 72,5 % (174/240) d'une portée de taille moyenne et 13,3 % (32/240) appartenaient à une grande portée.

Concernant le sexe des chiots, 131 étaient des femelles, les 109 autres étant des mâles.

Parmi les nouveaux-nés suivis, 23,8 % (57/240) présentaient un petit poids de naissance, 55,4 % (133/240) un poids de naissance moyen, et 20,8 % (50/240) un grand poids de naissance.

Le taux de croissance moyen des chiots entre 0 et 2 jours de vie était de 7,9 %  $\pm$  10,0 % avec 56 chiots (23,3%) ayant perdu en poids sur cette période, 10 (4,2%) étant restés stables et 174 (72,5%) ayant gagné en poids. Une corrélation positive a été observée entre le taux de croissance des chiots jusqu'à deux jours après la mise-bas et la variable d'étude qu'est la concentration sérique en IgG ( $\tau = 0,46$ ,  $p < 0,001$ ) : le modèle linéaire mixte s'intéressant à cette concentration a donc été pondéré par le taux de croissance des chiots.

Les chiots issus des chiennes du groupe « Témoin » étaient au nombre de 117 (48,8%) tandis que 123 chiots (51,3%) étaient nés de chiennes du groupe « Levure ». Les caractéristiques des nouveaux-nés appartenant aux chiennes « Témoin » et « Levure » sont décrites dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Caractéristiques des groupes de chiots « Témoin » et « Levure » (N=240)**

		Témoin (N=117)	Levure (N=123)
Format racial	M (N=61)	N=29 Berger Australien (N=29)	N=32 Berger Australien (N=25), Dalmatien (N=7)
	L (N=179)	N=88 Berger Allemand (N=5), Berger Blanc Suisse (N=4), Bouvier Bernois (N=28), Golden Retriever (N=13), Labrador Retriever (N=26), Montagne des Pyrénées (N=12)	N=91 Berger Blanc Suisse (N=7), Bouvier Bernois (N=15), Boxer (N=9), Golden Retriever (N=48), Labrador Retriever (N=12)
Taille de la portée	Petite (N=24)	N=13 5 chiots (N=13)	N=11 4 chiots (N=7), 5 chiots (N=4)
	Moyenne (N=152)	N=87 7 chiots (N=19), 8 chiots (N=30), 9 chiots (N=38)	N=65 6 chiots (N=6), 7 chiots (N=28), 8 chiots (N=8), 9 chiots (N=23)
	Grande (N=64)	N=17 10 chiots (N=10), 11 chiots (N=7)	N=47 9 chiots (N=8), 10 chiots (N=32), 11 chiots (N=7)
NEC J56 chienne	En surpoids (N=64)	N=31 NEC 6 (N=15), NEC 7 (N=8), NEC 8 (N=8)	N=33 NEC 6 (N=26), NEC 7 (N=7)
	Absence de surpoids (N=176)	N=86 NEC 4 (N=31), NEC 5 (N=55)	N=90 NEC 3 (N=32), NEC 4 (N=23), NEC 5 (N=35)
Poids de naissance	Petit (N=57)	N=40	N=17
	Moyen (N=133)	N=60	N=73
	Grand (N=50)	N=17	N=33
Sexe	Mâle (N=109)	N=57	N=52
	Femelle (N=131)	N=60	N=71
Croissance $_{0,2}$ (moyenne $\pm$ écart-type, %)		7,4 $\pm$ 11,1	8,4 $\pm$ 8,7

N = effectif

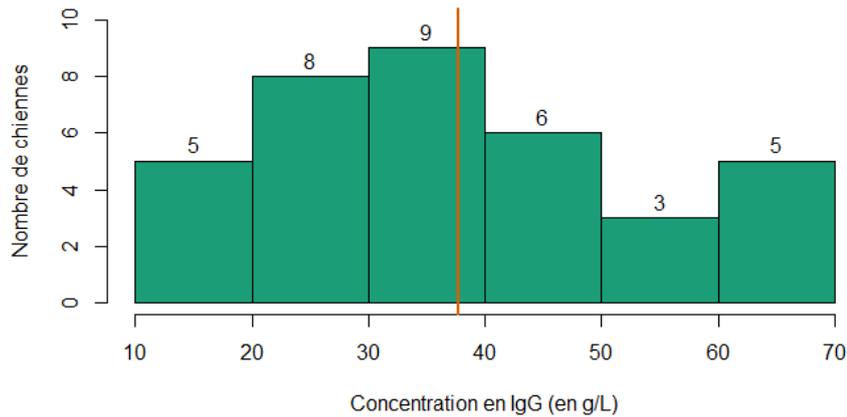
Dans notre étude, le poids de naissance des chiots s'est révélé associé à la supplémentation maternelle en SB : parmi les nouveaux-nés issus des chiennes du groupe « Levure », 7,1 % (17/240) présentaient un petit poids à la naissance contre 16,7 % (40/240) chez les chiots issus du groupe « Témoin » ( $p < 0,001$ ). Nous n'avons donc pas pu faire figurer le poids de naissance et la supplémentation en levure dans un même modèle statistique : l'influence de cette supplémentation étant le coeur de notre sujet, le poids de naissance n'est pas inclus dans l'analyse statistique multivariée.

## **B- Concentration en immunoglobulines**

### **1. IgG dans le sérum des chiennes**

#### **a) À 28 jours de gestation**

La moyenne de la concentration en IgG dans le sérum des 36 chiennes à 28 jours de gestation était de  $37,7 \pm 15,2$  g/L avec une valeur minimale de 14,3 g/L et une valeur maximale de 66,2 g/L. Près de 38,9 % des chiennes avaient une concentration sérique en IgG dépassant les 40 g/L (*figure 12*).

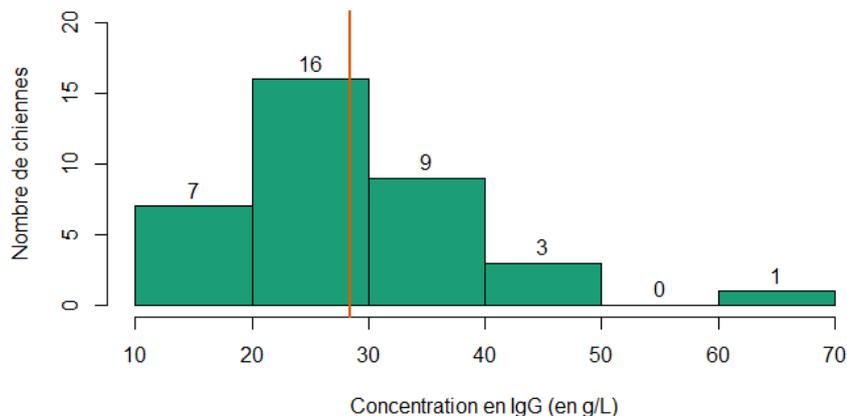


**Figure 12 : Répartition des chiennes selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum à 28 jours de gestation (N=36)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

#### **b) À 56 jours de gestation**

Dans les 36 échantillons de sérum à 56 jours de gestation, la moyenne de la concentration en IgG était de  $28,5 \pm 10,1$  g/L avec un minimum de 13,0 g/L et un maximum de 63,4 g/L. Environ 63,9 % des chiennes avaient une concentration en IgG dans leur sérum inférieure à 30 g/L (*figure 13*).

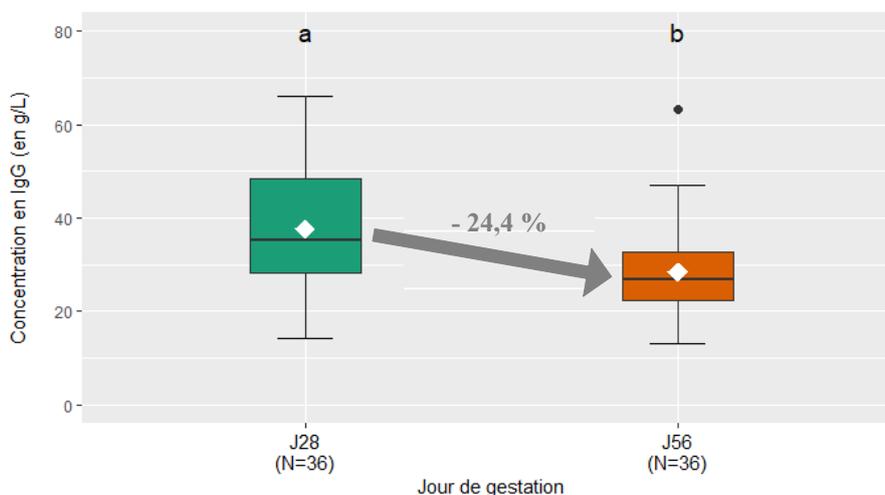


**Figure 13 : Répartition des chiennes selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum à 56 jours de gestation (N=36)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

### c) Évolution de la concentration sérique en IgG

D'après le test de Student apparié, la concentration sérique maternelle moyenne en IgG a chuté significativement de 24,4 % entre le 28ème et le 56ème jour de gestation passant de 37,7 g/L à 28,5 g/L ( $p < 0,001$  ; *figure 14*).



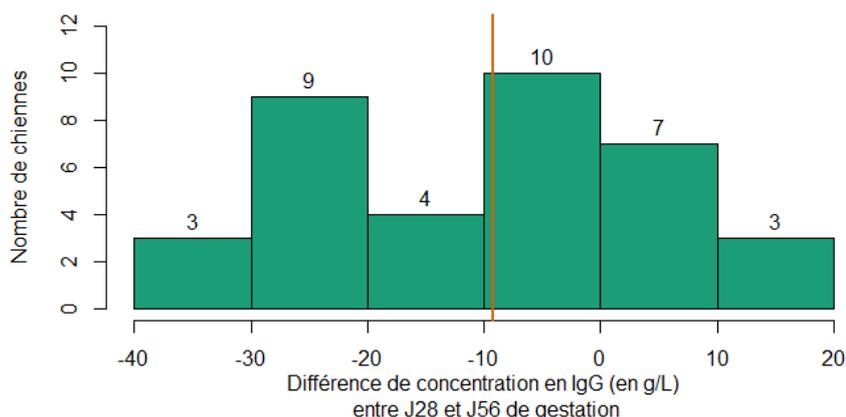
**Figure 14 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes au 28ème (J28) (N=36) et au 56ème (J56) (N=36) jour de gestation**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.

Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

La concentration sérique en IgG a diminué chez 72,2 % (26/36) des chiennes (*figure 15*) avec des différences de concentration entre le 28ème et le 56ème jours de gestation allant de - 38,5 g/L à + 15,8 g/L.



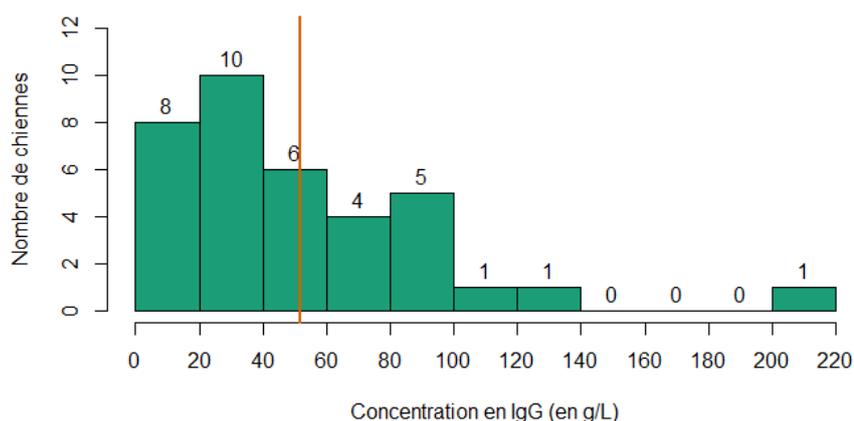
**Figure 15 : Répartition des chiennes selon la différence de concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum entre le 28ème (J28) et le 56ème (J56) jour de gestation (N=36)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

## 2. Immunoglobulines dans le colostrum

### a) IgG

Sur les 36 échantillons de colostrum, la moyenne de la concentration en IgG était de  $51,7 \pm 40,6$  g/L. Les valeurs de concentration en IgG dans le colostrum s'étendaient de 6,5 g/L à 201,7 g/L. La moitié des chiennes produisait un colostrum dont la concentration en IgG ne dépassait pas 40 g/L (*figure 16*). La valeur maximale de concentration en IgG dans le colostrum (201,7 g/L) étant aberrante, elle a été retirée de notre modèle statistique.

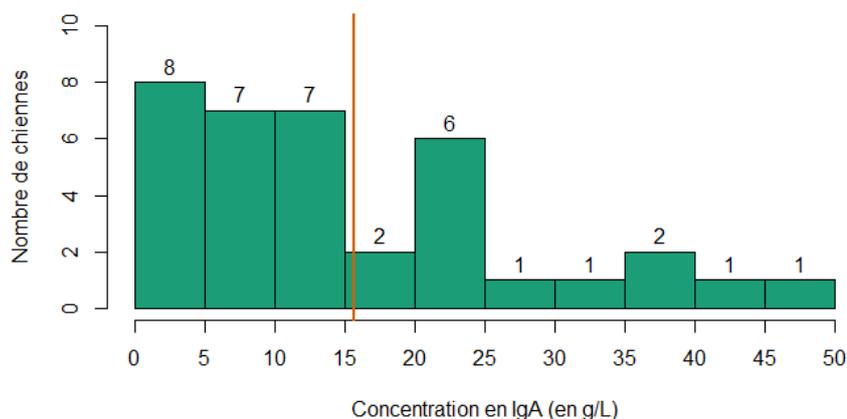


**Figure 16 : Répartition des chiennes selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur colostrum (N=36)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

### b) IgA

La moyenne de la concentration en IgA dans les 36 échantillons de colostrum était de l'ordre de  $15,7 \pm 12,1$  g/L. La plus petite valeur de concentration en IgA était de 1,7 g/L et le maximum était de 49,5 g/L. Environ 41,7 % des chiennes avaient une concentration en IgA dans leur colostrum inférieure à 10 g/L (*figure 17*).

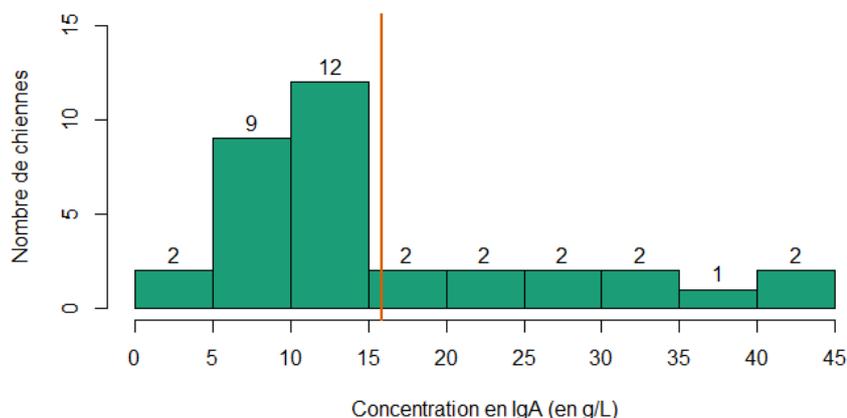


**Figure 17 : Répartition des chiennes selon la concentration en IgA (en g/L) dans leur colostrum (N=36)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

### 3. IgA dans le lait

La concentration moyenne en IgA dans les 34 échantillons de lait était de  $15,9 \pm 10,6$  g/L avec des valeurs allant de 3,6 g/L à 43,0 g/L. Près de 73,5 % des chiennes produisaient un lait dont la concentration en IgA était inférieure à 20 g/L (*figure 18*).

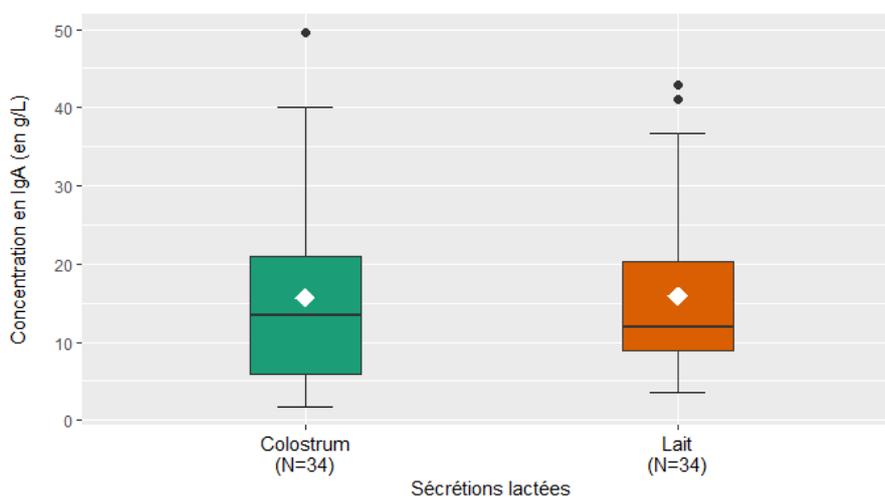


**Figure 18 : Répartition des chiennes selon la concentration en IgA (en g/L) dans leur lait (N=34)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

### 4. Évolution de la concentration en IgA dans les sécrétions lactées

Selon le test de Wilcoxon apparié, aucune différence n'a été observée concernant l'évolution de la concentration en IgA dans les sécrétions lactées entre le premier et le septième jour de lactation ( $p = 0,397$  ; *figure 19*).

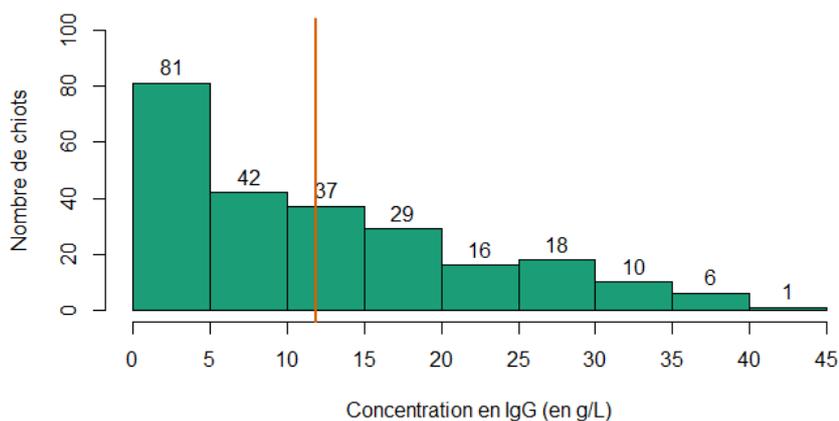


**Figure 19 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum (N=34) et le lait (N=34) des chiennes**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

## 5. IgG dans le sérum des chiots

La moyenne de la concentration en IgG dans le sérum des 240 chiots de notre étude était de  $11,9 \pm 10,2$  g/L. La concentration la plus basse atteignait 0,29 g/L tandis que la plus haute s'élevait à 43,5 g/L. Plus d'un tiers des chiots (33,4 %) avait une concentration sérique en IgG inférieure à 5 g/L (*figure 20*). Le nombre de chiots en déficit de TIP était de 57 sur 240 soit 23,8 %.



**Figure 20 : Répartition des chiots selon la concentration en IgG (en g/L) dans leur sérum (N=240)**

Le trait vertical orange représente la moyenne. La borne inférieure de chaque intervalle est exclue exceptée pour le premier intervalle.

### C- Corrélations entre les concentrations en immunoglobulines

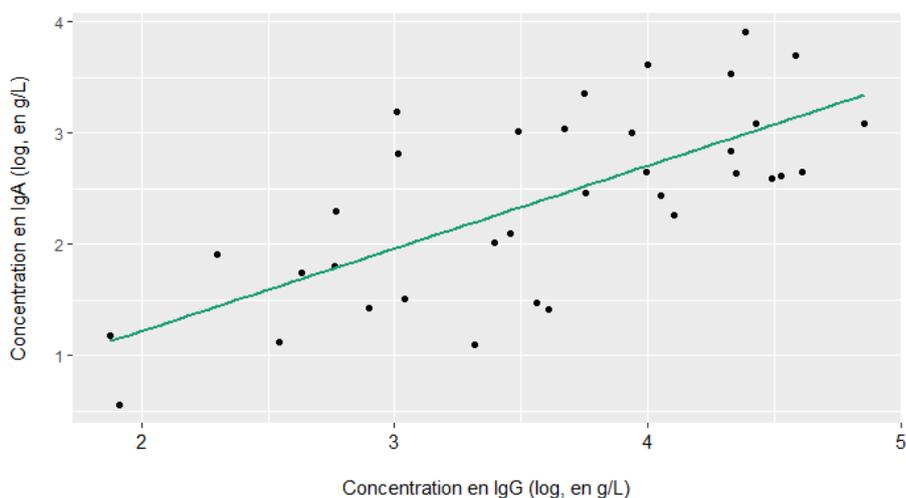
Les corrélations testées entre les concentrations en immunoglobulines dans les différentes matrices sont récapitulées dans le tableau 11. La corrélation entre les IgG du lait des chiennes et du sérum des chiots n'a pas été étudiée car elle est non pertinente du fait du prélèvement du lait 5 jours après le prélèvement du sérum des chiots.

**Tableau 11 : Corrélations entre les concentrations en immunoglobulines dans les différentes matrices**

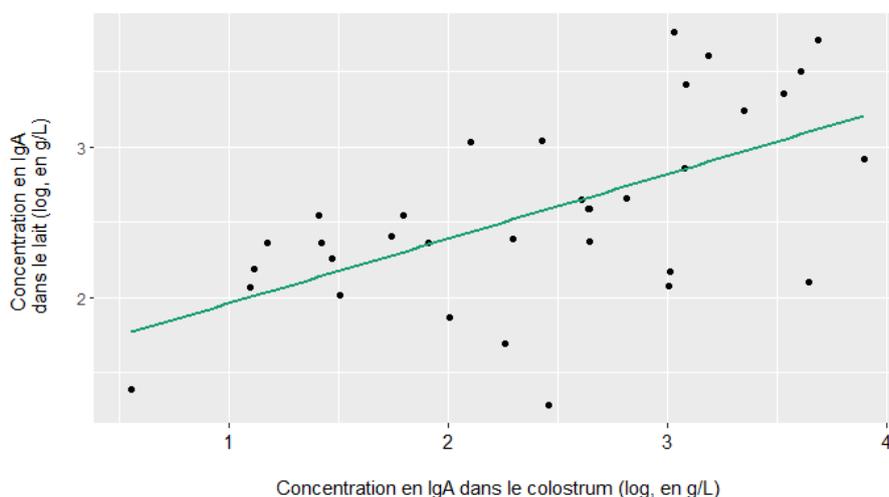
Concentration 1	Concentration 2	Test de corrélation	Valeur du coefficient	<i>p</i> -value (p)
IgG sérum chiennes J28	IgG sérum chiennes J56	Pearson	$r = 0,32$	
IgG sérum chiennes J28	IgG colostrum	Pearson	$r = 0,21$	
IgG sérum chiennes J56	IgG colostrum	Pearson	$r = 0,18$	
Différence IgG sérum chiennes J28-J56	IgG colostrum	Pearson	$r = -0,18$	
IgG colostrum <i>log</i>	IgA colostrum <i>log</i>	Pearson	$r = 0,55$ $r = 0,71$	<0,001 <0,001
IgA colostrum <i>log</i>	IgA lait <i>log</i>	Pearson	$r = 0,59$ $r = 0,60$	<0,001 <0,001
IgG sérum chiots	IgG sérum chiennes J28	Pearson	$r = 0,11$	
IgG sérum chiots	IgG sérum chiennes J56	Pearson	$r = -0,12$	
IgG sérum chiots	Différence IgG sérum chiennes J28-J56	Pearson	$r = -0,19$	
IgG sérum chiots	IgG colostrum	Kendall	$\tau = -0,12$	
IgG sérum chiots	IgA colostrum	Pearson	$r = -0,29$	

J28 : 28ème jour de gestation ; J56 : 56ème jour de gestation ; *log* : logarithme ; *r* : coefficient de Pearson ;  $\tau$  : coefficient de Kendall

Deux corrélations linéaires positives ont été mises en évidence entre les concentrations en IgG et en IgA dans le colostrum (*figure 21*), et entre les concentrations en IgA dans le colostrum et le lait (*figure 22*).



**Figure 21 : Corrélation linéaire entre la concentration en IgG (log, en g/L) et la concentration en IgA (log, en g/L) dans le colostrum (N=35)**  
( $r = 0,71$  ;  $p < 0,001$ )



**Figure 22 : Corrélation linéaire entre la concentration en IgA (log, en g/L) dans le colostrum et la concentration en IgA (log, en g/L) dans le lait (N=34)**  
( $r = 0,60$  ;  $p < 0,001$ )

## **D- Effets de la supplémentation en levure sur les concentrations en immunoglobulines**

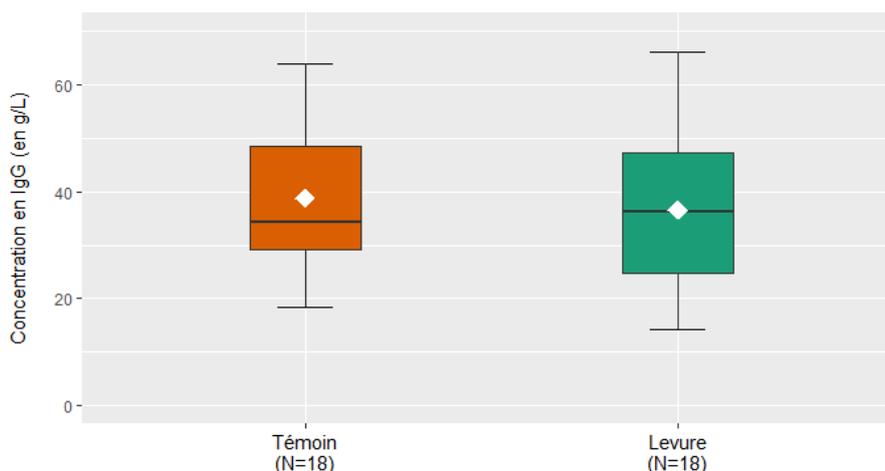
Les résultats des analyses statistiques multivariées sont récapitulés dans l'annexe 7.

### **1. IgG dans le sérum des chiennes**

#### **a) À 28 jours de gestation**

À 28 jours de gestation (avant le début de la supplémentation en levure), la concentration sérique en IgG n'était pas différente entre les deux groupes de chiennes étudiés selon le test de

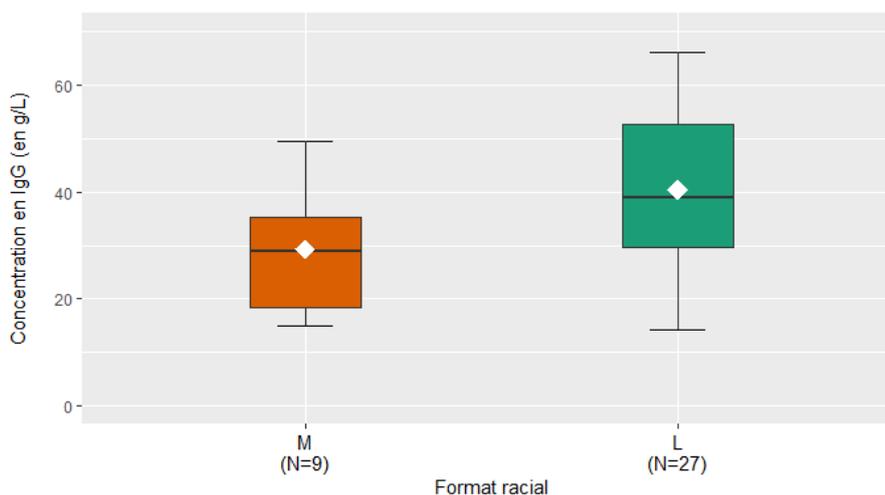
Student ( $p = 0,671$ ) : elle était en moyenne de  $38,7 \pm 14,7$  g/L chez les chiennes du groupe « Témoin » et de  $36,6 \pm 16,0$  g/L chez celles du groupe « Levure » (figure 23).



**Figure 23 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 28 jours de gestation selon qu'elles seront supplémentées en levure ou non (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

Par ailleurs, l'analyse multivariée s'intéressant aux liens entre le format racial, l'âge, la taille de la portée et la concentration sérique en IgG à 28 jours de gestation a révélé une tendance du format racial ( $p < 0,1$  ; figure 24). En effet, les chiennes de format racial M avaient une concentration en IgG dans leur sérum de  $29,4 \pm 12,2$  g/L contre  $40,4 \pm 15,3$  g/L chez les chiennes de format racial L. Ainsi, bien que l'association ne soit qu'une tendance, plus la chienne est de grande taille, plus son sérum est riche en IgG en milieu de gestation.



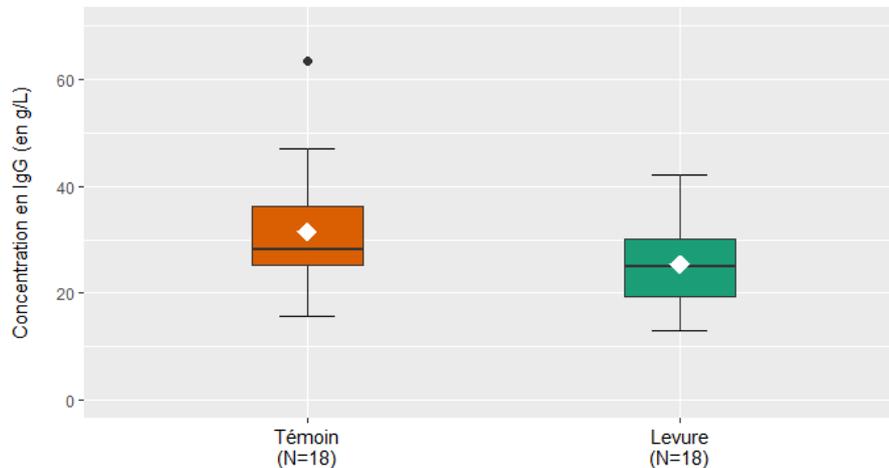
**Figure 24 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 28 jours de gestation selon leur format racial (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

### **b) À 56 jours de gestation**

D'après l'analyse multivariée effectuée avec l'âge, le format racial, la supplémentation, la taille de portée et l'interaction entre ces deux derniers facteurs comme variables explicatives,

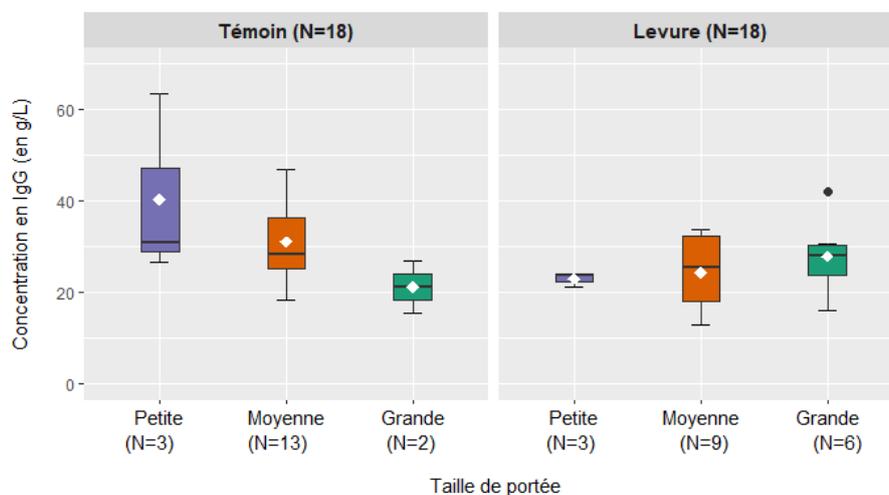
la supplémentation en levure n'a pas eu d'effet : aucune différence significative de la concentration en IgG dans le sérum des chiennes à 56 jours de gestation n'a été observée entre le groupe « Témoin » dont la concentration moyenne était de  $31,6 \pm 11,6$  g/L et le groupe « Levure » dont la moyenne de la concentration sérique en IgG était de  $25,3 \pm 7,5$  g/L ( $p = 0,253$  ; *figure 25*).



**Figure 25 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 56 jours de gestation selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

Néanmoins, une interaction quantitative entre la supplémentation et la taille de portée a été mise en évidence sous forme d'une tendance ( $p < 0,1$  ; *figure 26*) : dans le groupe « Témoin », la concentration sérique moyenne en IgG était respectivement de  $40,4 \pm 20,0$  g/L,  $31,1 \pm 9,0$  g/L et  $21,2 \pm 8,0$  g/L chez les chiennes attendant une petite, moyenne et grande portée contre  $23,0 \pm 1,6$  g/L,  $24,4 \pm 7,9$  g/L et  $27,9 \pm 8,7$  g/L chez les chiennes du groupe « Levure ».



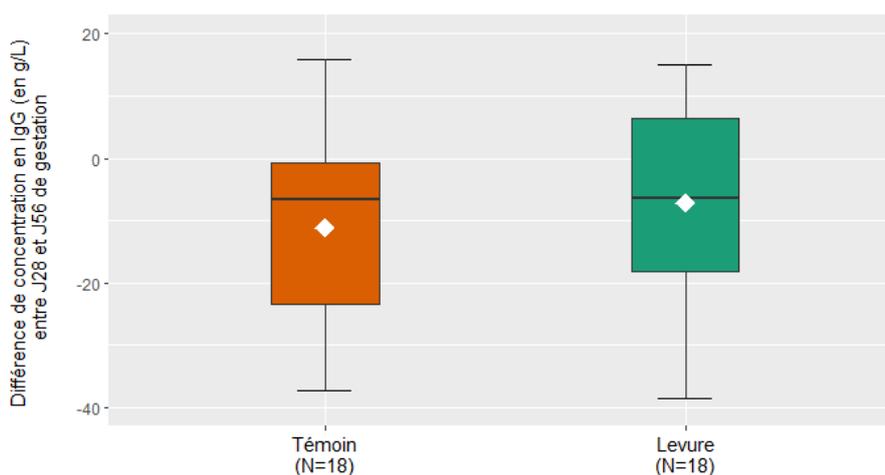
**Figure 26 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes à 56 jours de gestation selon la taille de la portée et la supplémentation en levure (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

Ainsi, plus la portée est grande, moins il y a d'IgG dans le sérum des chiennes « Témoin » à 56 jours de gestation. Chez les chiennes du groupe « Levure », la concentration sérique en IgG à 56 jours de gestation reste stable quelque soit la taille de la portée.

### **c) Évolution de la concentration sérique en IgG**

Suite à l'analyse statistique multivariée incluant la supplémentation, le format racial, la taille de portée, la différence de NEC entre le 28ème et le 56ème jour de gestation, l'âge des chiennes et trois interactions (entre la supplémentation et le format racial, la supplémentation et la différence de NEC entre J28 et J56, et la supplémentation et la taille de portée), la supplémentation en levure seule n'a pas eu d'influence sur la différence de concentration en IgG dans le sérum des chiennes entre 28 et 56 jours de gestation : les chiennes du groupe « Témoin » avaient une différence de concentration sérique moyenne de  $-11,2 \pm 15,2$  g/L tandis que dans le sérum des chiennes du groupe « Levure », la différence de concentration en IgG moyenne était de  $-7,2 \pm 15,7$  g/L ( $p = 0,349$  ; *figure 27*).

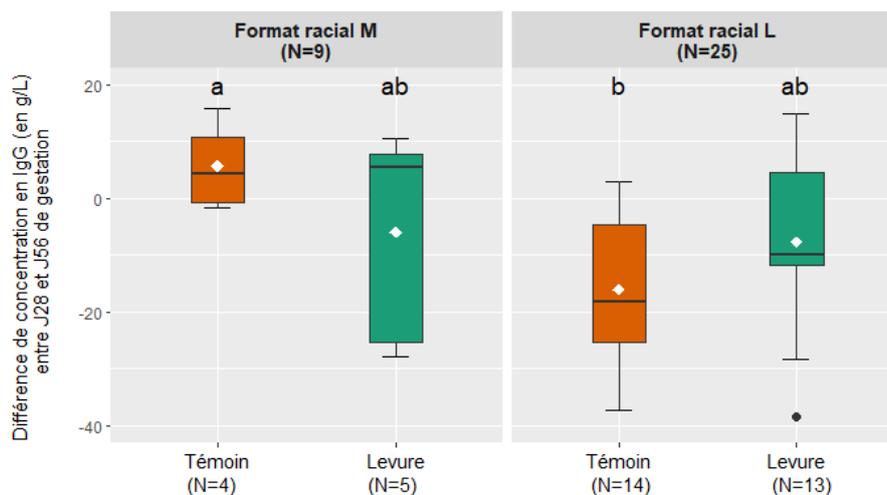


**Figure 27 : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Cependant, deux interactions quantitatives significatives comprenant la supplémentation ont été mises en lumière par ce modèle.

La première interaction associée à une modification significative de la différence de concentration sérique en IgG entre le 28<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> jour de gestation est basée sur la supplémentation en levure et le format racial ( $p < 0,05$  ; *figure 28*) : dans le groupe « Témoin », la moyenne de la différence de concentration sérique en IgG était de  $5,7 \pm 8,2$  g/L chez les chiennes de format racial M contre  $-16,0 \pm 13,1$  g/L chez les chiennes de format racial L. Chez les chiennes du groupe « Levure », celles de format racial M avaient une différence de concentration moyenne de  $-5,9 \pm 19,0$  g/L alors que la moyenne de la différence de concentration en IgG dans le sérum des chiennes de format racial L était de  $-7,7 \pm 15,1$  g/L.



**Figure 28 : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon leur format racial et la supplémentation en levure (N=36)**

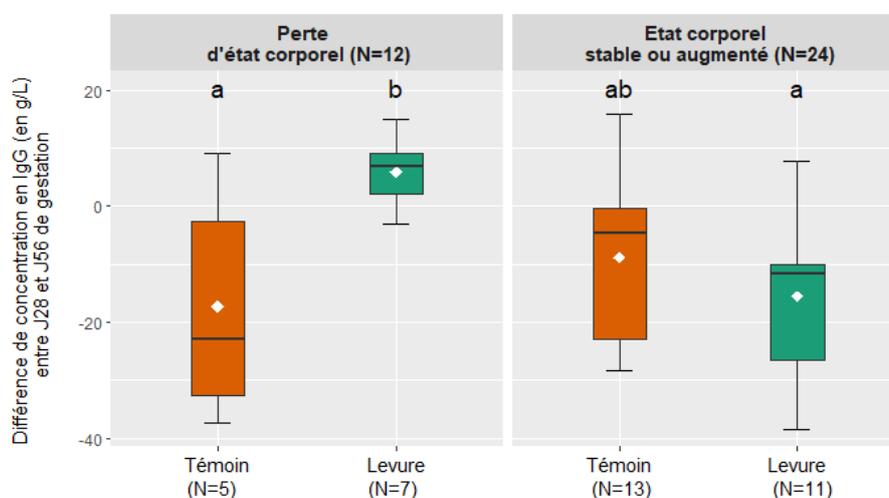
Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.

Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Ainsi, dans le groupe « Témoin », plus la chienne est de grande taille, plus la concentration sérique en IgG entre le 28<sup>ème</sup> et le 56<sup>ème</sup> jour de gestation chute. Chez les chiennes du groupe « Levure », le format racial n'est pas associé à une diminution de la concentration en IgG dans leur sérum entre le milieu et la fin de gestation.

La deuxième interaction associée à un changement significatif de la différence de concentrations en IgG dans le sérum maternel entre 28 et 56 jours de gestation repose sur la supplémentation en levure et la variation d'état corporel durant cette période ( $p < 0,01$  ; *figure 29*). Les chiennes du groupe « Témoin » ayant perdu en état corporel avaient une différence de concentration moyenne de  $-17,3 \pm 19,8$  g/L alors que celles dont l'état corporel est resté stable ou a augmenté avaient une différence de concentration moyenne de  $-8,9 \pm 13,2$  g/L. Dans le groupe « Levure », la moyenne de la différence de concentration sérique en IgG chez les chiennes ayant perdu en état corporel entre le 28ème et le 56ème jour de gestation était de  $5,9 \pm 6,3$  g/L contre  $-15,6 \pm 14,1$  g/L chez les chiennes ayant un état corporel stable ou augmenté.



**Figure 29 : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon la variation d'état corporel et la supplémentation en levure (N=36)**

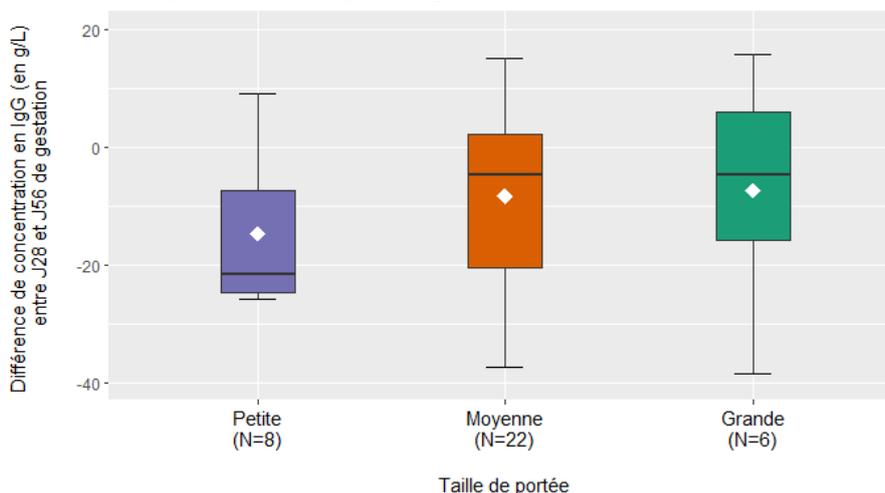
Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.

Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Ainsi, dans le groupe « Témoin », la variation d'état corporel n'est pas associée à une diminution de la concentration en IgG dans le sérum des chiennes entre le milieu et la fin de la gestation alors que, dans le groupe « Levure », plus l'état corporel diminue au cours de la gestation, moins la concentration sérique en IgG chute.

Par ailleurs, le modèle statistique a montré une tendance d'une association entre la taille de portée et la différence de concentration en IgG dans le sérum des chiennes entre 28 et 56 jours de gestation ( $p < 0,1$  ; *figure 30*). Les chiennes attendant une petite portée ont vu leur concentration en IgG dans le sérum diminuer de  $-14,8 \pm 14,3$  g/L entre le 28ème et le 56ème jour de gestation contre  $-8,3 \pm 14,8$  g/L et  $-7,4 \pm 18,5$  g/L pour celles allant donner naissance respectivement à une moyenne et une grande portée.



**Figure 30 : Boîtes à moustaches représentant la différence de concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiennes entre 28 (J28) et 56 jours (J56) de gestation selon la taille de la portée (N=36)**

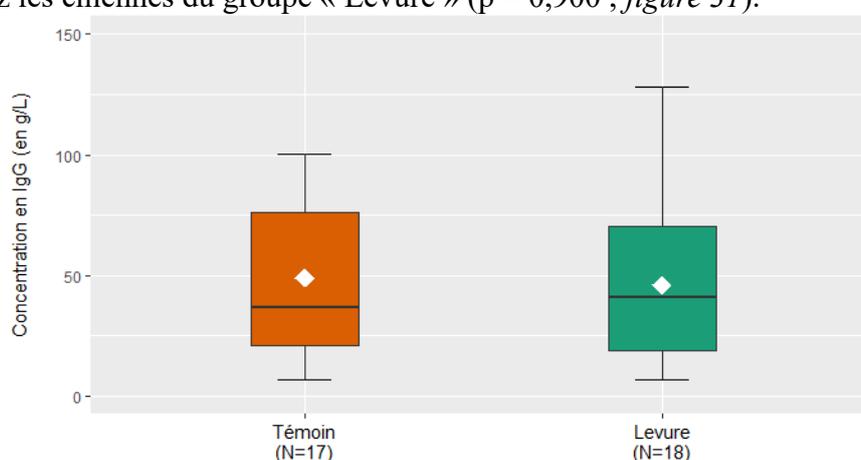
Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Ainsi, plus la portée attendue par une chienne est grande, moins sa concentration sérique en IgG chute entre le milieu et la fin de gestation.

## 2. Immunoglobulines dans le colostrum

### a) IgG

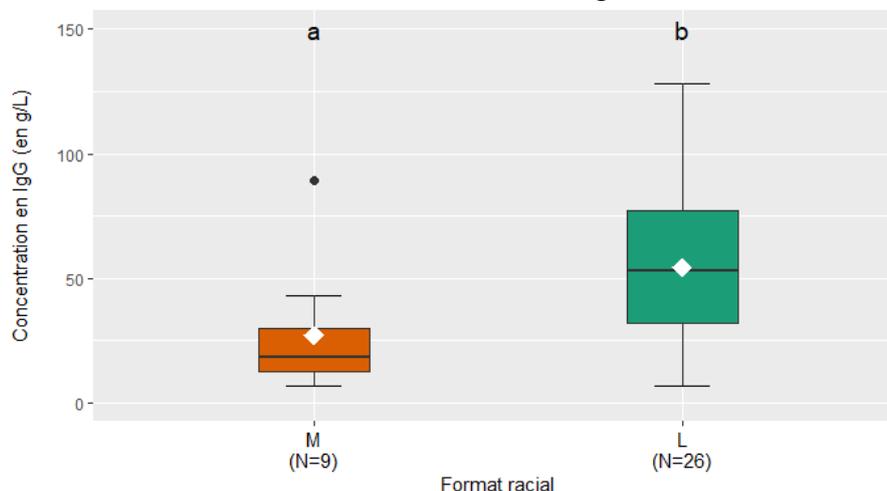
La concentration en IgG dans le colostrum n'a pas été influencée par la supplémentation en levure : elle était de  $48,9 \pm 31,2$  g/L chez les chiennes du groupe « Témoin » et de  $46,0 \pm 33,4$  g/L chez les chiennes du groupe « Levure » ( $p = 0,900$  ; *figure 31*).



**Figure 31 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=35)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Parmi l'âge et le format racial étudiés dans le modèle multivarié en plus de la supplémentation, le format racial de la chienne était associé à une différence significative de concentration en IgG dans le colostrum ( $p < 0,05$  ; *figure 32*) : les chiennes de format racial L avaient une concentration moyenne en IgG dans le colostrum de  $54,5 \pm 31,2$  g/L alors que celle des chiennes de format racial M était de  $27,0 \pm 25,8$  g/L.



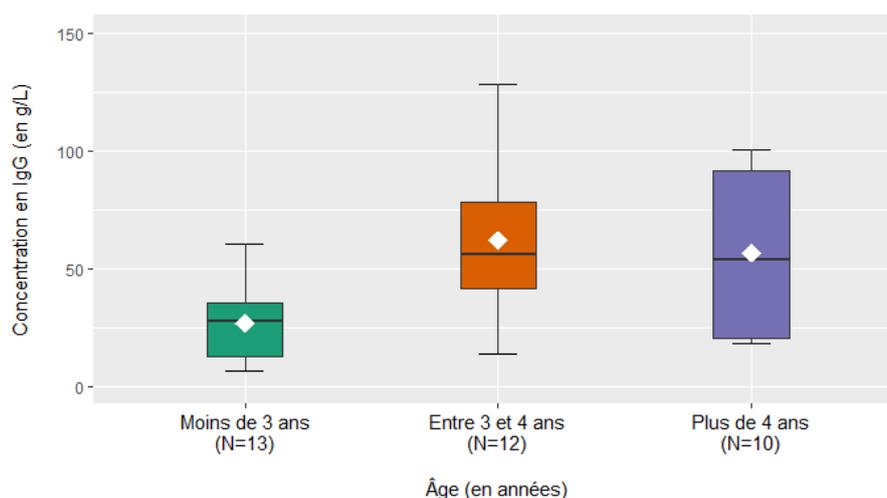
**Figure 32 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur format racial (N=35)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.

Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

L'âge de la chienne était également associé sous forme d'une tendance à la concentration en IgG dans le colostrum ( $p < 0,1$  ; *figure 33*) : la concentration colostrale en IgG était respectivement de  $26,7 \pm 17,4$  g/L,  $62,1 \pm 29,6$  g/L et  $56,8 \pm 37,1$  g/L chez les chiennes de moins de 3 ans, entre 3 et 4 ans, et de plus de 4 ans.



**Figure 33 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur âge (N=35)**

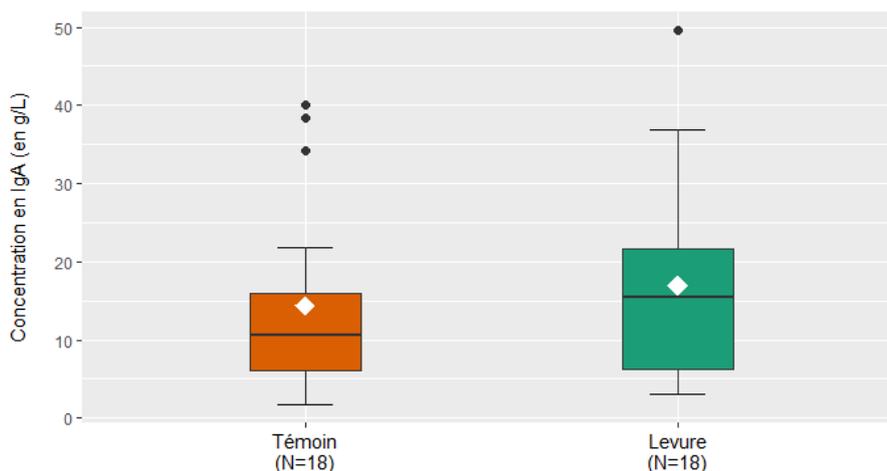
Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.

Le losange blanc indique la moyenne.

Ainsi, plus une chienne est de grande taille, plus son colostrum est riche en IgG. Bien que cela ne soit qu'une tendance, la concentration en IgG dans le colostrum augmente aussi avec l'âge de la chienne jusqu'à 4 ans.

## b) IgA

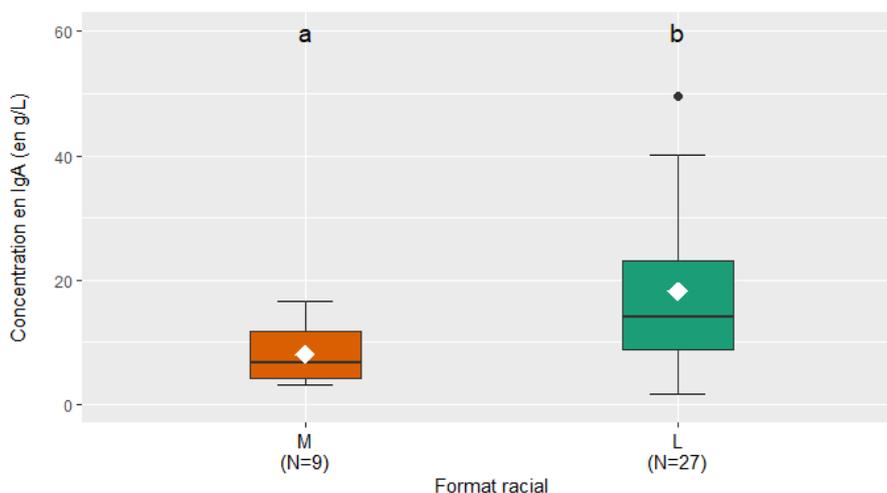
Le modèle statistique multivarié comprenant la supplémentation en levure, le format racial et l'âge des chiennes n'a montré aucune différence significative de la concentration en IgA dans le colostrum entre le groupe « Témoin » et le groupe « Levure » : le groupe « Témoin » avait une concentration colostrale moyenne en IgA de  $14,4 \pm 11,8$  g/L alors que les chiennes du groupe « Levure » avaient une concentration moyenne en IgA dans leur colostrum de  $16,9 \pm 12,6$  g/L ( $p = 0,285$  ; *figure 34*).



**Figure 34 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon la supplémentation en levure (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Tout comme pour la concentration en IgG dans le colostrum, le format racial et la concentration en IgA dans le colostrum étaient significativement associés ( $p < 0,05$  ; *figure 35*). Les chiennes de format racial L avaient une concentration moyenne en IgA dans le colostrum de  $18,2 \pm 12,8$  g/L tandis que celle des chiennes de format racial M était de  $8,0 \pm 4,8$  g/L.

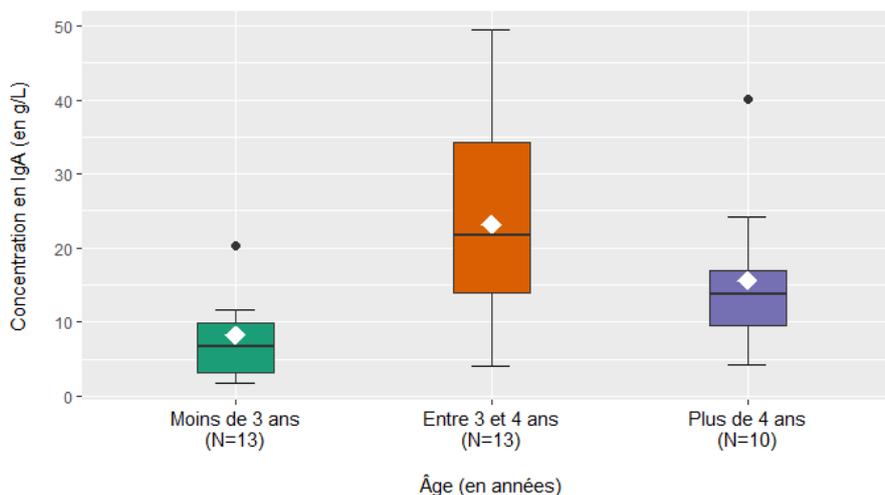


**Figure 35 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur format racial (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

De plus, une tendance d'une association entre l'âge des chiennes et la concentration en IgA dans le colostrum était montrée par le modèle statistique ( $p < 0,1$  ; *figure 36*) : les chiennes âgées de moins de 3 ans avaient une concentration moyenne de  $8,3 \pm 6,1$  g/L contre  $23,2 \pm 13,7$  g/L pour les chiennes ayant entre 3 et 4 ans, et  $15,6 \pm 10,5$  g/L chez les chiennes de plus de 4 ans.



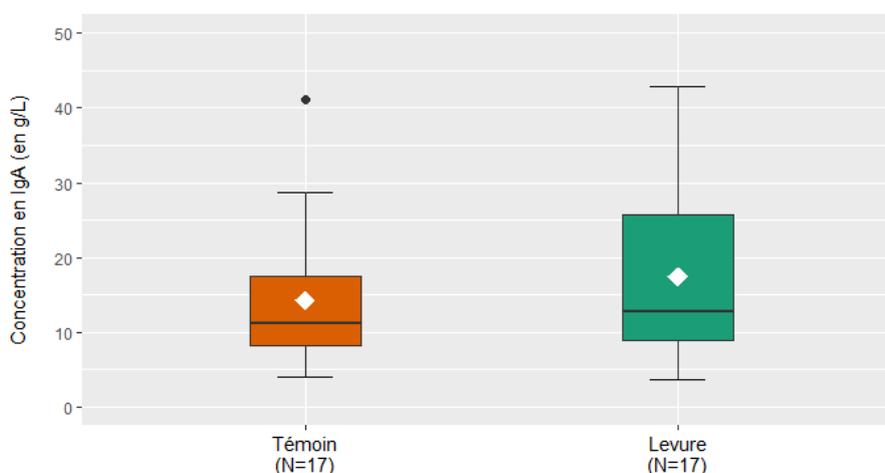
**Figure 36 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon leur âge (N=36)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

La concentration en IgA dans le colostrum augmente donc avec la taille et l'âge de la chienne jusqu'à 4 ans.

### **3. IgA dans le lait**

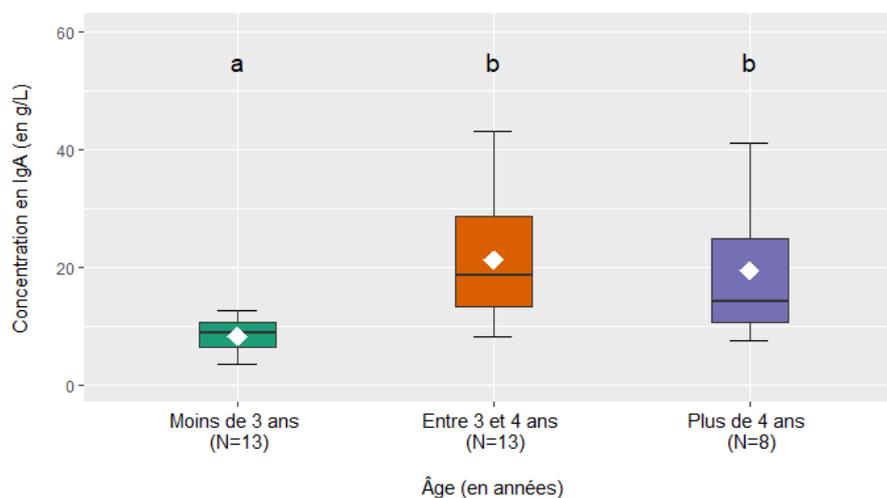
L'ANCOVA incluant la supplémentation, le format racial, l'âge et la NEC au 56ème jour de gestation a mis en évidence une tendance à l'amélioration de la concentration en IgA dans le lait par la supplémentation en levure ( $p < 0,1$  ; *figure 37*) : dans le groupe « Témoin », la concentration lactée moyenne en IgA était de  $14,3 \pm 9,4$  g/L contre  $17,4 \pm 11,8$  g/L chez les chiennes du groupe « Levure ».



**Figure 37 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon qu'elles sont supplémentées en levure ou non (N=34)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum. Le losange blanc indique la moyenne.

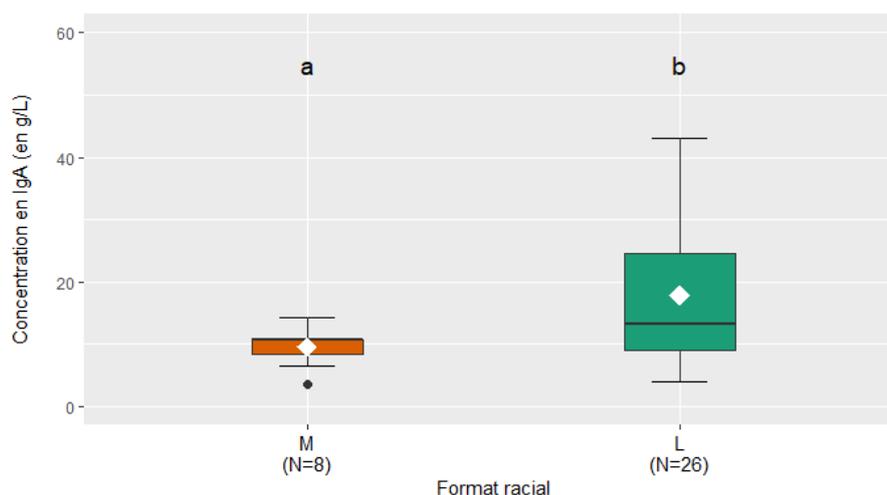
De plus, l'analyse multivariée a permis d'objectiver une association significative entre l'âge de la chienne et la concentration en IgA dans le lait ( $p < 0,01$  ; *figure 38*) : les chiennes de moins de 3 ans, ayant entre 3 et 4 ans et de plus de 4 ans avaient une concentration moyenne en IgA dans le lait respectivement de  $8,3 \pm 2,8$  g/L,  $21,2 \pm 10,3$  g/L et  $19,5 \pm 12,6$  g/L.



**Figure 38 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon leur âge (N=34)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.  
Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

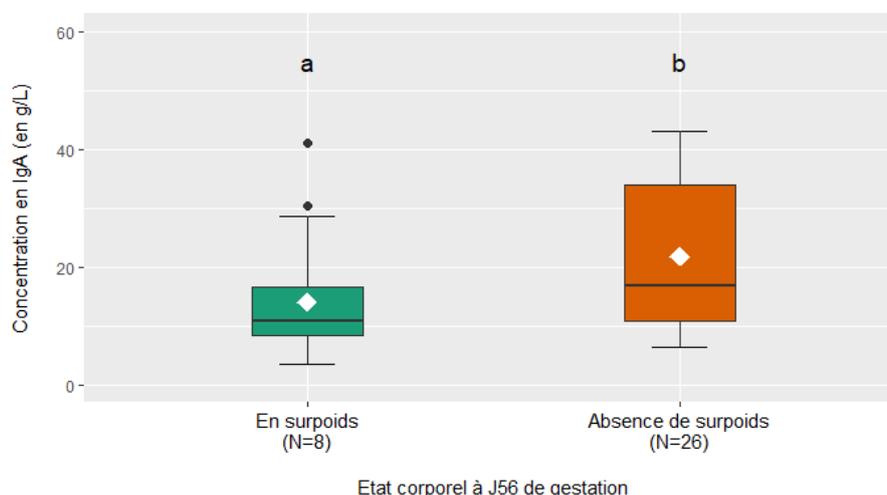
La concentration lactée en IgA était également associée au format racial de manière significative ( $p < 0,05$  ; *figure 39*). Les chiennes de format racial L avaient une concentration moyenne en IgA dans le lait de  $17,8 \pm 11,3$  g/L tandis que celle des chiennes de taille M était de  $9,5 \pm 3,2$  g/L.



**Figure 39 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon leur format racial (N=34)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.  
Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Enfin, la NEC à 56 jours de gestation et la concentration en IgA dans le lait étaient significativement associées ( $p < 0,05$  ; *figure 40*) : chez les chiennes en surpoids à 56 jours de gestation, la concentration moyenne en IgA dans le lait était de  $14,1 \pm 8,9$  g/L contre  $21,8 \pm 13,9$  g/L chez les chiennes en absence de surpoids au 56ème jour de gestation.



**Figure 40 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgA (en g/L) dans le lait des chiennes selon leur état corporel au 56ème jour (J56) de gestation (N=34)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.

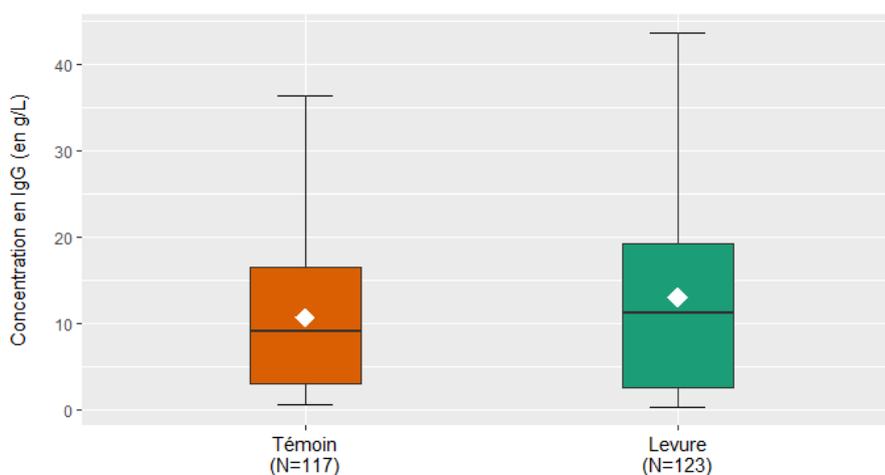
Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Par conséquent, la concentration en IgA dans le lait augmente avec la supplémentation en levure, avec le format racial et avec l'âge de la chienne jusqu'à ce qu'elle atteigne 4 ans. Au contraire, un excès pondéral en fin de gestation diminue la concentration lactée en IgA.

#### 4. IgG dans le sérum des chiots

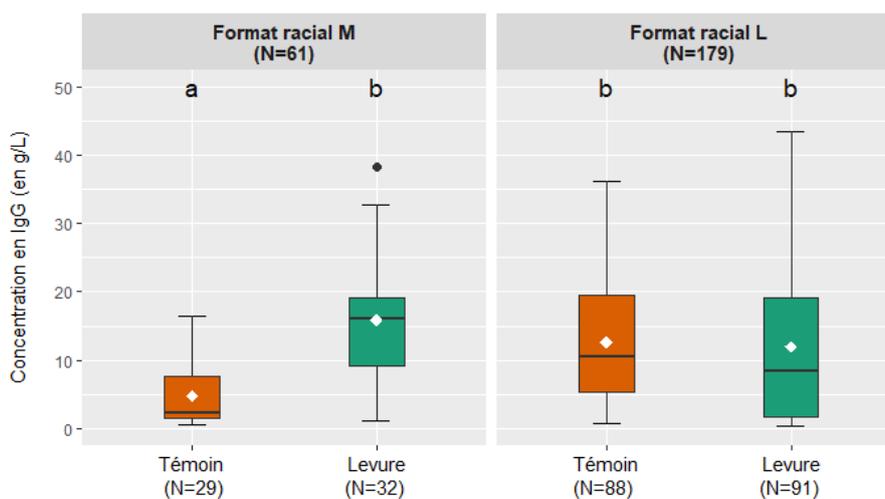
Dans le modèle linéaire mixte prenant en compte la supplémentation en levure, le format racial des chiots et l'interaction entre ces deux facteurs, la supplémentation n'a pas eu d'effet sur la concentration en IgG dans le sérum des chiots à 2 jours de vie : aucune différence significative de la concentration sérique en IgG n'a été observée entre les chiots nés des chiennes appartenant au groupe « Témoin » et ceux issus des chiennes du groupe « Levure » ( $p = 0,302$  ; *figure 41*). La concentration sérique moyenne en IgG 2 jours post-partum était de  $10,7 \pm 9,1$  g/L chez les chiots dont les mères appartiennent au groupe « Témoin » et de  $13,0 \pm 11,0$  g/L chez les chiots dont les mères appartiennent au groupe « Levure ».



**Figure 41 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiots selon que leur mère est supplémentée en levure ou non (N=240)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Cependant, l'interaction entre la supplémentation en levure et le format racial s'est révélée associée à la concentration en IgG dans le sérum des chiots ( $p < 0,05$  ; *figure 42*). En effet, les chiots de format racial M dont les mères font partie du groupe « Témoin » avaient une concentration sérique en IgG de  $4,8 \pm 4,6$  g/L contre  $15,9 \pm 8,4$  g/L chez les chiots de format racial M dont les mères appartiennent au groupe « Levure ». Chez les chiots de format racial L, les concentrations en IgG dans leur sérum étaient respectivement de  $12,3 \pm 9,5$  g/L et de  $12,0 \pm 11,6$  g/L chez les chiots nés de chiennes du groupe « Témoin » et ceux mis au monde par des chiennes du groupe « Levure ».



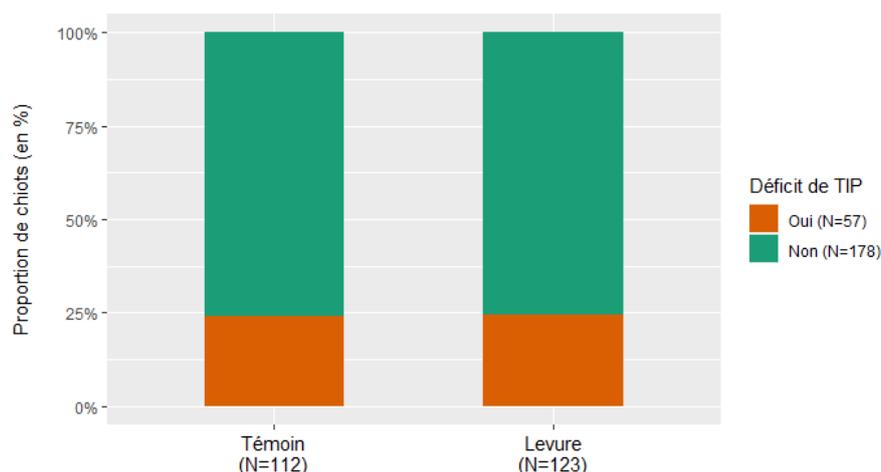
**Figure 42 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le sérum des chiots selon que leur mère est supplémentée en levure ou non et selon leur format racial (N=240)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Les lettres indiquent une différence de moyenne significative : deux moyennes ne partageant pas une même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

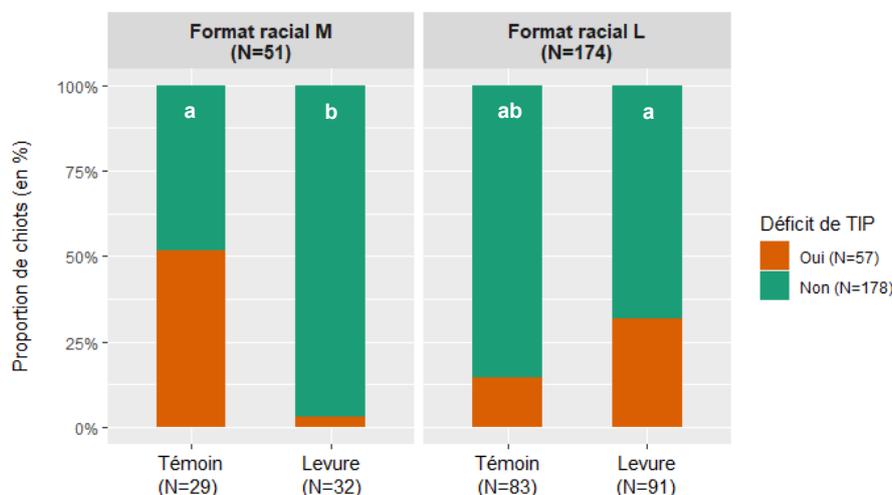
Ainsi, la supplémentation en levure des chiennes de format racial M pendant la gestation et la lactation a permis d'augmenter la concentration sérique en IgG de leurs chiots à 2 jours de vie.

En s'intéressant cette fois-ci au déficit de TIP à travers le modèle linéaire mixte généralisé faisant intervenir la supplémentation en levure, le format racial, l'interaction entre ces deux variables et la concentration en IgG dans le colostrum, nous avons constaté que la supplémentation en levure n'avait pas eu de conséquence sur le risque de chiots en déficit de TIP deux jours après leur naissance ( $p=0,137$  ; *figure 43*) : parmi les chiots nés de chiennes du groupe « Témoin », environ 24,1 % (27/112) étaient en déficit de TIP et chez les chiots issus de chiennes du groupe « Levure », cette proportion s'élevait à 24,4 % (30/123).



**Figure 43 : Proportion de chiots (en %) en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) selon que leur mère est supplémentée en levure ou non (N=235)**

Néanmoins, l'interaction entre la supplémentation en levure et le format racial, et la proportion de chiots en déficit de TIP deux jours après la mise-bas sont associés ( $p<0,05$  ; *figure 44*) : chez les chiots de format racial M, un seul était en déficit de TIP (soit 0,03% (1/32)) dans le groupe « Levure » contre 15 nouveaux-nés (52% (15/29)) en déficit de TIP dans le groupe « Témoin ». Pour les chiots de format racial L, 14 % (12/83) étaient en déficit de TIP chez les chiots du groupe « Témoin » contre 32 % (29/91) chez les chiots du groupe « Levure ».

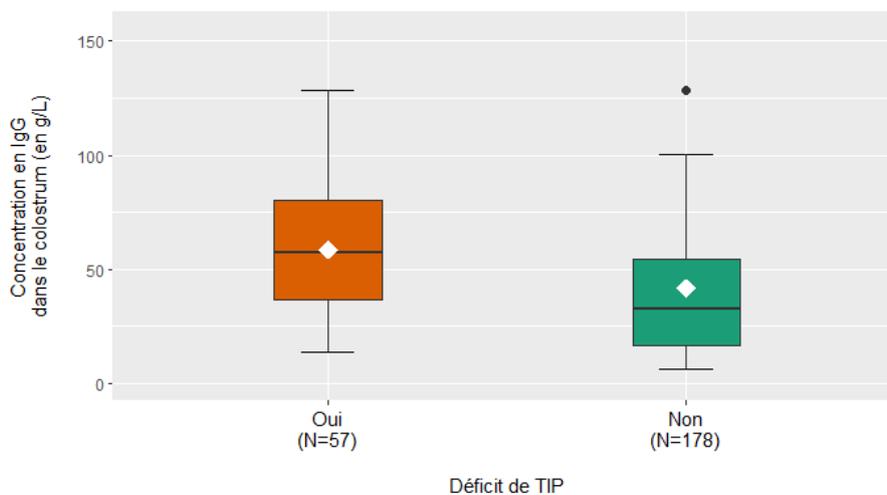


**Figure 44 : Proportion de chiots (en %) en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) selon que leur mère est supplémentée en levure ou non et selon leur format racial (N=235)**

Les lettres indiquent une différence d'odd-ratio significative : deux odd-ratio ne partageant pas une même lettre sont significativement différents ( $p<0,05$ ).

Par conséquent, la supplémentation en levure des chiennes de format racial M diminue le risque d'avoir des chiots en déficit de TIP, ce qui n'est pas le cas chez les chiots de format racial L.

Enfin, le modèle linéaire mixte généralisé a dévoilé une tendance d'association entre la concentration en IgG dans le colostrum et le nombre de chiots en déficit de transfert d'immunité passive ( $p < 0,1$  ; *figure 45*) : la concentration en IgG dans le colostrum des chiennes dont les chiots étaient en déficit de TIP était en moyenne de  $47,0 \pm 46,8$  g/L contre  $32,1 \pm 31,4$  g/L dans le colostrum des chiennes dont les chiots n'étaient pas en déficit de TIP.



**Figure 45 : Boîtes à moustaches représentant la concentration en IgG (en g/L) dans le colostrum des chiennes selon que leurs chiots sont en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) ou non (N=235)**

Les composants des boîtes sont (de bas en haut) : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile, maximum.  
Le losange blanc indique la moyenne.

Ainsi, plus le colostrum d'une chienne est riche en IgG, plus les chiots ont tendance à être en déficit de TIP.

## **IV. Discussion et perspectives**

### **A- Limites de l'étude**

#### **1. La population**

Notre étude a porté sur 36 chiennes et 240 chiots de neuf races différentes appartenant au même élevage canin. Il n'est donc pas possible d'extrapoler nos résultats à l'ensemble de la population canine. Néanmoins, le nombre d'individus et de races étudiés demeure supérieur à celui d'autres publications sur le même thème (*tableau 12*).

**Tableau 12 : Effectifs et races inclus dans différentes études s'intéressant à la supplémentation en pré- ou probiotiques et aux facteurs de variation du transfert d'immunité passive ou des concentrations en immunoglobulines dans les sécrétions lactées – Synthèse bibliographique**

	Supplémentation en prébiotiques et/ou en probiotiques		Autres facteurs de variation						Notre étude
	Adogony et al., 2007	Alonge et al., 2020	Bertieri, 2012	Coinus, 2014	Mila et al., 2015	Albaret, 2016	Aggouni, 2016	Viaud, 2018	
<b>Nombre de chiennes</b>	16	20	10	21	44	53	139	5	<b>36</b>
<b>Nombre de chiots</b>	Non précisé	122	Non étudiés	Non étudiés	Non étudiés	Non étudiés	657	34	<b>240</b>
<b>Nombre de races</b>	1	1	1	10	13	16	17	1	<b>9</b>

De plus, les chiens appartenant à un seul et même élevage, nous avons pu tester les effets de la levure SB sur les concentrations en immunoglobulines dans les sérums des chiennes et des chiots et, dans les sécrétions lactées, en s'affranchissant de biais liés à l'environnement (microbisme, alimentation, vaccination, logement...).

Les chiennes appartiennent à deux formats raciaux différents (M et L) mais les effectifs de chaque format sont déséquilibrés avec seulement un quart des chiennes de taille M (9 chiennes sur 36). Nous pouvons également regretter l'absence de chiennes de petite taille qui nous auraient permis d'approfondir les effets croisés entre le format racial et la supplémentation en levure.

#### **2. Le délai de prélèvements après la mise-bas**

Les prélèvements de colostrum n'ont pas été réalisés à une heure fixe après la mise-bas mais entre 24 et 48 heures après l'expulsion du premier chiot. Ceci est particulièrement préjudiciable pour évaluer les concentrations en IgG dans le colostrum. En effet, la concentration en IgG chute rapidement post-partum : en 24 heures, la concentration en IgG dans le colostrum diminue de 60 % par rapport à la concentration relevée dans les premières heures après la mise-bas et elle chute encore de 15 % à 48 heures après la mise-bas (Albaret, 2016). Le délai variable de prélèvements du colostrum après la mise-bas est donc responsable

en partie de la variabilité des concentrations colostrales en IgG dans notre étude. Ce délai n'est pas aussi important à considérer pour étudier les concentrations en IgA puisqu'elles restent stables au cours de la lactation (Bertieri, 2012).

Ayant été réalisée dans de vraies conditions d'élevage et non dans un centre d'expérimentation, l'étude ne permettait pas de rester sur place 24 heures sur 24 ce qui explique la période large de prélèvements.

### **3. Les immunoglobulines non dosées**

Les immunoglobulines M (IgM) et E (IgE) n'ont pas été dosées bien que le colostrum et le lait en contiennent (Tizard, 2018). Ce choix a été motivé par la faible part qu'occupent les IgM et les IgE parmi les immunoglobulines totales des sécrétions mammaires (seulement 1 % pour les IgM (Viaud, 2018) et les IgE sont indétectables (Chastant-Maillard et al., 2010)).

Nous avons décidé de doser les IgG uniquement dans le colostrum : en effet, au septième jour après la mise-bas (date de nos prélèvements), leur concentration est faible dans le lait atteignant  $3,1 \pm 4,2$  g/L (Albaret, 2016). De plus, étudier leur concentration à ce temps de lactation ne représente que peu d'intérêt puisque le TIP n'est plus efficace du fait de la fermeture de la barrière intestinale du chiot au bout de 16 heures de vie. Le nouveau-né ne bénéficiera donc pas des IgG contenues dans le lait de la mère.

### **4. Posologie de la supplémentation en levure**

Du fait du conditionnement de la levure dans des gélules, les chiennes n'ont pas reçu la même dose par kilogramme. Celle-ci a en effet varié entre 4,7 mg/kg/j soit  $3,4 \times 10^7$  CFU/kg/j pour la plus lourde des chiennes et 11,1 mg/kg/j soit  $6,8 \times 10^7$  CFU/kg/j pour la plus petite. Aucune recommandation précise n'existe concernant la posologie à administrer afin d'obtenir des effets de la levure SB sur le microbiote intestinal et donc sur les concentrations en immunoglobulines sériques de la chienne et dans ses sécrétions lactées. Pour démontrer un effet bénéfique de SB sur les entéropathies chroniques, D'Angelo et al. (2018) avaient eu recours à des doses plus élevées de l'ordre de  $2 \times 10^9$  CFU/kg/jour. Meineri et al. (2022) avaient également utilisé une posologie plus importante de levure SB à  $1 \times 10^9$  CFU/kg/j pour observer son impact positif sur l'inflammation intestinale et le stress de l'animal.

## **B- Résultats**

### **1. Concentration en immunoglobulines**

#### **a) IgG dans le sérum des chiennes**

Peu d'études se sont intéressées à la concentration sérique en IgG chez la chienne pendant la gestation.

Notre travail révèle des concentrations sériques en IgG supérieures à celles objectivées dans la littérature : en milieu de gestation, la moyenne de la concentration en IgG dans le sérum des chiennes d'Alonge et al. (2020) n'ayant pas encore reçu de pré- et probiotiques était de  $4,4 \pm 2,8$  g/L contre  $37,7 \pm 15,2$  g/L dans notre étude. A la mise-bas, la concentration sérique en IgG des chiennes était en moyenne de  $8,1 \pm 4,3$  g/L pour Mila et al. (2015) et de  $3,0 \pm 1,3$  g/L chez les chiennes du groupe « Témoin » d'Alonge et al. (2020) soit respectivement 3,5 fois et 9 fois moins que celle que nous avons mesurée en fin de gestation dans notre groupe « Témoin » ( $31,6 \pm 11,6$  g/L).

Tout comme Alonge et al. (2020) et Lierman et al. (2024), nous avons mis en évidence une diminution de la concentration sérique en IgG au cours de la gestation de la chienne. Cette chute peut s'expliquer par le transfert des IgG du sang vers la glande mammaire où elles se concentrent en toute fin de gestation. La baisse de la concentration sérique en IgG pendant la gestation est un processus connu depuis longtemps chez la truie (Bourne et al., 1973) et chez la vache (Godden, 2008).

#### **b) Immunoglobulines dans les sécrétions lactées**

##### **i. IgG**

Les chiennes du groupe « Témoin » de notre étude produisent un colostrum plus riche en IgG ( $48,9 \pm 31,2$  g/L) comparé à d'autres études menées dans l'espèce canine (Viaud, 2018 :  $40,8 \pm 17,3$  g/L ; Albaret, 2016 :  $40,2 \pm 12,8$  g/L). En accord avec la littérature, nos concentrations demeurent inférieures à celles relevées chez d'autres espèces domestiques :  $62,0 \pm 23,8$  g/L chez le chat (Claus et al., 2006) ou encore  $75,9 \pm 17,4$  g/L chez la truie (Hasan et al., 2019).

Nous notons également une forte variabilité inter-individuelle dans nos résultats : un facteur 14,8 sépare nos concentrations extrêmes en IgG dans le groupe « Témoin ». La littérature confirme une variabilité de la qualité immunologique du colostrum entre chiennes importante (*tableau 13*).

**Tableau 13 : Variabilité inter-individuelle de la concentration moyenne en IgG dans le colostrum de différentes études – Synthèse bibliographique**

	Mila et al., 2015	Aggouni, 2016	Viaud, 2018	Notre étude
<b>Ratio entre les concentrations extrêmes en IgG dans le colostrum</b>	5,2	22,2	4,3	<b>14,8</b>

De grandes différences de concentrations en IgG dans le colostrum sont également relevées chez d'autres espèces : entre deux élevages de truies, la concentration colostrale moyenne en IgG peut doubler passant de  $54,8 \pm 4,8$  g/L à  $105,8 \pm 3,6$  g/L (Hasan et al., 2019). Dans le colostrum de vaches, Silva-del-Río et al. (2017) ont également obtenu des concentrations en IgG séparées d'un facteur 7, allant de 23,7 g/L à 172,9 g/L.

## **ii. IgA**

Le colostrum et le lait que nous avons dosés dans le groupe « Témoin » sont également plus concentrés en IgA que dans d'autres études s'intéressant aux sécrétions lactées canines. La variabilité de la concentration en IgA dans les sécrétions mammaires également observée à l'issue de notre travail se confirme dans la littérature (*tableau 14*).

**Tableau 14 : Concentration en IgA (en g/L, moyenne  $\pm$  écart-type) dans les sécrétions lactées de chiennes – Synthèse bibliographique**

Sécrétions lactées	Bertieri, 2012	Albaret, 2016	Notre étude
<b>Colostrum</b>	13,3 $\pm$ 1,9	15,3 $\pm$ 6,0	<b>14,4 <math>\pm</math> 11,8</b>
<b>Lait</b>	7,8 $\pm$ 2,0	8,6 $\pm$ 4,1	<b>14,3 <math>\pm</math> 9,4</b>

De même que Bertieri (2012), il semble d'après nos résultats que la concentration en IgA demeure stable au cours de la lactation y compris chez les chiennes « Témoin ». Ce bilan diffère de l'étude d'Albaret (2016) dans laquelle des différences significatives de concentrations en IgA entre certains temps de lactation ont été trouvées. Néanmoins, nos propos sont à modérer puisque nous possédons des données pour seulement deux temps de lactation alors qu'Albaret (2016) a multiplié les prélèvements entre 4 heures après la mise-bas et 7 jours post-partum.

### c) IgG dans le sérum des chiots

Comme le reste des concentrations en immunoglobulines dosées dans notre étude, la concentration en IgG dans le sérum de nos chiots du groupe « Témoin » est plus élevée que celles mesurées dans la littérature (*tableau 15*).

**Tableau 15 : Concentration en IgG (en g/L, moyenne  $\pm$  écart-type) dans le sérum des chiots à 2 jours de vie – Synthèse bibliographique**

	Mila et al., 2014	Aggouni, 2016	Viaud, 2018	Notre étude
<b>Concentration en IgG dans le sérum des chiots</b>	6,1*	5,0 $\pm$ 4,3	8,8 $\pm$ 2,8	<b>10,7 <math>\pm</math> 9,1</b>

\*écart-type non communiqué

Les concentrations sériques en IgG varient grandement entre les chiots d'après Gonnier et Rossig (allant de 0,21 g/L à 24,6 g/L dans leur étude), de même que dans l'espèce féline (Claus et al., 2006) et chez les porcelets (Devilleers et al., 2011). Nos résultats ne font pas exception avec des concentrations s'étendant de 0,29 g/L à 43,5 g/L.

Aucune prévalence réelle du déficit de TIP n'a encore été mesurée dans l'espèce canine. Le nombre de chiots en déficit de TIP varie fortement entre les élevages mais la prévalence que nous avons mesurée dans le groupe « Témoin » de notre travail se rapproche de celle mise en évidence dans d'autres études (*tableau 16*).

**Tableau 16 : Prévalence de chiots en déficit de transfert d'immunité passive (TIP) (en %) – Synthèse bibliographique**

	Gooding et Robinson, 1982	Mila et al., 2014	Aggouni, 2016	Notre étude
<b>Chiots en déficit de TIP (en %)</b>	35,0 (7/20)	17,4 (26/149)	31,1 (204/657)	<b>23,1 (27/117)</b>

## 2. Liens entre les concentrations en immunoglobulines

### a) IgG dans le sérum des chiennes et dans le colostrum

Dans notre étude, le colostrum est environ 1,8 fois plus concentré en IgG que le sérum des chiennes à 56 jours de gestation. Ce rapport est moins élevé comparé aux résultats de Mila et al. (2015) et d'Alonge et al. (2020) pour lesquels les ratios étaient respectivement de 2,8 et de 4. Cependant, le colostrum a été prélevé tardivement selon les chiennes et le sérum a été collecté avant la mise-bas dans notre travail.

Par ailleurs, aucune corrélation n'a été montrée entre les concentrations en IgG dans le sérum pendant la gestation et le colostrum des chiennes. Ce constat rejoint l'analyse de Bertieri (2012), de Gonnier et Rossig (2013) et de Mila et al. (2015) qui ont noté l'absence d'association entre les concentrations en IgG du sérum maternel et du colostrum dans l'espèce

canine. Cela pourrait s'expliquer par les récepteurs FcRn au niveau de la glande mammaire qui conditionnent la concentration colostrale en IgG à la différence de la concentration sérique. Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de mise en évidence d'une corrélation entre ces deux concentrations est le moment du prélèvement du colostrum qui a varié entre les chiennes et qui a eu lieu après tétée(s) des chiots : étudier les concentrations en IgG dans le sérum et le colostrum des chiennes directement après la mise-bas (et plus précisément avant la tétée du premier chiot) serait intéressant.

Dans l'espèce porcine, les résultats divergent selon les études : aucun lien n'a été démontré par Foisnet et al. (2010) contrairement à Segura et al. (2020). Dans l'espèce féline, les concentrations sériques maternelles et colostrales en IgG seraient bien associées (Claus et al., 2006).

### **b) IgG et IgA dans le colostrum**

Nous avons démontré dans notre analyse que les concentrations en IgG et en IgA du colostrum étaient positivement corrélées : plus une chienne a une concentration colostrale en IgG élevée, plus celle en IgA est importante. Albaret (2016) a également mis en avant ce résultat dans l'espèce canine et il en est de même chez la vache (Costa et al., 2021). Ce constat peut s'expliquer par l'origine des IgG et des IgA dans le colostrum : en effet, au tout début de la lactation, ces deux classes d'immunoglobulines sont transférées du sérum maternel dans le colostrum par les récepteurs FcRn de la glande mammaire (Tizard, 2018). Dans l'espèce porcine, seules les IgG et les IgM colostrales sont corrélées (Segura et al., 2020) car, chez les porcins, les IgA colostrales proviendraient majoritairement d'une synthèse mammaire locale et non pas de la circulation générale contrairement aux IgG et aux IgM.

L'existence d'une telle corrélation entre différentes classes d'immunoglobulines du colostrum canin suggère qu'en développant une stratégie d'amélioration de la concentration d'un seul isotype, les teneurs de toutes les immunoglobulines colostrales seront impactées positivement.

### **c) IgA dans le colostrum et dans le lait**

A l'issue de notre travail, il apparaît qu'une chienne ayant une concentration élevée en IgA dans le colostrum produit également un lait riche en IgA. Ce résultat est à mettre en relation avec le mécanisme de synthèse de ces immunoglobulines dans les sécrétions lactées : pour le colostrum comme pour le lait, une population de « plasma cells » mammaire produit localement les IgA (Spencer et al., 2007). Mais, dans le colostrum, les IgA proviennent également pour moitié du sérum maternel et sont transférées par les récepteurs FcRn dont

l'expression diminue au cours de lactation (Tizard, 2018). Nous pouvons donc supposer que le pool de plasmocytes mammaires produisant les IgA augmente entre la colostrégnèse et la lactogénèse stabilisant ainsi la concentration en IgA dans les sécrétions lactées.

D'après cette corrélation, améliorer la concentration en IgA dans le colostrum aurait des répercussions bénéfiques sur la concentration en IgA pendant toute la lactation de la chienne. Des études approfondies sur les mécanismes de régulation des « IgA producing plasma cells » et des récepteurs FcRn seraient intéressantes.

#### **d) IgG dans le colostrum et dans le sérum des chiots**

Aucune corrélation entre les concentrations en IgG dans le colostrum de nos chiennes et dans le sérum de nos chiots à 2 jours de vie n'a été mise en relief. Néanmoins, nous avons constaté qu'une concentration colostrale élevée en IgG était associée à une augmentation légère du risque d'un déficit de TIP. Ce bilan qui peut paraître étonnant au premier abord trouverait son explication dans le biais représenté par la quantité de colostrum ingérée par les chiots pendant les deux premiers jours de vie. En effet, il s'avère que la concentration en IgG dans le colostrum des chiennes dont les chiots n'ont pas pris ou ont perdu du poids entre 0 et 2 jours post-partum est en moyenne de  $52,2 \pm 24,8$  g/L contre  $43,5 \pm 31,9$  g/L dans le colostrum des chiennes dont les chiots ont pris du poids sur cette période. Le taux de croissance permet d'approcher la quantité de colostrum ingérée. Ainsi, nous pouvons formuler l'hypothèse suivante : la concentration en IgG dans le colostrum des chiennes dont la progéniture est en déficit de TIP est élevée car les chiots en déficit de TIP ont tété moins que les chiots dont le TIP s'est bien déroulé.

Le lien entre la concentration colostrale en IgG et la concentration en IgG dans le sérum des chiots n'est pas encore bien établi dans l'espèce canine : Viaud (2018) a montré que plus le colostrum maternel était riche en IgG, plus l'immunoglobulinémie des chiots à deux jours d'âge était élevée alors que Mila et al. (2014) et Aggouni (2016) n'ont pas objectivé de relation entre ces deux concentrations. Celle-ci est pourtant bien avérée dans les espèces porcine (Devillers et al., 2011) et bovine (Beam et al., 2009). Dans notre étude, il est possible une nouvelle fois que la réalisation plus ou moins tardive des prélèvements de colostrum masque une corrélation entre la concentration en IgG dans le colostrum et celle dans le sérum des chiots à deux jours de vie.

#### **e) IgG dans le sérum des chiennes et des chiots**

A travers notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation ni d'association entre les concentrations sériques en IgG des chiennes et des chiots contrairement au résultat

de Gonnier et Rossig (2013) ou encore de Claus et al. (2006) chez les chatons. En effet, de trop nombreux paramètres rentrent en jeu que ce soit la quantité d'IgG dans le colostrum, la quantité de colostrum tétée ou encore le moment de la tétée.

### **3. Facteurs de variation des concentrations en immunoglobulines**

#### **a) Le format racial**

Suite à notre analyse, il s'avère que le format racial et la concentration en IgG dans le sérum des chiennes au milieu de la gestation, de même que la cinétique de cette concentration entre le milieu et la fin de gestation, sont associés : plus la chienne est de grande taille, plus la concentration en IgG dans le sérum à 28 jours de gestation est élevée et plus cette concentration chute entre 28 et 56 jours de gestation. Aucune étude ne s'est intéressée aux facteurs de variation des concentrations en immunoglobulines dans le sérum de chiennes au cours de la gestation. Notre résultat constitue donc un réel apport de connaissance. En dehors de la gestation, Dall'Ara et al. (2023) ont également montré que les chiens de format racial L avaient un titre en anticorps contre le parvovirus canin de type II plus élevé que les chiens de format racial M ou Small (S).

Il apparaît difficile de comparer ce bilan par rapport à d'autres espèces dans la mesure où la notion de format racial s'applique essentiellement à l'espèce canine. Pour autant, un effet de la race sur la concentration sérique en IgG et sur sa cinétique pendant la gestation existe chez les truies (Klobasa et al., 1985) et chez les vaches (Murphy et al., 2005).

Concernant les sécrétions lactées, les concentrations élevées en IgG et en IgA que nous avons mesurées peuvent s'expliquer par l'influence du format racial des chiennes faisant partie de notre population : nous avons en effet 75 % de chiennes de grande taille (L). Or, comme nous l'avons vu, plus la chienne est de grande taille, plus les concentrations en IgG et en IgA dans le colostrum et dans le lait augmentent. Contrairement à nos résultats, les travaux d'Aggouni (2016) n'ont pas permis d'établir l'influence du format racial de la chienne sur la qualité immunologique du colostrum. Quant à l'étude d'Albaret (2016), un effet du format racial de la chienne y est identifié mais uniquement sur les concentrations en IgA des sécrétions lactées et seulement entre des chiennes de grande taille (L) et de petite taille (S).

Enfin, contrairement à Gonnier et Rossig (2013) et Mila et al. (2014), une association entre le format racial et les concentrations sériques en IgG des chiots à 2 jours de vie semble exister. Les concentrations en IgG dans le sérum varient également chez des veaux de races différentes (Cavirani et al., 2024).

Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore connus mais l'influence du format racial sur les concentrations en immunoglobulines dans le sérum des chiennes et de leurs chiots, ainsi que dans les sécrétions lactées mérite bien d'être approfondie.

### **b) La taille de portée**

Nous avons constaté que plus la taille de portée est grande, plus la concentration en IgG dans le sérum des chiennes en fin de gestation est faible. Nous avons également démontré que plus une chienne attend une grande portée, moins la concentration sérique en IgG chute entre le milieu et la fin de gestation. Cependant, cette association entre la taille de portée et la concentration en IgG dans le sérum maternel n'est pas franche dans notre travail et nous devons rester prudents quant à l'importance de ce facteur de variation. En effet, aucune étude n'est disponible chez la chienne. De plus, aucun lien entre la taille de portée et la concentration en IgG dans le colostrum canin n'a été mis en évidence ce qui rend d'ailleurs le TIP particulièrement challengeant chez les grandes portées. Enfin, il a été montré que la concentration sérique en IgG durant la gestation ne varie pas entre des truies hyper-prolifiques et peu prolifiques (Chen et al., 2021).

### **c) L'âge de la chienne**

En accord avec Coinus (2014) et Albaret (2016), nous avons montré que l'âge de la chienne influence la concentration en IgG dans le colostrum. Mais le consensus n'est pas établi (Mila et al., 2015 ; Aggouni, 2016).

Concernant les concentrations en IgA dans les sécrétions mammaires canines, nous venons confirmer l'intuition d'Albaret (2016) : plus la chienne est âgée, plus la concentration en IgA dans le lait et le colostrum est importante.

Ce facteur de variation de la qualité immunologique des sécrétions lactées ne se limite pas à l'espèce canine. Ainsi, chez la truie (Inoue et al., 1980 ; Hasan et al., 2019) ou encore la vache (Devery-Pocius et al., 1983), l'âge est aussi associé à la concentration en immunoglobulines dans le colostrum : les sécrétions lactées des femelles âgées sont plus riches en immunoglobulines.

Quelle que soit l'espèce, une hypothèse biologique serait que les femelles âgées ont été exposées à des antigènes pendant plus longtemps que de jeunes femelles et que par conséquent, elles produiraient un colostrum et un lait avec une concentration en anticorps supérieure. Un autre explication qui reste à vérifier serait une augmentation du nombre de récepteurs FcRn dans le tissu mammaire avec l'âge de la parturiente.

#### **d) La note d'état corporel**

La concentration en IgA dans le lait de notre population a été influencée significativement par la note d'état corporel en fin de gestation, les chiennes en surpoids étant défavorisées. La littérature sur ce sujet est pauvre dans l'espèce canine mais également chez les animaux de production. A la différence de notre résultat, Juthamane et al. (2024) ont montré que la concentration en IgA dans le colostrum des truies était positivement corrélée à la note d'état corporel, le tissu mammaire de truies plus maigres se développant moins que celui de truies plus grasses. Néanmoins, une note d'état corporel trop élevée chez la truie serait également préjudiciable pour le développement de la glande mammaire en fin de gestation (Head et Williams, 1991). Finalement, dans l'espèce porcine comme dans l'espèce canine, des états corporels extrêmes devraient être évités afin d'obtenir des concentrations en immunoglobulines optimales dans les sécrétions lactées.

#### **4. La supplémentation en levure**

La tendance se dessinant lorsque nous nous intéressons à l'efficacité de la supplémentation en levure SB pour améliorer la concentration en IgA dans le lait des chiennes est un résultat prometteur. En effet, les conséquences sur la santé du chiot sont importantes, les IgA du lait assurant un rôle immunitaire local majeur. Après leur ingestion, elles parviennent au niveau de l'intestin du chiot qui ne peut plus les absorber sept jours après la mise-bas. Mais elles sont capables de neutraliser les entéropathogènes dans la lumière intestinale et participent ainsi à la lutte contre une cause majeure de mortalité néonatale.

La levure SB a également influencé les concentrations en immunoglobulines dans le sérum des chiennes et des chiots mais seulement dans des sous-populations bien définies. La concentration en IgG dans le sérum maternel a ainsi été augmentée chez les chiennes ayant perdu en état corporel au cours de la gestation. Chez les chiots de format racial M, la concentration sérique en IgG est plus élevée et une diminution du risque de déficit de TIP est notée grâce à SB. Néanmoins, du fait des petits effectifs constituant ces sous-groupes, nos résultats ne sont que préliminaires. En particulier, nous devons rester prudents quant à la capacité de SB à diminuer le risque de déficit de TIP chez les chiots de format racial M étant donné qu'un seul chiot est identifié dans cette situation. Une étude sur une population plus grande et davantage homogène est primordiale pour approfondir les effets de SB sur le TIP du chiot et sur les concentrations en immunoglobulines dans le sérum maternel et dans les sécrétions lactées de l'espèce canine.

Néanmoins, notre étude a révélé que la supplémentation en levure permettrait de diminuer l'impact de certains facteurs de variation tels que le format racial ou moins

nettement la taille de portée, sur la concentration en IgG dans le sérum des chiennes (et sa cinétique au cours de la gestation) et sur la concentration en IgG dans le sérum des chiots. Cette possible faculté des probiotiques à réduire la variabilité des concentrations en immunoglobulines dans le sérum de l'espèce canine est une notion intéressante mais complexe. Des travaux davantage poussés sont nécessaires pour évaluer les conséquences de ce résultat sur la santé des chiots nouveaux-nés : ceux-ci pourraient bénéficier d'une meilleure protection systémique et la mortalité néonatale en serait ainsi diminuée.

Un dernier point mérite notre attention et concerne l'ensemble des valeurs de concentrations en immunoglobulines que nous avons obtenu dans notre analyse : celles-ci sont en moyenne plus élevées que dans la littérature ce qui pose la question d'un effet de la supplémentation en levure à l'échelle de toute notre population. Les chiennes des deux groupes « Témoin » et « Levure » ont en effet partagé le même environnement : les chiennes « Témoin » pourraient donc avoir bénéficié également de SB. Déterminer si des contacts rapprochés avec des chiennes supplémentées peuvent modifier le microbiote intestinal de chiennes non supplémentées serait judicieux. Une autre hypothèse pouvant expliquer des moyennes de concentrations en immunoglobulines supérieures à d'autres études est le recours à des techniques de dosage différentes.

A la différence de notre travail, Alonge et al. (2020) ont réussi à objectiver une augmentation des concentrations en IgG et IgA dans le colostrum de chiennes supplémentées en pré- et probiotiques pendant la gestation. Mais, contrairement à notre étude, ils se sont affranchis de biais liés au format racial (seules des chiennes Dogue allemand ont été étudiées), à l'âge et à la taille de portée. L'utilisation de prébiotiques en plus des probiotiques n'est peut-être pas non plus anodine. Pour autant, les travaux d'Adogony et al. (2007) montrent que l'efficacité des prébiotiques pour augmenter les concentrations en immunoglobulines dans les sécrétions mammaires et le sérum des chiots n'est pas si évidente : les concentrations sériques en IgG n'étaient pas différentes entre les chiots issus de chiennes supplémentées ou non. Dans le colostrum et dans le lait, seul un enrichissement en IgM a été constaté chez le groupe de chiennes supplémentées. En dehors de la gestation et de la lactation, l'amélioration de la concentration sérique en immunoglobulines par les probiotiques ne fait pas l'unanimité non plus (Lin et al., 2019 ; Xu et al., 2019 ; Rossi et al., 2020).

Chez d'autres espèces notamment porcine, les levures du genre *Saccharomyces* ont montré un effet bénéfique sur les concentrations en IgG dans le sérum des porcelets (Jang et al., 2013) et sur les concentrations en IgG (Zanello et al., 2013 ; Jang et al., 2013) et en IgA

dans le colostrum (Guillou et al., 2012). Mais ce résultat n'est pas partagé par tous (Le Floch et al., 2022), de même que dans l'espèce bovine (Hiltz et al., 2023).

### **C- Perspectives**

La variabilité de nos résultats ainsi que l'effectif réduit de notre population nous empêchent de statuer, à l'échelle de l'espèce canine, sur l'efficacité de la levure SB pour améliorer les concentrations en immunoglobulines dans le sérum des chiennes et de leur progéniture, ainsi que dans les sécrétions lactées. Nous avons pu conclure à des effets bénéfiques de SB dans certains sous-groupes de notre étude mais des effectifs plus grands et une population plus homogène, en terme de format racial par exemple, seraient intéressants. Au-delà des caractéristiques de notre population d'étude, un point particulier du protocole expérimental aurait pu permettre de mieux apprécier l'influence de la supplémentation en probiotiques : si le colostrum avait été prélevé avant la tétée des chiots, nous aurions pu mieux visualiser les relations entre les concentrations sériques maternelles, colostrales et celles du sérum des chiots.

Enrichir en immunoglobulines le sérum des chiennes et leurs sécrétions mammaires pour améliorer le TIP chez le chiot sont des objectifs louables mais qui doivent s'inscrire dans un contexte plus global d'amélioration de la santé du chiot. Ainsi, étudier la croissance et la mortalité de chiots nés de chiennes supplémentées en probiotiques ou évaluer l'impact d'une supplémentation sur des troubles de santé néonataux précis (telle que la diarrhée néonatale) pourraient être intéressants. Une étude a d'ailleurs montré qu'en supplémentant les chiennes pendant la gestation avec des pré- et probiotiques, les nouveaux-nés sont moins sujets aux gastro-entérites (Melandri et al., 2020). Dans cet optique, étudier si les probiotiques peuvent améliorer le transfert d'IgG spécifiques de pathogènes fréquents en élevage comme le parvovirus canin de type II ou l'herpèsvirus canin de type I après la vaccination des chiennes serait judicieux.

Enfin, les posologies de probiotiques à administrer pour observer des conséquences bénéfiques sur la santé des chiens en général sont encore manquantes. Pour pallier ces lacunes, des études comparant les effets de doses de levure différentes sont requises.

## CONCLUSION

A l'issue de notre travail, nous n'avons pu formellement identifier une efficacité de la levure SB pour augmenter les concentrations en immunoglobulines dans le sérum, le colostrum et le lait de chiennes, ni pour améliorer le TIP chez le chiot. Nous tirons néanmoins de notre étude quelques résultats intéressants que ce soit la tendance à l'enrichissement du lait en IgA chez les chiennes supplémentées ou l'atténuation des effets de facteurs de variation tels que le format racial sur les concentrations en IgG sériques maternelles et des nouveaux-nés. La supplémentation en probiotiques a amélioré la qualité immunologique du sérum des chiennes et des chiots uniquement dans certaines situations : chez les chiennes maigrissant au cours de la gestation et chez les chiots de format racial M pour lesquels le risque de déficit de TIP est réduit. Pour mener notre analyse avec le plus de rigueur possible, nous avons donc dû prendre en compte de nombreux facteurs de variation (âge, format racial, taille de la portée, note d'état corporel...) dont l'étude vient enrichir la littérature et apporte de nouvelles connaissances. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents précis du transfert des immunoglobulines entre la chienne et sa progéniture ne sont pas encore élucidés dans l'espèce canine. La compréhension des interactions entre les probiotiques, le microbiote intestinal et l'immunité de la chienne et des chiots constitue un défi supplémentaire sur lequel se penche de plus en plus d'auteurs.

En effet, le recours aux probiotiques s'inscrit dans la démarche « One Health » ayant notamment pour but une diminution de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire. La levure SB constitue réellement une piste intéressante qui pourrait être utilisée facilement par les éleveurs canins afin d'améliorer la santé de leurs animaux. Même si les posologies restent à définir, son innocuité garantit une généralisation de son utilisation dans les années à venir.

## BIBLIOGRAPHIE

ABDOU, Harouna, MARICHATOU, Hamani, BECKERS, Jean-François, DUFRASNE, Isabelle et HORNICK, Jean-Luc, 2012. Physiologie de la production et composition chimique du colostrum des grands mammifères domestiques: généralités. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 2012. Vol. 156, pp. 87-98.

ADKINS, Yuriko, LEPINE, Allan et LONNERDAL, Bo, 2001. Changes in protein and nutrient composition of milk throughout lactation in dogs. *American journal of veterinary research*. 1 septembre 2001. Vol. 62, pp. 1266-72. DOI 10.2460/ajvr.2001.62.1266.

ADOGONY, V., RESPONDEK, F., BIOUSSE, V., RUDEAUX, F., DELAVAL, J., BIND, J.-L. et SALMON, H., 2007. Effects of dietary scFOS on immunoglobulins in colostrums and milk of bitches. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Juin 2007. Vol. 91, n° 5-6, pp. 169-174. DOI 10.1111/j.1439-0396.2007.00688.x.

AGGOUNI, Charlotte, 2016. *Étude de la qualité immunologique et énergétique du colostrum de la chienne : impact sur la santé du chiot*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

AKTAS, Mustafa, BORKU, Mehmet et OZKANLAR, Yunusemre, 2007. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in dogs with lincomycin induced diarrhoea. *BULLETIN OF THE VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY* [en ligne]. 2007. Vol. 51, n° 3. [Consulté le 1 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://avesis.atauni.edu.tr/yayin/caca6774-91f6-481b-97d2-ff66038e06b8/efficacy-of-saccharomyces-boulardii-as-a-probiotic-in-dogs-with-lincomycin-induced-diarrhoea>

ALBARET, Amélie, 2016. *Composition immunologique des sécrétions lactées chez la chienne*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

ALONGE, Salvatore, AIUDI, Giulio Guido, LACALANDRA, Giovanni Michele, LEOCI, Raffaella et MELANDRI, Monica, 2020. Pre- and Probiotics to Increase the Immune Power of Colostrum in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7, pp. 806. DOI 10.3389/fvets.2020.570414.

AYSHPUR, O.Y., MUSHTUK, I.Y., MUZYKINA, L.M., TARASOV, O.A., YERMOLENKO, O.M., GUMENIUK, V.V. et DEREVYANKO, M.M., 2021. The analysis of the condition of colostrum immunity of sows after vaccination against porcine epidemic diarrhoea virus. [en ligne]. 2021. [Consulté le 30 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://agris.fao.org/search/en/providers/122436/records/6474b0cdbc45d9ecdbc0093b>

BARONCELLO, Sheila, CANDIAGO, Nathalia Turkot, GELINSKI, Jane Mary Lafayette Neves, CALIARI, Vinícius et BARATTO, César Milton, 2020. Meat Pet Snacks By Containing Encapsulated *Saccharomyces Boulardii*. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*. 11 juillet 2020. Vol. 2, n° 4. DOI 10.24018/ejfood.2020.2.4.69.

BASTOS, Taís Silvino, SOUZA, Camilla Mariane Menezes, LEGENDRE, Héloïse, RICHARD, Nadège, PILLA, Rachel, SUCHODOLSKI, Jan S, DE OLIVEIRA, Simone Gisele, LESAUX, Achraf Adib et FÉLIX, Ananda Portella, 2023a. Effect of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Probiotic on Diet Digestibility, Fermentative Metabolites, and Composition and Functional Potential of the Fecal Microbiota of Dogs Submitted to an Abrupt Dietary Change. *Microorganisms*. 1 février 2023. Vol. 11, n° 2, pp. 506. DOI 10.3390/microorganisms11020506.

BASTOS, Taís Silvino, SOUZA, Camilla Mariane Menezes, KAELLE, Gislaine Cristina Bill, DO NASCIMENTO, Mariana Quintino, DE OLIVEIRA, Simone Gisele et FÉLIX, Ananda Portella, 2023b. Diet supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* from different fermentation media modulates the faecal microbiota and the intestinal fermentative products in dogs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 1 mai 2023. Vol. 107 Suppl 1, pp. 30-40. DOI 10.1111/jpn.13824.

BEAM, A.L., LOMBARD, J.E., KOPRAL, C.A., GARBER, L.P., WINTER, A.L., HICKS, J.A. et SCHLATER, J.L., 2009. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science*. Août 2009. Vol. 92, n° 8, pp. 3973-3980. DOI 10.3168/jds.2009-2225.

BEBIAK, D. M., LAWLER, Dennis F. et REUTZEL, L. F., 1987. Nutrition and Management of the Dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1 mai 1987. Vol. 17, n° 3, pp. 505-533. DOI 10.1016/S0195-5616(87)50051-1.

BERTIERI, Marie-Blanche, 2012. *Étude de la concentration en immunoglobulines des sécrétions mammaires de la chienne*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

BOUCHARD, Guy, PLATA-MADRID, Hernando, YOUNGQUIST, Robert S., BUENING, Gerald M., GANJAM, Venkateshu K., KRAUSE, Gary F., ALLEN, Gary K. et PAINE, Allyson L., 1992. Absorption of an alternate source of immunoglobulin in pups. *American Journal of Veterinary Research*. 1 février 1992. Vol. 53, n° 2, pp. 230-233. DOI 10.2460/ajvr.1992.53.02.230.

BOURNE, F. J. et CURTIS, Jill, 1973. The transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. *Immunology*. Janvier 1973. Vol. 24, n° 1, pp. 157-162.

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*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

CAVIRANI, Sandro, GAMBETTI, Corrado, SCHIANO, Emiliana, CASALETTI, Eleonora, SPADINI, Costanza, MEZZASALMA, Nicolò, CABASSI, Clotilde Silvia et TADDEI, Simone, 2024. Comparison of immunoglobulin G concentrations in colostrum and newborn calf serum from animals of different breeds, parity and gender. *Large Animal Review*. 16 juin 2024. Vol. 30, n° 3, pp. 105-111.

CHAPPUIS, G., 1998. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine*. Août 1998. Vol. 16, n° 14-15, pp. 1468-1472. DOI 10.1016/S0264-410X(98)00110-8.

- CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, MARCHETEAU, Elie, FREYBURGER, Ludovic, FONTBONNE, Alain, BERGAMO, Pierre, RAVIER, Jean-François et REYNAUD, Karine, 2010. Identification and quantification of immunoglobulins in canine colostrum – Quantification of colostrum transfer. *Proceedings of 7th congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, Louvain La Neuve, Belgique*. 14-15 mai 2010. p107.
- CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, FREYBURGER, Ludovic, MARCHETEAU, Elie, THOUMIRE, Sandra, RAVIER, Jean-François et REYNAUD, Karine, 2012. Timing of the Intestinal Barrier Closure in Puppies. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012. Vol. 47, n° s6, pp. 190-193. DOI 10.1111/rda.12008.
- CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, AGGOUNI, Charlotte, ALBARET, Amélie, FOURNIER, Aurélie et MILA, Hanna, 2017. Canine and feline colostrum. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017. Vol. 52, n° S2, pp. 148-152. DOI 10.1111/rda.12830.
- CHASTANT, Sylvie et MILA, Hanna, 2016. Canine colostrum. *Veterinary Focus*. 1 janvier 2016. Vol. 26, pp. 32-38.
- CHASTANT, Sylvie et MILA, Hanna, 2019. Passive immune transfer in puppies. *Animal Reproduction Science*. 1 août 2019. Vol. 207, pp. 162-170. DOI 10.1016/j.anireprosci.2019.06.012.
- CHEN, Jiali, LI, Fuchang, YANG, Weiren, JIANG, Shuzhen et LI, Yang, 2021. Comparison of Gut Microbiota and Metabolic Status of Sows With Different Litter Sizes During Pregnancy. *Frontiers in Veterinary Science*. 23 décembre 2021. Vol. 8., DOI 10.3389/fvets.2021.793174
- CLAUS, Melissa A., LEVY, Julie K., MACDONALD, Kristin, TUCKER, Sylvia J. et CRAWFORD, P. Cynda, 2006. Immunoglobulin concentrations in feline colostrum and milk, and the requirement of colostrum for passive transfer of immunity to neonatal kittens. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Juin 2006. Vol. 8, n° 3, pp. 184-191. DOI 10.1016/j.jfms.2006.01.001.
- COINUS, Stéphanie, 2014. *Composition nutritionnelle et immunologique du colostrum canin*. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- COSTA, A., GOI, A., PENASA, M., NARDINO, G., POSENATO, L. et DE MARCHI, M., 2021. Variation of immunoglobulins G, A, and M and bovine serum albumin concentration in Holstein cow colostrum. *Animal*. 1 juillet 2021. Vol. 15, n° 7, pp. 100299. DOI 10.1016/j.animal.2021.100299.
- DALL'ARA, P., MELONI, T., ROTA, A., SERVIDA, F., FILIPE, J. et VERONESI, M. C., 2015. Immunoglobulins G and lysozyme concentrations in canine fetal fluids at term of pregnancy. *Theriogenology*. 1 mars 2015. Vol. 83, n° 4, pp. 766-771. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.11.013.
- DALL'ARA, Paola, LAUZI, Stefania, ZAMBARBIERI, Jari, SERVIDA, Francesco, BARBIERI, Laura, ROSENTHAL, Roberto, TURIN, Lauretta, SCARPARO, Elena et FILIPE, Joel, 2023. Prevalence of Serum Antibody Titers against Core Vaccine Antigens in Italian Dogs. *Life*. Février 2023. Vol. 13, n° 2, pp. 587. DOI 10.3390/life13020587.

D'ANGELO, Simona, FRACASSI PHD, Federico, BRESCIANI, Francesca, GALUPPI, Roberta, DIANA, Alessia, LINTA, Nikolina, BETTINI, Giuliano, MORINI, Maria et PIETRA, Marco, 2018. Effect of *Saccharomyces boulardii* in dogs with chronic enteropathies: double-blinded, placebo-controlled study. *Veterinary Record*. 2018. Vol. 182, n° 9, pp. 258-258. DOI 10.1136/vr.104241.

DAVID, Pauline et MANSALIER, Elodie, 2021. *Influence de la supplémentation en probiotiques de la chienne au cours de la gestation et en lactation sur la sante de la mère et celle des 73 chiots avant sevrage*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

DAY, M. J., 2007. Immune System Development in the Dog and Cat. *Journal of Comparative Pathology*. 1 juillet 2007. Vol. 137, pp. S10-S15. DOI 10.1016/j.jcpa.2007.04.005.

DEVERY-POCIUS, J. E. et LARSON, B. L., 1983. Age and Previous Lactations as Factors in the Amount of Bovine Colostral Immunoglobulins<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*. 1 février 1983. Vol. 66, n° 2, pp. 221-226. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(83)81780-9.

DEVILLERS, N., LE DIVIDICH, J. et PRUNIER, A., 2011. Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal*. 2011. Vol. 5, n° 10, pp. 1605-1612. DOI 10.1017/S175173111100067X.

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA CONCURRENCE, DE LA CONSOMMATION ET DE LA RÉPRESSION DES FRAUDES, 2023. Additifs pour l'alimentation animale [en ligne]. *DGCCRF*. 3 février 2023. [Consulté le 11 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fiches-pratiques/additifs-pour-l'alimentation-animale>

DOMINGOS, R. L., SILVA, B. A. N., BRAVO DE LAGUNA, F., ARAUJO, W. A. G., GONÇALVES, M. F., REBORDÕES, F. I. G., EVANGELISTA, R. P., DE ALKMIM, T. C. C., MIRANDA, H. A. F., CARDOSO, H. M. C., CARDOSO, L. A., HABIT, S. R. et DA MOTTA, S. A. B., 2021. *Saccharomyces Cerevisiae* var. *Boulardii* CNCM I-1079 during late gestation and lactation improves voluntary feed intake, milk production and litter performance of mixed-parity sows in a tropical humid climate. *Animal Feed Science and Technology*. 1 février 2021. Vol. 272, pp. 114785. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2020.114785.

ELGHANDOUR, M.M.Y., TAN, Z.L., ABU HAFSA, S.H., ADEGBEYE, M.J., GREINER, R., UGBOGU, E.A., CEDILLO MONROY, J. et SALEM, A.Z.M., 2020. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 1 mars 2020. Vol. 128, n° 3, pp. 658-674. DOI 10.1111/jam.14416.

FIETTO, Juliana L.R, ARAÚJO, Raquel S, VALADÃO, Frederico N, FIETTO, Luciano G, BRANDÃO, Rogelio L, NEVES, Maria J, GOMES, Fátima C.O, NICOLI, Jacques R et CASTRO, Ieso M, 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*. Août 2004. Vol. 50, n° 8, pp. 615-621. DOI 10.1139/w04-050.

FOISNET, A, FARMER, C, DAVID, C et QUESNEL, H, 2010. Relationships between colostrum production by primiparous sows and sow physiology around parturition. *Journal of animal science*. 1 mai 2010. Vol. 88, n° 5, pp. 1672-1683. DOI 10.2527/jas.2009-2562.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *World Health Organization*. 2001.

GARRIGUES, Quentin, MUGNIER, Amélie, CHASTANT, Sylvie, SICARD, Flavie, MARTIN, Jean-Charles, SVILAR, Ljubica, CASTEX, Mathieu, RAMIS-VIDAL, Manuel Guillermo, ROVERE, Nicoletta, MICHAUD, Laurine, DAVID, Pauline, MANSALIER, Elodie, RODILES, Ana, MILA, Hanna et APPER, Emmanuelle, 2024. The supplementation of female dogs with live yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* CNCM I-1079 acts as gut stabilizer at whelping and modulates immunometabolic phenotype of the puppies. *Frontiers in Nutrition*. 12 avril 2024. Vol. 11, pp. 1366256. DOI 10.3389/fnut.2024.1366256.

GODDEN, Sandra, 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1 mars 2008. Vol. 24, n° 1, pp. 19-39. DOI 10.1016/j.cvfa.2007.10.005.

GONNIER, Milène et ROSSIG, Lisa, 2013. *Étude du colostrum et du transfert passif de l'immunité dans l'espèce canine*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

GRAFF, Sandrine, CHAUMEIL, Jean-Claude, BOY, Pierre, LAI-KUEN, René et CHARRUEAU, Christine, 2008. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces bouardii* yeast. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2008. Vol. 54, n° 4, pp. 221-227. DOI 10.2323/jgam.54.221.

GREENE, C.E., SCHULTZ, R.D., 2006. Immunoprophylaxis and immunotherapy. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3ème édition, Philadelphia : WB Saunders.

GUILLOU, David, SACY, Audrey, MARCHAND, Dominique, TREUT, Yannig LE et DIVIDICH, Jean LE, 2012. Influence de l'apport alimentaire de *Saccharomyces cerevisiae bouardii* sur les immunoglobulines du colostrum et du lait de truie. *Journées Recherche Porcine*. 2012. Vol. 44, pp. 189-190.

HASAN, Shah, ORRO, Toomas, VALROS, Anna, JUNNIKKALA, Sami, PELTONIEMI, Olli et OLIVIERO, Claudio, 2019. Factors affecting sow colostrum yield and composition, and their impact on piglet growth and health. *Livestock Science*. Septembre 2019. Vol. 227, pp. 60-67. DOI 10.1016/j.livsci.2019.07.004.

HEAD, R.H., WILLIAMS, I.H., 1991. Mammogenesis is influenced by pregnancy nutrition. In: *Proceedings of the Third Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association*, 24-27 November 1991, Albury, NSW, Australia, p. 33.

HEDDLE, R. J. et ROWLEY, D., 1975. Dog immunoglobulins. I. immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. *Immunology*. Juillet 1975. Vol. 29, n° 1, pp. 185-195.

HILTZ, R. L., STEELREATH, M. R., DEGENSHEIN-WOODS, M. N., HUNG, H. C., AGUILAR, A., NIELSEN, H., REZAMAND, P. et LAARMAN, A. H., 2023. Effects of *Saccharomyces cerevisiae bouardii* (CNCM I-1079) on feed intake, blood parameters, and production during early lactation. *Journal of Dairy Science*. 1 janvier 2023. Vol. 106, n° 1, pp. 187-201. DOI 10.3168/jds.2021-21740.

INDREBØ, Astrid, TRANGERUD, Cathrine et MOE, Lars, 2007. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 12 décembre 2007. Vol. 49, n° 1, pp. S2. DOI 10.1186/1751-0147-49-S1-S2.

INOUE, T., KITANO, K. et INOUE, K., 1980. Possible factors influencing the immunoglobulin G concentration in swine colostrum. *American Journal of Veterinary Research*. Juillet 1980. Vol. 41, n° 7, pp. 1134-1136.

JANG, Y. D., KANG, K. W., PIAO, L. G., JEONG, T. S., AUCLAIR, E., JONVEL, S., D'INCA, R. et KIM, Y. Y., 2013. Effects of live yeast supplementation to gestation and lactation diets on reproductive performance, immunological parameters and milk composition in sows. *Livestock Science*. 1 avril 2013. Vol. 152, n° 2, pp. 167-173. DOI 10.1016/j.livsci.2012.12.022.

JONES, E et SPENCER, SA, 2007. The physiology of lactation. *Paediatrics and Child Health*. 1 juin 2007. Vol. 17, n° 6, pp. 244-248. DOI 10.1016/j.paed.2007.03.001.

JUTHAMANEE, Patthawan, SUWIMONTEERABUTR, Junpen et TUMMARUK, Padet, 2024. The influence of parity, body condition, litter size and carbetocin administration on colostrum production and immunoglobulin levels in highly productive sows within a tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*. 10 février 2024. Vol. 56, n° 2, pp. 74. DOI 10.1007/s11250-024-03925-z.

KHATRI, Indu, TOMAR, Rajul, GANESAN, K., PRASAD, G. S. et SUBRAMANIAN, Srikrishna, 2017. Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Scientific Reports*. 23 mars 2017. Vol. 7, n° 1, pp. 371. DOI 10.1038/s41598-017-00414-2.

KLOBASA, F., HABE, F., WERHAHN, E. et BUTLER, J. E., 1985. Changes in the concentrations of serum IgG, IgA and IgM of sows throughout the reproductive cycle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1 décembre 1985. Vol. 10, n° 4, pp. 341-353. DOI 10.1016/0165-2427(85)90023-6.

KLOPFENSTEIN C., COUTURE Y., MARTINEAU G.P., BOUCHARD E., 2002. Physiopathologie comparative de la lactation chez la truie et chez la vache. *Médecine Vétérinaire du Québec*. Vol.32, pp. 52-56.

KUO, Timothy T., BAKER, Kristi, YOSHIDA, Masaru, QIAO, Shuo-Wang, AVESON, Victoria G., LENCER, Wayne I. et BLUMBERG, Richard S., 2010. Neonatal Fc Receptor: From Immunity to Therapeutics. *Journal of Clinical Immunology*. 1 novembre 2010. Vol. 30, n° 6, pp. 777-789. DOI 10.1007/s10875-010-9468-4.

LAFLAMME, D. P., 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Practice*. 1997. Vol. 22, n°4, pp. 10-15.

LE FLOC'H, Nathalie, ACHARD, Caroline Stéphanie, EUGENIO, Francis Amann, APPER, Emmanuelle, COMBES, Sylvie et QUESNEL, Hélène, 2022. Effect of live yeast supplementation in sow diet during gestation and lactation on sow and piglet fecal microbiota, health, and performance. *Journal of Animal Science*. 8 juin 2022. Vol. 100, n° 8, pp. skac209. DOI 10.1093/jas/skac209.

LEVIEUX, Didier et OLLIER, Alain, 1999. Bovine immunoglobulin G,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research*. Août 1999. Vol. 66, n° 3, pp. 421-430. DOI 10.1017/S0022029999003581.

LIERMAN, Shay, EGERER, Azizeh et LARSON, Laurie, 2024. Circulating anti-Canine Parvovirus Antibody Titer Is Impacted by Colostrum Production in Breeding Bitches. *Animal and Veterinary Sciences*. 20 septembre 2024. Vol. 12, pp. 138-141. DOI 10.11648/j.av.s.20241205.12.

LIN, Ching-Yen, ALEXANDER, Celeste, STEELMAN, Andrew J, WARZECHA, Christine M, DE GODOY, Maria R C et SWANSON, Kelly S, 2019. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on fecal characteristics, nutrient digestibility, fecal fermentative end-products, fecal microbial populations, immune function, and diet palatability in adult dogs. *Journal of Animal Science*. 3 avril 2019. Vol. 97, n° 4, pp. 1586-1599. DOI 10.1093/jas/skz064.

LÓPEZ-SERRANO, Sergi, NEILA-IBÁÑEZ, Carlos, COSTA-HURTADO, Mar, MAHMMOD, Yasser, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Jorge, GALINDO-CARDIEL, Iván José, DARJI, Ayub, RODRÍGUEZ, Fernando, SIBILA, Marina et ARAGON, Virginia, 2021. Sow Vaccination with a Protein Fragment against Virulent *Glaesserella* (*Haemophilus*) parasuis Modulates Immunity Traits in Their Offspring. *Vaccines*. Mai 2021. Vol. 9, n° 5, pp. 534. DOI 10.3390/vaccines9050534.

MACHADO-NETO, R., GRAVES, C. N. et CURTIS, S. E., 1987. Immunoglobulins in piglets from sows heat-stressed prepartum. *Journal of Animal Science*. Août 1987. Vol. 65, n° 2, pp. 445-455. DOI 10.2527/jas1987.652445x.

MARTIN, Mathilde, 2024. *Supplémentation maternelle avec la levure Saccharomyces boulardii chez la chienne en gestation et en lactation : effets sur la composition nutritionnelle du colostrum et du lait et la croissance des chiots jusqu'au sevrage*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

MCFARLAND, Lynne V, 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 14 mai 2010. Vol. 16, n° 18, pp. 2202-2222. DOI 10.3748/wjg.v16.i18.2202.

MEINER, Giorgia, MARTELLO, Elisa, ATUAHENE, David, MIRETTI, Silvia, STEFANON, Bruno, SANDRI, Misa, BIASATO, Ilaria, CORVAGLIA, Maria Rita, FERROCINO, Ilario et COCOLIN, Luca Simone, 2022. Effects of *Saccharomyces boulardii* Supplementation on Nutritional Status, Fecal Parameters, Microbiota, and Mycobiota in Breeding Adult Dogs. *Veterinary Sciences*. Août 2022. Vol. 9, n° 8, pp. 389. DOI 10.3390/vetsci9080389.

MELANDRI, Monica, AIUDI, Giulio Guido, CAIRA, Michele et ALONGE, Salvatore, 2020. A Biotic Support During Pregnancy to Strengthen the Gastrointestinal Performance in Puppies. *Frontiers in Veterinary Science*. 4 août 2020. Vol. 7, pp. 417. DOI 10.3389/fvets.2020.00417.

MILA, Hanna, 2015. *Neonatal period in the dog: Immunological and nutritional determinants for survival*. Thèse d'université, Université de Toulouse.

- MILA, Hanna, FEUGIER, Alexandre, GRELLET, Aurélien, ANNE, Jennifer, GONNIER, Milène, MARTIN, Maelys, ROSSIG, Lisa et CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, 2014. Inadequate passive immune transfer in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Preventive Veterinary Medicine*. 1 septembre 2014. Vol. 116, n° 1, pp. 209-213. DOI 10.1016/j.prevetmed.2014.05.001.
- MILA, Hanna, FEUGIER, Alexandre, GRELLET, Aurélien, ANNE, Jennifer, GONNIER, Milène, MARTIN, Maelys, ROSSIG, Lisa et CHASTANT-MAILLARD, Sylvie, 2015. Immunoglobulin G concentration in canine colostrum: Evaluation and variability. *Journal of Reproductive Immunology*. 1 novembre 2015. Vol. 112, pp. 24-28. DOI 10.1016/j.jri.2015.06.001.
- MUGNIER, Amélie, BRÉVAUX, Julie, GRELLET, Aurélien, MILA, Hanna, LYAZRHI, Faouzi, MARIANI, Claire, ADIB, Achraf et CHASTANT, Sylvie, 2018. Low birth weight as a risk factor for early neonatal puppy mortality. *Proceeding of the 21rd congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction*, Venise, Italie. 22-23 juin 2023. P 127.
- 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.
- MURPHY, B. M., DRENNAN, M. J., O'MARA, F. P. et EARLEY, B., 2005. Cow Serum and Colostrum Immunoglobulin (IgG<sub>1</sub>) Concentration of Five Suckler Cow Breed Types and Subsequent Immune Status of Their Calves. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2005. Vol. 44, n° 2, pp. 205-213.
- NORCROSS, N. L., 1982. Secretion and composition of colostrum and milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 novembre 1982. Vol. 181, n° 10, pp. 1057-1060.
- PARDO, Silvina, GALVAGNO, Miguel Angel et CERRUTTI, Patricia, 2009. [Studies of viability and vitality after freezing of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*: physiological preconditioning effect]. *Revista iberoamericana de micologia*. 1 juin 2009. Vol. 26, n° 2, pp. 155-160. DOI 10.1016/s1130-1406(09)70028-2.
- PEREIRA, Keylla Helena Nobre Pacífico, FUCHS, Kárita da Mata, MENDONÇA, Júlia Cosenza, XAVIER, Gleice Mendes, KNUPP, Fabíola Cardoso et LOURENÇO, Maria Lucia Gomes, 2023. Topics on maternal, fetal and neonatal immunology of dogs and cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1 décembre 2023. Vol. 266, pp. 110678. DOI 10.1016/j.vetimm.2023.110678.
- PERRICONE, Vera, SANDRINI, Silvia, IRSHAD, Nida, SAVOINI, Giovanni, COMI, Marcello et AGAZZI, Alessandro, 2022. Yeast-Derived Products: The Role of Hydrolyzed Yeast and Yeast Culture in Poultry Nutrition-A Review. *Animals: an open access journal from MDPI*. 31 mai 2022. Vol. 12, n° 11, pp. 1426. DOI 10.3390/ani12111426.
- POFFENBARGER, E. M., OLSON, P. N., CHANDLER, M. L., SEIM, H. B. et VARMAN, M., 1991. Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. *American Journal of Veterinary Research*. Août 1991. Vol. 52, n° 8, pp. 1221-1224.

POLLOCK, R V et CARMICHAEL, L E, 1982. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 janvier 1982. Vol. 180, n° 1, pp. 37-42.

QUIGLEY, James, MILLS, Diamond et RAPIDS, Cedar, 2004. The role of oral immunoglobulins in systemic and intestinal immunity of neonatal calves. *Ames, IA, Iowa State University*. 1 janvier 2004.

ROSSI, Giacomo, PENGO, Graziano, GALOSI, Livio, BERARDI, Sara, TAMBELLA, Adolfo Maria, ATTILI, Anna Rita, GAVAZZA, Alessandra, CERQUETELLA, Matteo, JERGENS, Albert E., GUARD, Blake C., LIDBURY, Jonathan A., STAINER, Joerg M., CROVACE, Alberto Maria et SUCHODOLSKI, Jan S., 2020. Effects of the Probiotic Mixture Slab51® (SivoMixx®) as Food Supplement in Healthy Dogs: Evaluation of Fecal Microbiota, Clinical Parameters and Immune Function. *Frontiers in Veterinary Science*. 4 septembre 2020. Vol. 7. DOI 10.3389/fvets.2020.00613.

SALMON, H., 1999. The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 décembre 1999. Vol. 72, n° 1, pp. 143-155. DOI 10.1016/S0165-2427(99)00127-0.

SALMON, Henri, 2003. Immunophysiology of the mammary gland and transmission of immunity to the young. *Reproduction Nutrition Development*. septembre 2003. Vol. 43, n° 5, pp. 471-475. DOI 10.1051/rnd:2003033.

SALMON, Henri, BERRI, Mustapha, GERDTS, Volker et MEURENS, François, 2009. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental & Comparative Immunology*. 1 mars 2009. Vol. 33, n° 3, pp. 384-393. DOI 10.1016/j.dci.2008.07.007.

SCHÄFER-SOMI, Sabine, BÄR-SCHADLER, Sabine et AURICH, Jörg E., 2005. Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Research in Veterinary Science*. 1 avril 2005. Vol. 78, n° 2, pp. 143-150. DOI 10.1016/j.rvsc.2004.07.011.

SEGURA, Mónica, MARTÍNEZ-MIRÓ, Silvia, LÓPEZ, Miguel José, MADRID, Josefa et HERNÁNDEZ, Fuensanta, 2020. Effect of Parity on Reproductive Performance and Composition of Sow Colostrum during First 24 h Postpartum. *Animals*. 12 octobre 2020. Vol. 10, n° 10, pp. 1853. DOI 10.3390/ani10101853.

SENGER, P.L., 2012. *Pathways to pregnancy and parturition*, 3rd ed.

SERIEYS, Francis, 1993. *Le Colostrum de vache: bien le connaître pour mieux l'utiliser*. Ploufragan (rue du Sabot, BP 57, 22440) : SmithKline Beecham.

SILVA-DEL-RÍO, N., ROLLE, D., GARCÍA-MUÑOZ, A., RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, S., VALLDECABRES, A., LAGO, A. et PANDEY, P., 2017. Colostrum immunoglobulin G concentration of multiparous Jersey cows at first and second milking is associated with parity, colostrum yield, and time of first milking, and can be estimated with Brix refractometry. *Journal of Dairy Science*. Juillet 2017. Vol. 100, n° 7, pp. 5774-5781. DOI 10.3168/jds.2016-12394.

SMITH, Frances O., 2011. Prenatal Care of the Bitch and Queen. *Small Animal Pediatrics*. 2011. pp. 1-10. DOI 10.1016/B978-1-4160-4889-3.00001-2.

SPENCER, Jo, BOURSIER, Laurent et EDGEWORTH, Jonathan D., 2007. IgA Plasma Cell Development. In : KAETZEL, Charlotte Slayton (éd.), *Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A* [en ligne]. Boston, MA : Springer US. pp. 25-42. [Consulté le 24 septembre 2024]. ISBN 978-0-387-72232-0. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72232-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72232-0_2)

STERCOVA, E., KUMPRECHTOVA, D., AUCLAIR, E. et NOVAKOVA, J., 2016. Effects of live yeast dietary supplementation on nutrient digestibility and fecal microflora in beagle dogs. *Journal of Animal Science*. Juillet 2016. Vol. 94, n° 7, pp. 2909-2918. DOI 10.2527/jas.2016-0584.

TIZARD Ian R., 2018. *Veterinary Immunology*, 10th ed. St. Louis, Mo : Elsevier/Saunders.

USAMI, Katsuki, NIIMI, Kanae, MATSUO, Ayumi, SUYAMA, Yoshihisa, SAKAI, Yoshifumi, SATO, Shintaro, FUJIHASHI, Kohtaro, KIYONO, Hiroshi, UCHINO, Saeka, FURUKAWA, Mutsumi, ISLAM, Jahidul, ITO, Kaori, MORIYA, Taiki, KUSUMOTO, Yutaka, TOMURA, Michio, HOVEY, Russell C., SUGAWARA, Junichi, YONEYAMA, Hiroshi, KITAZAWA, Haruki, WATANABE, Kouichi, ASO, Hisashi et NOCHI, Tomonori, 2021. The gut microbiota induces Peyer's-patch-dependent secretion of maternal IgA into milk. *Cell Reports*. 7 septembre 2021. Vol. 36, n° 10, pp. 109655. DOI 10.1016/j.celrep.2021.109655.

VIAUD, Camille, 2018. *Le comportement de tétée du chiot et son implication dans le transfert passif de l'immunité*. Thèse de doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

WESTRÖM, Björn, ARÉVALO SUREDA, Ester, PIERZYNOWSKA, Kateryna, PIERZYNOWSKI, Stefan G. et PÉREZ-CANO, Francisco-José, 2020. The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Frontiers in Immunology*. 9 juin 2020. Vol. 11. DOI 10.3389/fimmu.2020.01153

XU, Haiyan, HUANG, Weiqiang, HOU, Qiangchuan, KWOK, Lai-Yu, LAGA, Wuri, WANG, Yanjie, MA, Huimin, SUN, Zhihong et ZHANG, Heping, 2019. Oral Administration of Compound Probiotics Improved Canine Feed Intake, Weight Gain, Immunity and Intestinal Microbiota. *Frontiers in Immunology*. 2 avril 2019. Vol. 10. DOI 10.3389/fimmu.2019.00666

YANG, Fan, ZHU, Zixiang, LIU, Huanan, CAO, Weijun, ZHANG, Wei, WEI, Ting, ZHENG, Min, ZHANG, Keshan, TIAN, Hong, ZENG, Qiaoying, CAI, Xuepeng et ZHENG, Haixue, 2021. Evaluation of Antibody Response in Sows after Vaccination with Senecavirus A Vaccine and the Effect of Maternal Antibody Transfer on Antibody Dynamics in Offspring. *Vaccines*. Octobre 2021. Vol. 9, n° 10, pp. 1066. DOI 10.3390/vaccines9101066.

ZANELLO, Galliano, MEURENS, François, SERREAU, Delphine, CHEVALEYRE, Claire, MELO, Sandrine, BERRI, Mustapha, D'INCA, Romain, AUCLAIR, Eric et SALMON, Henri, 2013. Effects of dietary yeast strains on immunoglobulin in colostrum and milk of sows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 mars 2013. Vol. 152, n° 1, pp. 20-27. DOI 10.1016/j.vetimm.2012.09.023.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Ebenezer Satyaraj,  
Nestle Purina PetCare Company, United States

REVIEWED BY  
Soledad López-Enríquez,  
Sevilla University, Spain  
Giacomo Biagi,  
University of Bologna, Italy

\*CORRESPONDENCE  
Amélie Mugnier  
✉ ameliemugnier@lallemand.com

<sup>†</sup>These authors share senior authorship

RECEIVED 08 January 2024  
ACCEPTED 29 March 2024  
PUBLISHED 12 April 2024

CITATION  
Garrigues Q, Mugnier A, Chastant S,  
Sicard F, Martin J-C, Svilar L, Castex M,  
Ramis-Vidal MG, Rovere N, Michaud L,  
David P, Mansalier E, Rodiles A, Mila H and  
Apper E (2024) The supplementation of  
female dogs with live yeast *Saccharomyces  
cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 acts as  
gut stabilizer at whelping and modulates  
immunometabolic phenotype of the puppies.  
*Front. Nutr.* 11:1366256.  
doi: 10.3389/fnut.2024.1366256

COPYRIGHT  
© 2024 Garrigues, Mugnier, Chastant, Sicard,  
Martin, Svilar, Castex, Ramis-Vidal, Rovere,  
Michaud, David, Mansalier, Rodiles, Mila and  
Apper. This is an open-access article  
distributed under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The  
use, distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# The supplementation of female dogs with live yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 acts as gut stabilizer at whelping and modulates immunometabolic phenotype of the puppies

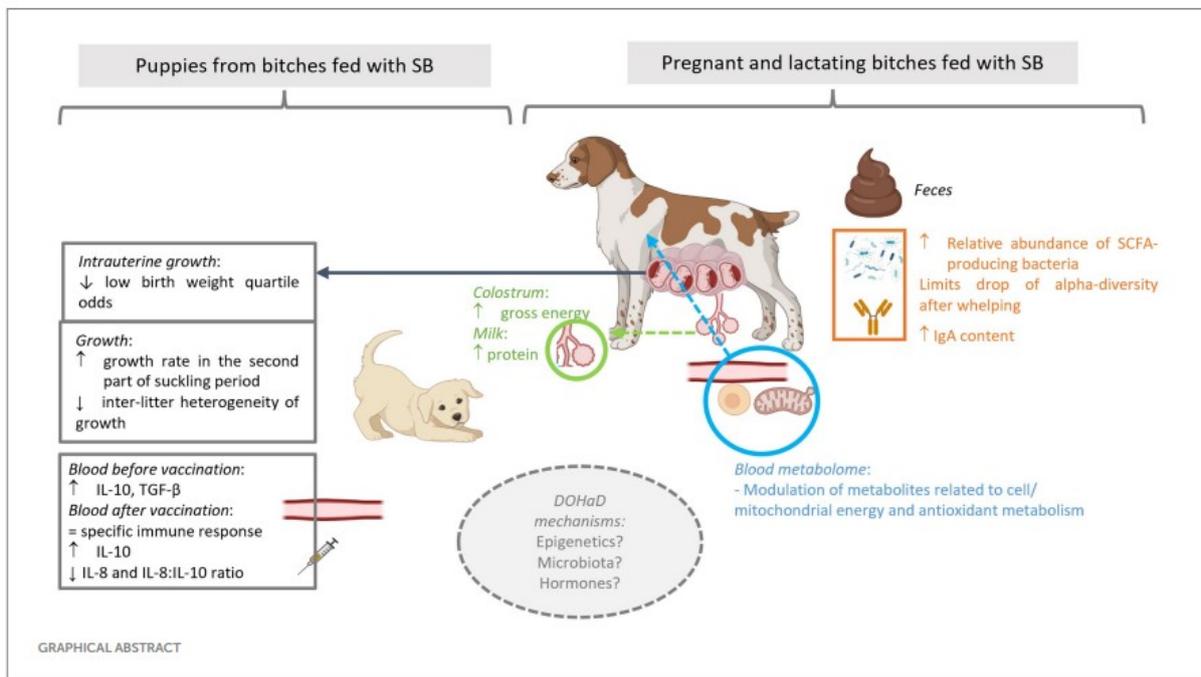
Quentin Garrigues<sup>1</sup>, Amélie Mugnier<sup>2\*</sup>, Sylvie Chastant<sup>1†</sup>,  
Flavie Sicard<sup>3,4</sup>, Jean-Charles Martin<sup>3</sup>, Ljubica Svilar<sup>3,4</sup>,  
Mathieu Castex<sup>2</sup>, Manuel Guillermo Ramis-Vidal<sup>5,6</sup>,  
Nicoletta Rovere<sup>7</sup>, Laurine Michaud<sup>1</sup>, Pauline David<sup>1</sup>,  
Elodie Mansalier<sup>1</sup>, Ana Rodiles<sup>2</sup>, Hanna Mila<sup>1</sup> and  
Emmanuelle Apper<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>NeoCare, ENVT, Université de Toulouse, Toulouse, France, <sup>2</sup>Lallemand SAS, Blagnac, France,  
<sup>3</sup>Aix-Marseille Université, C2VN, INRAE, INSERM, Marseille, France, <sup>4</sup>CriBioM, Aix Marseille Université,  
Marseille, France, <sup>5</sup>Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of  
Murcia, Murcia, Spain, <sup>6</sup>Instituto Murciano de Investigación en Biomedicina (IMIB), Murcia, Spain,  
<sup>7</sup>Department of HASFS, VESPA, University of Veterinary, Milan, Italy

Time around parturition is a stressful period for both bitches and their puppies. The use of probiotics has been proposed, e.g., in pigs, to improve health status of sows, their reproductive performances and in turn, the health and performance of their progeny. The objective of the present study was to evaluate the impact, on both dams and puppies, of a supplementation of bitches with the live yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 (SB-1079) during the second part of the gestation and the lactation period. A total of 36 bitches of medium and large-sized breeds were enrolled. They were divided into two groups, one of which received  $1.3 \times 10^9$  colony forming units of live yeast per day. At dam's level, SB-1079 yeast shaped a different microbiota structure between the two groups just after whelping, impacted alpha diversity and some plasma metabolites related to energy metabolism. Regarding reproductive performances, SB-1079 improved gross energy of the colostrum (1.4 vs. 1.2kcal of ME/g) as well as the concentration of protein in milk at Day 7 after parturition (10.4 vs. 7.6%). SB-1079 also reduced the odds of having low birth weight in the litter. At puppy's level, a modulation of immunometabolic phenotype is suggested by the observation of increased growth rates during the early pediatric period (i.e., between 21 and 56 days of life, 225 vs. 190%) and a decrease of the IL-8:IL-10 ratio after vaccination against rabies (4.2 vs. 16.9). Our findings suggest that SB-1079 supplementation during gestation and lactation has the potential to enhance health of bitches and in turn health of puppies through maternal programming.

## KEYWORDS

yeast, maternal programming, dog, puppy, immunometabolic phenotype, *Saccharomyces cerevisiae boulardii*



## 1 Introduction

Gestation, *peripartum* period and lactation are challenging times for dogs. Bitches must cope with rapid changes in their physiological state (1, 2) and puppies must adapt quickly from a protected intrauterine life to an extrauterine life. How the mother manages these periods is essential to ensure her good health but also to optimally support survival, health and well-being of the puppies (3–5). For example, adequate maternal behavior and sufficient colostrum/milk production are essential, not only for puppy survival but also for their growth until weaning. In addition, it was suggested that, as in humans, early events during the fetal and neonatal life of a dog may have long-term impacts on its health. In humans, this concept of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) was supported by a large body of epidemiological and experimental data since the first hypothesis in the 1990s (6). More recently some evidence regarding the long-term effects of early life exposures was also described in dogs (7) with, e.g., an increased risk of overweight among low birthweight (LBW) puppies (8).

Given the link between reproduction and nutrition, an appropriate nutritional strategy contributes to improve the health status of dams, their reproductive performances and in turn, the health of their litters at short and long-term (9–12). Probiotics, and particularly *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (SB), have gained extensive attention in animal nutrition and have been demonstrated to modulate digestive microbiota and support the digestive processes (13, 14). More precisely, SB exerts a trophic effect on the intestinal microbiota, resulting in beneficial effects on the microbial community diversity, structure, and support of beneficial microbes and microbial functions. Mechanisms at play are likely to combine oxygen consumption, pathogen binding, production of short-chain fatty acids (SCFA, including acetic acid), production of polyamines, B-vitamins and production of specific proteases (15). This trophic effect on the

microbiota (“gut microbiota stabilizer” effect) is expected to be responsible for most of the subsequent benefits measured in the intestine and at systemic level, even if a direct crosstalk between the yeast and the host’s cells cannot be ruled out. Those beneficial effects could, in turn, have a positive impact on welfare and performance of the animals. Recent scientific evidence on the use of SB demonstrated the involvement of maternal programming in sows and piglets through the dietary use of live microbial strains administered during gestation and lactation (13, 16, 17). More precisely, feeding SB during gestation and lactation improves digestive health of the sows through an impact on intestinal transit and a stabilization of gut microbiota at farrowing, by promoting the relative abundance of fiber degrader bacteria while decreasing the presence of undesirable bacteria such as *Campylobacter*. Furthermore, SB is demonstrated as benefiting sows’ performances as well as immune status and performances of their piglets (16–18).

Like in swine, canine species are polytocous, and the female (bitch) can give birth to multiple puppies in the same litter. Another similarity with swine is that puppies are born hypogammaglobulinemic, with limited glucose reserves and hypothermic, making the mother and her nursing capacities pivotal for their survival (19). Moreover, just like in piglets, birth weight is critical for the newborn dog, as low birth weight puppies present considerably increased risk of death during neonatal period (20, 21). Despite the growing interest of the scientific community regarding dog’s microbiome, literature regarding the impact of live yeast supplementation on reproductive performance in canine species is scarce. The objective of this study was thus to evaluate the effect of live yeast *S. boulardii* CNCM I-1079 supplementation of the pregnant and lactating bitches on their microbiota, health, and reproductive performance and on growth and immune parameters of puppies. The hypothesis is that the “maternal programming” mediated effect observed in sows and their progeny could be extended to the canine species.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the local ethical committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale, Science et Santé Animale n°115; reference number: SSA\_2020-004, Toulouse, France). The experimental protocol followed current applicable guidelines for the care and use of animals. Written informed consent was obtained from the owner of the kennel for the participation of its animals in this study.

### 2.2 Experimental design

#### 2.2.1 Animals and housing

This study was conducted in a single breeding facility. Thirty-six bitches from medium ( $> 15$  and  $\leq 25$  kg) or large-sized ( $> 25$  kg) breeds (Supplementary Table S5) were selected on day 28 of gestation (G28) after a positive pregnancy diagnosis performed by the veterinary practitioner with a portable ultrasound machine (G0 = day of ovulation determined by blood progesterone assay). They were randomly divided into two groups according to the breed size format, the age at mating, parity, body condition score and faecal score. From the time of inclusion, one group was supplemented with placebo capsules (Control,  $n=18$ ) and the other group with capsules containing the live yeast (Yeast,  $n=18$ ). Then, the follow-up of the dams and their puppies after whelping lasted until separation of the puppies, around 56 days *post-partum* (DPP56). All puppies included were born by natural delivery (i.e., no caesarean section) and remained with their mothers during the entire experiment allowing them to suckle freely.

Dogs were subjected to the same housing conditions with wood shaving as bedding material all the time. From ovulation to 8 days before whelping, bitches were kept in individual outdoor pens. Then, until 35 days *post-partum* (DPP35), they were housed in individual pens in the maternity building equipped with a floor heating system and heating lamps. Finally, dams and litters were moved to individual pens in the pre-weaning building of the breeding facility until the end of the trial. All animals were vaccinated and dewormed following the veterinary protocol in place at the breeding facility (Supplementary Table S1).

#### 2.2.2 Diets and probiotic supplementation

In order to fulfill the recommendations of the National Research Council (NRC) (22) linked to physiological stages of the bitches, two petfood manufactured by CRUSTY FOOD SAS (Montardit, Verteuil d'Agenais, France) were used. From G0 until G28, bitches received Diet 1, a complete extruded food containing wheat, peas, dehydrated poultry proteins, poultry fat, corn gluten, poultry protein hydrolysate, rice bran, meat hydrolysate, dehydrated lamb proteins, beet pulp, minerals and fish oil as feed materials; and trace minerals, vitamin A, vitamin D3 and vitamin E as nutritional feed additives. Then, from G28 to the end of the experiment (DPP56), Diet 2 was fed. It contained dehydrated poultry proteins, rice, wheat, corn, animal fat, rice bran, meat hydrolysate, corn gluten, beet pulp, minerals and fish oil as feed materials; and trace minerals, vitamin A, vitamin D3 and vitamin E as nutritional feed additives. Nutritional values of both diets are available

in Table 1. Diet 2 was made available to puppies once they reached 3 weeks of age, after a transition of around one week with the same diet mixed with water. During the experiment, all dogs had *ad libitum* access to water.

The additive tested was *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 (Levucell SB®, Lallemand SAS, Blagnac, France; SB-1079) given in 400-mg vegetal capsules (hydroxypropylmethylcellulose capsule size 1 clear, Suheung Co, South Korea) containing 6.25% yeast (measured at  $6.4 \times 10^8$  colony-forming unit (CFU) of yeast/capsule), 92.75% potato starch and 1% silicic acid. Each dam in the Yeast group received two capsules per day (i.e.,  $1.3 \times 10^9$  CFU of yeast/day), one in the morning and one in the evening, in a bullet of dry food softened in hot water then turned into a bullet, made from the diet at the time (Diet 2 from G28) to ensure full consumption. The Control group was fed the same capsules in a bullet of wet petfood but without the yeast.

### 2.3 Sampling and measurements

To evaluate the impact of live yeast supplementation, various parameters were measured on the dams and their puppies (Figure 1).

#### 2.3.1 Parameters evaluated at dam level

##### 2.3.1.1 Zootechnical performances of dams

Individual body weight (BW) and Body Condition Score [BCS, 9-points scale (23)] of dams were recorded at G28, G56, DPP1, DPP28 and DPP56. The quantity of kibbles distributed before and remaining after a meal was recorded daily from G28 to the end of the experiment. Individual food intake (FI) was obtained by calculating the difference between the quantity of kibbles distributed daily and the quantity of kibbles remaining at the end of each day.

##### 2.3.1.2 Gut health related parameters

Feces were collected for three consecutive days at four time points: G28, G56, DPP1 and DPP56, pooled for each animal and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before further analysis to evaluate faecal dry matter (DM) and

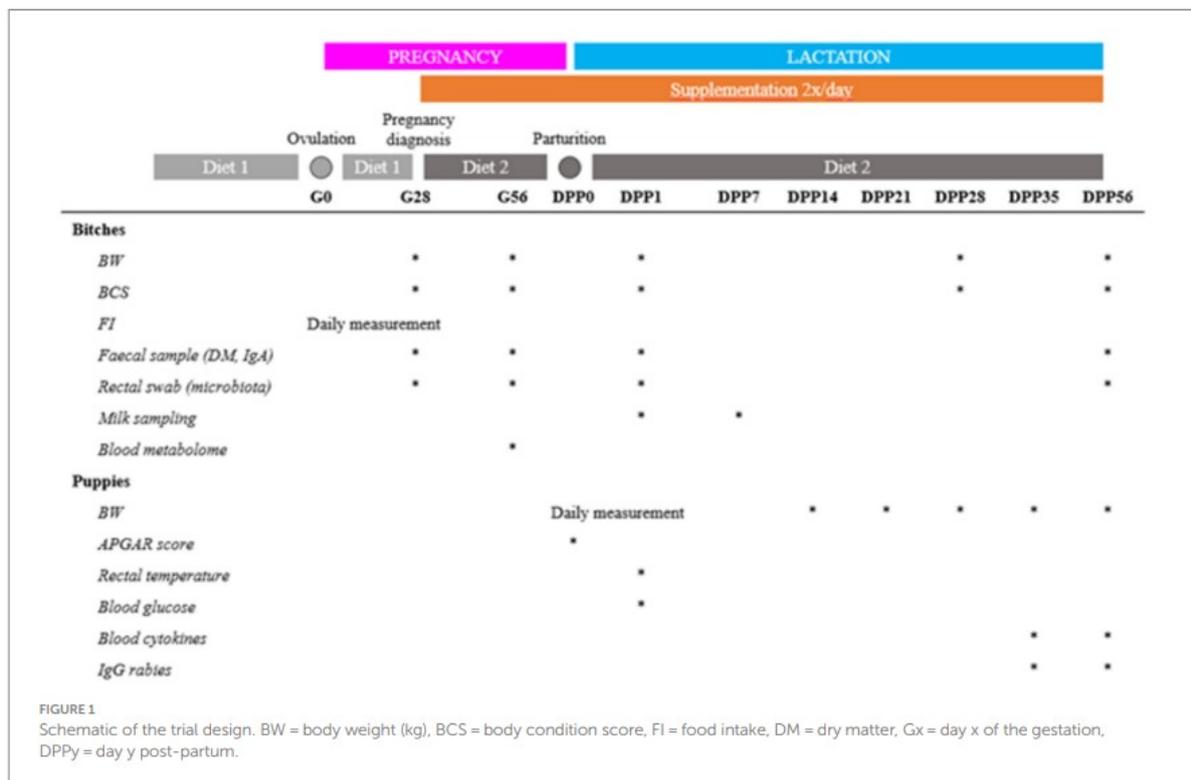
TABLE 1 Analysis of nutritional values of the feeds used in the study.

Parameter	Feed	
	Diet 1	Diet 2
Moisture, %	5.7	6.3
Crude ash, % as fed	8.7	9.3
Crude protein, % as fed	30.8	28.4
Ether extract <sup>a</sup> , % as fed	15.1	16.8
Crude fibre, % as fed	2.7	<2
Carbohydrates <sup>b</sup> , %	37.0	37.7
Vitamin E, mg/kg as fed	124	114
Vitamin A, IU/kg as fed	7,670	7,330
Vitamin D, IU/kg as fed	1,080	1,000
Metabolizable energy <sup>c</sup> , kcal/100 g	385.8	408.6

<sup>a</sup>Crude fat.

<sup>b</sup>Carbohydrate was calculated from equation: %Dry Matter = (%Ether extract + %Crude Protein + %Crude Ash + %Crude fibre).

<sup>c</sup>Metabolizable energy was calculated from equation (22, 24).



immunoglobulin A concentration (IgA). In addition, at the same time points, a faecal swab was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to perform 16S rRNA amplicon sequencing and determine faecal microbiota composition.

### 2.3.1.3 Blood metabolome

Blood was collected from the cephalic vein before whelping at G56 on a heparinized tube. The blood was centrifugated (16,000 RCF for 10 min) to isolate the plasma, and two aliquots of 250  $\mu\text{L}$  each were put in the Eppendorf tubes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### 2.3.1.4 Reproductive performances

For each dam, reproductive performances were evaluated through litter composition (number of born alive and stillborn puppies), losses (number of puppies dying from birth to DPP56) and colostrum/milk quality. Colostrum and milk were collected at DPP1 and DPP7, respectively, to determine nutritional content, IgG (for colostrum) and IgA concentrations. Before collecting the milk, an intramuscular administration of 1 or 2 UI of oxytocin was performed.

## 2.3.2 Parameters evaluated at puppy level

Each of the 254 puppies from the 36 litters born alive were identified at birth using a colored collar.

### 2.3.2.1 Newborn viability

APGAR score was recorded immediately after delivery except for puppies born between 9 p.m. and 4 a.m. A score of 7–10 means no distress, 4–6 means moderate distress and 0–3 means severe distress (25). Bodyweight at birth (BWb) was measured in the first 12 h after

birth using a digital scale (EB3 Series, Ohaus, Parsippany, NJ, United States, maximum capacity of 5 kg, precision  $\pm 0.1$  g). To deal with the variability of BWb depending on the breed (20, 26), puppies were categorized into quartile groups based on their breed and BWb (20, 21). Quartile 1 (Q1) included the 25% puppies with the lightest BWb, while quartile 4 (Q4) included the 25% heaviest. Threshold values for the targeted breeds (Supplementary Table S2) were defined based on the 4,010 BWb registered in the breeding facility during the last seven years. At DPP1, rectal temperature and blood concentration of glucose were measured.

### 2.3.2.2 Growth of puppies

In addition to weights as such, two growth rates (GR) were calculated [GR 0–21 and GR 21–56, Eq. (1)].

$$GR_{x-y} (\text{in}\%) = \left[ \frac{\text{weight at Day } y - \text{weight at Day } x}{\text{weight at Day } x} \right] \times 100 \quad (1)$$

### 2.3.2.3 Vaccination, serum specific IgG and cytokines

57 puppies selected according to their health status and BWb were included for cytokines and immune response analyses. At DPP35, puppies were vaccinated against rabies (Rabigen mono, Virbac). Just before vaccination (DPP35) and at the end of the trial (DPP56) blood samples were collected from jugular vein in dry tubes. The blood was centrifugated (16,000 RCF for 10 min) to isolate the serum, and two

aliquots of 500–750  $\mu\text{L}$  each were put in the microcentrifuge tubes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

## 2.4 Chemical analyses and DNA extraction

### 2.4.1 Chemical analyses of diets

The experimental diets were subjected to Weende (proximate) analysis. They were dried to a constant weight at  $103^{\circ}\text{C}$  to determine dry matter (DM, ISO 1442, 1997). Crude ash was determined by combustion at  $550^{\circ}\text{C}$  (ISO 936, 1998). Crude protein was calculated from Kjeldahl nitrogen ( $6.25 \times \text{N}$ , ISO 5983-1, 2005). Crude fibre was analysed by acid-alkali digestion (ISO 5498, 1981), and crude fat was analysed using acid-hydrolysis followed by Soxhlet extraction (ISO 1443, 1973). Analysis was performed by an external lab (Upscience, Vannes, France).

### 2.4.2 Faecal dry matter and IgA

200 g samples of pooled faeces were used to determine faecal DM using freeze-dried method (University of Bologna, Italy, internal protocol). IgA content in lyophilized faecal samples was carried out by using a commercial kit (dog IgA ELISA Quantitation Set, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, United States; assay range: 15.6–1,000 ng/mL), following the procedure described by Zannoni et al. (27).

### 2.4.3 Faecal microbiota

DNA was extracted from rectal swabs using Quick-DNA Faecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, United States) following the manufacturer's instructions. Quantification of extracted DNA was checked using a fluorometric method with Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen<sup>®</sup> dsDNA assay kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) measured via QuantStudio<sup>TM</sup>3 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using universal primers 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG) and 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT). PCR amplicons were purified with HighPrep PCR system (MAGBIO GENOMICS, Gaithersburg, MD, United States) and used for library construction with the Illumina NEXTflex PCR-Free DNA sequencing kit (Bioo Scientific corp., Austin, TX, United States). Amplicon libraries were sequenced on an Illumina MiSeq 2,500 platform (Illumina, San Diego, CA, United States) at GeT-PlaGe INRAE Platform (Toulouse, France) for paired-end fragment sizes of 250 bp. All reagents used were molecular grade.

### 2.4.4 Milk and colostrum composition

Protein, sugar and lipid assays from milk and colostrum samples were carried out in collaboration with the Department of Nutrition at the Smithsonian Institute in Washington using standard colostrum and milk analysis methods developed by Hood et al. (28). For the determination of dry matter, the colostrum and milk samples were weighed, dried in a forced convection oven for 3.5 to 4 h at  $100^{\circ}\text{C}$  and then reweighed. Total nitrogen was determined using the Kjeldahl method with a Dumas nitrogen gas analyser. The total amount of nitrogen was then multiplied by 6.38 to determine total protein (29). Sugars were determined by phenol-sulphuric acid colorimetric procedure using a standard range of lactose monohydrate (30) and

read at 490 nm on a microplate reader (Model ELX808; BioTek, Winooski, VT). Fat content was determined using the Röse-Gottlieb method (28), which involves three sequential extractions with diethyl ether and petroleum ether after disaggregation of milk fat globules with ammonium hydroxide and ethyl alcohol. All above nutrient contents were expressed as the percentage of nutrient content per 100 g of colostrum or milk. The gross energy (GE) content of colostrum and milk were calculated from the values of protein, sugar and lipid content using Eq. (2) with fat, protein and sugar expressed as percentage (31).

$$GE = 9.11 \times \text{fat} + 5.86 \times \text{protein} + 3.95 \times \text{sugar} \quad (2)$$

This equation is likely to slightly overestimate GE because it does not correct for non-protein nitrogen. However, it has been verified against GE values measured by calorimetry (32). Finally, milk was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until IgA and IgG assays using a previously described and validated ELISA method (Dog IgG and Dog IgA ELISA Kits, Bethyl Laboratories, Montgomery, United States) (33, 34).

### 2.4.5 Serum cytokines determination

The IL-8, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  concentrations in serum were tested by ELISA. The range of minimum detection, sensitivity and type of sample that could be used for each cytokine are listed in Supplementary Table S3. Once performed according to manufacturer instructions, the results were read in a spectrophotometer (Biochrom Anthos 2010 Microplate Reader, Biochrom LTD, Cambridge, UK) at the wavelength indicated for the dye used (450 nm). The quantification was made by means of a standard curve. In all cases will be included positive and negative controls (blanks).

### 2.4.6 Specific IgG against rabies

Quantification of anti-rabies antibodies was assessed using fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test, as recommended in the OIE Terrestrial Manual 2018 (35). Prior to the test, 80  $\mu\text{L}$  of puppies' serum were diluted with 160  $\mu\text{L}$  of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% of fetal calf serum. All puppies with levels of antibody equal to or above 0.5 UI/mL were considered protected.

### 2.4.7 Metabolome

Polar and semi-polar metabolites were extracted from the plasma of the bitches by protein precipitation using methanol. 50  $\mu\text{L}$  of plasma sample was homogenized in 200  $\mu\text{L}$  of  $-20^{\circ}\text{C}$  cold methanol. After shaking and one-hour incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$ , samples were vortex homogenized and centrifuged for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and 16,000 relative centrifugal force (RCF). Supernatants were then filtered through a 10 kDa centrifugal filter (VWR<sup>®</sup>, Rosny-sous-Bois, France, 10 kDa), dried under the gentle nitrogen stream and resuspended in 125  $\mu\text{L}$  of water/acetonitrile/formic acid (90/10/0.1, v/v/v). Samples were transferred in to the 0.45  $\mu\text{m}$  centrifugal filters (VWR<sup>®</sup>, 0.45  $\mu\text{m}$ ) and filtered for 15 min at 16000 RCF and  $4^{\circ}\text{C}$ . 50  $\mu\text{L}$  of sample was transferred into the vials and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before the analysis. Quality control samples, pool samples were prepared by assembling an equal volume of each analyzed plasma sample. Blank samples were prepared following the same extraction protocol but for water instead of plasma.

All samples were analyzed using high performance liquid chromatography (Dionex UltiMate 3,000, Thermo Scientific, Bremen, Germany) hyphenated to a high-resolution mass spectrometry (Q-Exactive Plus hybrid mass spectrometer, Thermo Scientific). Samples were analyzed randomly, and pool samples were injected every five biological samples. Reverse and normal phases were used for the chromatographic separation. For reverse phase, a Hypersil Gold C18 (100 mm × 2.1 mm × 1.9 μm) (Thermo Scientific) column was used. Oven temperature was set at 40°C. The flow rate was maintained at 0.4 mL/min, and 0.1% formic acid solutions in water and acetonitrile were used in mobile phases A and B, respectively. A first minute at 0% of B in the isocratic elution was followed by ten minutes on a linear gradient to 100% B, which was then maintained in isocratic mode for two minutes. Gaining initial conditions in one minute was followed by two minutes column equilibration. For normal phase separation, a HILIC (Se-Quant, ZIC-HILIC Peek Coated 150 × 2.1 mm × 5 μm, Merck) column was used. The oven temperature was kept at 25°C, and the flow rate at 0.25 mL/min. 16 mM ammonium formate in water was a mobile phase A, and 0.1% formic acid was mobile phase B. Chromatographic separation was done as follows. For first two minutes phase B was kept at 97%, then for 8 min decreased to 70%, for 5 min decreased to 10% and stayed isocratic for 2 min. After this gradient, the initial conditions were achieved in one minute and the column equilibration was achieved in nine minutes. Data acquisitions were obtained in a switching ion polarities mode in the *m/z* 80–100 range and with resolving power 35,000 FWHM (for *m/z* 200). Electrospray needle was kept at ±3.5 kV, S-lens RF level of 55 and a capillary temperature of 320°C. Sheath gas, auxiliary gas and sweep gas flow rates were maintained at 30, 8, and 0 arbitrary units, respectively. MS/MS spectra were acquired on a pool sample using High Collision energy Dissociation (HCD) and Data Dependent Analysis (DDA) method to obtain structural information for the large palette of metabolites.

Raw data were converted to mzXML files and processed using XCMS library in the R environment. Parameters applied for the data processing in each analysis mode are described in [Supplementary Table S4](#).

Tables of each analyzing mode, containing the *m/z*, retention times and intensities of the signals detected in all analyzed samples, were then filtered (coefficient of variation <30% in the repeated QC samples) and normalized (Van-der-Kloet algorithm), and only stable peaks were submitted to the annotation using our in-house database containing the possible adducts *m/z* and retention times of around 1,300 endogenous metabolites. Attributed annotations were verified by comparing the reference and pool MS/MS spectra.

## 2.5 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software (version 4.1.0) (36) for all parameters except microbiota for which QIIME2 (version 2020.2) (37) was used.

### 2.5.1 Models used

The quality of the randomization based on the chosen criteria (age, BCS, faecal score and parity) was assessed using a nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) rank test between Yeast and Control groups.

#### 2.5.1.1 Food intake, body weight, body condition score, faecal DM

The effect of the supplementation with SB-1079 on FI (total, during gestation and during lactation) was analysed using linear model with treatment, breed size, litter size and age of the dam as fixed effects (38). BW and BCS were also analyzed using linear mixed models with the same fixed effects plus time, interaction “time × treatment” and “dam” as random effect using lme4 and lmerTest packages (39, 40).

#### 2.5.1.2 Colostrum and milk composition

A linear model was used with treatment, breed size, litter size and dam's age as fixed effects.

#### 2.5.1.3 Litter size and health related endpoints

Count data (i.e., number of puppies born, stillborn, number of weaned puppies) were analysed with generalized linear model (GLM) with a Poisson distribution. Treatment, breed size, litter size (except for number of puppies born) and age of the dam were used as fixed effects.

#### 2.5.1.4 Quartiles of birthweight

First, a Chi-Square analysis was performed to evaluate the repartition of puppies within quartiles between the treatment groups. Afterwards, a multinomial regression was performed using the treatment, the litter size, the age of the dam as fixed factors and individual/female dog as random effect with the ordinal package (note: breed size was not included in the models as this effect was considered in the variable construction).

#### 2.5.1.5 Growth parameters

The effect of the supplementation with SB-1079 on growth rate was analysed using a linear mixed model with treatment, breed size, litter size, age of the dam, quartile of puppies' BWb as fixed effects, dam as random effect. This model allowed to handle correlation among puppies of the same litter and thus to avoid the pseudo-replication that using dogs of the same litter would cause (20, 41).

To adjust multivariate models, litter size was classified into three classes depending on the number of puppies born: less than 7 (Class 1), 7 or 8 (Class 2) and more than 8 (Class 3). Age of bitch at mating is an important factor associated to the reproductive performance (42, 43). It was included using three classes: ≤ 3 years (Class 1), [3; 4 years] (Class 2) and > 4 years (Class 3).

#### 2.5.1.6 Faecal IgA in dams, serum cytokines and specific IgG in puppies

For all those parameters, the yeast effect was evaluated using nonparametric WMW rank tests.

#### 2.5.1.7 Faecal microbiota

All bioinformatics analysis were done according to Garrigues et al. (44) in QIIME2 (version 2020.2) with Greengenes (gg-13-8-99-nb-classifier) using sklearn classifier method according to Bokulich et al. (45). To compare paired differences in alpha-diversity (e.g., the microbial diversity within the faecal ecosystem – i.e. intra-individual diversity of the faecal microbiota, evaluating using the Shannon index), a longitudinal analysis was done using a non-parametric Prentice signed-rank test within treatment and nonparametric WMW

rank test between treatments. PERMANOVA on the Aitchison distance matrix was used to assess the benefits of the yeast on the beta-diversity (i.e., the interindividual diversity of the faecal microbiota) in QIIME2 (version 2020.2). Finally, linear discriminant analysis effect size (LEfSe) (46) from Galaxy was used to identify differences in taxonomy data between the two groups just after whelping and the average composition during the whole study.

### 2.5.1.8 Metabolomics

Collected, filtered and annotated data from C18 and HILIC chromatographic separation and from positive and negative ionization modes of 83 plasma samples were merged in one non-redundant table containing 228 putatively identified molecules. When a metabolite was detected in both ionization modes or in both chromatographic modes (C18 and HILIC), the one chosen corresponded to the least coefficient of variation in the QC sample and to the highest raw intensity measured. A partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) was used to observe and discriminate bitches fed or not with SB-1079.

### 2.5.2 Models' construction and validation

Fixed effects and covariates were chosen for their biological relevance. Collinearity was assessed graphically to build the statistical model while a score called the variance inflation factor [VIF, (47)] was calculated to validate the final model. This score measures how much the variance of a regression coefficient is inflated due to multicollinearity in the model. The smallest possible value of VIF is 1 (absence of multicollinearity). As a rule of thumb, a VIF value that exceeds 5 indicates a problematic amount of collinearity (48).

For linear models and quantitative outcomes, adjusted means and standard errors (SE) obtained in the Control and Yeast groups, respectively, were reported, as well as the *p*-values for fixed effects. When required, Tukey *post-hoc* tests were performed (49). Assumptions of normality and homoscedasticity of the residuals were verified with the visual observation of studentized residuals' plots, and with statistical tests of Shapiro and Bartlett for normality and homoscedasticity of the residuals, respectively. If assumptions were not fulfilled, a non-parametric Wilcoxon rank sum test was performed.

For all generalized linear models using a Poisson distribution (number of puppies), the appropriateness of the model to the data was assessed by Pearson residuals test. The dispersion of the residuals was evaluated by the ratio between the residual deviance and the number of degrees of freedom and by a dispersion test (50), testing the null hypothesis of equidispersion in Poisson GLM against the alternative of overdispersion. If surdispersion was detected, a model using a quasipoisson law was performed. *p*-value, incidence ratio, and 95% confidence interval are reported for each regression.

For multinomial regression (51), the appropriateness of the model to the data was assessed by Pearson residuals test. To confirm the importance of the yeast treatment (and other fixed effects) in the model, a likelihood ratio test was performed using nested models, one with and the other without the treatment (or the targeted fixed effect), with a comparison between different models to check the significant of each model tested. Dispersion parameter was also checked by the ratio between the residual deviance and the number of degrees of freedom which should be close to 1. *p*-value of comparison between Control and Yeast groups, odds ratio, and 95% confidence interval are reported.

For all the statistical procedures, an effect was considered as statistically significant with  $p < 0.05$ , a biological trend was noticed for  $p < 0.10$ .

## 3 Results

### 3.1 Description of the population studied

The final bitches' cohort was composed of 4 and 5 medium-size and 14 and 13 large-size breeds enrolled in the Control and Yeast group, respectively (Supplementary Table S5). No statistical difference was detected for all the parameters considered for the randomization, confirming that the animals were homogeneously balanced between the two groups based on the chosen criteria (Supplementary Table S6).

### 3.2 Impact of the supplementation at dam's level

#### 3.2.1 Bodyweight, body condition and food intake

No difference was observed between experimental groups at any time for BW, BCS and FI of the dams (all  $p > 0.10$ , Table 2). As anticipated due to their physiological status, a time effect was observed for BW, which was higher at the end of gestation (G56), lower at DPP1 and intermediate at G28, DPP28 and DPP56 (Table 2). BCS was stable all along the study except just after parturition (DPP1), where it transiently decreased in both groups.

#### 3.2.2 Gut health of the dams

For faecal DM, the interaction between time and treatment tended to be significant ( $p < 0.1$ ). Indeed, a reduction of faecal DM over the course of the experiment was detected in the Control group while it remained stable in the Yeast group (−2% vs. 0%).

Faecal IgA concentrations averaged between G56 and DPP56 tended to be higher in the Yeast group compared to the Control group ( $23.3 \pm 3.17$  vs.  $14.5 \pm 1.98$  mg/g,  $p < 0.1$ ) with a significant difference at DPP1 ( $11.8 \pm 2.83$  and  $23.0 \pm 4.16$  mg/g DM for Control and Yeast group respectively,  $p < 0.05$ ). No time effect was observed on faecal IgA concentration (data not shown).

The evolution of the Shannon index as a marker of alpha diversity in the faecal microbiota differed between treatments across the experimental period (Figure 2A). In the Yeast group, the alpha diversity did not significantly change during the study period even if a gradual numerical increase was described during lactation. In particular, there was no marked reduction in the alpha diversity around whelping (G56) contrary to what was observed in the Control group. Indeed, significant differences were identified in the Control group between G28 and G56 and then G56 and DPP1.

Whatever the treatment and the time of sampling, the microbiota of the bitches was mostly composed of taxa belonging to the phylum Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria and Proteobacteria, and family Corynebacteriaceae, Fusobacteriaceae, Bacteroidaceae, Clostridiaceae, Veillonellaceae, Lactobacillaceae, Lachnospiraceae, Paraprevotellaceae and Streptococcaceae (Figure 2B). A PERMANOVA analysis showed that the beta-diversity significantly differed at DPP1 between Control and Yeast groups (Figure 2C;

TABLE 2 Average body weight, body condition score, gestation and lactation durations and food intake of bitches supplemented or not with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079.

Parameters	LS means $\pm$ SE		p-value (fixed effect)					
	Control	Yeast	Treatment	Time	Treatment $\times$ Time	Age	Breed size	Litter size
BW, kg	29.3 $\pm$ 1.12	26.9 $\pm$ 1.11	0.117	<0.001	0.758	0.346	<0.001	0.684
BCS	4.96 $\pm$ 0.31	4.78 $\pm$ 0.31	0.667	<0.001	0.647	0.422	0.274	0.703
Gestation duration, d	61.6 $\pm$ 0.24	61.9 $\pm$ 0.23	0.355	NR	NR	0.122	0.017	0.702
Lactation duration*, d	58.6 $\pm$ 0.61	57.8 $\pm$ 1.53	0.650	NR	NR			
FI gestation, g/d	524 $\pm$ 25.7	529 $\pm$ 25.3	0.784	NR	NR	0.068	0.005	0.626
FI lactation, g/d	936 $\pm$ 75.0	838 $\pm$ 73.8	0.409	NR	NR	0.124	0.173	0.893
FI overall, g/d	784 $\pm$ 50.3	729 $\pm$ 49.5	0.523	NR	NR	0.077	0.071	0.823

\*Wilcoxon-Mann-Whitney rank test (conditions for a linear model not fulfilled). Raw means are given in this case.

LS means = adjusted least square means, SE = standard error, BW = bodyweight, BCS = body condition score, FI = food intake, NR = non relevant (time effect was not tested), d = day.

Table 3), where relative abundances of *Clostridium hiranonis*, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Megamonas* were higher in the Yeast group compared with Control group (Figure 2D), together with *Dorea* and *Bacteroides plebeius* identified by LEfSe discriminant analysis (Supplementary Figure S1). These taxa were also detected across the entire study, suggesting a lasting effect of the yeast on the microbiota of dogs. It is also interesting to note that along the study, the microbiota of bitches in the Control group was characterized by higher relative abundances of *Proteus*, *Mycoplasma*, *Tissierellaceae*, *Pasteurellaceae* or *Vagococcus* compared to the Yeast group (Figure 2E).

### 3.2.3 Plasma metabolome

In order to identify relevant metabolites allowing to discriminate, at G56, bitches fed or not with SB-1079, two successive PLS-DA were used. The first was used as a basis for fitting a more robust model by selecting the most discriminant metabolites, i.e., those with a variance importance in projection (VIP) score greater than 1.48. The final PLS-DA (R2Y = 0.562, Q2Y = 0.466) was adjusted with 1 latent variable and based on 23 metabolites. The result of cross-validated analysis of variance (CV-ANOVA;  $p < 0.01$ ) indicated that the final PLS-DA model was valid and was able to discriminate between bitches of Control or Yeast group. It highlighted 23 discriminant metabolites (Supplementary Figure S2): xanthosine, N-acetylneuraminic acid, 2-aminopyridine-3-carboxylic acid, 2-hydroxybutyrate, L-alanine, 16:0-lysophosphatidylcholine, 18:0-lysophosphatidylcholine, indole-3-acetate, itaconate, 16:0-lysophosphatidylinositol, kynurenic acid, 4-methyl-L-glutamate, 2-hydroxyisocaproic acid, butyryl- and octanoyl-L carnitines, 3-hydroxybutanoate, 4-coumarate, 5-methylthioribose, O-acetylserine, ureidopropionate, creatine, creatinine and trans 4-hydroxy-L-proline.

### 3.2.4 Reproductive performances

#### 3.2.4.1 Colostrum and milk composition

As shown in Table 4, gross energy of the colostrum was significantly higher in the Yeast group compared with the Control ( $p < 0.05$ ) and a tendency of increased glucose concentration was noted ( $p < 0.1$ ). In addition, the concentration of protein in milk was found significantly higher in Yeast than those in Control group ( $p < 0.05$ ), while a trend of higher gross energy was also observed ( $p < 0.1$ ).

#### 3.2.4.2 Litter composition and puppy viability

In total 284 puppies were born during the study (142 in each group) with 254 puppies born alive. As shown in Table 5, no difference in the number of puppies born or in the number of stillborn puppies was evidenced between the two groups. However, the multinomial regression demonstrated that the odds of having puppies with BWb from Q1 and Q2 was lower in Yeast compared with Control group (Table 6; Figure 3A). A litter effect was also observed, with the largest litters having greater odds to have LBW puppies (Q1).

Concerning puppy's general health, no effect of yeast was obtained on APGAR score, rectal temperature or glycaemia (all  $p > 0.10$ ) which averaged  $8.2 \pm 0.2$ ,  $36.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , and  $125.5 \pm 5.4$  mg/dL, respectively (data not shown). A total of 221 puppies were weaned resulting in a mortality rate from birth to DPP56 of 21.8%, with no difference between the two groups (Table 5).

### 3.3 Impact of supplementation on immunometabolic phenotype of puppies

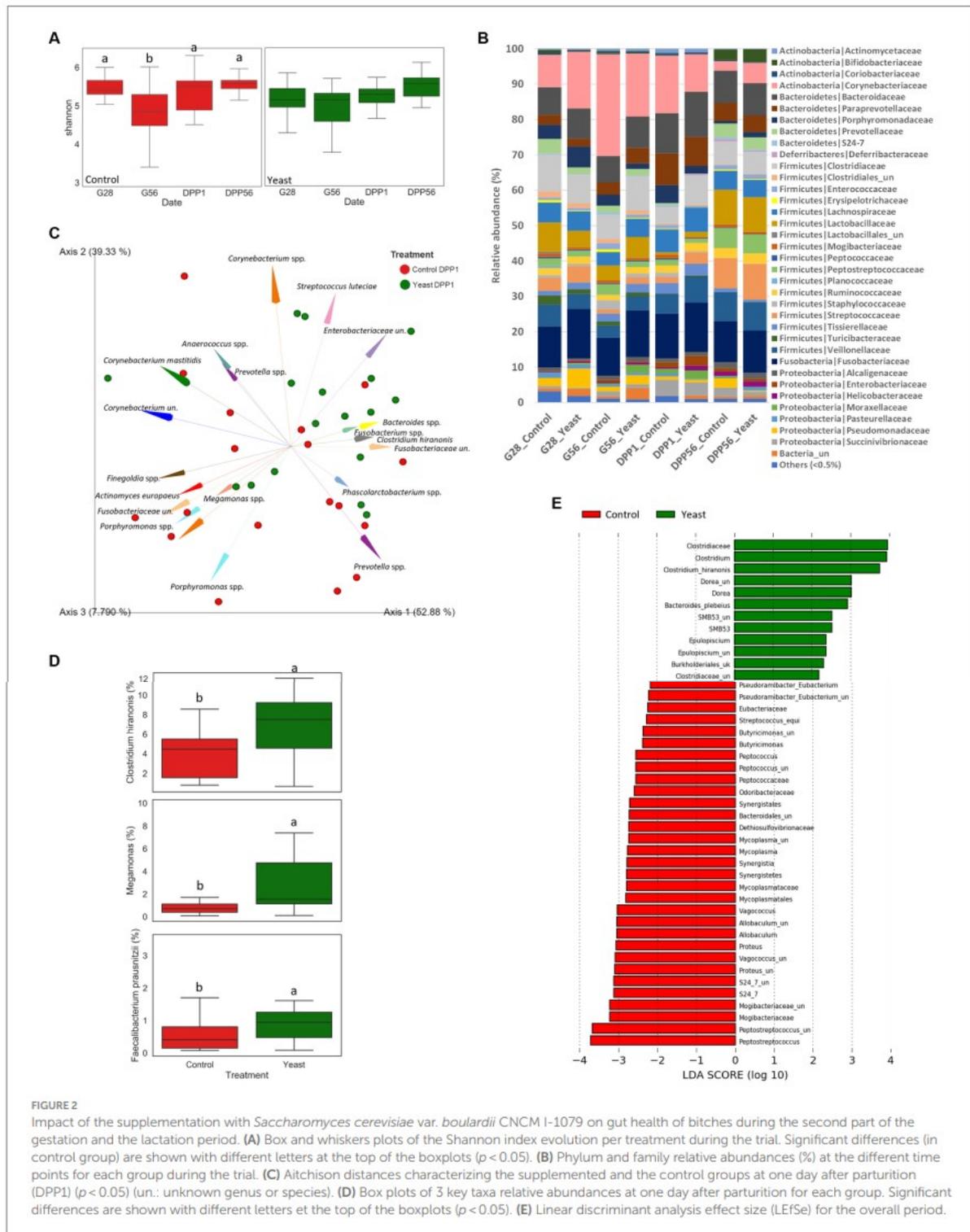
#### 3.3.1 Postnatal growth of puppies

The supplementation of the bitches with the live yeast did not change the GR 0–21, while increasing the GR 21–56 ( $p < 0.05$ , Table 6). Interestingly, a significant effect of BWb on GR 0–21 was observed, with higher values in LBW categories ( $p < 0.01$ , Table 6 and Figure 3B). In addition, a tendency towards a greater GR 0–21 was observed in large-sized puppies compared with the other sizes ( $p < 0.1$ , Table 7).

In addition, the variation coefficient of litters' average body weight from DPP4 to DPP56 was significantly reduced in puppies from bitches of the Yeast group compared with those of the Control group (Figure 3C; asymptotic test for the equality of coefficients and modified signed-likelihood ratio test (SLRT) for equality of coefficients,  $p < 0.05$ ). At the end of the trial (DPP56) variation coefficients of litters' average BW were 33.2 and 14.2% for Control and Yeast group, respectively.

#### 3.3.2 Immune parameters

Before vaccination (DPP35), puppies from bitches of the Yeast group had higher serum concentrations of anti-inflammatory cytokine IL-10 and of TGF $\beta$ , while the 3 other pro-inflammatory cytokines were unaffected (Table 8). After vaccination (DPP56), serum



concentrations of IL-8 tended to decrease while serum contents of IL-10 tended to increase in puppies from yeast-fed mothers, resulting in decreasing the IL-8: IL-10 ratio (Table 8). The evaluation of the

specific immune response after vaccination measured by anti-rabies IgG titration revealed that whatever the experimental group all puppies were protected against the virus (Table 8).

TABLE 3 Effect of a supplementation with the additive on the beta-diversity using PERMANOVA on the Aitchison distance matrix at day 1 post-partum (DPP1)<sup>a</sup>.

Group comparison	Aitchison distance	Pseudo-F-value	P-value
<b>Aitchinson distance, DPP1</b>			
Control-control (within group)	1.945 ± 0.880	4.076	0.02
Yeast-yeast (within group)	1.634 ± 0.789		
Control-yeast (between groups)	1.984 ± 0.909*		
<b>Aitchinson distance, from G56 to DPP56</b>			
Control-control (within group)	1.953 ± 0.024	1.079121	0.338
Yeast-yeast (within group)	1.860 ± 0.016		
Control-yeast (between groups)	1.826 ± 0.013		

<sup>a</sup>P < 0.05 in the PERMANOVA test means that the distances between the two groups are significantly different.

TABLE 4 Impact of the supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 on composition of colostrum and milk (n = 18 per group).

	LS means ± SE		P-value			
	Control	Yeast	Treatment	Age	Breed size	Litter size
<i>Colostrum (DPP1)</i>						
Dry matter, %	21.0 ± 0.87	22.4 ± 0.89	0.375	0.669	0.022	0.909
Crude protein, %	8.96 ± 0.74	9.46 ± 0.76	0.396	0.912	0.507	0.013
Sugars, %	2.64 ± 0.19	3.08 ± 0.20	0.059	0.550	0.186	0.396
Fat, %	6.80 ± 0.61	7.78 ± 0.60	0.117	0.005	0.563	0.998
Gross energy, kcal/g	1.24 ± 0.60	1.39 ± 0.62	0.015	0.032	0.337	0.056
IgA, g/L	12.3 ± 3.05	16.3 ± 3.00	0.512	0.058	0.063	0.848
IgG, g/L	41.8 ± 7.39	44.0 ± 7.27	0.776	0.031	0.062	0.737
<i>Milk (DPP7)</i>						
Dry matter, %	20.8 ± 0.72	22.2 ± 0.65	0.306	0.456	0.043	0.551
Crude protein, %	7.64 ± 0.83	10.4 ± 0.76	0.042	0.003	0.316	0.592
Sugars, %	3.56 ± 0.02	3.46 ± 0.02	0.966	0.398	0.428	0.699
Fat, %	8.98 ± 0.71	9.53 ± 0.65	0.416	0.198	0.473	0.863
Gross energy, kcal/g	1.41 ± 0.09	1.61 ± 0.08	0.093	0.215	0.330	0.706
IgA, g/L	13.0 ± 2.60	18.1 ± 2.52	0.297	0.003	0.083	0.830

LS means = adjusted least square means, SE = standard error, DPP = day post-partum.

## 4 Discussion

The gestation, peripartum and neonatal periods are challenging for bitches and their puppies. The aim of the present study was to evaluate whether supplementing the dams with live yeast from mid-gestation until separation of the puppies could support the animals during these periods. The effect of supplementation was investigated both in the dams and in their offspring.

Disruption of the maternal microbiota around birth could compromise normal bacterial colonization of the infant's gastrointestinal tract, and, in turn, increase susceptibility to inflammation and reduce gut barrier function (52–54). Measuring the microbiota resilience is a good way to evaluate the impact of the *peripartum* period, which is a physiological stress, on the health status of the bitches and their offspring (55). The diversity index has been described as a good indicator of gut resilience in humans (56, 57).

Previous work in humans has shown that the diversity of bacterial species within an individual typically declines with gestation and this may contribute to microbiota unbalance (58), probably because of hormonal storm. In our study, in agreement with this observation, significant differences were identified in the Control group between G28 and G56 and then G56 and DPP1; the Shannon index being the lowest at G56. Thus, the supplementation with SB-1079 seemed to limit the variation in the microbiota diversity around parturition. Interestingly, same evolution of alpha-diversity is described in sows, for which microbiota richness is reported to be the lowest on day 1 before and day 3 after parturition, and such result has also been reported in sows (59, 60). Thus, adding SB-1079 before a physiological challenge like parturition can be an interesting strategy to improve microbiota resistance and/or recovery, both components of the resilience.

Overall, the microbiota of the bitches was characterized by ASVs typical of healthy adult dogs like Fusobacteriaceae, Enterobacteriaceae,

TABLE 5 Impact of the supplementation of the dam with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 on litter size, number of puppies born alive, and number of puppies weaned and mortality at weaning ( $n = 36$  litters and 254 born alive puppies).

Item	Control	Yeast	IRR $\pm$ SE	95% CI	P-value
<i>Litter size</i>					
Intercept			7.86 $\pm$ 1.13	6.19–9.85	<0.001
Treatment (control as reference)	142	142	1.01 $\pm$ 1.13	0.80–1.28	0.935
Age (class 1 as reference; $\leq 3$ y)					
Class 2 ( $>3 \leq 4$ years)	124	78	0.99 $\pm$ 1.16	0.74–1.32	0.966
Class 3 ( $>4 \leq 6$ years)	124	82	1.06 $\pm$ 1.15	0.80–1.40	0.690
Breed size (large as reference)	216	68	0.94 $\pm$ 1.15	0.71–1.23	0.656
<i>Stillborn puppies</i>					
Intercept			0.30 $\pm$ 2.17	0.05–1.17	0.125
Treatment (control as reference)	17	13	0.78 $\pm$ 1.47	0.36–1.65	0.509
Age (class 1 as reference; $\leq 3$ y)					
Class 2 ( $>3 \leq 4$ years)	5	8	2.36 $\pm$ 1.78	0.78–7.86	0.136
Class 3 ( $>4 \leq 6$ years)	5	17	4.89 $\pm$ 1.67	1.92–14.9	0.002
Breed size (large as reference)	27	3	0.41 $\pm$ 1.92	0.09–1.28	0.174
<i>Litter size (class 1 as reference, <math>&lt;7</math> puppies born)</i>					
Class 2 (7–8 puppies born)	3	8	1.08 $\pm$ 2.03	0.29–5.16	0.918
Class 3 ( $> 8$ puppies born)	3	19	1.87 $\pm$ 1.96	0.56–8.56	0.352
<i>Number of weaned puppies</i>					
Intercept			4.33 $\pm$ 1.258	2.71–6.66	<0.001
Treatment (control as reference)	111	110	0.97 $\pm$ 1.148	0.74–1.27	0.823
Age (class 1 as reference; $\leq 3$ y)					
Class 2 ( $>3 \leq 4$ years)	108	61	0.95 $\pm$ 1.178	0.68–1.30	0.746
Class 3 ( $>4 \leq 6$ years)	108	53	0.79 $\pm$ 1.186	0.56–1.10	0.168
Breed size (large as reference)	161	61	1.22 $\pm$ 1.169	0.90–1.65	0.194
<i>Litter size (class 1 as reference, <math>&lt;7</math> puppies born)</i>					
Class 2 (7–8 puppies born)	30	82	1.50 $\pm$ 1.242	0.99–2.33	0.062
Class 3 ( $> 8$ puppies born)	30	110	1.68 $\pm$ 1.232	1.13–2.57	0.013

IRR = Incidence Rate Ratio, SE = standard error, CI = confidence interval.

*Clostridium hiranonis* (recently renamed as *Peptacetobacter hiranonis*), *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium* (61), but also by other ASVs that are more typical of gestation and lactation, like *Lactobacillaceae*, *Porphyromonas* and *Corynebacterium*. Pregnancy and lactation periods in bitches are most probably accompanied by changes on the gut microbiota as noticed in other species. In humans and swine, these changes include increased abundance of *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and opportunistic pathogens and a decrease in species richness as well as in SCFA producers bacteria, all occurring as pregnancy progresses (60, 62). Interestingly, the beta-diversity was overall not different between the 2 groups but differed significantly one day *post-partum*.

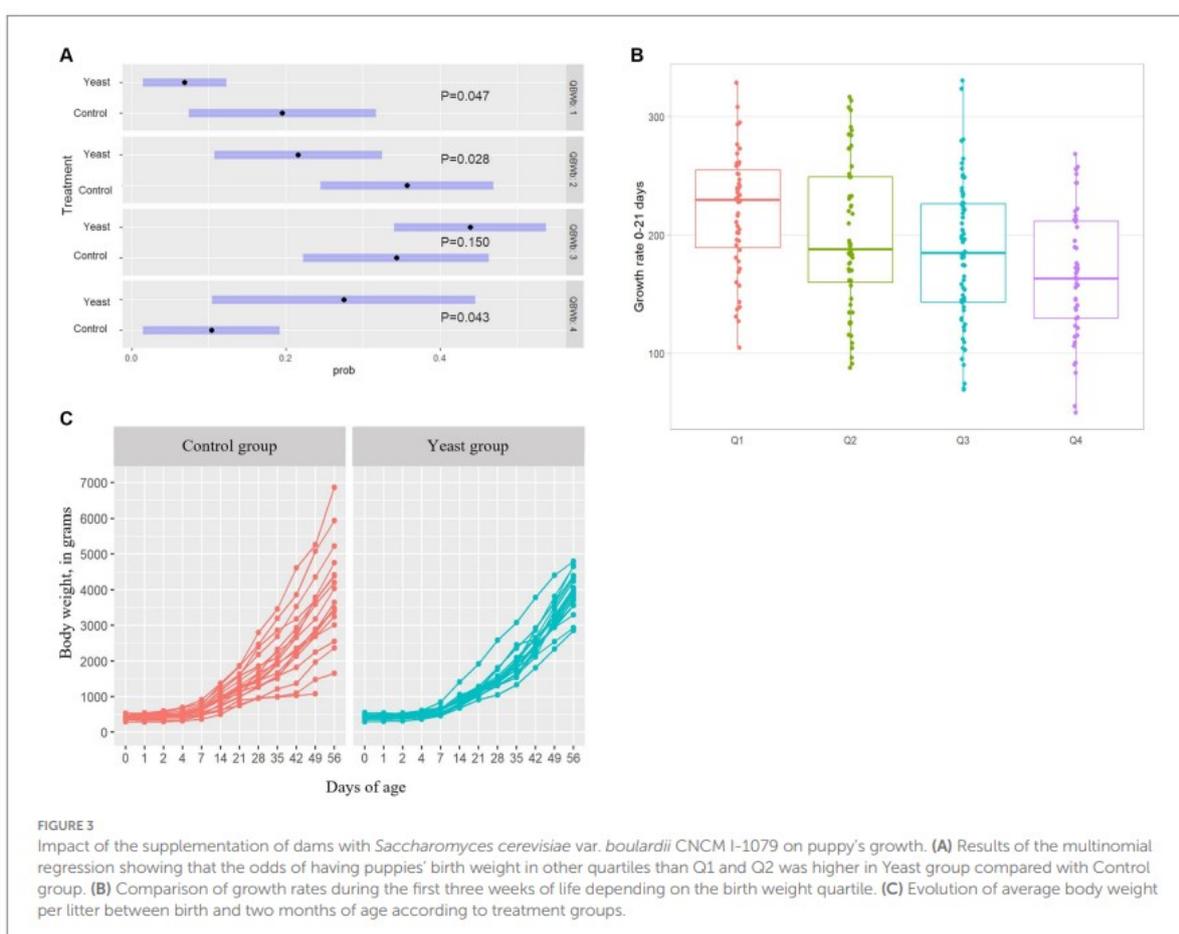
At day 1 *post-partum* (Figures 2C,D; Supplementary Figure S2), feeding SB-1079 *pre-partum* promoted a higher relative abundance of bacteria known as beneficial and linked to SCFAs production, notably *C. hiranonis*, *F. prausnitzii*, *Dorea*, *Megamonas* and *Bacteroides plebeius*. *F. prausnitzii* is a pH and oxygen sensitive bacteria, which is a well described butyrate producer while *Fusobacterium* spp. are among the “canine healthy microbiota bacteria” and can produce

butyrate from protein (61, 63). Increased abundance of *Megamonas* spp., an important propionate and acetate producer, has been found in healthy compared to diarrheic cats (64) and in dogs consuming inulin-rich diets (65). Interestingly in sows, a better persistence of relative abundance of fibrolytic bacteria, oxygen and pH sensitive strains, was reported in SB-fed sows (13, 59), suggesting that the live yeast can shape the microenvironment of the gut to favor growth of strict anaerobes. Besides the observed increase in beneficial bacteria, the LEfSe analysis at DPP1 also indicated a higher relative abundance of Enterobacteriaceae in the Yeast group compared to the Control group (Supplementary Figure S1). To deeply explore this difference, we conducted qPCR to evaluate the number of 16S DNA copies belonging to *E. coli* and found no difference between the two groups (data not reported here). All along the study, the microbiota of bitches fed the control diet was characterized by higher relative abundances of diverse bacteria (facultative anaerobes for most of them) known as opportunistic and potentially pathogenic like *Proteus* spp., *Mycoplasma* spp., *Tissierellaceae.ph2.ph2\_un* and/or *Vagococcus* spp. compared with Yeast group. Another potential pathogen, *Tissierella*

TABLE 6 Impact of the supplementation of the dam with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 on the probability of low birth weight puppies ( $n = 36$  litters and 254 born alive puppies).

	Number of Q1 BWb		Multinomial regression	
	Control	Yeast	OR $\pm$ SE (95% CI)	P-value
<b>Treatment (control as reference)</b>	41	19	$3.5 \pm 1.77$ (1.14–10.69)	0.028
<b>Age (class 1 as reference; <math>\leq 3</math> y)</b>				
Class 2 ( $>3 \leq 4$ years)	26	17	$1.14 \pm 1.95$ (0.31–4.21)	0.844
Class 3 ( $>4 \leq 6$ years)	26	17	$1.16 \pm 1.97$ (0.38–5.52)	0.580
<b>Litter size (class 1 as reference, <math>&lt;7</math> puppies born)</b>				
Class 2 (7–8 puppies born)	4	17	$0.59 \pm 2.24$ (0.12–2.85)	0.508
Class 3 ( $> 8$ puppies born)	4	39	$0.21 \pm 2.15$ (0.05–0.94)	0.041

Q1 BWb = birthweight in the lowest 25%, OR = Odds Ratio, SE = standard error, CI = confidence interval.



sp. was found in higher relative abundance in LBW puppies (66). Interestingly, Bendahmane et al. demonstrated that the supplementation of bitches with SB-1079 resulted in a decrease of opportunistic pathogenic bacteria relative abundances, especially in LBW puppies (67).

Secretory IgA (sIgA) are used as an intestinal biomarker because they play an important role in maintenance of gastrointestinal homeostasis by coating the bacteria, favoring a tolerant,

non-inflammatory relationship with the host and the homeostatic control of the intestinal redox environment. Faecal sIgA concentration is well-correlated with the sIgA concentration in supernatants taken from duodenal explant cultures in dogs, thus measuring faecal sIgA provides a good indicator of mucosal immunoglobulin levels, reflecting what happens in the gut. In our study, SB-1079 supplementation of bitches resulted in the increase in faecal sIgA concentration ( $23.3 \pm 3.17$  vs.  $14.5 \pm 1.98$  mg/g in average during all the

TABLE 7 Impact of supplementation of the dam with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 on postnatal growth of puppies ( $n = 36$  litters and 254 born alive puppies).

	LS means $\pm$ SE		P-value (fixed effects)				
	Control	Yeast	Treatment	Age	Breed size	Litter size	QBWb
GR 0–21, %	196 $\pm$ 12.2	178 $\pm$ 12.3	0.247	0.153	0.054	0.323	0.005
GR 21–56, %	190 $\pm$ 11.0	225 $\pm$ 11.2	0.022	0.334	0.393	0.393	0.742

GR x-y = growth rate between Day x and Day y, calculated as [(weight at Day y – weight at Day x)  $\div$  weight at Day x]  $\times$  100, LS means = adjusted least square means, SE = standard error, QBWb = quartile group of birthweight.

TABLE 8 Impact of the supplementation of the dam with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079 on cytokine levels (medians) of their puppies before and after vaccination against rabies ( $n = 57$  puppies).

	DPP35, before vaccination			DPP56, after vaccination		
	Control ( $n = 31$ )	Yeast ( $n = 26$ )	P-value	Control ( $n = 31$ )	Yeast ( $n = 26$ )	P-value
<b>Serum cytokines, pg/mL</b>						
IL-8	4,401	3,828	0.975	2,768	2,128	0.064
IFN $\alpha$	708.7	297.8	0.669	1,157	326.7	0.559
IFN $\gamma$	0	0	0.598	0	0	0.314
IL-10	247.4	531.3	0.043	168.9	407.6	0.068
TGF $\beta$	1,300	1,640	0.001	1,421	1,327	0.754
IL-8:IL-10	14.7	7.77	0.241	16.9	4.22	0.032
<b>Specific IgG anti-rabies, UI/mL</b>						
IgG	0.13	0.13	0.200	3.46	5.29	0.936

study period), especially at DPP1. In agreement with these results, calves supplemented with SB have been shown to exhibit higher concentrations of ileal and colonic sIgA, along with a greater relative abundance of jejunal *F. prausnitzii* (68, 69). On the contrary, Meineri et al. (70) reported a decrease in faecal sIgA in adult dogs supplemented with SB. The sIgA production is still difficult to interpret, as it is intimately connected with stress hormones release, immune cells and microbiota. Nevertheless, decrease in faecal sIgA has been identified in case of stress challenge in rodent models, while higher concentrations have been described as providing a better protection against colonization of *Clostridium difficile* in infants (71). To go further and to fully understand the effect observed in our study, an evaluation of the concentration of butyrate produced as well as a characterization of the faecal IgA-binding bacteria would have been required. Taken all together, the higher faecal IgA concentrations and the positive microbiota changes could mean that SB may favor better colon homeostasis during the challenging period around whelping.

Bitches receiving SB-1079 in their food exhibited subtle modulation in their plasmatic metabolome just before parturition (Supplementary Figure S2). Interestingly, a part of the discriminant metabolites (glycerophospholipids, acylcarnitines, ketone bodies) between Yeast and Control groups seems to be associated to lipid and energy metabolisms. Two glycerophospholipids are found as discriminant between the 2 groups. Interestingly, Alassane-Kpembé et al. (72) reported that the supplementation of piglets with SB resulted in a modulation of blood and liver glycerophospholipid pathway. Acyl-carnitines derivatives are involved in fatty-acids  $\beta$ -oxidation and essential to meet the fetal energy needs and to fuel the placenta. When fatty acid oxidation is defective or diminished an increase in plasma acylcarnitine levels can be observed (73). In humans, several studies tried to find biomarkers of LBW or preeclampsia. The concentration

of certain lysophosphatidylcholines in cord blood has been shown to positively correlate with BWb (74). Besides, the increase in serum levels of propionyl-carnitine, malonyl-carnitine, isovaleryl-carnitine, palmitoyl-carnitine and linoleoyl-carnitine were associated with gestational diabetes mellitus risk (75). Finally, ketone bodies are considered as markers of gestational diabetes during pregnancy in women (76). We could thus hypothesize that the supplementation with SB allow a better lipid/energy metabolic status, leading to better perinatal outcomes, i.e., the decreased odd of birth of LBW puppies or a higher gross energy in colostrum. However, those results are preliminary in canine species, and further research would be required to better measure the importance of those potential biomarkers of energy metabolism during gestation.

Another metabolite which raises interest during pregnancy is creatine, which has been found increased and discriminant in the Yeast group. Its homeostasis changes during pregnancy and alterations to maternal creatine homeostasis throughout gestation could impact the growth and well-being of the offspring. There is an increased requirement for maternal creatine due to the rapid growth and increased metabolic requirements of the fetus in the third trimester of pregnancy in humans. Interestingly, maternal urinary creatine excretion across pregnancy was positively correlated with birthweight centile and birth length, suggesting a relationship between maternal creatine status and fetal growth (77). In a retrospective case-controlled study (78), a 18% reduction in maternal serum creatine concentration during the third trimester of pregnancy was associated with a greater incidence of poor perinatal outcomes. Our study suggests for the first time and as in humans, a link between creatine metabolism during gestation and perinatal outcomes in canine species. Whether alterations in maternal circulating creatine concentrations are indicative of other poor perinatal outcomes is still to be ascertained. Thus, while links are beginning to emerge between maternal creatine

homeostasis throughout pregnancy and infant outcomes, further studies are required to understand adaptations to maternal creatine homeostasis throughout gestation and their association with pregnancy outcomes. Supplementation with SB could offer a nutritional strategy for modulating creatine metabolism with the aim of improving perinatal outcomes.

Our study highlights that, in pregnant bitches like in women, there is an interdependence between the gut microbiota and the host. A better faecal microbiota resilience of the alpha-diversity occurs with a consecutive promotion of SCFA-producing bacteria in bitches fed with SB-1079. It would have been interesting to evaluate SCFA production in order to correlate it with the results obtained from microbiota and metabolomic analyses. However, data obtained constitute microbial indications suggesting a relationship between microbiota diversity, SCFAs and energetic metabolism. Coumarate, found as a discriminant metabolite, is a phenolic compound which has been found to be present in high quantity in the extracellular fraction of SB (79) produces through shikimate pathway, an active metabolic pathway in SB (80), and directly absorbed in the upper digestive tract. This compound possesses antioxidant activity, protects against generation of reactive oxygen species and has shown potential therapeutic benefit in experimental diabetes and hyperlipidemia (79, 81). Interestingly, supplementation of pregnant women with polyphenols have been reported to decrease the risk of intrauterine growth restriction (82). Another interesting metabolite that links microbiota and host-metabolism is the itaconate which has been recently discovered to be a mammalian antimicrobial metabolite. Itaconic acid has great potential to be an antimicrobial compound against viruses and antibiotic-resistant bacteria and exhibits immunomodulatory effects (83). Its production occurs after lipopolysaccharide (LPS) activation of macrophages (83) to compete against succinate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. A decrease in the plasmatic concentration of this compound could be related to a positive effect of SB in the gut, resulting in less LPS stimulation through toll-like receptor 2 (TLR2) (84). The discriminant metabolite indole-3-acetate is consistent with a positive effect on gut barrier, as indole and its derivatives may promote the upregulation of adhesion-related genes and enhance the intestinal barrier to prevent enteritis. Of note, the pathway of indolacetaldehyde production from tryptophan is an active pathway in SB (80). Also indole-3 acetate occurs from tryptophan breakdown by the gut bacterial activity [*Clostridium* (85) but also *Bifidobacterium* (86)].

Throughout gestation and then via mammary secretions, female provides her puppies with the energy they need to survive and develop. During the first days after birth, colostrum, providing energy and immunity, is indispensable for newborn puppies to deal with the challenging transition from intrauterine to extrauterine life (19, 87). Many studies in pigs support that live yeast supplementation during gestation and/or lactation improves the quality of colostrum (16, 88–91). In the current study, the SB-1079 supplementation had no effect on the immune composition of the colostrum. Results of other studies using live yeast are controversial. No change in the immune composition was described in dairy cows (92) or in sows (13) but another study in sows demonstrated an increase of the IgG concentration in sow colostrum (93). Additional studies on the impact of SB supplementation on the immune composition of the colostrum in the canine species are required due to its great variation among bitches. Indeed, the IgG and IgA concentrations may vary greatly depending on time elapsed since

the onset of lactation and sampling, and depending on the number of puppies born within a litter and their suckling behaviour (33, 94). However, the supplementation of bitches with SB-1079 increased colostrum gross energy (Table 4). It could be beneficial considering the high energy requirements of puppies just after birth, their limited energy reserves and their immature thermoregulation system (95). Interestingly, in bitches, plasma N-acetylneuraminic acid (also known as sialic acid) was identified as a discriminant metabolite, suggesting a modulation of amino-sugar metabolism (96, 97). Sialic acid has been described as increasing in gestating women, being largely involved in the milk oligosaccharides synthesis, and crossing the placenta to participate to *in utero* body growth and brain development (98). Dunière et al. (91) reported that a supplementation of gestating ewes with a live yeast resulted in significantly higher levels of colostrum N-glycolylneuraminic acid. In our study, the decrease in number of LBW puppies as well as the trend to have more sugars in the colostrum are consistent with a modulation of the amino-sugar metabolism. In addition, we previously observed that 2-day old puppies from bitches supplemented with SB had a faecal microbiota richer in Lactibacillaceae which are well-described to use milk oligosaccharides (67). Finally, at day 7 *post-partum*, SB-fed bitches had a higher concentration of milk proteins and a trend of higher energy content. It was described that in the canine species, proteins provide a significant portion of the calories in colostrum and milk (99). The modulation of the plasma metabolome just before parturition could relate to the increase in energy and protein content in the mammary gland secretions, although further research is required for a better understanding of the mechanisms involved. Alternatively, it is possible that supplementation with SB improved overall nutrient digestibility in the bitches (92).

The concept of immunometabolism has emerged recently whereby the repolarizing of inflammatory immune cells toward anti-inflammatory profiles by manipulating cellular metabolism represents a new potential approach to control inflammation. It is of great interest to study it during the early life. Interestingly, main mechanisms described to sustain the DOHaD hypothesis (6) are related to epigenetics, for which mitochondrial metabolites and cofactors play a critical role and for which microbiota has been demonstrated to be a histone methylation and acetylation driver (100). B vitamins group (including nicotinic acids) and SCFAs are for example sources of acetyl-CoA or nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) which affect histone acetylation while butyrate induced histone acetylation (100). Thus, supplementing bitches with live yeast SB-1079 could affect the immunometabolic profile of their offsprings, via different mechanisms. In the current study, this profile was evaluated through the body weight at birth, the growth rate, the specific immune response as well as plasma pro- and anti-inflammatory cytokines before and after vaccination against rabies. Further studies are warranted to deeply explore the persistence of metabolic changes observed in puppies, through for example modification of the epigenome (101).

One parameter of litter composition, the repartition of puppies among BWb quartiles, was significantly influenced by the SB-1079 supplementation. Reducing the number of LBW puppies is of great interest for breeders considering their lower energy reserves, lower motility, higher risks of hypoxia, hypothermia and thus, their higher risk of neonatal mortality compared to normal BWb (20, 21, 102). Apart from this major short-term consequence, LBW was also suggested to increase odds to become obese in later life in the canine species (8). Further studies are needed to understand how

supplementation could influence intra-uterine growth, especially as this result has not been found in other studies on pigs. One hypothesis could be that SB supplementation improved overall nutrient digestibility by modulation of dam microbiota and improvement of metabolism (103). The potential antioxidant effect of SB through its metabolites, as well as the effect on energy metabolism suggested in our study could also allow an increase of nutrients dedicated to fetus growth or a better placental function or efficiency (103). Future studies should therefore include an assessment of antioxidant status as well as an evaluation of nutrient digestibility in bitches to support the hypotheses suggested by the results of the current study.

Beside the effect on BWb quartiles, an impact in the growth rate pattern was detected, with notably an improved growth during the second part of the suckling period. As in humans, monitoring the growth of puppies is recommended to identify abnormal patterns. This should be used as a proxy to evaluate short- and long-term health (104). To our knowledge, those results are the first ones reporting such an effect of live yeast supplementation to bitches on the growth pattern of puppies. A rapid growth at the beginning of life is not desired as it may favor obesity in later life (105–107). In dogs, the link between early postnatal growth and later overweight as well as the sensitivity window in which rapid growth should be avoided remain to be explored. Interestingly, our study confirmed that puppies belonging to the LBW quartile (Q1) exhibited a quicker, also called “catch-up,” growth compared to the other puppies, already described in rodents or humans (108, 109). Therefore, further studies are required to evaluate the effect of the improved growth detected in the yeast group during the second half of the suckling period on long-term health. Besides the impact on the pattern, yeast supplementation allowed a better homogeneity of postnatal growth between puppies and thus avoided extreme trajectories. Having a homogenous growth pattern in the kennel should also facilitate litter's management for breeders. In our study, puppies were not directly fed with SB, leading to speculate an indirect effect of SB. In swine, SB given to the sows has also been demonstrated to have a beneficial effect on the postnatal growth of piglets. This could be explained by the improved immune status, assessed by the serum IgG concentration, observed in piglets born to supplemented dams (16–18).

In parallel to the growth patterns, inflammatory and immunological status of the puppies was assessed before and after vaccination against rabies virus. This antigen was chosen to make sure that all the dogs, including bitches, were naïve. The aim was to avoid interference with maternal antibodies, but also to ensure that the reaction to the vaccine was not biased by a reaction to the pathogen linked to spontaneous infection. Just before vaccination, the plasma concentrations in IL-10 and in TGF- $\beta$  were significantly increased when bitches received SB-1079. After vaccination, while the specific immune response was efficient in all puppies, blood IL-8 tended to decrease; blood IL-10 to increase, leading to a significant lower IL-8: IL-10 ratio. The supplementation of the bitches with SB-1079 attenuated the inflammatory response after a vaccination while maintaining appropriate levels of specific IgG. In humans fed SB and suffering from diarrhea-dominant irritable bowel syndrome blood IL-10 increased; while blood IL-8 and TNF- $\alpha$  decreased (110) whereas in sheep, a direct supplementation induced higher seroconversion after vaccination (73). The IL-8 plays a critical role in acute inflammation and its concentration increases in blood of infants suffering from necrotizing enterocolitis (111). More generally, circulating IL-8 is proposed as a promising biomarker of gut permeability in humans (112). Besides, IL-10 and TGF- $\beta$  are

associated with immune tolerance and promotion of Treg cells and are thus of paramount importance during early life.

## 5 Conclusion

Our study highlighted an effect of SB-1079 on bitches' outcomes and in turn on maternal programming of puppies, confirming that like in other species, maternal nutrition can impact the immunometabolic phenotype of the offsprings. Indeed, in dams, it resulted in modulating gut homeostasis and microbiota while modifying cell metabolism. The inter-talk between microbiota and host seems to be an interesting area to be further investigated, in this physiological condition, but also in others like obesity, insulin resistance or in elderly populations. Feeding bitches with SB-1079 is a promising approach to optimize the health and nutrition of the vulnerable mother–infant dyad, but continued work in nutritional immunology is required to further enhance our understanding of the power of nutrition and diet to improve early-life health of companion animals.

Interestingly, a lot of similarities between humans and dogs have been highlighted, the canine species appearing as a good model to understand the DOHaD in humans and to test the effect of some nutritional strategies. More research on gut microbiota and blood or urinary metabolism of mothers and puppies is required to better understand the maternal programming effects allowed by the supplementation of live yeast to the bitches. To compare with what happens in humans, it could be of great interest to monitor the impact of the SB supplementation of the bitches on the long-term health of puppies, and notably on the obesity and diabetes risk assessment which is a major issue in pets as well as in human population.

## Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository and accession number(s) can be found at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1063569/>.

## Ethics statement

The animal study was approved by Comité d'Éthique en Expérimentation Animale, Science et Santé Animale n°115; reference number: SSA\_2020-004, Toulouse, France. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

## Author contributions

QG: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. AM: Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. SC: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing – review & editing. FS: Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review & editing. J-CM: Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review & editing. LS: Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing

– review & editing. MC: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. MR-V: Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. NR: Resources, Writing – review & editing. LM: Formal analysis, Resources, Writing – review & editing. PD: Resources, Writing – review & editing. EM: Resources, Writing – review & editing. AR: Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – review & editing. HM: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. EA: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. Funding was provided by Région Occitanie Pyrénées-Méditerranée. In addition, the author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article: this work was partially supported by Lallemand SAS (Blagnac, France).

## Acknowledgments

The authors would like to thank the breeder for giving access to the animals. Assistance provided by Fanny Mercier for sampling,

## References

- Ottka C, Vapalahti K, Arlt SP, Bartel A, Lohi H. The metabolic differences of anestrus, heat, pregnancy, pseudopregnancy, and lactation in 800 female dogs. *Front Vet Sci.* (2023) 10:1105113. doi: 10.3389/fvets.2023.1105113
- Arlt SP. The bitch around parturition. *Theriogenology.* (2020) 150:452–7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.046
- Lezama-García K, Mariti C, Mota-Rojas D, Martínez-Burnes J, Barrios-García H, Gazzano A. Maternal behaviour in domestic dogs. *Int J Vet Sci Med.* (2019) 7:20–30. doi: 10.1080/23144599.2019.1641899
- Dwyer CM. Maternal behaviour and lamb survival: from neuroendocrinology to practical application. *Animal.* (2014) 8:102–12. doi: 10.1017/S1751731113001614
- Santos NR, Beck A, Fontbonne A. A review of maternal behaviour in dogs and potential areas for further research. *J Small Anim Pract.* (2020) 61:85–92. doi: 10.1111/jsap.13085
- Barker DJP. *Mothers, babies and health in later life.* 2nd ed Edinburgh: Churchill Livingstone (1998). 217 p. Available at: <http://www.tandfonline.com/toc/rwhi20/> (Accessed June 13, 2023)
- Gaillard V, Chastant S, England G, Forman O, German AJ, Suchodolski JS, et al. Environmental risk factors in puppies and kittens for developing chronic disorders in adulthood: a call for research on developmental programming. *Front Vet Sci.* (2022) 9:944821. doi: 10.3389/fvets.2022.944821
- Mugnier A, Morin A, Cellard F, Devaux L, Delmas M, Adib-Lesaux A, et al. Association between birth weight and risk of overweight at adulthood in Labrador dogs. *PLoS One.* (2020) 15:e0243820. doi: 10.1371/journal.pone.0243820
- Fontaine E. Food intake and nutrition during pregnancy, lactation and weaning in the dam and offspring. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* (2012) 47:326–30. doi: 10.1111/rda.12102
- Koemel NA, Skilton MR. Epigenetic aging in early life: role of maternal and early childhood nutrition. *Curr Nutr Rep.* (2022) 11:318–28. doi: 10.1007/s13668-022-00402-7
- Lilycrop KA, Burdge GC. Maternal diet as a modifier of offspring epigenetics. *J Dev Orig Health Dis.* (2015) 6:88–95. doi: 10.1017/S2040174415000124
- Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D. Diet before and during pregnancy and offspring health: the importance of animal models and what can be learned from them. *Int J Environ Res Public Health.* (2016) 13:586. doi: 10.3390/ijerph13060586
- Le Floc'h N, Achard CS, Eugenio FA, Apper E, Combes S, Quesnel H. Effect of live yeast supplementation in sow diet during gestation and lactation on sow and piglet fecal

microbiota, health, and performance. *J Anim Sci.* (2022) 100:skac209. doi: 10.1093/jas/skac209

## Conflict of interest

AM, AR, MC, and EA were employed by the company Lallemand SAS.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

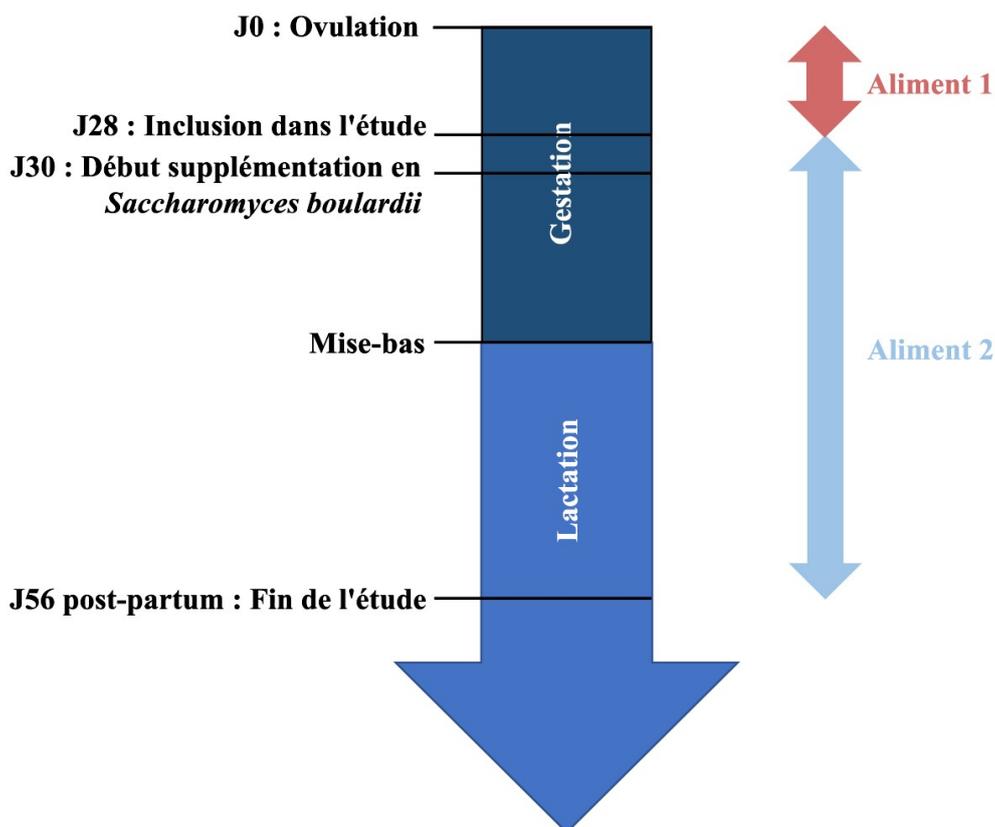
The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2024.1366256/full#supplementary-material>

- Ballet N, Renaud S, Roume H, George F, Vandekerckove P, Boyer M, et al. *Saccharomyces cerevisiae*: multifaceted applications in one health and the achievement of sustainable development goals. *Encyclopedia.* (2023) 3:602–13. doi: 10.3390/encyclopedia3020043
- Pais P, Almeida V, Yilmaz M, Teixeira MC. *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic? *J Fungi.* (2020) 6:78. doi: 10.3390/jof6020078
- Domingos RL, Silva BAN, Bravo de Laguna F, Araujo WAG, Gonçalves MF, Rebordões FIG, et al. *Saccharomyces Cerevisiae* var. *Boulardii* CNCM I-1079 during late gestation and lactation improves voluntary feed intake, milk production and litter performance of mixed-parity sows in a tropical humid climate. *Anim Feed Sci Technol.* (2021) 272:114785. doi: 10.1016/j.anifeeds.2020.114785
- Sun H, de Laguna FB, Wang S, Liu F, Shi L, Jiang H, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* *boulardii* on sows' farrowing duration and reproductive performance, and weaning piglets' performance and IgG concentration. *J Anim Sci Technol.* (2022) 64:10–22. doi: 10.5187/jast.2021.e106
- Tan CQ, Wei HK, Sun HQ, Long G, Ao JT, Jiang SW, et al. Effects of supplementing sow diets during two gestations with konjac flour and *Saccharomyces boulardii* on constipation in periparturient period, lactation feed intake and piglet performance. *Anim Feed Sci Technol.* (2015) 210:254–62. doi: 10.1016/j.anifeeds.2015.10.013
- Mila H. *Neonatal period in the dog: Immunological and nutritional determinants for survival.* France: Université de Toulouse (2015). 167 p. Available at: <https://oatao.univ-toulouse.fr/15972/1/Mila.pdf> (Accessed May 23, 2023)
- Mugnier A, Mila H, Guiraud F, Brévaux J, Lecarpentier M, Martinez C, et al. Birth weight as a risk factor for neonatal mortality: breed-specific approach to identify at-risk puppies. *Prev Vet Med.* (2019) 171:104746. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104746
- Mila H, Grellet A, Feugier A, Chastant-Maillard S. Differential impact of birth weight and early growth on neonatal mortality in puppies. *J Anim Sci.* (2015) 93:4436–42. doi: 10.2527/jas.2015-8971
- National Research Council. *Nutrient requirements of dogs and cats.* Washington, DC: National Academies Press (2006).
- Laflamme DP. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine Pract.* (1997) 22:15.
- Fédération Européenne de l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers. *Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs.* (2019).

25. Veronesi MC, Panzani S, Faustini M, Rota A. An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*. (2009) 72:401–7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.03.010
26. Gropetti D, Pecile A, Palestini C, Marelli SP, Boracchi P. A National Census of birth weight in purebred dogs in Italy. *Animals*. (2017) 7:43. doi: 10.3390/ani7060043
27. Zannoni A, Pietra M, Gaspardo A, Accorsi PA, Barone M, Turroni S, et al. Non-invasive assessment of fecal stress biomarkers in hunting dogs during exercise and at rest. *Front Vet Sci*. (2020) 7:126. doi: 10.3389/fvets.2020.00126
28. Hood WR, Voltura MB, Ofedal OT. Methods of measuring milk composition and yield in small mammals In: Ed. Thomas H. Kunz. *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Baltimore, MD: Smithsonian, John Hopkins University Press. (1988) 529–53.
29. Jones DB. *Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins*. Washington, MD: U.S. Department of Agriculture (1931). 24 p.
30. Marier JR, Baulet M. Direct analysis of lactose in Milk and serum. *J Dairy Sci*. (1959) 42:1390–1. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(59)90747-7
31. Perrin DR. The calorific value of milk of different species. *J Dairy Res*. (1958) 25:215–20. doi: 10.1017/S0022029900009213
32. Hinde K, Power ML, Ofedal OT. Rhesus macaque milk: magnitude, sources, and consequences of individual variation over lactation. *Am J Phys Anthropol*. (2009) 138:148–57. doi: 10.1002/ajpa.20911
33. Mila H, Feugier A, Grellet A, Anne J, Gonnier M, Martin M, et al. Immunoglobulin G concentration in canine colostrum: evaluation and variability. *J Reprod Immunol*. (2015) 112:24–8. doi: 10.1016/j.jri.2015.06.001
34. Schäfer-Somi S, Bär-Schadler S, Aurich JE. Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Res Vet Sci*. (2005) 78:143–50. doi: 10.1016/j.rvsc.2004.07.011
35. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. (1998) 212:79–87. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00212-3
36. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R found stat Comput (2022) Vienna, Austria: Available at: <https://www.R-project.org/>
37. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. (2019) 37:852–7. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
38. Zeileis A, Hothorn T. Diagnostic checking in regression relationships. *R News*. (2002) 2:7–10. Available at: <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>
39. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw*. (2015) 67:1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
40. Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. Lmer test package: tests in linear mixed effects models. *J Stat Softw*. (2017) 82:1–26. doi: 10.18637/jss.v082.i13
41. Alberghina D, Giò M, Quartuccio M, Majolino G, Liotta L. Puppy growth rate during early periods of Labrador retriever development: role of litter size and photoperiod of birth. *Ital J Anim Sci*. (2021) 20:26–32. doi: 10.1080/1828051X.2020.1863869
42. Chastant-Maillard S, Guillemot C, Feugier A, Mariani C, Grellet A, Mila H. Reproductive performance and pre-weaning mortality: preliminary analysis of 27, 221 purebred female dogs and 204, 537 puppies in France. *Reprod Domest Anim*. (2017) 52:158–62. doi: 10.1111/rda.12845
43. Axné E, Rasmus LS, Melangen T. Factors affecting reproductive performance in the Swedish Bernese mountain dog. *Acta Vet Scand*. (2022) 64:28. doi: 10.1186/s13028-022-00646-x
44. Garrigues Q, Apper E, Rodiles A, Rovere N, Chastant S, Mila H. Composition and evolution of the gut microbiota of growing puppies is impacted by their birth weight. *Sci Rep*. (2023) 13:14717. doi: 10.1038/s41598-023-41422-9
45. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. (2018) 6:90. doi: 10.1186/s40168-018-0470-z
46. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. (2011) 12:R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
47. Fox J, Weisberg S. *An R companion to applied regression*. Third edition. Sage, Thousand Oaks CA (2019). Available at: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
48. James DA, Mosel K, Chipps SR. The influence of light, stream gradient, and iron on *Didymosphenia geminata* bloom development in the Black Hills, South Dakota. *Hydrobiologia*. (2014) 721:117–27. doi: 10.1007/s10750-013-1654-y
49. Lenth R. Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares mean. R Package Version 181–1 (2022). Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
50. Kleiber C, Zeileis A. AER: Applied econometrics with R. (2008). Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=AER> (Accessed June 20, 2023)
51. Christensen R. Ordinal—Regression Models for Ordinal Data. (2022). Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=ordinal> (Accessed June 20, 2023)
52. Huang X-Z, Zhu L-B, Li Z-R, Lin J. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. *World J Clin Pediatr*. (2013) 2:46–53. doi: 10.5409/wjcp.v2i4.46
53. Kapourchali FR, Cresci GAM. Early-life gut microbiome—the importance of maternal and infant factors in its establishment. *Nutr Clin Pract*. (2020) 35:386–405. doi: 10.1002/ncp.10490
54. He J, Zheng W, Tao C, Guo H, Xue Y, Zhao R, et al. Heat stress during late gestation disrupts maternal microbial transmission with altered offspring's gut microbial colonization and serum metabolites in a pig model. *Environ Pollut*. (2020) 266:115111. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115111
55. Dogra SK, Doré J, Damak S. Gut microbiota resilience: definition, link to health and strategies for intervention. *Front Microbiol*. (2020) 11:572921. doi: 10.3389/fmicb.2020.572921
56. Raymond F, Ouameur AA, Déraspe M, Iqbal N, Gingras H, Dridi B, et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J*. (2016) 10:707–20. doi: 10.1038/ismej.2015.148
57. Tap J, Furet J-P, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, et al. Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol*. (2015) 17:4954–64. doi: 10.1111/1462-2920.13006
58. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Kling Bäckhed H, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. (2012) 150:470–80. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.008
59. Apper E, Castex M, Achard C. Compositions and methods for growing the population of microorganisms in a gut of monogastric animals. (2020). Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2020249246A1/en?qoq=patent+W2020249246> (Accessed June 7, 2023)
60. Gaukroger CH, Edwards SA, Walshaw J, Nelson A, Adams IP, Stewart CJ, et al. Shifting sows: longitudinal changes in the periparturient faecal microbiota of primiparous and multiparous sows. *Animal*. (2021) 15:100135. doi: 10.1016/j.animal.2020.100135
61. Pilla R, Suchodolski JS. The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Front Vet Sci*. (2020) 6:498. doi: 10.3389/fvets.2019.00498
62. Wei S, Bahl MI, Baunwall SMD, Hvas CL, Licht TR. Determining gut microbial Dysbiosis: a review of applied indexes for assessment of intestinal microbiota imbalances. *Appl Environ Microbiol*. (2021) 87:e00395–21. doi: 10.1128/AEM.00395-21
63. AlShawaqfeh MK, Wajid B, Minamoto Y, Markel M, Lidbury JA, Steiner JM, et al. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol Ecol*. (2017) 93. doi: 10.1093/femsec/fix136
64. Suchodolski JS, Foster ML, Sohail MU, Leutenegger C, Queen EV, Steiner JM, et al. The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PLoS One*. (2015) 10:e0127378. doi: 10.1371/journal.pone.0127378
65. Beloshapka AN, Dowd SE, Suchodolski JS, Steiner JM, Duclos L, Swanson KS. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol*. (2013) 84:532–41. doi: 10.1111/1574-6941.12081
66. Garrigues Q, Apper E, Rodiles A, Chastant S, Mila H. *Differences in the establishment and evolution of the gut microbiota between low and Normal birth weight growing puppies*. 26th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN), Basel, Switzerland: (2022).
67. Bendahmane I, Apper E, Garrigues Q, Chastant S, Meynadier A, Mila H. *Effect of maternal supplementation with live yeast S. Boulardii I-1079 on the gut microbiota of newborn puppies*. 1st European Symposium on Animal Reproduction (ESAR), Nantes, France: (2023).
68. Villot C, Chen Y, Pedgerachny K, Chaucheyras-Durand F, Cheveau E, Skidmore A, et al. Early supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 in newborn dairy calves increases IgA production in the intestine at 1 week of age. *J Dairy Sci*. (2020) 103:8615–28. doi: 10.3168/jds.2020-18274
69. Rostoll Cangiano L, Villot C, Amorin-Hegedus R, Malmuthuge N, Gruninger R, Guan LL, et al. *Saccharomyces cerevisiae* boulardii accelerates intestinal microbiota maturation and is correlated with increased secretory IgA production in neonatal dairy calves. *Front Microbiol*. (2023) 14:1129250. doi: 10.3389/fmicb.2023.1129250
70. Meineri G, Martello E, Atuahene D, Miretti S, Stefanon B, Sandri M, et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on nutritional status, fecal parameters, microbiota, and Mycobiota in breeding adult dogs. *Vet Sci*. (2022) 9:389. doi: 10.3390/vetsci9080389
71. Bridgman SL, Konya T, Azad MB, Guttman DS, Sears MR, Becker AB, et al. High fecal IgA is associated with reduced *Clostridium difficile* colonization in infants. *Microbes Infect*. (2016) 18:543–9. doi: 10.1016/j.micinf.2016.05.001
72. Alassane-Kpembé I, Pinton P, Hupé J-F, Neves M, Lippi Y, Combes S, et al. *Saccharomyces cerevisiae* Boulardii reduces the Deoxynivalenol-induced alteration of the intestinal transcriptome. *Toxins*. (2018) 10:199. doi: 10.3390/toxins10050199
73. Koster MPH, Vreeken RJ, Harms AC, Dane AD, Kuc S, Schielen PCJ, et al. First-trimester serum Acylcarnitine levels to predict preeclampsia: a metabolomics approach. *Dis Markers*. (2015) 2015:e857108:1–8. doi: 10.1155/2015/857108

74. Chao de la Barca JM, Chabrun F, Lefebvre T, Roche O, Huetz N, Blanchet O, et al. A Metabolomic profiling of intra-uterine growth restriction in placenta and cord blood points to an impairment of lipid and energetic metabolism. *Biomedicines*. (2022) 10:1411. doi: 10.3390/biomedicines10061411
75. Zhao H, Li H, Zheng Y, Zhu L, Fang J, Xiang L, et al. Association of altered serum acylcarnitine levels in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Sci China Chem*. (2020) 63:126–34. doi: 10.1007/s11426-019-9580-2
76. Tanner HL, Dekker Nitert M, Callaway LK, Barrett HL. Ketones in pregnancy: why is it considered necessary to avoid them and what is the evidence behind their perceived risk? *Diabetes Care*. (2021) 44:280–9. doi: 10.2337/dc20-2008
77. Dickinson H, Davies-Tuck M, Ellery S, Grieger J, Wallace E, Snow R, et al. Maternal creatine in pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. (2016) 123:1830–8. doi: 10.1111/1471-0528.14237
78. Heazell AEP, Bernatavicius G, Warrander L, Brown MC, Dunn WB. A Metabolomic approach identifies differences in maternal serum in third trimester pregnancies that end in poor perinatal outcome. *Reprod Sci*. (2012) 19:863–75. doi: 10.1177/1933719112438446
79. Datta S, Timson DJ, Annappure US. Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *J Sci Food Agric*. (2017) 97:3039–49. doi: 10.1002/jsfa.8147
80. Fu J, Liu J, Wen X, Zhang G, Cai J, Qiao Z, et al. Unique probiotic properties and bioactive metabolites of *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. (2022) 15:967–82. doi: 10.1007/s12602-022-09953-1
81. Alam MA, Subhan N, Hossain H, Hossain M, Reza HM, Rahman MM, et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr Metab*. (2016) 13:27. doi: 10.1186/s12986-016-0080-3
82. Yeste N, Gómez N, Vázquez-Gómez M, García-Contreras C, Pumarola M, González-Bulnes A, et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: intrauterine growth restriction and Hydroxytyrosol affect the development and neurotransmitter profile of the Hippocampus in a pig model. *Antioxidants*. (2021) 10:1505. doi: 10.3390/antiox10101505
83. Peace CG, O'Neill LAJ. The role of itaconate in host defense and inflammation. *J Clin Invest*. (2022) 132:e148548. doi: 10.1172/JCI148548
84. Terciolo C, Dapoigny M, Andre F. Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. *Clin Exp Gastroenterol*. (2019) 12:67–82. doi: 10.2147/CEG.S181590
85. Marion S, Studer N, Desharnais L, Menin L, Escrig S, Meibom A, et al. In vitro and in vivo characterization of *Clostridium scindens* bile acid transformations. *Gut Microbes*. (2019) 10:481–503. doi: 10.1080/19490976.2018.1549420
86. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol*. (2013) 24:160–8. doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.005
87. Nowak R, Poindron P. From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reprod Nutr Dev*. (2006) 46:431–46. doi: 10.1051/rnd:2006023
88. Peng X, Yan C, Hu L, Huang Y, Fang Z, Lin Y, et al. Live yeast supplementation during late gestation and lactation affects reproductive performance, colostrum and milk composition, blood biochemical and immunological parameters of sows. *Anim Nutr*. (2020) 6:288–92. doi: 10.1016/j.aninu.2020.03.001
89. Jang YD, Kang KW, Piao LG, Jeong TS, Auclair E, Jonvel S, et al. Effects of live yeast supplementation to gestation and lactation diets on reproductive performance, immunological parameters and milk composition in sows. *Livest Sci*. (2013) 152:167–73. doi: 10.1016/j.livsci.2012.12.022
90. Chaucheyras-Durand F, Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes*. (2010) 1:3–9. doi: 10.3920/BM2008.1002
91. Dunière L, Renaud JB, Steele MA, Achard CS, Forano E, Chaucheyras-Durand F. A live yeast supplementation to gestating ewes improves bioactive molecule composition in colostrum with no impact on its bacterial composition and beneficially affects immune status of the offspring. *J Nutr Sci*. (2022) 11:e5. doi: 10.1017/jns.2022.3
92. Hiltz RL, Steelreath MR, Degenshein-Woods MN, Hung HC, Aguilar A, Nielsen H, et al. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* *boulardii* (CNCM I-1079) on feed intake, blood parameters, and production during early lactation. *J Dairy Sci*. (2023) 106:187–201. doi: 10.3168/jds.2021-21740
93. Zanello G, Meurens F, Serreau D, Chevalyere C, Melo S, Berri M, et al. Effects of dietary yeast strains on immunoglobulin in colostrum and milk of sows. *Vet Immunol Immunopathol*. (2013) 152:20–7. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.023
94. Chastant S. Lactation in domestic carnivores. *Anim Front*. (2023) 13:78–83. doi: 10.1093/af/vfad027
95. Münnich A, Küchenmeister U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reprod Domest Anim*. (2014) 49:64–74. doi: 10.1111/rda.12329
96. Yang H, Lu L, Chen X. An overview and future prospects of sialic acids. *Biotechnol Adv*. (2021) 46:107678. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107678
97. Li D, Lin Q, Luo F, Wang H. Insights into the structure, metabolism, biological functions and molecular mechanisms of sialic acid: a review. *Food Secur*. (2024) 13:145. doi: 10.3390/foods13010145
98. Liu F, Simpson AB, D'Costa E, Bunn FS, van Leeuwen SS. Sialic acid, the secret gift for the brain. *Crit Rev Food Sci Nutr*. (2022) 63:9875–94. doi: 10.1080/10408398.2022.2072270
99. Rossi L, Lumbreras AEV, Vagni S, Dell'Anno M, Bontempo V. Nutritional and functional properties of colostrum in puppies and kittens. *Animals*. (2021) 11:3260. doi: 10.3390/ani11113260
100. Krautkramer KA, Dhillon RS, Denu JM, Carey HV. Metabolic programming of the epigenome: host and gut microbial metabolite interactions with host chromatin. *Transl Res*. (2017) 189:30–50. doi: 10.1016/j.trsl.2017.08.005
101. Licciardi PV, Wong S-S, Tang ML, Karagiannis TC. Epigenome targeting by probiotic metabolites. *Gut Pathog*. (2010) 2:24. doi: 10.1186/1757-4749-2-24
102. Groppetti D, Ravasio G, Bronzo V, Pecile A. The role of birth weight on litter size and mortality within 24h of life in purebred dogs: what aspects are involved? *Anim Reprod Sci*. (2015) 163:112–9. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.10.005
103. Feng T, Liu Y. Microorganisms in the reproductive system and probiotic's regulatory effects on reproductive health. *Comput Struct Biotechnol J*. (2022) 20:1541–53. doi: 10.1016/j.csbj.2022.03.017
104. Scherdel P, Dunkel L, van Dommelen P, Goulet O, Salaün J-F, Brauner R, et al. Growth monitoring as an early detection tool: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol*. (2016) 4:447–56. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00392-7
105. Ong KKL. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ*. (2000) 320:967–71. doi: 10.1136/bmj.320.7240.967
106. Ozanne SE, Hales CN. Catch-up growth and obesity in male mice. *Nature*. (2004) 427:411–2. doi: 10.1038/427411b
107. Singhal A. Long-term adverse effects of early growth acceleration or catch-up growth. *Ann Nutr Metab*. (2017) 70:236–40. doi: 10.1159/000464302
108. Jimenez-Chillaron JC, Patti M-E. To catch up or not to catch up: is this the question? Lessons from animal models. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. (2007) 14:23–9. doi: 10.1097/MED.0b013e328013da8e
109. Hector KL, Nakagawa S. Quantitative analysis of compensatory and catch-up growth in diverse taxa. *J Anim Ecol*. (2012) 81:583–93. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01942.x
110. Abbas Z, Yakoob J, Jafri W, Ahmad Z, Azam Z, Usman MW, et al. Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. (2014) 26:630–9. doi: 10.1097/MEG.0000000000000094
111. Benkoe TM, Mechtler TP, Weninger M, Pones M, Rebhandl W, Kasper DC. Serum levels of interleukin-8 and gut-associated biomarkers in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Surg*. (2014) 49:1446–51. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.03.012
112. Pärtty A, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Infantile colic is associated with low-grade systemic inflammation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. (2017) 64:691–5. doi: 10.1097/MPG.0000000000001340

## ANNEXE 2 : Protocole d'alimentation des chiennes et des chiots



### **Aliment 1 : Croquettes ADULTE 30/16** CRUSTY FOOD SAS (Montardit, Verteuil d'Agenais, France)

**Composition :** blé, pois, protéines de volaille déshydratées (18 %), graisse de volaille, gluten de maïs, protéines de volaille hydrolysées, riz, hydrolysats de viandes, protéines d'agneau, protéines de poissons déshydratées (0,5 %)

#### **Additifs :**

- Vitamines : A, D3
- Oligo-éléments : fer, iode, cuivre, manganèse, zinc, sélénium

#### **Constituants analytiques :**

- Protéines brutes : 30 %
- Matières grasses brutes : 16 %
- Cellulose brute : 3 %
- Cendres brutes : 7 %

### **Aliment 2 : Croquettes PUPPY 28/18** CRUSTY FOOD SAS (Montardit, Verteuil d'Agenais, France)

**Composition :** protéines de volaille déshydratées (30 %), maïs, blé, riz (15 %), graisse de volaille, hydrolysats de viandes, gluten de maïs, pulpe de betterave déshydratée, minéraux, huile de poisson

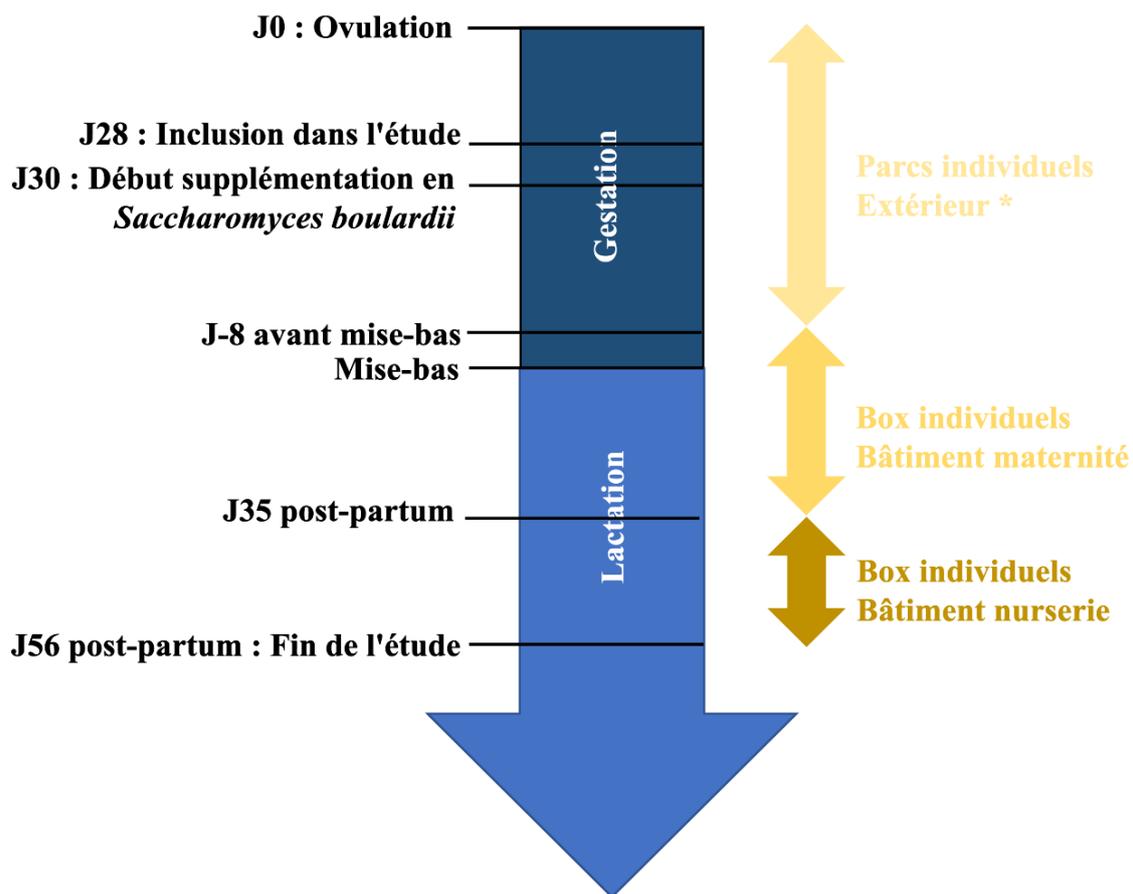
#### **Additifs :**

- Vitamines : A, D3, E
- Oligo-éléments : fer, iode, cuivre, manganèse, zinc, sélénium

#### **Constituants analytiques :**

- Protéines brutes : 28 %
- Matières grasses brutes : 18 %
- Cellulose brute : 2 %
- Cendres brutes : 8 %
- Humidité : 10 %

### ANNEXE 3 : Conditions d'hébergement des chiennes et des chiots



Toutes les chiennes et leur portée dorment sur des copeaux de bois.

\* 6 chiennes sont logées dans des box individuels dans la maternité sur cette période (2 du groupe « Témoin » et 4 du groupe « Levure »)

#### **ANNEXE 4 : Protocole de vaccination et de vermifugation**

	<b>Période</b>	<b>Traitement</b>
Chiennes	1 mois avant l'ovulation	<p>Vaccination :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parvovirus (virus atténué, Vanguard, Zoëtis, France)</li> <li>- Maladie de Carré, hépatite de Rubarth (adénovirus de type 2 atténués)</li> <li>- Parvovirus (parvovirus de type 2b atténué)</li> <li>- Parainfluenza et leptospirose (L. interrogans serovar icterohaemorrhagiae, serovar bratislava and serovar canicola, and L. kirschneri serovar grippotyphosa, atténuées, vaccin Biocan Novel DHPPi+L4, Bioveta, République Tchèque)</li> </ul>
	8 jours avant la mise-bas, entrée dans la maternité	<p>Vermifugation :</p> <p>Pulvérisation de 1ml/L d'eau de phoxime, (Sebacil 50% solution 500 mg/mL, Elanco, Allemagne)</p>
Chiots	Entre 9 et 33 jours d'âge	<p>Vermifugation :</p> <p>2 doses par voie orale à 1 semaine d'intervalle de 50 mg/kg de fenbendazole (Panacur, MSD Animal Health, Royaume-Uni) et 1 mg/kg de diclazuril (Vecoxan, MSD Animal Health, France)</p>
	A 21 jours d'âge	<p>Vaccination :</p> <p>Bordetella bronchiseptica et parainfluenza (vaccin Nobivac KC, MSD Animal Health)</p>
	A 28 jours d'âge	<p>Vaccination :</p> <p>Parvovirus 3 injections à 1 semaine d'intervalle (Vanguard, Zoëtis, France)</p>

## ANNEXE 5 : Protocole rédigé des dosages ELISA

### Test ELISA

#### I- Préparation des solutions

##### Matériel du labo:

- 1 bouteille d'H2O stérile de **250ml**
- 1 éprouvette graduée de **250ml**
- 1 bouteille vide de **250ml**
- 1 bouteille d'H2O stérile de **1L**
- 1 éprouvette de **1L**
- 1 bouteille vide de **1L**

##### Matériel du kit :

- 10X Dilution Buffer B (25ml)
- 20X Wash Buffer (50ml)

##### Préparation:

###### • *Solution de 1X Dilution Buffer B*

- Mesurer **225ml** d'**H2O stérile** dans l'éprouvette de **250ml**
- Transvaser l'H2O stérile dans une bouteille de 250ml
- Ajouter les 25 ml de solution 10X Dilution Buffer B
- Bien mélanger en agitant la bouteille à la main

###### • *Solution de 1X Wash Buffer*

- Mesurer **950ml** d'**H2O stérile** dans l'éprouvette de 1L
- Transvaser l'H2O stérile dans une bouteille de 1L
- Ajouter les 50ml de la solution de 20X Wash Buffer
- Bien mélanger en agitant la bouteille à la main

=> **Conserver les solutions à 4 °C**

# Test ELISA

## Ila- Préparation des échantillons

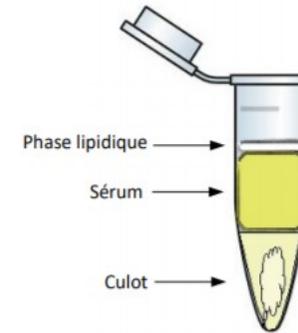
### (1) Préparation pour les échantillons de colostrum et de lait

Matériel : - Échantillons dans les tubes Eppendorf  
- Centrifugeuse à 4°C  
- Bac contenant de la glace pilée

- Décongeler les échantillons 30 minutes à l'air ambiant
- Centrifuger à 20 000g pendant 30 min à 4 °C

Remarque : penser à bien équilibrer la centrifugeuse  
(si besoin, remplir un tube Eppendorf avec de l'eau jusqu'à avoir approximativement le même volume que dans le tube Eppendorf contenant l'échantillon et les placer face à face dans la centrifugeuse)

- Placer immédiatement les échantillons dans la glace. On doit pouvoir observer les 3 couches du schéma à droite.
- Diluer (voir étape suivante)

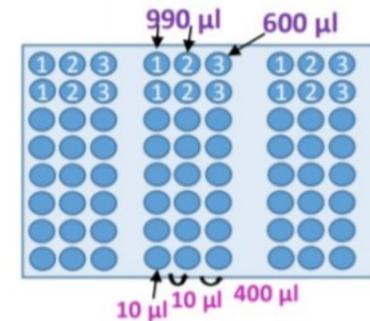


### (2) Dilution des échantillons (ex: 1/25 000e)

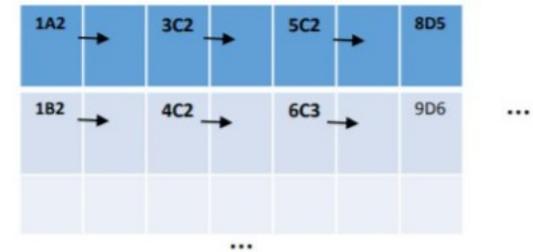
Matériel : - Tubes de dilution 1,2ml  
- Solution de 1X Dilution Buffer B (250 ml)  
- Bécher  
- Multipipette réglée sur 1 ml avec un réservoir de 25 ml  
- Pipette multicanaux 10 µl  
- Cônes 10 µl

- Pipette multicanaux 300 µl  
- Cônes 200 µl  
- Feuille de papier absorbant  
- Grille papier ELISA  
- Échantillons dans les tubes Eppendorf  
- Pipette de 10 µl

- Préparer les tubes 3 pour 3 avec un rang d'espacement (voir schéma à droite)
- Verser quelques ml de solution de 1X Dilution Buffer B dans un bécher
- Mettre 990 µl de 1X Dilution Buffer B dans les puits colonne 1 et 2 et 600 µl dans ceux colonne 3  
(Pour cela, verser 1 ml de Buffer dans toutes les colonnes avec la multipipette (voir Remarques p.3) puis enlever l'excédent grâce aux pipettes multicanaux de volume adapté)



- Noter les échantillons sur la grille ELISA (voir modèle à droite)
- Si on travaille sur **sérum**, bien vortexer les échantillons VS Si on travaille sur **colostrum ou lait**, à l'aide de la pipette 10 µl, écarter la couche supérieure de gras. Changer de cône s'il est obstrué. Prélever le sérum à travers le trou créé dans le gras
- Ajouter **10 µl** de sérum de chaque échantillon dans les puits de la colonne 1 à l'aide de la pipette 10 µl
- Une fois la colonne 1 faite, la mélanger avec la pipette multicanaux 300 µl (V=200 µl)
- Prendre **10 µl** de la colonne 1 et ajouter à la colonne 2 avec la pipette multicanaux 10 µl . Jeter les cônes
- Mélanger la colonne 2 avec la pipette multicanaux 300 µl (V=200 µl)
- Prendre **400 µl (2x200 µl)** de la colonne 2 et ajouter à la colonne 3 avec la pipette multicanaux 300 µl . Jeter les cônes



**Remarques concernant l'utilisation de la multipipette :**

- Évacuer le premier volume du réservoir avant de verser dans les tubes de dilution
- Évacuer le dernier volume du réservoir
- Vérifier les niveaux de liquide dans les tubes de dilution (jeter et recommencer le tube s'il y a un doute sur le volume versé)

# Test ELISA

## IIb- Préparation des échantillons

### (1) Préparation pour les échantillons de colostrum et de lait

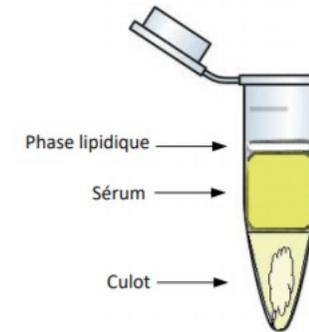
Matériel : - Échantillons dans les tubes Eppendorf  
- Centrifugeuse à 4°C  
- Bac contenant de la glace pilée

- Décongeler les échantillons 30 minutes à l'air ambiant
- Centrifuger à 20 000g pendant 30 min à 4 °C

Remarque : penser à bien équilibrer la centrifugeuse

(si besoin, remplir un tube Eppendorf avec de l'eau jusqu'à avoir approximativement le même volume que dans le tube Eppendorf contenant l'échantillon et les placer face à face dans la centrifugeuse)

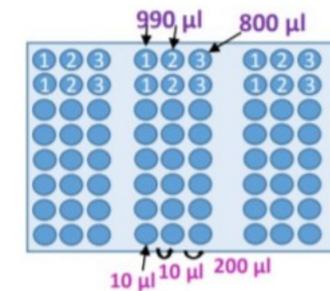
- Placer immédiatement les échantillons dans la glace. On doit pouvoir observer les 3 couches du schéma à droite.
- Diluer (voir étape suivante)



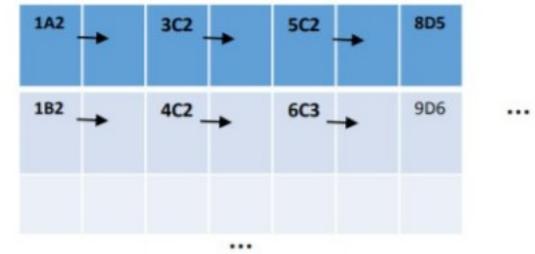
### (2) Dilution des échantillons (ex: 1/50 000e) (conseillée IgA lait et colostrum + IgG sérum chiots)

Matériel : - Tubes de dilution 1,2ml  
- Solution de 1X Dilution Buffer B (250 ml)  
- Bécher  
- Multipipette réglée sur 1 ml avec un réservoir de 25 ml  
- Pipette multicanaux 10 µl  
- Cônes 10 µl  
- Pipette multicanaux 300 µl  
- Cônes 200 µl  
- Feuille de papier absorbant  
- Grille papier ELISA  
- Échantillons dans les tubes Eppendorf  
- Pipette de 10 µl

- Préparer les tubes 3 pour 3 avec un rang d'espacement (voir schéma à droite)
  - Verser quelques ml de solution de 1X Dilution Buffer B dans un bécher
  - Mettre **990 µl** de **1X Dilution Buffer B** dans les puits colonne 1 et 2 et **800 µl** dans ceux colonne 3
- (Pour cela, verser 1 ml de Buffer dans toutes les colonnes avec la **multipipette (voir Remarques p.3)** puis enlever l'excédent grâce aux pipettes multicanaux de volume adapté)



- Noter les échantillons sur la grille ELISA (voir modèle à droite)
- Si on travaille sur sérum, bien vortexer les échantillons VS Si on travaille sur colostrum ou lait, à l'aide de la pipette 10 µl, écarter la couche supérieure de gras. Changer de cône s'il est obstrué. Prélever le sérum à travers le trou créé dans le gras
- Ajouter **10 µl** de sérum de chaque échantillon dans les puits de la colonne 1 à l'aide de la pipette 10 µl
- Une fois la colonne 1 faite, la mélanger avec la pipette multicanaux 300 µl (V=200 µl)
- Prendre **10 µl** de la colonne 1 et ajouter à la colonne 2 avec la pipette multicanaux 10 µl . Jeter les cônes
- Mélanger la colonne 2 avec la pipette multicanaux 300 µl (V=200 µl)
- Prendre **200 µl** de la colonne 2 et ajouter à la colonne 3 avec la pipette multicanaux 300 µl . Jeter les cônes



# Test ELISA

## IIC- Préparation des échantillons

### (1) Préparation des échantillons de colostrum et de lait

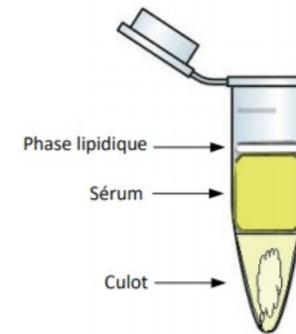
Matériel : - Échantillons dans les tubes Eppendorf  
- Centrifugeuse à 4°C  
- Bac contenant de la glace pilée

- Décongeler les échantillons 30 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 20 000g pendant 30 min à 4 °C

Remarque : penser à bien équilibrer la centrifugeuse

(si besoin, remplir un tube Eppendorf avec de l'eau jusqu'à avoir approximativement le même volume que dans le tube Eppendorf contenant l'échantillon et les placer face à face dans la centrifugeuse)

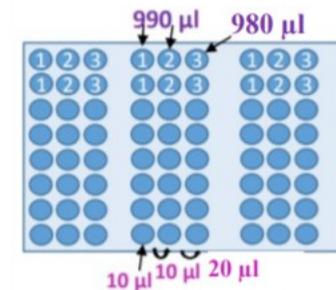
- Placer immédiatement les échantillons dans la glace. On doit pouvoir observer les 3 couches du schéma à droite.
- Diluer (voir étape suivante)



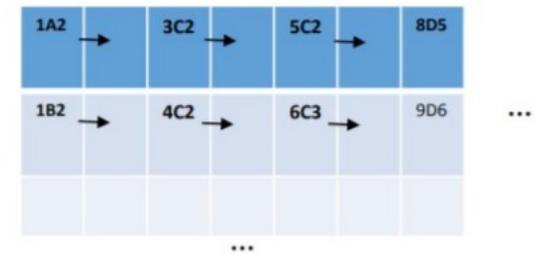
### (2) Dilution des échantillons (ex: 1/500 000e) (conseillée IgG colostrum)

Matériel : - Tubes de dilution 1,2ml  
- Solution de 1X Dilution Buffer B (250 ml)  
- Bêcher  
- Multipipette réglée sur 1 ml avec un réservoir de 25 ml  
- Pipette multicanaux 10 µl  
- Cônes 10 µl  
- Feuille de papier absorbant  
- Grille papier ELISA  
- Échantillons dans les tubes Eppendorf  
- Pipette de 10 µl  
- Pipette multicanaux 300 µl  
- Cônes 200 µl

- Préparer les tubes 3 pour 3 avec un rang d'espacement (voir schéma à droite)
- Verser quelques ml de solution de 1X Dilution Buffer B dans un bêcher
- Mettre **990 µl** de **1X Dilution Buffer B** dans les puits colonne 1 et 2 et **980 µl** dans ceux colonne 3  
(Pour cela, verser 1 ml de Buffer dans toutes les colonnes avec la **multipipette (voir Remarques p.3)** puis enlever l'excédent grâce à la pipette multicanaux 10 µl)



- Noter les échantillons sur la grille ELISA (voir modèle à droite)
- Si on travaille sur **sérum**, bien vortexer les échantillons VS Si on travaille sur **colostrum ou lait**, à l'aide de la pipette 10  $\mu$ l, écarter la couche supérieure de gras. Changer de cône. Prélever le sérum à travers le trou créé dans le gras
- Ajouter **10  $\mu$ l** de sérum de chaque échantillon dans les puits de la colonne 1 à l'aide de la pipette 10  $\mu$ l
- Une fois la colonne 1 faite, la mélanger avec la pipette multicanaux 300  $\mu$ l (V=150  $\mu$ l)
- Prendre **10  $\mu$ l** de la colonne 1 et ajouter à la colonne 2 avec la pipette multicanaux 10  $\mu$ l . Jeter les cônes
- Mélanger la colonne 2 avec la pipette multicanaux 300  $\mu$ l (V=150  $\mu$ l)
- Prendre **2x10  $\mu$ l** de la colonne 2 et ajouter à la colonne 3 avec la pipette multicanaux 10  $\mu$ l . Jeter les cônes



**Remarque :** La concentration en Ig dans les sécrétions lactées variant considérablement au cours de la lactation, les dilutions conseillées selon le temps après la mise-bas sont répertoriées dans la thèse d'Amélie ALBARET sur la composition immunologique des sécrétions lactées chez la chienne, p.29

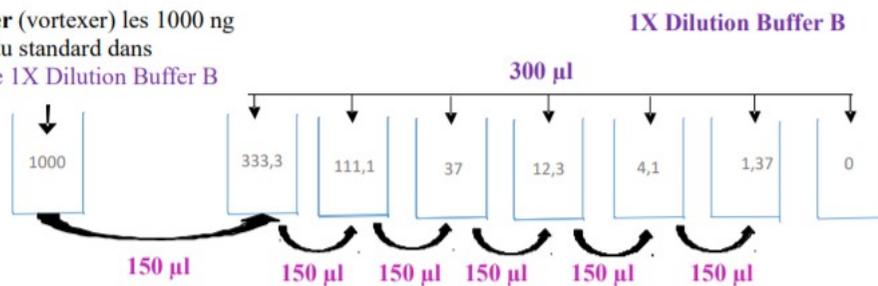
# Test ELISA

## III- ELISA

### (A) Préparation du standard

Matériel : 2 flacons de standard lyophilisé / 7 tubes / Pipette 1000  $\mu$ l /  
Pipette 200 $\mu$ l

Mélanger (vortexer) les 1000 ng  
du standard dans  
1 ml de 1X Dilution Buffer B



- /!\ Si le standard est raté => la plaque est ratée
- Garder le standard pour toutes les plaques de la journée
- Bien mélanger entre chaque (5 fois minimum et sans mouvements brusques)
- **Jeter le cône avant de mélanger le tube suivant**

(1) Numéroté les colonnes de la plaque

(2) Ajout des échantillons et du standard

- Ajouter **100  $\mu$ l** de **standard** dans les premiers puits (rangée 1) (en commençant par la dilution 0) (pipette 100  $\mu$ l)
- Mélanger les puits de la colonne 3 des échantillons dilués (pipette multicanaux 100 $\mu$ l)
- Ajouter **100  $\mu$ l** de ces **échantillons** dans les puits de la plaque en duplicata

Attendre **1H**

(3) Rincer 4 fois avec le 1X Wash Buffer

- /!\ Bien secouer la plaque avant de laver ET APRES !  
(La machine est réglée pour laisser un fond de Wash après le lavage)

## Test ELISA

### *(B) Incubation avec l'Ac de détection*

Mat : Pipette multicanaux 100µl, solution Dog IgG/A Detection Antibody, 1 plaque de Peyer

(4) Ajouter **100 µl** d'Ac de détection dans chaque puits



Attendre **1H**

(5) Rincer 4 fois avec le 1X Wash Buffer

### *(C) Incubation avec la solution HRP*

Mat : Pipette multicanaux 100µl, solution HRP A, 1 plaque de Peyer

(6) Ajouter **100 µl** d'HRP dans chaque puits



Attendre **30 min**

(7) Rincer 4 fois avec le 1X Wash Buffer

### *(D) Incubation avec le substrat TMB et la solution STOP*

Mat : Pipette multicanaux 100µl, substrat TMB, solution STOP, 2 plaques de Peyer

(8) Ajouter **100 µl** de TMB dans chaque puits



Attendre **30 minutes dans le noir**

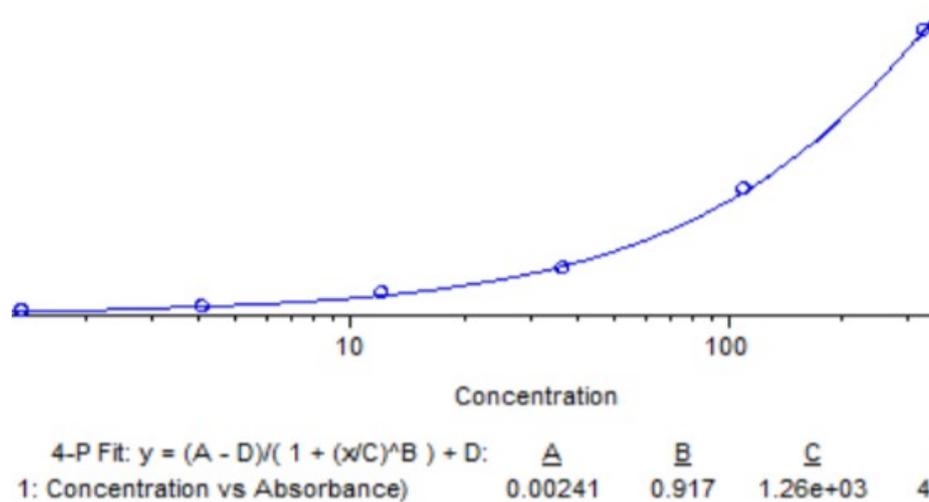
**! \ Ne pas couvrir d'aluminium**

(9) Ajouter **100 µl** de solution STOP dans chaque puits

### *(E) Mesure de l'absorbance*

(10) Analyser au spectrophotomètre à 450 nm dans les 30 minutes qui suivent maximum !

**ANNEXE 6 : Exemple de courbe-étalon obtenue avec le kit ELISA IgA de chez Bethyl Lab., Montgomery, USA**



## **ANNEXE 7 : Récapitulatif des résultats des modèles statistiques**

- Résultats des modèles ANCOVA :

	Moyenne ± écart-type		<i>p-value</i>							
	Témoin	Levure								
Sérum des chiennes			Supplé- mentation	Format racial	Taille de portée	Âge	Supplé- mentation X taille de portée	Différence NEC J28-J56	Supplé- mentation X format racial	Supplé- mentation X différence NEC J28- J56
IgG J28 (g/L)	38,7 ± 14,7	36,6 ± 16,0		0,059	0,583	0,187				
IgG J56 (g/L)	31,6 ± 11,6	25,3 ± 7,5	0,253	0,993	0,745	0,178	0,068			
Différence IgG J28-J56 (g/L)	-11,2 ± 15,2	-7,2 ± 15,7	0,349	0,592	0,093	0,781	0,144	<0,001	0,020	0,006
Colostrum			Supplémentation		Format racial		Âge			
IgG (g/L)	48,9 ± 31,2	46,0 ± 33,4	0,900		0,010		0,053			
IgA (g/L)	14,4 ± 11,8	16,9 ± 12,6	0,285		0,040		0,073			
Lait			Supplémentation	Format racial		Âge		NEC J56		
IgA (g/L)	14,3 ± 9,4	17,4 ± 11,8	0,090	0,036		0,004		0,036		

- Résultats du modèle linéaire mixte :

	Moyenne ± écart-type		<i>p-value des effets fixes</i>		
	Témoin	Levure			
Sérum des chiots			Supplémentation	Format racial	Supplémentation X format racial
IgG (g/L)	10,7 ± 9,1	13,0 ± 11,0	0,302	0,082	0,013

- Résultats du modèle linéaire mixte généralisé :

Déficit de TIP	Témoin	Levure	Odds-Ratio	Intervalle de confiance 95%	<i>p-value</i>
Intercept			0,04	0,00 - 0,47	0,010
Supplémentation (témoin en référence)	27	30	0,21	0,03 – 1,64	0,137
Format racial (M en référence)	15	1	0,09	0,00 – 3,12	0,180
Supplémentation X format racial (témoin X M en référence)	15	1	245,28	2,50 – 2,58x10 <sup>4</sup>	0,019
IgG colostrum (g/L)	49,1 ± 33,7	43,9 ± 29,1	1,03	1,00 – 1,07	0,053



**NOM** : MICHAUD

**Prénom** : Laurine

**Titre** : Effets d'une supplémentation en *Saccharomyces boulardii* chez la chienne en gestation et en lactation sur la concentration en immunoglobulines dans les sécrétions lactées et sur le transfert de l'immunité passive du chiot

**Résumé** : Le transfert d'immunité passive (TIP) via le colostrum puis l'ingestion du lait contenant des immunoglobulines (Ig) conditionnent la mortalité néonatale des chiots. Les IgG ont été dosées dans le sérum et le colostrum de 36 chiennes dont la moitié a été supplémentée en *Saccharomyces boulardii* (SB) pendant la gestation et la lactation. Les IgG dans le sérum de leurs chiots ainsi que les IgA du colostrum et du lait ont été analysées. Dans notre étude, SB a légèrement amélioré la concentration en IgA dans le lait mais, seule, elle n'a pas montré d'effet sur la qualité immunologique du colostrum ni sur le TIP. Néanmoins, chez les chiennes, elle limite l'impact de la taille de portée et du format racial sur la quantité d'IgG sériques et, elle augmente la concentration en IgG sériques des mères maigrissant pendant la gestation. Enfin, chez les chiots de format racial médium, la concentration sérique en IgG est plus élevée et une diminution du risque de déficit de TIP est notée grâce à SB.

**Mots-clés** : chien, colostrum, lait, transfert d'immunité passive, *Saccharomyces boulardii*, immunoglobulines

---

**Title**: Effects of a supplementation with *Saccharomyces boulardii* in pregnant and lactating female dogs on the immunoglobulin concentration of mammary secretions and passive immune transfer in puppies

**Abstract**: Passive immune transfer (PIT) through colostrum and the ingestion of milk containing immunoglobulins (Ig) is crucial for neonatal mortality in puppies. IgG levels were measured in the serum and colostrum of 36 bitches, half of which were supplemented with *Saccharomyces boulardii* (SB) during gestation and lactation. The IgG levels in the serum of their puppies, as well as the IgA levels in the colostrum and milk, were analyzed. In our study, SB slightly improved the concentration of IgA in the milk ; however, it did not show any effect on the immunological quality of the colostrum or on PIT by itself. Nonetheless, in bitches, it mitigates the impact of litter size and breed size on serum IgG levels, and it increases serum IgG concentrations in mothers losing weight during gestation. Finally, in puppies of medium-sized breeds, serum IgG concentrations are higher, and a decrease in the risk of PIT deficiency is observed thanks to SB.

**Keywords**: dog, colostrum, milk, passive immune transfer, *Saccharomyces boulardii*, immunoglobulins