

RÉSUMÉ

de la thèse de doctorat intitulée:

LA RECHERCHE SUR LES IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DU MICROBIOME DANS LA DIGESTION DU CHIEN

Doctorant: **ȘOLTZ (Răsvan Șoltz) Gianina Loredana**

Coordinateur scientifique: **Professeur CODREANU Mario**

MOTS-CLÉS: *microbiome, dysbiose, maladies gastro-intestinales, acides gras à chaîne courte, acides biliaires, entéropathie chronique*

La thèse de doctorat, intitulée *La recherche sur les implications physiologiques et physiopathologiques du microbiome dans la digestion du chien*, est structurée conformément aux dispositions en vigueur, comprenant ainsi deux parties principales:

-**Le première** partie correspond à l'étude bibliographique associée et comprend 42 pages, soit 23,0 % du volume de la thèse.

-**La partie II** présente la recherche propre et comprend 141 pages, soit 77,0 % du volume de la thèse.

Le microbiome est considéré comme une partie intégrante de l'organisme des mammifères et a été qualifié d'"organe caché" (Soontararak et al., 2019). La période néonatale représentant une étape critique pour l'établissement et le développement du microbiote intestinal, elle influence profondément la future trajectoire de santé des individus. La dysbiose, un déséquilibre ou une perturbation de la communauté microbienne intestinale, a été associée à diverses affections telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, l'obésité et même des troubles neurologiques (Beretta et al., 2023).

En outre, la phase pédiatrique de la vie est essentielle pour un départ en bonne santé des chiots. Tout au long de leur vie, de nombreux chiens souffrent de maladies chroniques qui affectent leur qualité et leur espérance de vie, ainsi que le lien qui les unit à leur maître. Nombre de ces affections chroniques, réfractaires au traitement, trouvent leur origine dans des facteurs de risque liés à la précocité de la vie. Par conséquent, l'amélioration des soins vétérinaires préventifs et la garantie de la santé des jeunes dans les chenils, puis au domicile des propriétaires, sont des facteurs qui contribueront à l'amélioration de la qualité de vie et à la prévention des affections tardives.

Chapitre I: Résumé des données bibliographiques récentes et des études cliniques sur le microbiome canin, des similitudes avec le microbiome humain, telles

qu'elles figurent dans les dernières publications, étant donné qu'il s'agit de l'approche la plus récente en médecine humaine.

Chapitre II: Présente les notions de base sur le microbiome et ses fonctions chez les chiens adultes et juvéniles, ainsi que les rôles des différentes bactéries dans le microbiome canin.

Chapitre III: il examine les rôles du microbiote sur divers systèmes et organes, notamment la digestion, les interactions avec les nutriments alimentaires et l'impact des différentes formules alimentaires sur le développement optimal du microbiome ou le développement aberrant de certains taxons. Elle couvre également le métabolisme des acides biliaires, la relation du microbiome avec l'immunité, l'entérite, l'obésité, les conditions dermatologiques et l'axe intestin-cerveau.

L'objectif principal de l'étude était d'identifier le moment de la maturation du microbiote chez les chiots en croissance et le seuil de similarité avec celui des adultes en termes de composition des principales bactéries décrivant un microbiote normobiotique sain. En outre, l'étude visait à identifier un premier paramètre fonctionnel à partir de la métabolomique du microbiote, à savoir le niveau d'acides biliaires secondaires dans les fèces.

La partie II, intitulée "**Recherche personnelle**", constitue environ 80% de la thèse et est organisée en 4 chapitres, conclusions générales et bibliographie. Les résultats sont illustrés par des tableaux, des graphiques et des figures.

Le chapitre IV : "Recherche sur le contexte du microbiome digestif des chiots en croissance en fonction de l'âge" a été mené sur une cohorte de 78 chiots des races Akita américain, Bully américain, Bouledogue français, Rottweiler et Pointer allemand à poil court, âgés de 7 à 56 semaines. Au total, 112 échantillons individuels uniques ont été prélevés, à partir desquels 20 échantillons composites ont été créés pour les tests, prélevés à des intervalles de 2 à 4 semaines. Les échantillons fécaux ont d'abord été réfrigérés, puis transférés à -20 °C jusqu'au test final par la méthode qPCR dans un laboratoire en Allemagne, en utilisant l'équipement de Roche Diagnostics et analysés avec des outils d'interprétation statistique tels que MedCalc® Statistical Software version 22.021, JMP 5.0 Professional Edition English Academic, et SAS Institute GmbH. La confirmation des données statistiques a été effectuée à l'aide du test T de Student et de l'ANOVA.

Groupe I : chiots âgés de 7 à 14 semaines

Ce groupe comprenait 7 échantillons composites provenant des 5 races. Les résultats de la charge bactériologique ont montré une numération bactérienne totale log/ADN/gramme, avec une moyenne de 9,33 dans les échantillons analysés. *Fecalibacterium spp* a été identifié avec une moyenne de 6,33 log ADN/g de fèces, en dessous de la valeur moyenne chez l'adulte. *Blautia spp* avait une valeur de 7,09 log ADN/g de fèces, en dessous de la valeur adulte minimale. *C. hiranonis* avait une moyenne de 8,51 log ADN/g de fèces, légèrement supérieure à la valeur maximale chez l'adulte. *E. coli* avait une moyenne de 6,46 log ADN/g de fèces, dans la fourchette

normale de l'adulte. La moyenne de *Fusobacteria spp* était de 6,02 log ADN/g de fèces, en dessous du minimum adulte. *Turicibacter spp* a atteint une moyenne de 8,07 log ADN/g de fèces, ce qui se situe dans la fourchette normale des adultes.

L'acide biliaire total moyen était de 2,12 [$\mu\text{mol/g}$], ce qui est significativement inférieur au maximum adulte, en raison du très jeune âge.

Groupe II : chiots âgés de 15 à 34 semaines

Ce groupe comprenait 7 échantillons composites provenant des 5 races étudiées. Les résultats de la charge bactériologique ont montré une numération bactérienne totale log/ADN/gramme, avec une moyenne de 9,76 log ADN/g de fèces, inférieure à la valeur moyenne chez l'adulte. *Fecalibacterium spp* a été identifié avec une moyenne de 6,88 log/ADN/g de fèces, dans la fourchette adulte. *Blautia spp* avait une valeur moyenne de 7,55 log/ADN/g de fèces, inférieure à la valeur minimale pour un adulte en bonne santé. *C. hiranonis* avait une valeur moyenne de 8,85 log ADN/g de fèces, au-dessus du maximum de l'adulte. La valeur moyenne de *E. coli* était de 6,6 log ADN/g de fèces, ce qui se situe dans la fourchette normale des adultes. La moyenne de *Fusobacteria spp* était de 6,86 log ADN/g de fèces, légèrement en dessous du minimum adulte. La moyenne de *Turicibacter spp* était de 7,83 log ADN/g de fèces, dans la fourchette normale de l'adulte. La moyenne des acides biliaires totaux était de 2,44 [$\mu\text{mol/g}$], ce qui est nettement inférieur au maximum des adultes en bonne santé.

Groupe III : chiots âgés de 39 à 57 semaines

Six échantillons composites provenant de trois races étudiées ont été inclus. Les résultats de la charge bactériologique ont montré une numération bactérienne totale log/ADN/gramme, avec une moyenne de 9,35 log ADN/g de fèces, significativement inférieure à la valeur moyenne chez l'adulte. *Fecalibacterium spp* a été identifié avec une moyenne de 6,99 log/ADN/g de fèces, dans la fourchette adulte. *Blautia spp* avait une valeur moyenne de 7,11 log/ADN/g de fèces, inférieure à la valeur minimale pour un adulte en bonne santé. *C. hiranonis* avait une valeur moyenne de 8,02 log ADN/g de fèces, au-dessus du maximum de l'adulte. *E. coli* avait une valeur moyenne de 5,6 log ADN/g de fèces, dans la fourchette normale des adultes. La moyenne de *Fusobacteria spp* était de 6,87 log ADN/g de fèces, légèrement en dessous du minimum adulte. La moyenne de *Turicibacter spp* était de 7,51 log ADN/g de fèces, dans la fourchette normale de l'adulte. La moyenne des acides biliaires totaux était de 4,2 [$\mu\text{mol/g}$], ce qui est nettement inférieur au maximum des adultes en bonne santé.

Pour ce groupe, nous nous attendions à ce que les valeurs des paramètres individuels soient plus proches de celles des adultes en bonne santé. Cependant, un déséquilibre dans le ratio des types de microbiote sains a été observé, probablement dû à des facteurs externes inconnus, tels que des contaminations parasitaires, qui ont pu perturber le développement du microbiote, comme l'indiquent les scores intestinaux dans le tableau.

Dans les chenils étudiés, nous avons pu effectuer des analyses temporelles pour 4 portées différentes : Akita américain, Pointer allemand à poil court, Bully américain

et Bulldog français, afin d'identifier une corrélation entre l'évolution bactérienne et l'âge de l'animal.

Les résultats centralisés indiquent une diversité due à de multiples facteurs influençant le développement du microbiome, tels que la race, la méthode de naissance, une composition alimentaire très diversifiée en termes de macronutriments et de micronutriments, en particulier les fibres, et l'âge en semaines.

En suivant l'évolution des 6 espèces bactériennes et du nombre total de bactéries par rapport aux adultes en bonne santé, le graphique suivant montre les différences entre les échantillons. Ces différences ne peuvent toutefois pas être attribuées exclusivement à l'âge, car il existe au moins 5 autres variables. Si tous les chiens étaient nourris de la même manière, appartenaient à la même race et étaient nés de la même façon, cette différenciation serait possible.

Deux échantillons, 39 et 49, ressemblent au microbiote d'un adulte sain, à l'exception du niveau de *Turicibacter spp*, qui est significativement inférieur aux valeurs minimales de l'adulte. *Turicibacter spp* joue un rôle important en interagissant avec les niveaux de lipides de l'hôte : triglycérides, cholestérol et acides biliaires, et contribue à limiter l'excès de poids en modulant la biologie des lipides.

Un autre aspect observé suggère que tous les échantillons présentent des niveaux de *C. hiranonis* significativement supérieurs aux valeurs des adultes en bonne santé. Il a été démontré que *C. hiranonis* convertit les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. Sa carence entraîne une limitation des acides biliaires secondaires, une dysbiose et une diarrhée potentielle.

Nous n'avons pas identifié d'aspects connexes dans la littérature concernant les niveaux élevés de *C. hiranonis*, en particulier chez les jeunes patients en bonne santé.

L'analyse finale des données indique des similitudes claires dans le microbiote de certains échantillons par rapport aux limites de référence pour les chiens adultes en bonne santé.

Si l'on considère les 6 bactéries testées et le nombre total de bactéries dans chaque échantillon comme un paramètre de la santé du microbiote, deux échantillons ont montré une diversité similaire de bactéries saines et un microbiote très similaire à celui d'adultes en bonne santé : les échantillons 39 (Bouledogue français de 30 semaines) et 49 (American Bully de 32 semaines), comme le montre le graphique ci-dessus. Les deux portées dont les résultats sont marqués sur le diagramme provenaient de chiots mis au monde par césarienne.

Pendant, même les échantillons provenant de chiots âgés de 40 à 56 semaines ne présentaient pas des niveaux optimaux de *Blautia* par rapport au groupe de contrôle adulte de la littérature.

La corrélation de nombre total de bactéries et l'âge n'est pas significativement différente de zéro ($p = 53,58$; $R^2 = 0,02295$). Pour les données disponibles, aucune régression linéaire ou corrélation entre les bactéries et l'âge n'a pu être établie. En

raison du nombre limité et diversifié d'échantillons, il n'a pas été possible de déterminer une corrélation claire.

Chapitre V : "Recherche sur le contexte du microbiome digestif des chiots en croissance en relation avec la formule nutritionnelle" analyse les aspects nutritionnels des 78 chiots des races Akita américain, Bully américain, Bouledogue français, Rottweiler et Pointer allemand à poil court, âgés de 7 à 56 semaines, avec des déterminations nutritionnelles statistiques utilisant l'équipement de Roche Diagnostics et analysées avec des outils d'interprétation statistique tels que le logiciel statistique MedCalc®, version 2. 2.021, JMP 5.0 Professional Edition English Academic, et SAS Institute GmbH. La confirmation des données statistiques a été effectuée à l'aide du test T de Student et de l'ANOVA.

Les groupes ont été divisés en deux catégories : aliments industriels de qualité supérieure pour chiots en croissance, répondant aux normes et exigences de la FEDIAF en matière de croissance, et aliments BARF.

Groupe A - Rottweiler (5 chiots, 1 échantillon), Akita américain (1 portée, 5 chiots âgés de 10 semaines), Bully américain (2 portées, 13 chiots provenant d'élevages différents). Ils ont d'abord été nourris avec une formule extrudée super-premium pour la croissance, puis avec des produits d'animalerie étiquetés pour la période de croissance et/ou des aliments faits maison. Les produits d'animalerie étaient complets et équilibrés, destinés à la phase de croissance, seuls ou en combinaison avec d'autres aliments spécifiés pour chaque chiot/portée.

Groupe B - Comprend des chiens d'arrêt allemands à poil court (3 portées, 22 chiots), des Bully américains (2 portées, 13 chiots), des Rottweiler (5 chiots), des Akita américains (1 portée, 5 chiots provenant de différents élevages), nourris avec une marque super-premium adaptée à l'âge après le sevrage (jusqu'à 14 semaines), puis transition vers une autre formule complète et équilibrée pour l'étape de croissance suivante (après 14 semaines), enrichie de fibres prébiotiques, de DHA pour le développement cérébral et les propriétés anti-inflammatoires, et d'un complexe de soutien immunitaire, adapté à chaque âge et à chaque taille.

Groupe C : Alimentation mixte avec des produits d'animalerie étiquetés pour la période de croissance, qui ne répondent pas aux exigences nutritionnelles de la FEDIAF pour les stades de croissance, combinée avec des BARF à parts égales à partir du sevrage (4 semaines). Ce groupe comprenait des Bouledogues français (5 portées, 27 chiots du même élevage) nourris avec des BARF incomplets et des croquettes spécifiques à la croissance. Ce groupe n'a pas été confirmé négatif pour les parasites intestinaux.

Les trois groupes ont subi une transition alimentaire de 5 à 7 jours aux semaines 3 à 5, puis 8 à 10, afin d'éviter les stress multiples et d'assurer l'acceptation de la nouvelle alimentation et l'adaptation digestive aux nouvelles formules adaptées à l'âge et à la taille des chiots.

Les données statistiques montrent une augmentation de la diversité bactérienne avec l'âge, confirmant les aspects scientifiques publiés dans d'autres études, influencée par des facteurs alimentaires tels que les fibres alimentaires fermentescibles, les niveaux de protéines et les ratios de macronutriments.

Dans l'évaluation dépendante de l'alimentation, nous avons également mesuré des interférences particulières de chacun des nutriments précédemment validés comme contribuant au développement optimal du microbiote : protéines, lipides, fibres.

L'analyse statistique du facteur nutritif : les lipides a montré que seulement 24,1% de la variation de la concentration bactérienne totale peut être expliquée par une relation linéaire en ce qui concerne la concentration en lipides. Parmi les facteurs influençant la concentration de bactéries totales, il est également démontré que la concentration de protéines et de fibres dans le régime alimentaire.

En analysant le facteur nutritionnel : la protéine sur la croissance du microbiote, bien que l'équation de régression soit hautement significative ($P=0,0117$), elle parvient à expliquer 30,43% de la variance de la concentration en bactéries totales en relation avec les variations du niveau de protéines dans les formules d'alimentation.

La corrélation entre les concentrations de bactéries totales et le facteur d'influence nutritionnelle : les fibres alimentaires est significative ($p = 0,03$), ayant un degré d'association acceptable. Ceci est surprenant car il est connu par d'autres études que les fibres ont une contribution majeure au développement du microbiote digestif. L'analyse statistique appliquée pourrait donner ces valeurs contradictoires, en raison du nombre limité d'échantillons et de la diversité des facteurs interdépendants.

On considère que le facteur nutritionnel est essentiel au travers de tous les nutriments suivis et que la contribution au développement du microbiote est d'autant plus importante que les chiots suivent une alimentation complète, équilibrée et adaptée à la croissance et que la gestion de l'alimentation est cohérente et constante sur le long terme.

Le chapitre VI : "Recherche sur le contexte du microbiome digestif des chiots en croissance en fonction du mode de naissance, de la race et de l'élevage " analyse le microbiome en fonction du mode de naissance, de la race et de l'élevage pour la même cohorte que celle des chapitres précédents.

Impact de la méthode de naissance: Mesuré par la corrélation des bactéries totales avec la méthode de naissance en tant que paramètre unique, révélant des données statistiquement significatives en divisant les chiots en deux groupes. Des différences limitées ont été observées dans la concentration bactérienne totale en fonction de la méthode de naissance. Bien que l'on présume des différences significatives dans le microbiote entre les chiots nés par voie vaginale et ceux nés par césarienne, la représentation limitée de l'échantillon a pu influencer les résultats statistiques.

Impact de la race: analyse en fonction des races brachycéphales et non brachycéphales. L'analyse statistique a été réalisée avec l'ANOVA du facteur de différenciation - bactéries totales log ADN/g de fèces par type de race, races brachycéphales (nr=11) et non-brachycéphales (nr=9), ce qui a donné des différences significatives mineures. Le test de Shapiro-Wilk pour la distribution normale des 2 groupes de races brachycéphales (nr=11) et non brachycéphales (nr=9) a été appliqué pour confirmer les résultats identifiés avec l'ANOVA. Le test de Shapiro-Wilk pour la distribution normale a révélé des différences significatives statistiquement mineures, basées sur un nombre limité d'échantillons.

Impact - chenil: Pour étudier les différences significatives potentielles dans la concentration bactérienne moyenne entre les chenils, l'analyse ANOVA a été appliquée lorsque les données étaient normalement distribuées. Dans ce cas, l'égalité des variances a également été testée. Si les variances n'étaient pas égales, mais que les données étaient normalement distribuées, l'analyse Welch-ANOVA a été appliquée, ce qui permet d'analyser ce type de données. Dans le cas où les données n'étaient pas normalement distribuées, le test de Kruskal-Wallis a été appliqué.

L'analyse Welch-Anova a donné un résultat significatif ($p = 0,084$). Le résultat peut être accepté, indiquant une probabilité de 91,6 % que les différences dans les valeurs moyennes des bactéries totales selon le facteur CHENILS sont dues à ce facteur, donc la concentration des bactéries totales pour la race Bouledogue français sont au niveau de signification différent de la concentration des bactéries totales des autres races.

La portée de l'Akita américain montre un retard dans la croissance moyenne des bactéries totales, peut-être en raison d'un manque de fibres alimentaires. Les portées de Pointer allemand et de Bully américain présentent des similitudes et une normalité dans le développement de la moyenne des bactéries totales par rapport aux adultes, mais aussi entre elles, en raison de l'alimentation enrichie en fibres prébiotiques. La race Bouledogue français présente un nombre total de bactéries plus élevé, peut-être en corrélation avec le facteur d'alimentation BARF, qui peut contenir des agents pathogènes.

En outre, toutes les valeurs moyennes des concentrations bactériennes totales enregistrées pour les races étudiées se situent en dehors de la fourchette de 10,9 log ADN/g de fèces - 15,1 log ADN/g de fèces, et en dessous de la valeur minimale de la fourchette adulte de 10,9 log ADN/g de fèces.

Cela était prévisible et s'explique principalement par le fait que le microbiote des jeunes chiots est encore en cours de développement. En outre, il est bien connu que le type d'alimentation, et plus particulièrement les fibres fermentescibles dans la composition totale des fibres alimentaires, contribue à l'augmentation de la diversité du microbiote et du nombre de bactéries. Il s'agit d'un deuxième facteur contribuant à la population de bactéries saines et à l'augmentation de leur nombre.

L'analyse Welch-ANOVA étant à la limite de la signification, il a été décidé d'effectuer le test post-hoc HSD de Tukey-Kramer pour comparer les valeurs moyennes des concentrations bactériennes totales. Le test HSD de Tukey-Kramer montre qu'il existe une différence, à la limite de la signification, entre les concentrations bactériennes totales pour les races bouledogue français et Akita américain. L'American Bully et le Pointer allemand ne présentent pas de différence significative en ce qui concerne les valeurs moyennes des bactéries totales.

Les valeurs moyennes des bactéries totales pour l'American Bully et le Pointer allemand diffèrent à la limite de la signification de celles de l'American Akita et du Bouledogue français.

Ces résultats peuvent être précisés en effectuant le test T pour chaque paire de races afin de mettre en évidence d'éventuelles différences significatives

Si l'on accepte une probabilité de 93,6 % (au lieu de 95 %) pour considérer qu'il existe une différence significative entre l'Akita américain et le Bouledogue français en termes de concentration bactérienne totale, alors ces deux races diffèrent significativement à cet égard.

Entre les chenils de l'Akita américain et du Bouledogue français, il y a une différence significative dans les valeurs moyennes des concentrations bactériennes totales. Lorsque l'on obtient une probabilité de $P = 0,0646$ en comparant les deux moyennes, on peut dire qu'il y a une probabilité de 93,6 % que cette différence soit due au facteur considéré, c'est-à-dire l'élevage (qui inclut d'autres facteurs dans notre cas).

La plupart des différences ont pu être observées en comparant des facteurs de chenil similaires, qui sont similaires en termes de taux de croissance bactérienne et de type d'alimentation.

L'ANOVA pour la comparaison des concentrations moyennes de *Fecalibacterium prausnitzii* en fonction du chenil allait de 3,4 log ADN/g de fèces à 8,0 log ADN/g de fèces. *Fecalibacterium prausnitzii* est l'une des bactéries digestives dominantes.

La disponibilité des nutriments essentiels au maintien de *F. prausnitzii* peut influencer la distribution de cette espèce dans l'intestin. Une étude récente basée sur une carte métabolique fonctionnelle de la souche de *F. prausnitzii* a prédit son incapacité à synthétiser les acides aminés alanine, cystéine, méthionine, sérine et tryptophane. Une analyse plus poussée des génomes de *F. prausnitzii* a permis d'observer une auxotrophie pour les vitamines et les cofacteurs, tels que la biotine, le folate, la niacine, le pantothénate, la pyridoxine et la thiamine. En revanche, il a été prévu que cette espèce produise de la cobalamine, et les patients atteints de IBD sont connus pour présenter une carence en cobalamine.

L'ANOVA pour la comparaison des concentrations moyennes de *Blautia spp.* par chenil avec le test de Kruska - Wallis pour la comparaison des concentrations moyennes de *Blautia spp.* par chenil indique une différence significative à la limite de la signification ($p = 0,073097$). Si un seuil statistique de $0,08 > 0,05$ est accepté, on

peut considérer qu'il existe des différences significatives entre les chenils en termes de concentrations de *Blautia* spp.

Sur la base des données disponibles, des différences significatives dans les concentrations moyennes de *Blautia* spp. sont trouvées uniquement entre les chenils Bouledogue français et Akita américain ($p = 0,0357$). Il est difficile de définir la causalité des différences importantes entre les deux chenils.

On sait que les réactions catalysées par *Blautia* spp. lors de la conversion des flavonoïdes comprennent la déméthylation, la déshydroxylation et la déglycosylation, grâce aux enzymes correspondantes telles que les β -glucosidases et les O-glycosidases.

En analysant les principales voies métaboliques et les enzymes liées à la biotransformation, il est possible de prédire si la bactérie peut biotransformer des substances bioactives spécifiques.

L'ANOVA pour comparer les concentrations moyennes de *C. hiranonis* par chenil révèle que les différences statistiquement significatives entre les chenils sont statistiquement limitées. Les valeurs SD montrent la variabilité des concentrations bactériennes, et l'élevage présentant la plus grande variabilité des valeurs de cette bactérie est l'Akita américain, en raison d'une grande variabilité entre les périodes d'échantillonnage des oisillons et d'importantes variations de l'alimentation entre les périodes. Il pourrait s'agir d'un facteur incohérent par rapport aux autres élevages.

L'élevage présentant la plus grande variabilité dans les valeurs de concentration de *C. hiranonis* était l'American Akita ($SD = 2,55476 \log \text{ADN/g}$ de fèces) (tableau 6.18). Cela se reflète également dans l'intervalle de confiance à 95 % dans lequel les concentrations de *C. hiranonis* peuvent être attendues pour des animaux élevés dans des conditions identiques à celles de l'élevage d'American Akita. On peut affirmer que, dans les conditions d'élevage des poussins, avec une probabilité de 95 %, les concentrations de *C. hiranonis* dans le nid de l'élevage d'Akita américain seront comprises entre 0,5936 $\log \text{ADN/fèces}$ et 13,286 $\log \text{ADN/fèces}$.

La variabilité du *C. hiranonis* dans cette portée de chiots pourrait être due aux différents types d'aliments reçus. La formule proposée deux mois après le sevrage est inadéquate sur le plan nutritionnel pour la période de croissance. Une autre cause possible de la variation de *C. hiranonis* dans cet élevage pourrait être le facteur génétique de prédisposition aux IBD, les Akita étant connus pour être prédisposés aux IBD et aux pathologies à médiation immunitaire généralement sujettes aux allergies. Chez les adultes atteints de IBD, *C. hiranonis* a une faible proportion dans le microbiote des personnes étudiées

D'autre part, la variabilité des valeurs de *C. hiranonis* entre les chenils pourrait être due à l'alimentation. L'American Bully et le Pointer allemand ont été nourris avec un régime complet et équilibré adapté à leur âge, contenant suffisamment de fibres prébiotiques qui contribuent au développement de *C. hiranonis*.

L'analyse ANOVA visant à identifier l'existence de différences significatives dans les concentrations d'*E. coli* entre les chenils étudiés a montré que pour le chenil

American Bully, seule une valeur de la concentration moyenne d'*E. coli* dépassait la valeur maximale autorisée, la valeur maximale de l'intervalle de confiance de la concentration moyenne d'*E. coli* pour ce chenil ne dépassant pas la valeur maximale autorisée.

Pour l'élevage américain d'Akita, bien que toutes les valeurs des nids soient inférieures à la limite supérieure de la concentration moyenne d'*E. coli*, la très grande variabilité des valeurs enregistrées a entraîné un intervalle de confiance de la concentration moyenne d'*E. coli* dont la limite supérieure (9,2917 log ADN/g de fèces) est bien supérieure à la valeur maximale autorisée (8 log ADN/g de fèces). Dans ce cas, on peut soupçonner qu'il existe un risque de valeurs supérieures à la limite autorisée dans ce chenil, car la moyenne par chenil peut toujours être supérieure à 8 log ADN/g de fèces.

Ce risque est associé à une surpopulation bactérienne d'*E. coli* pathogènes et à des risques de IBD à long terme, en corrélation également avec le niveau plus faible de *C. hiranonis*. Des niveaux élevés d'*E. coli* peuvent également influencer une faible réponse au vaccin.

L'analyse ANOVA des valeurs moyennes de *Fusobacteria spp.* par élevage, observe que les intervalles de confiance pour l'Akita américain et le Bouledogue français sont clairement disjoints et pour cette raison, il est suspecté qu'il y ait une différence significative entre les niveaux moyens de *Fusobacteria* de ces deux élevages.

Pour vérifier l'hypothèse, un test T a été effectué pour comparer la concentration de *Fusobacteria spp.* entre les chenils des Akita américains et des Bouledogues français.

Fusobacteria spp. est une bactérie aux vertus probiotiques qui a trouvé sa place dans l'alimentation du Bully américain et du Pointer allemand. Dans le cas de l'élevage de l'American Akita, l'alimentation ne contenait pas suffisamment de fibres prébiotiques pour contribuer à la croissance optimale de *Fusobacteria* dans cette race. D'autre part, les portées de l'élevage de bouledogues français, nourries avec 1/2 BARF et 1/2 aliment junior industriel, avaient un apport limité en fibres, insuffisant par rapport au niveau recommandé.

L'analyse ANOVA de la relation entre la concentration totale de *Turicibacter spp.* en fonction du chenil a donné un résultat faiblement significatif, à la limite de la signification ($p = 0,0588$). En raison de la manière dont l'analyse ANOVA et le test HSD de Tukey-Kramer sont mathématiquement construits, le résultat obtenu pour le test de Tukey-Kramer n'est pas significatif dans de telles situations.

En maintenant un niveau de signification de 0,05, les concentrations moyennes de *Turicibacter spp.* pour les races de Bouledogues français et de Pointer allemand ne diffèrent pas de manière significative. Si nous acceptons un niveau de signification de 0,1, nous considérons qu'il existe des différences significatives entre les deux races en ce qui concerne les concentrations moyennes de *Turicibacter spp.*

Un niveau de signification de 0,05 indique qu'il y a une probabilité de 95% que la différence entre les valeurs moyennes de *Turicibacter spp.* soit due au facteur de chenil et que seulement 5% de cette différence soit due au hasard. Il est possible, pour des raisons médicales évidentes, d'accepter un niveau de signification de 0,1, c'est-à-dire d'accepter une probabilité de 90% que la différence entre les valeurs moyennes soit due au facteur de chenil avec les détails.

Il existe une très bonne corrélation entre les concentrations de *Fecalibacterium prausnitzii* et de *Fusobacteria spp.* Le coefficient de corrélation de Pearson est hautement significatif ($p < 0,0001$). Les 2 espèces sont en relation d'alimentation croisée, les niveaux optimaux de *Fecalibacterium prausnitzii* influenceront les niveaux optimaux de *Fusobacteria spp.*

Le chapitre VII de la deuxième partie de la thèse de doctorat, intitulé "**Recherche sur le contexte du microbiome digestif des chiots en croissance en relation avec les niveaux d'acides biliaires**" implique l'analyse des acides biliaires chez les animaux par chromatographie en phase gazeuse ou liquide. Pour l'extraction des acides biliaires secondaires, une quantité définie de fèces a été pesée. Les acides biliaires ont été extraits dans le tampon d'extraction inclus dans le kit d'analyse des acides biliaires pour la nuit.

Selon l'analyse statistique, il existe une relation significative entre le nombre de colonies de *C. hiranonis* et le niveau d'acides biliaires ($p = 0,0338$), les grandeurs étant donc inversement proportionnelles.

La corrélation inverse entre *C. hiranonis* et les acides biliaires totaux n'est pas surprenante. Cela peut également s'expliquer par le fait que dans les échantillons moyens, nous avons également des chiots âgés de moins de 16 semaines, chez lesquels la valeur des acides biliaires est inférieure à la valeur maximale de l'adulte. Le développement accru de *C. hiranonis* a entraîné de faibles valeurs d'acides biliaires totaux. D'autre part, les faibles valeurs d'acide biliaire corrélées aux niveaux optimaux de *C. hiranonis* dans le tube digestif confirment l'absence de risque de shunts hépatiques chez les chiots en bonne santé inclus dans l'étude.

Les données correspondant aux concentrations en acides biliaires n'étant pas normalement distribuées par rapport aux adultes, la comparaison des moyennes des valeurs de ce paramètre a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

On constate qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives par chenil entre les valeurs moyennes de concentration d'acide biliaire ($p = 0,835$). Les faibles valeurs d'acide biliaire peuvent être principalement dues à l'âge des chiots, qui sont des juniors en bonne santé sans prédisposition raciale aux shunts hépatiques.

La très grande variabilité des valeurs de concentration en acides biliaires pour la portée Akita américaine a influencé le résultat de l'analyse. Pour cette raison, une analyse comparative de chaque paire a été choisie. Après avoir vérifié la normalité des

données et l'égalité des variances, il a été décidé d'effectuer des tests paramétriques ou non paramétriques, selon le cas.

L'analyse statistique réalisée à l'aide de tests t pour échantillons indépendants, tels que le test T, le test de Welch et le test non paramétrique de Mann-Whitney, a confirmé l'absence de différences significatives entre les valeurs moyennes de la concentration en acides biliaires et la race ou le chenil.

Nous concluons que la relation entre *C. hiranonis* et les acides biliaires totaux dans les nids étudiés confirme la normalité de la métabolisation des lipides chez les chiots de ces nids, indépendamment des autres paramètres des chiots ou des facteurs externes.

Le **chapitre VIII** contient 194 sources bibliographiques citées dans le texte.