

Université de Montréal

Optimisation de la viabilité bactérienne pour la transplantation de microbiote fécal chez le chien

Par

Mélanie Ratté

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M.Sc.)
en sciences vétérinaires, option biomédecine

Juin 2022

©Mélanie Ratté, 2022

Université de Montréal

Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Optimisation de la viabilité bactérienne pour la transplantation de microbiote fécal chez le
chien**

Présenté par

Mélanie Ratté

A été évalué par les personnes suivantes :

Marie-Claude Blais

Présidente-rapporteuse

Marcio Carvalho Costa

Directeur de recherche

Frédéric Sauvé

Membre du jury

Résumé

Le microbiote intestinal est constitué d'un écosystème complexe de microorganismes appartenant à différents règnes. Cependant, la majorité de ces microorganismes sont d'origine bactérienne. Par conséquent, de nombreuses études, y compris la présente, se concentrent sur l'étude des communautés bactériennes. Les microorganismes ont développé une relation mutualiste avec le corps humain et agissent de plusieurs manières sur sa santé. Une perturbation du microbiote intestinal, nommée dysbiose, est reliée au développement d'une multitude de problèmes de santé chez diverses espèces animales.

La transplantation de microbiote fécal suscite l'intérêt dans le domaine de la médecine vétérinaire. La préparation et l'entreposage affectent la composition et la viabilité bactérienne des fèces destinées à la transplantation de microbiote fécal (TMF). Jusqu'à présent, il demeure l'absence d'un protocole vétérinaire pour effectuer la préparation et l'entreposage des transplants fécaux canins. Par conséquent, l'objectif de cette étude était de comparer la viabilité bactérienne d'échantillons fécaux en présence et en absence d'oxygène et d'effectuer la congélation à l'aide de deux cryoprotecteurs différents. Les hypothèses de ce projet étaient les suivantes : la préparation des échantillons en absence d'oxygène préservera la viabilité bactérienne, l'utilisation d'un cryoprotecteur contenant des antioxydants pour la congélation générera le meilleur taux de viabilité, et le microbiote de chaque individu n'aura pas la même capacité à résister aux effets de la préparation et de l'entreposage.

Les fèces de 10 chiens en santé ont été collectées et immédiatement transférées à l'intérieur d'une chambre anaérobique. Des aliquotes de 1,8 g ont été diluées dans 7,2 ml d'un cryoprotecteur contenant du glycérol à 10% (Gly) ou des antioxydants (Cryo). Les échantillons ont été homogénéisés et filtrés en condition aérobie (Ae) et en condition anaérobique (An) à l'intérieur d'une chambre anaérobique, simulant la préparation de la TMF. Les échantillons ont été congelés à -20 °C durant 90 jours (F) pour l'évaluation des effets de l'entreposage. La viabilité bactérienne des échantillons a été déterminée à l'aide de la cytométrie de flux. L'analyse de la

composition bactérienne chez les 10 donneurs de matières fécales a été réalisée par le séquençage de la région V4 du gène de l'ARNr 16S à l'aide de la plateforme Illumina MiSeq.

Les échantillons non congelés, préparés en absence d'oxygène et dilués avec Cryo présentaient les plus grands taux de viabilité (66,78 %) par rapport aux autres groupes ($p < 0,05$). Les échantillons exposés à l'oxygène avaient une viabilité bactérienne inférieure ($p < 0,01$). Toutefois, les échantillons dilués avec Cryo présentaient une viabilité plus élevée (65,26 %) que les échantillons dilués dans Gly (55,20 % ; $p < 0,001$) en présence d'oxygène. La viabilité bactérienne a diminué en raison de la congélation des échantillons ($p < 0,001$). L'ensemble des échantillons frais avaient une viabilité médiane de 62,23 % et, à la suite de la congélation, elle était de 22,68 %. Cependant, les échantillons congelés à l'aide de glycérol avaient une viabilité plus élevée (30,61 % ; $p < 0,001$). Le genre *Prevotella* était fortement corrélé à la viabilité ($R = 0,731$; $p < 0,05$, $R = 0,756$; $p < 0,05$, $R = 0,834$; $p < 0,01$, $R = 0,752$; $p < 0,05$).

Ces résultats indiquent que la viabilité bactérienne est optimale lors de l'utilisation de matières fécales en absence d'oxygène et lors d'une dilution à l'aide d'un cryoprotecteur contenant des antioxydants. La congélation a significativement réduit la viabilité bactérienne, mais le glycérol semble mieux préserver les bactéries. La présence de certaines espèces plus résistantes et l'impact de la composition du microbiote sur l'efficacité de la TMF nécessitent une enquête plus approfondie.

Mots clés : Transplantation de microbiote fécal, viabilité bactérienne, dysbiose intestinale, microbiote intestinal, séquençage de nouvelle génération, microbiote canin.

Abstract

The intestinal microbiota is made up of a complex ecosystem of microorganisms belonging to different kingdoms. However, bacterial cells are much more numerous. Therefore, many studies, including the present one, focus on the study of bacterial communities. Microorganisms have developed a mutualistic relationship with the animal body and act in several ways on its health. A disturbance of the intestinal microbiota, called dysbiosis, is linked to the development of a multitude of health problems in various animal species.

There is an emerging interest in the transplantation of fecal microbiota in veterinary medicine. Preparation and storage affect the quality of transplants intended for faecal microbiota transplantation (FMT). Considering the absence of a protocol in veterinary medicine, the objective of this study was to optimize bacterial viability during the preparation and storage of canine fecal transplants. The hypotheses of this project were that the preparation of samples in the absence of oxygen will preserve bacterial viability, that the use of a cryoprotectant containing antioxidants for freezing will yield the best viability rate and the microbiota of individuals does not have the same ability to withstand the effects of preparation and storage.

Feces from ten healthy dogs were collected, and immediately transferred inside an anaerobic chamber. Aliquots of 1.8 g were diluted in 7.2 ml of a cryoprotectant containing glycerol (Gly) or antioxidants (Cryo). The samples were homogenized and filtered, simulating the TMF preparation. To evaluate the impact of oxygen on bacterial viability, the procedures were performed outside (Ae) and inside (An) the anaerobic chamber. Samples were frozen at -20°C for 90 days (F) to evaluate effect of freezing. The bacterial viability of samples was determined using flow cytometry. Analysis of the bacterial composition was performed by sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene, using the Illumina MiSeq platform.

Fresh samples prepared under anaerobiosis and diluted with Cryo had the highest viability (66.78%) compared to the other groups ($p < 0.05$). Bacterial viability was affected by oxygen ($p < 0.01$) but solutions prepared with Cryo had higher viability (65.26%) than samples diluted in Gly

(55.20%; $p < 0.001$). Freezing decreased bacterial viability from 62.23% to 22.68% ($p < 0.001$). However, samples frozen using glycerol showed higher viability (30.61%; $p < 0.001$). The genus *Prevotella* was strongly correlated with viability ($R = 0.731$; $p < 0.05$, $R = 0.756$; $p < 0.05$, $R = 0.834$; $p < 0.01$, $R = 0.752$; $p < 0.05$).

These results show that bacterial viability is optimal when preparing feces under anaerobic conditions and using a cryoprotectant containing antioxidants. If freezing is necessary, glycerol seems to preserve the bacteria better. The presence of some more resilient species and the impact of microbiota composition on the efficacy of TMF requires further investigation.

Keywords: Faecal microbiota transplantation, bacterial viability, gut dysbiosis, dog gut microbiota, next-generation sequencing, canine microbiota.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux	10
Liste des illustrations	11
Liste des acronymes et des abréviations.....	12
Remerciements.....	14
Introduction	15
Chapitre 1 – Revue de littérature	18
1. Le microbiote intestinal	18
1.1 Les technologies utilisées pour l'étude du microbiote.....	18
1.2 L'évaluation du microbiote.....	20
1.3 La comparaison visuelle des communautés bactériennes	20
1.4 La composition du microbiote intestinal	25
1.5 L'indice de dysbiose.....	32
1.2 La barrière intestinale	33
1.3 Les fonctions du microbiote.....	35
1.3.1 La tolérance immunitaire des bactéries commensales	36
1.3.2 L'équilibre entre les cellules lymphocytaires Th17 et Treg	38
1.3.3 La défense contre les entéro-pathogènes	38
1.3.4 La production d'acides gras à chaîne courte	41
1.3.5 La déconjugaison de l'acide biliaire primaire	41
1.3.6 La production de vitamines	42
1.4 Les facteurs ayant un impact sur le microbiote	42
1.4.1 L'usage des antibiotiques	43

1.4.2 La diète	44
1.5 Les manipulations du microbiote intestinal.....	45
1.5.1 Les prébiotiques	47
1.5.2 La transplantation de microbiote fécal (TMF)	47
1.5.3 La TMF en médecine vétérinaire	50
1.6 L'importance de la viabilité bactérienne	52
1.7 La préparation des échantillons pour la TMF	53
1.7.1 L'exposition à l'oxygène	53
1.8 L'entreposage des transplants fécaux	54
1.8.1 La congélation.....	54
1.8.2 Les autres méthodes d'entreposage	55
1.9 Les donneurs et le protocole de sélection	57
1.9.1 La diversité bactérienne et la TMF	59
1.10 Les voies d'administration de la TMF.....	60
1.11 Hypothèses et objectifs.....	63
Chapitre 2- Manuscrit scientifique	64
2.1 Abstract	64
2.2 Introduction	64
2.3 Material and methods.....	67
2.3.1 Sample collecting and fecal processing	67
2.3.2 Bacterial viability and enumeration	69
2.3.3 Analysis of bacterial composition.....	70
2.3.4 Statistical analysis.....	70
2.4 Results	71
2.4.1 Bacterial viability	71
2.4.2 The bacterial viability of freeze-thawed samples.....	74
2.4.3 The correlation analysis between bacterial composition and viability	76
2.5 Discussion.....	79
2.5.1 Summary.....	79
2.5.2 The exposure to oxygen causes a loss of viability	79
2.5.3 The use of antioxidants and anaerobic conditions yield higher viability rates	80
2.5.4 The bacterial viability was affected by freezing at -20°C in cryoprotectants.....	81
2.5.5 The impact of the microbiota composition in bacterial viability.....	81
2.6 Conclusion	83
2.7 Funding.....	83
2.8 Acknowledgements.....	83
2.9 Conflicts of Interest.....	83
2.10 References.....	83

Chapitre 3 – Discussion générale	88
3.1 L'étude de la viabilité bactérienne.....	88
3.2 L'exposition à l'oxygène	90
3.3 La nécessité d'entreposer les échantillons fécaux.....	92
3.3.1 Les cryoprotecteurs	92
3.3.2 La cryopréservation à l'azote liquide.....	93
3.4 L'analyse de la composition bactérienne.....	94
3.5 Les donneurs de matières fécales.....	96
3.6 Les perspectives de la TMF	97
3.6.1 L'utilisation des éléments autres que les microorganismes.....	97
3.6.2 Les autres microorganismes de la TMF	99
3.6.3 L'utilisation de donneurs multiples	100
3.6.4 La médecine personnalisée et les biomarqueurs.....	101
3.7 La conclusion générale.....	102
Références.....	104

Liste des tableaux

Tableau 1 - Composition du microbiote intestinal d'humains atteints de maladies intra ou extra-intestinales.(A et B).....	27
Tableau 2 - Composition du microbiote intestinal de chiens ayant une maladie intra ou extra-intestinale.	29
Tableau 3 - Méthodes de préparation et d'entreposage d'échantillons fécaux pour la TMF.	48
Tableau 4 - Critères de sélection recommandés pour la sélection de donneurs fécaux canins.	58
Tableau 5 - Essais cliniques utilisant la TMF chez le chien	62

Manuscrit

Table 1 - Bacterial viability of all experimental groups	72
Table 2 - Analysis of deviance table with estimate standard errors of the mixed linear model of fresh samples.	73
Table 3 - Analysis of deviance table with estimate standard errors from mixed linear model of freeze-thawed samples.	76
Table 4 - Pearson correlation between the Shannon diversity index and bacterial viability.....	76
Table 5 - Pearson correlation between relative abundance of Prevotella and bacterial viability rates.	79

Liste des illustrations

Illustration 1 - Abondance relative d'échantillons fécaux équins avant et après l'administration d'antibiotiques.	21
Illustration 2 - Graphique thermique de corrélation entre l'abondance de genres bactériens et de biomarqueurs d'inflammation.	22
Illustration 3 - Courbe de raréfaction des communautés bactériennes.	23
Illustration 4 - Graphique d'analyse en coordonnées principales (PCoA) en deux dimensions.	24
Illustration 5 - Graphique d'analyse en coordonnées principales (PcoA) en trois dimensions.....	25
Illustration 6 - Représentation du maintien de la barrière intestinale.	35
Illustration 7 - Processus de tolérance immunitaire du microbiote intestinal.	37
Illustration 8 - Résistance à la colonisation d'espèces pathogènes médiée par les espèces commensales.....	40

Manuscrit

Figure 1 - Sample processing.....	68
Figure 2 - The effect of ambient condition and cryoprotectants on bacterial viability among fresh samples	73
Figure 3 - Pairwise comparisons of bacterial viability of fresh samples.	74
Figure 4 - Bacterial viability of all samples before and after freezing 90 days at -20°C.....	75
Figure 5 - The effect of the cryoprotectant on the viability of frozen samples.	75
Figure 6 - Relative abundance of the 18 most abundant bacteria.	78

Liste des acronymes et des abréviations

(AMPs)	<i>Antimicrobial peptides</i> (Peptides antimicrobiens)
(APRIL)	<i>Proliferation-inducing ligand</i> (Ligands d'induction de prolifération)
(BAFF)	<i>B-cell activating factor</i> (Activateur de lymphocyte B)
(CDI)	<i>Clostridioides difficile infection</i> (Infection à <i>Clostridioides difficile</i>)
(DCs)	Dendricytes
(EMA)	<i>Ethidium monoazide</i> (monoazide d'éthidium)
(IBD)	<i>Inflammatory bowel disease</i> (Maladie inflammatoire de l'intestin)
(ID)	Indice de dysbiose
(IgA)	Immunoglobuline-A
(IL-10)	Interleukine-10
(IL-17A)	Interleukine-17A
(IL-17F)	Interleukine-17F
(IL-22)	Interleukine-22
(IL-23)	Interleukine-23
(PCoA)	<i>Principal Coordinates Analysis</i> (Analyse en coordonnées principales)
(PCR)	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymérisation en chaîne)
(PGE2)	Prostaglandine E2
(PRRs)	<i>Patern recognition factors</i> (Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)
(MAMPs)	<i>Microbe-associated molecular pattern</i> (Motifs moléculaires associés aux antigènes)
(PMA)	<i>Propidium monoazide</i> (Monoazide de propidium)
(qPCR)	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Polymérisation en chaîne quantitative)
(SCFAs)	<i>Short chain fatty acids</i> (Acide gras à chaîne courte)
(TLSP)	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> (Lymphopoïétine stromale thymique)
(TGF- β)	<i>Transforming growth factor beta</i> (Facteurs de croissance bêta)
(TLR)	<i>Toll-like receptor</i> (Récepteur de type Toll)
(TMF)	Transplantation de microbiote fécal

(VLPs) *Viral-like particules* (Particules pseudovirales)
(ZO-1) Zonula Occludens-1

Remerciements

To **Marcio**, I cannot express enough thanks to you for giving me the opportunity to work on such a fascinating subject. Thanks to you, I acquired a passion, a lot of learning and a great career opportunity. I am also extremely grateful for the help, support, and valuable advice you have given me throughout my master's degree. I was very lucky to have an exceptional mentor like you.

Aux membres de mon comité-conseil ; **Younès Chorfi** et **Marie-Claude Blais**, je vous suis très reconnaissante pour le temps que vous m'avez accordé ainsi que pour tous vos précieux conseils.

Aux membres du jury, je vous remercie beaucoup d'avoir accepté de m'accorder votre précieux temps pour la révision de mon mémoire.

To my lab members, **Rebecca**, and **Julia** thank's to you both for your collaboration in these research projects. I had a lot of fun working with you girls and I will keep good memories. I am grateful to have met wonderful girls like you. **Laura F.** and **Sarah C.** thank's for your precious help and your encouragements during this project. It was a real pleasure to meet you both.

À mon conjoint, mon ami et partenaire **Dominic**, je suis tellement heureuse de t'avoir dans ma vie. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien et tes encouragements durant toutes ces années. Merci d'avoir su me faire rire dans les moments plus difficiles et d'avoir cru en moi.

À ma famille et à mes grandes amies, je vous suis tellement reconnaissante pour vos encouragements à poursuivre mes rêves, pour votre aide et votre compréhension pour mes nombreuses absences involontaires durant ces années. Je suis choyée de vous avoir dans ma vie.

Introduction

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui est colonisé par un nombre s'élevant à plus d'un trillion de microorganismes [1, 2]. Ces derniers colonisent l'ensemble du corps des animaux, mais ils sont beaucoup plus nombreux à l'intérieur du tractus gastro-intestinal. Le microbiote contient des microorganismes appartenant à différents règnes, mais la majorité de ces individus sont des bactéries [3, 4]. Ces microorganismes ont développé une relation mutualiste avec leur hôte et agissent de plusieurs manières sur la santé générale et intestinale de l'hôte [5-7]. Le microbiote intestinal d'un individu en bonne santé est caractérisé par une grande diversité bactérienne. Ainsi, le microbiote permet l'établissement et le maintien d'un système immunitaire fonctionnel, une production de métabolites essentiels, le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et une défense contre les entéropathogènes [8-13]. Le microbiote est une composante complexe ayant un impact majeur sur la santé de l'hôte à un point tel qu'il est maintenant reconnu comme étant un organe à part entière [14].

La dysbiose se résume en une perturbation du microbiote intestinal menant à des changements structurels et fonctionnels à savoir : une diminution de la diversité bactérienne et de la production de métabolites essentiels ainsi que l'augmentation de l'abondance d'espèces pathogènes [15-19]. Des analyses du microbiote intestinal à partir de matières fécales et de biopsies de la muqueuse intestinale indiquent une diminution d'espèces telles que *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Blautia*, *Fusobacterium* et *Clostridium hiranonis* et une augmentation d'*Escherichia coli* et de *Streptococcus* chez des chiens atteints d'entéropathies comparativement à des individus en santé [19-21]. D'ailleurs, la quantification des changements en ce qui concerne l'abondance de ces groupes et l'utilisation concomitante d'un algorithme mathématique sont employées pour rapporter ces changements sous forme d'indice de dysbiose (ID) [22]. De plus en plus de travaux de recherche démontrent que la dysbiose intestinale est reliée au développement de nombreuses maladies intra et extra-intestinales chez différentes espèces animales [18, 23-31].

Le succès de la transplantation de microbiote fécal pour le traitement de l'infection à *Clostridioides difficile* (CDI; *Clostridioides difficile* infection) chez l'humain a fait émerger l'intérêt de son usage en médecine vétérinaire, notamment chez les animaux de compagnie [30, 32, 33]. Cette méthode se décrit par l'utilisation de la matière fécale provenant d'un donneur en bonne santé pour effectuer le transfert de microorganismes bénéfiques dans le tube digestif d'un receveur [3]. Elle a pour but de rétablir une composition normale (eubiose) du microbiote, d'augmenter la diversité bactérienne et la quantité des populations bénéfiques [5]. Ainsi, elle crée un milieu défavorable aux espèces pathogènes et privilégie le rétablissement de la barrière intestinale par le biais d'une diminution de l'inflammation et d'une modulation du système immunitaire [5, 34]. D'ailleurs, la TMF semble efficace dans de nombreuses études effectuées chez les humains pour le traitement de maladies intra et extra-intestinales [32, 35-38]. Dans quelques études chez les animaux de compagnie, des résultats encourageants ont été observés pour le traitement d'entéropathies [33, 39-42].

Plusieurs études antérieures indiquent que la capacité des bactéries bénéfiques à coloniser le tube digestif du receveur est nécessaire à la réussite de la TMF [43-45]. Par conséquent, la viabilité des microorganismes au moment de la transplantation est essentielle. Or, la viabilité et la composition bactérienne sont affectées par les manipulations lors de la préparation et l'entreposage des échantillons fécaux [46]. À ce jour, il n'existe pas de protocole de préparation et d'entreposage des transplants fécaux canins [47].

Le microbiote intestinal du chien est composé majoritairement d'espèces bactériennes anaérobies strictes [48]. D'ailleurs, une diminution importante de viabilité d'espèces anaérobies strictes a été observée dans le cadre d'études antérieures lors d'une exposition à l'oxygène [49]. Cette diminution a provoqué des changements dans la composition bactérienne, menant à l'augmentation d'espèces pathogènes et à une diminution d'espèces bénéfiques [49]. La congélation est généralement utilisée pour l'entreposage des transplants fécaux [50]. Il s'agit d'une option intéressante, car elle permet l'entreposage de transplants de qualité tout en facilitant leur accès en cas de besoin [50-58]. Cependant, la congélation peut altérer la membrane cellulaire des bactéries et, ainsi, diminuer leur viabilité [49]. Quelques chercheurs se sont

intéressés aux effets de la congélation à partir d'échantillons fécaux humains. L'utilisation d'un cryoprotecteur semblait limiter la diminution de la viabilité bactérienne [59-63]. Néanmoins, jusqu'à présent, aucune étude ne semble avoir évalué l'impact de l'oxygène et de la congélation à partir d'échantillons fécaux canins.

En somme, la manipulation du microbiote intestinal par la TMF est prometteuse. Cependant, la viabilité des microorganismes au moment de la transplantation semble primordiale. Il est donc nécessaire d'évaluer les facteurs qui affectent la viabilité et la composition bactérienne pour l'établissement d'un éventuel protocole de préparation et d'entreposage des matières fécales.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1. Le microbiote intestinal

Les microorganismes sont omniprésents sur la planète ; ils colonisent également l'intérieur et l'extérieur du corps des animaux. Le tube digestif de ces derniers abrite des trillions d'individus qui forment le microbiote, incluant des virus, des archées, des protozoaires, des mycètes et des bactéries. Ces individus vivent en symbiose avec l'hôte et sont impliqués dans le maintien et la régulation de différents systèmes physiologiques tout en profitant de la niche écologique que l'hôte leur apporte. De plus, ils stimulent le système immunitaire et le développement de la structure intestinale, ils protègent l'hôte contre les entéropathogènes et lui fournissent des nutriments grâce aux métabolites qu'ils produisent [5-7].

Ces communautés microbiennes habitent différents endroits du corps tels que le tractus digestif (cavité orale, estomac et tube digestif), la peau, les poumons ainsi que le tractus urogénital. Le nombre ainsi que les différentes espèces qui s'y trouvent varient en fonction de la localisation [3]. Toutefois, c'est à l'intérieur du gros intestin que l'on trouve le plus grand nombre de microorganismes, et plus particulièrement des bactéries [64]. Des études de séquençage à haut débit basées sur le pyroséquençage du gène de l'ARNr 16S indiquent que le microbiote intestinal canin pourrait contenir plusieurs milliers de phylotypes bactériens [4, 65]. Bien qu'il existe une quantité importante d'archées, de mycètes et de virus jouant un rôle dans la santé et les pathologies, ces microorganismes demeurent peu étudiés. En effet, l'apparition de nouvelles technologies a favorisé l'identification et la classification des procaryotes par le séquençage de leur ADN, facilitant l'étude de la composition bactérienne [4, 64]. De plus, le fait que le microbiote soit composé en majorité par des bactéries, la plupart des études, y compris la présente, se concentrent sur l'analyse de la composition bactérienne.

1.1 Les technologies utilisées pour l'étude du microbiote

Grâce aux progrès technologiques, l'écosystème complexe du microbiote et ses interactions avec l'hôte sont aujourd'hui mieux compris. Autrefois, les espèces bactériennes

étaient identifiées par l'utilisation des méthodes de culture. Cependant, seule une faible proportion d'espèces bactériennes peut être cultivée à l'aide de ces méthodes [66, 67]. En effet, les conditions optimales de croissance de certains microorganismes ne sont pas élucidées, et plusieurs espèces bactériennes sont difficilement obtenues en milieu de culture [68]. De plus, ces méthodes ne permettent pas d'identifier les autres microorganismes qui composent le microbiote tels que les archées, les mycètes, les protozoaires et les virus [69]. Elles demeurent toutefois utiles dans différents domaines de recherche ainsi que dans le domaine médical, notamment puisqu'elles permettent, entre autres, d'identifier un agent pathogène spécifique à l'aide de tests de sensibilité à des antibiotiques. Ces méthodes de culture peuvent également être utiles pour caractériser leurs propriétés métaboliques ainsi que leurs facteurs de virulence, mais ces derniers nécessitent généralement un recours à la PCR et à l'étude génomique.

L'usage des méthodes indépendantes de culture est maintenant l'approche priorisée pour l'étude de l'écosystème du microbiote. Notamment, la technique d'empreinte macromoléculaire, l'hybridation *in situ* en fluorescence, les puces à ADN et la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) offrent la possibilité de quantifier les bactéries présentes dans l'échantillon ou de cibler un taxon [69]. Pour ce faire, l'ADN ou l'ARN est extrait des échantillons et, par la suite, un gène spécifique est amplifié à l'aide d'une amorce ciblant les régions conservées du gène en question. Pour l'identification des bactéries, le gène ribosomal 16S est le plus souvent ciblé [68]. Cependant, le nombre d'espèces pouvant être séquencées est limité, ce qui augmente les coûts et le temps nécessaire pour effectuer les analyses [69].

Le séquençage de nouvelle génération a permis d'augmenter le rendement des analyses grâce à sa capacité à séquencer un millier de fragments d'ADN en parallèle. Cependant, la taille de ces fragments est généralement limitée et rend impossible la classification à un rang taxonomique au niveau de l'espèce [69]. Bien que le séquençage de nouvelle génération ait fait progresser les connaissances de façon importante, cette technologie comporte certaines limitations. Notamment, elle ne permet d'obtenir que l'abondance relative de chaque taxon, c'est-à-dire l'abondance des uns par rapport aux autres, empêchant ainsi de déterminer les changements quantitatifs au niveau d'un taxon individuel [70]. De plus, elle pose un défi majeur

sur le plan de l'analyse bio-informatique, car elle apporte des quantités massives de données de séquençage. Récemment, Pacific Biosciences® a développé une technologie qui permet d'utiliser l'intégralité du gène ribosomal 16S, rendant ainsi possible la classification des organismes au niveau de l'espèce [71]. De plus, cette technologie permet d'effectuer des analyses plus approfondies telles que la transcriptomique (l'étude de l'ensemble des ARNm transcrits) et l'épigénétique (l'étude des changements dans l'activité des gènes). Bien que cette méthode génère plus d'informations lors des analyses, cette méthode a pour limitation un taux d'erreur plus élevé et un débit plus faible comparativement au séquençage de nouvelle génération [71].

1.2 L'évaluation du microbiote

La diversité alpha caractérise l'écosystème à l'intérieur d'un échantillon par l'utilisation d'indices tels que la richesse et l'uniformité. La richesse correspond au nombre de taxons différents qui compose la communauté et l'uniformité représente la proportion de chacun de ces taxons. La diversité correspond à un calcul mathématique qui regroupe la richesse et la régularité [69].

La diversité bêta est l'indice utilisé afin de comparer la biodiversité entre plusieurs communautés. Elle est calculée à l'aide de la mesure du nombre d'espèces qui partagent plus d'une communauté et de la mesure de la structure. Cette dernière tient compte à la fois du nombre d'espèces communes et distinctes ainsi que leur abondance relative [69].

1.3 La comparaison visuelle des communautés bactériennes

Différentes représentations des analyses du microbiote peuvent être conçues. Le graphique en bâtons qui représente l'abondance relative (Illustration 1.) offre une vue d'ensemble sur les différents taxons présents dans les communautés par rapport au nombre total de taxons. Cependant, lorsque le graphique est employé pour présenter des niveaux taxonomiques inférieurs tels que l'espèce ou le genre, les interprétations statistiques doivent être effectuées avec prudence. En effet, en raison d'une importante quantité de données, un seuil de probabilité de 5 % ($p = 0,05$) risque d'engendrer un résultat faussement significatif sur 20, ce qui

pourrait mener à une surinterprétation des résultats. Des corrections de la valeur p doivent donc être apportées, par exemple, avec un test de Bonferroni ou de Benjamini–Hochberg [69].

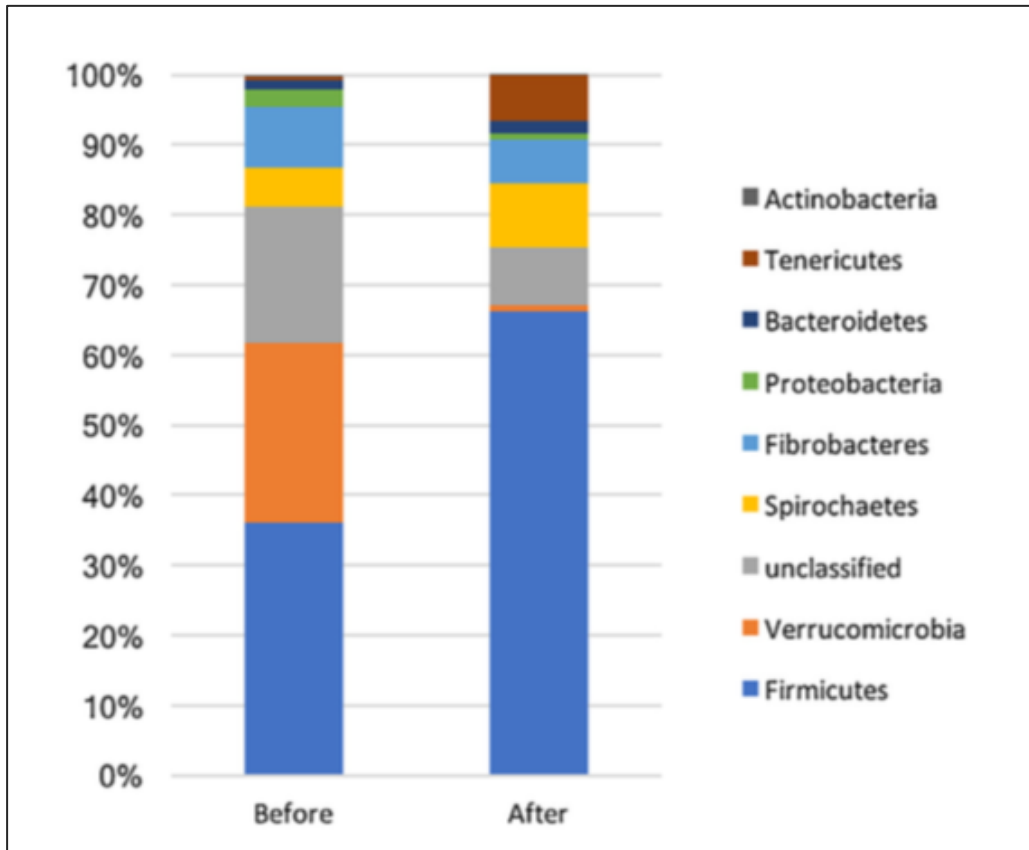


Illustration 1 - Abondance relative d'échantillons fécaux équins avant et après l'administration d'antibiotiques.

Graphique en bâtons représentant l'abondance relative de phylums bactériens présents dans des échantillons fécaux équins avant et après l'usage d'un antibiotique [72]. Reproduit à partir de *Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs*, Costa, M.C., et al., *BMC veterinary Research*, volume 11, page 19, © 2015, avec l'autorisation de *BMC veterinary Research* (libre accès).

L'abondance relative peut être représentée à l'aide d'un graphique de carte thermique (Illustration 2.). Celui-ci permet de comparer les communautés grâce à des couleurs qui représentent différents niveaux d'abondance relative. Cette représentation est plus utile pour des données peu nombreuses. En effet, avec un trop grand nombre de taxons différents, il devient difficile de distinguer visuellement des résultats [69].

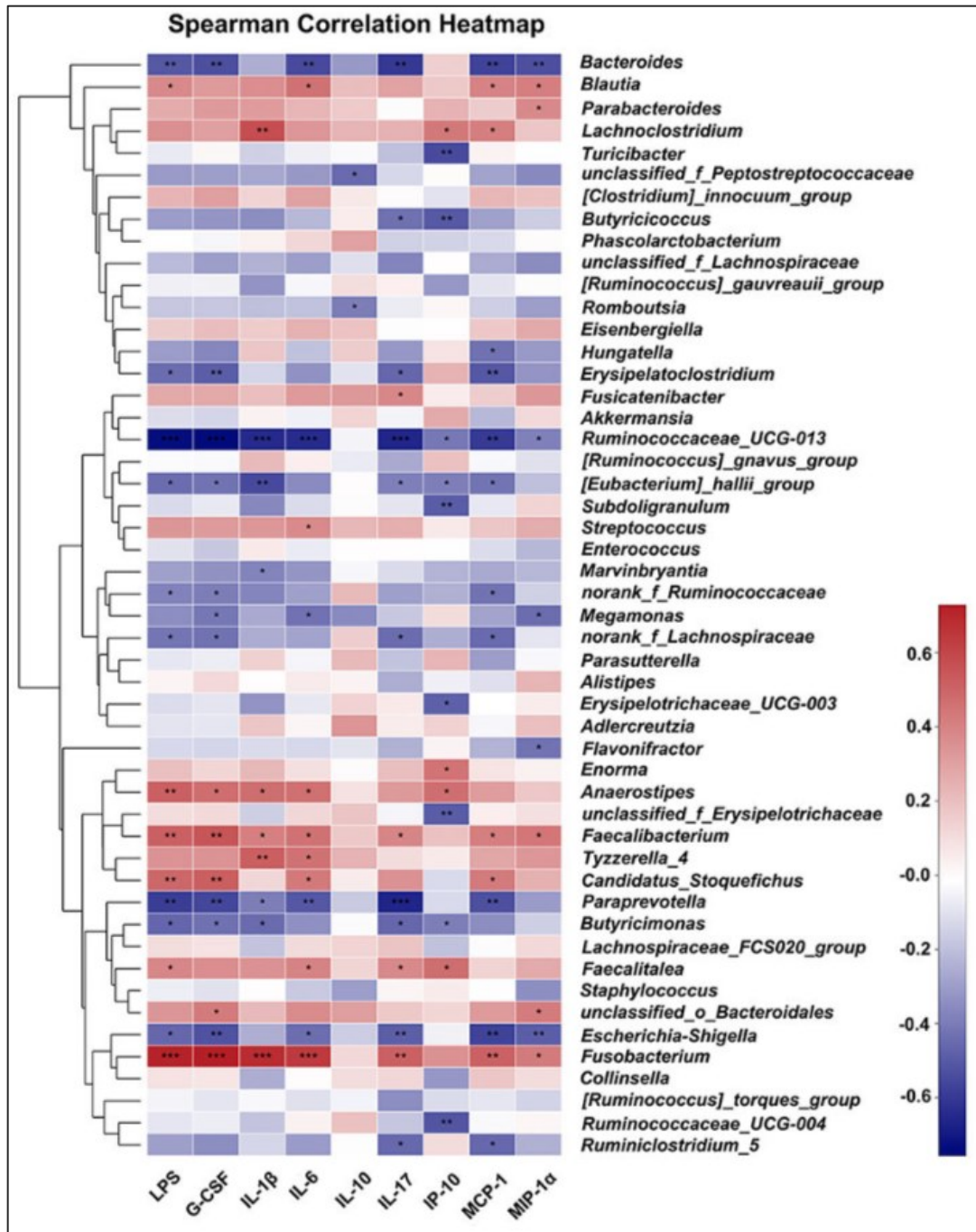


Illustration 2 - Graphique thermique de corrélation entre l'abondance de genres bactériens et de biomarqueurs d'inflammation. L'échelle de couleurs passe du bleu au rouge en fonction de l'abondance relative. Plus elle est importante, plus elle tend vers le rouge, et inversement pour le bleu [73]. Reproduit à partir de *Faecal microbiota transplantation from metabolically compromised human donors accelerates osteoarthritis in mice*, Huang, Z., et al., *Annals of the Rheumatic Diseases*, volume 79, pages 646-656, ©2020, BMJ Publishing Group Limited (libre accès).

Une courbe de raréfaction (Illustration 3.) permet d’obtenir une représentation visuelle simple et rapide de la richesse et de la diversité des différentes communautés bactériennes. Dans ce graphique, le nombre de genres (ou d’un autre rang taxonomique) est représenté par rapport au nombre de séquences d’ADN lues. À chaque lecture, un certain nombre de genres bactériens est détecté. Ainsi, plus la diversité est importante, plus la pente est abrupte au début de la courbe. La richesse peut être visualisée à partir du nombre de genres une fois le plateau atteint [69].

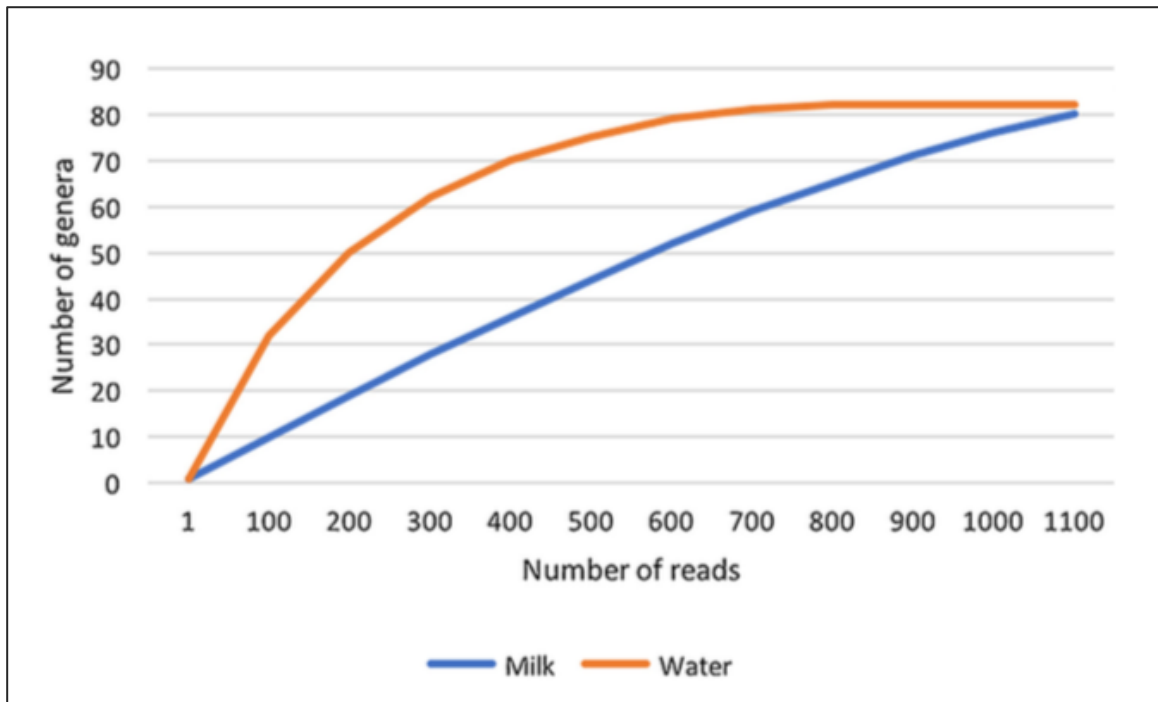


Illustration 3 - Courbe de raréfaction des communautés bactériennes. Ces courbes représentent deux échantillons (deux communautés bactériennes) ayant la même richesse bactérienne (80 genres). Dans cet exemple, l’eau (orange) contient une plus grande diversité bactérienne que le lait (bleu) [69]. Reproduit à partir de *Methods and basic concepts for microbiota assessment*, Costa, M. et J.S. Weese, *The veterinary journal*, volume 249, page 10-15, © 2019, avec l’autorisation de Elsevier Ltd.

L’utilisation de l’analyse en coordonnées principales (PCoA) offre la possibilité de visualiser la similarité entre les communautés (Illustration 4.). Elle représente graphiquement une matrice de corrélations entre les différents taxons qui sont présents dans les communautés. De cette façon, il est possible de déterminer les similarités des communautés en fonction de la distance sur la matrice. Ainsi, plus les points sont rapprochés, plus les communautés sont

similaires [69]. Cette représentation peut être en deux ou trois dimensions en fonction des résultats. Si l'ensemble des résultats est similaire, le pourcentage de variation est plus faible, rendant la visualisation plus difficile ; dans un tel cas, l'ajout d'une troisième dimension facilite l'interprétation [74].

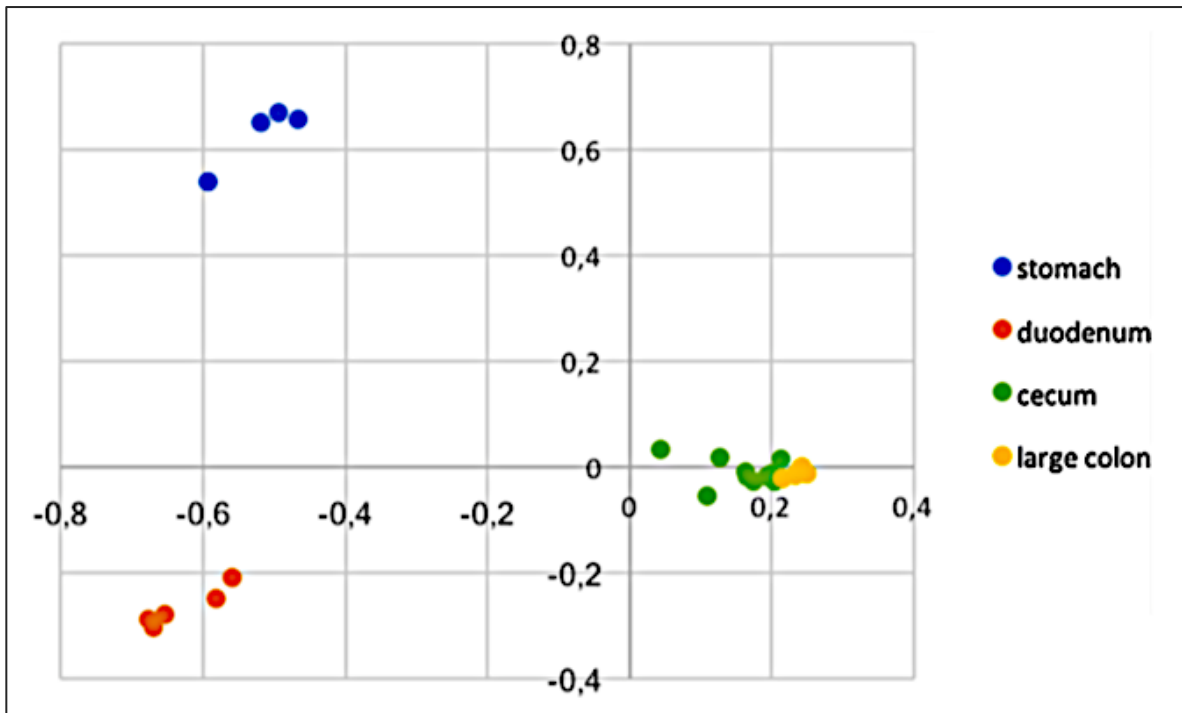


Illustration 4 - Graphique d'analyse en coordonnées principales (PCoA) en deux dimensions. Le graphique d'analyse en coordonnées principales (PcoA) illustre la similarité des communautés bactériennes localisées dans l'estomac, le duodénum et le colon de chevaux [72]. Dans ce graphique, les communautés provenant du colon sont similaires à celles du cæcum et différentes de celles qui sont localisées dans l'estomac ou le duodénum. Reproduit à partir de *Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs*, Costa, M.C., et al., *BMC veterinary Research*, volume 11, page 19, © 2015, avec l'autorisation de *BMC veterinary Research*.

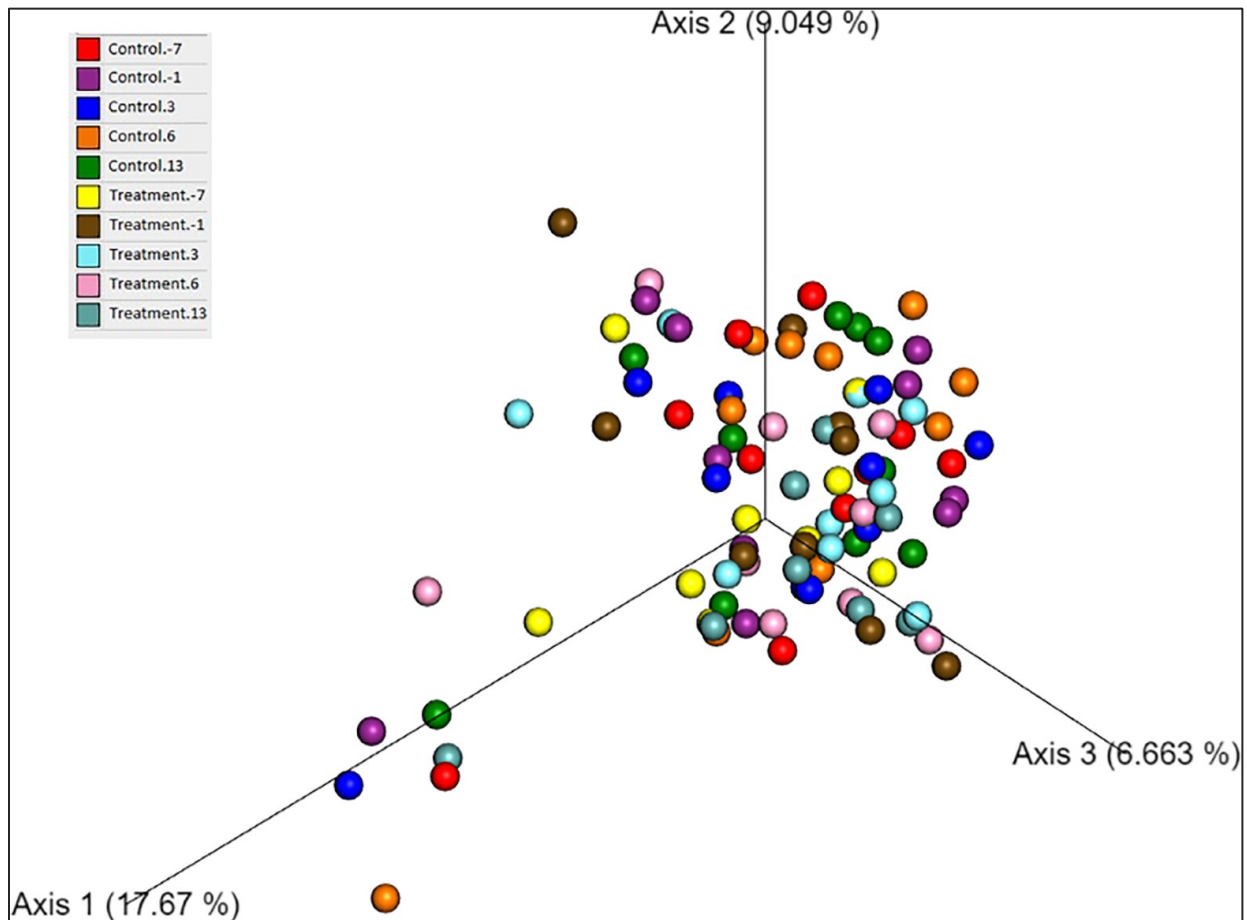


Illustration 5 - Graphique d'analyse en coordonnées principales (PcoA) en trois dimensions L'analyse en coordonnées principales (PcoA) des communautés microbiennes représente des échantillons fécaux de chiens avec ou sans l'administration de fenbendazole par voie orale. Les résultats représentés dans cette figure montrent une absence de dissimilarité entre les groupes « traitement » et les groupes « contrôle » [75]. Reproduit à partir de *Evaluation of the effects of anthelmintic administration on the fecal microbiome of healthy dogs with and without subclinical Giardia spp. and Cryptosporidium canis infections*, Fujishiro, M.A., et al., *PLOS ONE*, volume 15, ©2020, avec l'autorisation de *PLOS ONE* (libre accès).

1.4 La composition du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal de chiens en bonne santé est caractérisé par une forte présence de phylums bactériens tels que les *Firmicutes*, les *Bacteriodes*, les *Fusobacteria* et les *Actinobacteria*. D'un individu à l'autre, leurs proportions varient dans une certaine mesure et créent donc ce que l'on nomme un profil microbien [76]. Cependant, la conservation des gènes parmi les espèces fait en sorte qu'ils possèdent des capacités métaboliques comparables [77]. La

diversité bactérienne apporte une quantité importante de voies métaboliques complémentaires à celles de l'hôte. Ainsi, la diversité bactérienne garantit un apport en métaboliques essentiels au maintien de sa santé [78].

De nombreuses études effectuées chez l'humain indiquent qu'une altération de la composition du microbiote intestinal, nommée dysbiose, est associée à différentes maladies intra et extra-intestinales [79-94]. Les changements généralement observés dans la composition bactérienne se caractérisent par la diminution d'espèces connues pour avoir des fonctions bénéfiques pour l'hôte et par l'augmentation d'espèces pathogènes. Cependant, il demeure incertain si ces changements sont la cause ou l'effet du développement de ces maladies.

Tableau 1 - Composition du microbiote intestinal d'humains atteints de maladies intra ou extra-intestinales. Ce tableau représente une liste non exhaustive, à titre d'exemple, des modifications du microbiote intestinal d'humains ayant une maladie intra-intestinale A) et extra-intestinale B) comparativement à des individus sains [87-94].

A)

Maladies intra-intestinales	Échantillons	Analyses	Changements observés	Référence
Maladie de Crohn (n= 6) Ctrl (n=6)	Fèces	PCR quantitative en temps réel	<ul style="list-style-type: none"> ↓ <i>Eubacterium rectale</i> ↓ <i>Bacteroides fragilis</i> ↓ <i>B. vulgatus</i> ↓ <i>Ruminococcus albus</i> ↓ <i>R. callidus</i> ↓ <i>R. bromii</i> ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ↑ <i>Enterococcus</i> sp. ↑ <i>Clostridium difficile</i> ↑ <i>Escherichia coli</i> ↑ <i>Shigella flexneri</i> ↑ <i>Listeria</i> 	Kang et al. 2010 [89]
Syndrôme du côlon irritable (n= 62) Ctrl (n= 46)	Fèces	Puces à ADN combiné à la PCR	<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>Dorea</i> ↑ <i>Ruminococcus</i> ↑ <i>Clostridium spp</i> ↓ Bacteroidetes ↓ <i>Bifidobacterium</i> ↓ <i>Faecalibacterium</i> ↓ méthanogènes 	Rajilić-Stojanović et al 2011 [87]
Maladie cœliaque (n= 18) Ctrl (n=18)	Fèces	Pyroséquençage du gène ribosomal 16S	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Proteobacteria ↓ Bacteroidetes ↓ Firmicutes 	Wacklin et al. 2014 [88]
Infection à <i>C. difficile</i> (n= 14) Ctrl (n= 669)	Écouvillons	Séquençage du gène ribosomal 16S	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Diversité bactérienne ↑ <i>Enterococcus</i> ↓ <i>Ruminococcus</i> ↓ <i>Blautia</i> ↓ <i>Prevotella</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i> 	Berkell et al. 2021 [90]

Ctrl= contrôle sain; n= nombre d'individus; ↑= supérieur; ↓= inférieur.

B)

Maladies extra-intestinales	Échantillon	Analyses	Changements observés	Référence
Eczéma atopique (n= 20) Ctrl (n=20)	Fèces	Pyroséquençage-454 du gène ribosomal 16S	↓ <i>Bacteroides</i> ↑ Proteobacteria ↓ Diversité bactérienne	Abrahamsson et al. 2012 ^[93]
Obésité (n= 19) Ctrl (n= 9)	Fèces	Micropuces à ADN	↑ Proteobacteria ↓ Diversité bactérienne ↓ Ratio Bacteroidetes/Firmicutes	Verdam et al 2013 ^[94]
Trouble dépressif majeur (n= 43) Ctrl (n= 57)	Fèces	PCR quantitative	↓ <i>Bifidobacterium</i> ↓ <i>Lactobacillus</i>	Aizawa et al. 2016 ^[92]
Désordre du spectre de l'autisme (n= 30) Ctrl (n= 24)	Fèces	Séquençage du gène ribosomal 16S	↑ <i>Lactobacillaceae</i> ↑ <i>Bifidobacteriaceae</i> ↑ <i>Veillonellaceae</i> ↑ <i>Lactobacillus</i> ↑ <i>Desulfovibrio</i> ↑ <i>Bacteroides vulgatus</i> ↑ Bacteroidetes	Pulikkan et al 2018 ^[91]

Ctrl= contrôle sain; n= nombre d'individus; ↑= supérieur; ↓= inférieur.

Tableau 2 - Composition du microbiote intestinal de chiens ayant une maladie intra ou extra-intestinale. Ce tableau représente une liste non exhaustive, à titre d'exemple, des modifications du microbiote intestinal de chiens ayant une maladie intra-intestinale A) et extra-intestinale B) comparativement à des individus sains [79-86]

A)

Maladies intra-intestinales	Échantillons	Analyses	Changements observés	Référence
Maladie inflammatoire de l'intestin (n = 7) Ctrl (n=7)	Biopsies (duodénum)	Séquençage du gène ribosomal 16S	↑ Pseudomonas ↑ Acinetobacter ↑ Conchiformibius, ↑ Achromobacter ↑ Brucella, ↑ Brevundimonas ↓ Clostridia	Suchodolski et al. 2010 [79]
Entéropathies chroniques (n=13) Ctrl (n=10)	Biopsies (duodénum, iléon et colon)	Séquençage du gène ribosomal 16S	↑ Bacilli, ↑ Erysipelotrichi ↑ Lactobacillales ↑ Actinomycetales ↑ Erysipelotrichales	Allenspach et al. 2010 [81]
Diarrhées hémorragiques aiguës (n=13) Ctrl (n=32)	Fèces	Pyroséquençage-454 du gène ribosomal 16S	↑ <i>Sutterella</i> ↑ <i>Clostridium perfringens</i> ↓ Blautia ↓ Ruminococcaceae ↓ <i>Faecalibacterium</i> ↓ <i>Turicibacter</i> spp.	Suchodolski et al 2012 [80]
Diarrhées aiguës (n=13) Ctrl (n=13)	Fèces	Pyroséquençage-454 du gène ribosomal 16S	↓ Diversité bactérienne ↑ Clostridium ↓ Bacteroidetes ↓ <i>Faecalibacterium</i> ↓ Ruminococcaceae	Guard et al 2015 [82]
Parvovirus (n=4) Ctrl (n=4)	Fèces	Séquençage du gène ribosomal 16S	↓ Diversité bactérienne ↑ Proteobacteria ↑ <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ Bacteroidetes ↓ <i>Prevotella</i> ↓ <i>Lactobacillus</i>	Seok Park et al. 2019 [93]

Ctrl= contrôle sain; n= nombre d'individus; ↑= supérieur; ↓= inférieur.

B)

Maladies extra-intestinales	Échantillon	Analyses	Changements observés	Référence
Insuffisance pancréatique exocrine (n=36) Ctrl (n=34)	Fèces	PCR quantitative	↑ <i>Escherichia coli</i> ↑ <i>Lactobacillus</i> ↑ <i>Bifidobacterium</i> ↑ <i>Fusobacterium</i> ↓ <i>Fusobacterium</i> ↓ <i>Clostridium hiranonis</i>	Blake et al 2019 [84]
Diabète (n=10) Ctrl (n=10)	Fèces	Séquençage du gène ribosomal 16S	↑ <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Erysipelotrichia</i> ↓ <i>Mogibacteriaceae</i> ↓ <i>Anaeroplasmataceae</i>	Jergens et al 2019 [86]
Obésité (n=6) Ctrl (n=6)	Fèces	Séquençage du gène ribosomal 16S	↓ <i>Faecalibacterium</i> ↓ <i>Phascolarctobacterium</i> ↓ <i>Megamonas</i> ↓ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Mucispirillum</i> ↓ <i>Ruminococcaceae</i>	Kim et al. 2022 [85]

Ctrl= contrôle sain; n= nombre d'individus; ↑= supérieur; ↓= inférieur.

Par exemple, dans une étude prospective effectuée par Berkell et al., une caractérisation longitudinale du microbiote intestinal de 945 patients humains hospitalisés de 6 pays européens a été effectuée [90]. Les individus ayant une faible diversité bactérienne ont développé une CDI alors que ceux ayant une plus grande diversité ne l'ont pas développée. De plus, les individus ayant la CDI avaient une abondance plus élevée du genre bactérien *Enterococcus* constitué principalement par *E. faecium* et *E. faecalis*, qui sont également deux entérocoques fréquemment observés lors d'infections chez l'humain [95-97]. De plus, il est rapporté que lors d'une maladie inflammatoire de l'intestin, tel que la maladie de Crohn, certaines espèces bénéfiques produisant le butyrate, telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, diminuent [98]. Ce métabolite réduit l'inflammation de la muqueuse intestinale par le biais d'un effet immunomodulateur caractérisé par l'inhibition de la production et de la libération de cytokines inflammatoires [99-101].

De plus, les travaux de recherche effectués chez l'humain et les animaux de compagnie indiquent que le microbiote intestinal impliqué dans la pathogénie de l'obésité est associé à des altérations de la composition bactérienne du microbiote intestinal [85, 102-108]. D'ailleurs, le transfert de microbiote fécal d'humains obèses à l'intérieur du tube digestif de souris axéniques (exemptes de germe) engendrait une prise de poids significative par rapport aux souris qui avaient reçu le microbiote fécal de témoins maigres [109]. Très récemment, Kim et al. ont effectué des analyses comparatives par séquençage génétique du microbiote fécal de chiens obèses et non-obèses. Les analyses ont révélé une abondance relative supérieure de *Faecalibacterium*, de *Phascolarctobacterium*, de *Megamonas*, de *Bacteroides*, de *Mucispirillum* et d'un genre non classé au sein des *Ruminococcaceae* comparativement aux chiens ayant un poids idéal [110].

Une modification du ratio Firmicutes/Bacteroidetes est fréquemment citée dans la littérature comme étant un marqueur d'obésité chez l'humain et les animaux [103, 111-117]. Cependant, plusieurs études ont obtenu des résultats contradictoires ; certaines indiquent une abondance supérieure de Firmicutes [118-121] et une abondance inférieure de Bacteroidetes [114, 121-123], alors que d'autres suggèrent l'inverse [118, 124-127]. Ces divergences pourraient

s'expliquer par les différences méthodologiques dans le traitement des échantillons et de l'analyse des séquences d'ADN. Par conséquent, il est actuellement difficile d'établir si l'augmentation ou la diminution du rapport Firmicutes/Bacteroidetes est un signe distinctif de l'obésité.

1.5 L'indice de dysbiose

Un indice de dysbiose a récemment été développé par Al Shawaqfeh et al. pour la caractérisation des changements dans la composition du microbiote fécal des chiens atteints d'une maladie inflammatoire chronique (IBD; *inflammatory bowel disease*). L'IBD est diagnostiquée par l'exclusion de causes communes au développement de symptômes gastro-intestinaux tels que la présence de parasites ou d'entéropathogènes. Les symptômes doivent être présents pendant une durée minimum de 3 semaines [22]. Cette pathologie implique différents facteurs tels que des prédispositions génétiques, certains antigènes provenant de l'alimentation ainsi que des réponses immunitaires exacerbées impliquant le microbiote et le système immunitaire. Le diagnostic final est confirmé par l'évaluation histopathologique démontrant l'infiltration de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale et des changements de la structure épithéliale [22, 128].

L'indice de dysbiose implique des changements relatifs à l'abondance de 7 groupes bactériens ont été identifiés chez des chiens atteints d'IBD. Ces informations ont été obtenues dans le cadre d'études ayant utilisé des méthodes de ciblage du gène de l'ARNr 16S telles que le séquençage de nouvelle génération ou la PCR quantitative (qPCR). La composition bactérienne des fèces de ces chiens se caractérisait par une diminution d'espèces telles que *Faecalibacterium*, *Turicibacter*, *Blautia*, *Fusobacterium* et *Clostridium hiranonis* et une augmentation d'*Escherichia coli* et de *Streptococcus* [19-21]. À partir des fèces de 95 chiens en bonne santé et de 106 chiens atteints d'entéropathies chroniques, la quantification des groupes bactériens fécaux a été effectuée. Les chiens malades avaient comme critère de sélection une durée des symptômes supérieure à 3 semaines ainsi qu'une inflammation de la muqueuse intestinale confirmée par analyses histopathologiques. Ensuite, l'utilisation concomitante d'un algorithme mathématique et de la quantification de l'ADN extrait chez ces groupes bactériens (logADN/g) a été effectuée.

Cette dernière étape a permis de rapporter ces changements sous forme d'indice de dysbiose. Une valeur positive indiquait la présence d'une dysbiose alors qu'une valeur négative indiquait une eubiose [22].

De manière similaire, un indice de dysbiose a récemment été développé chez le chat [129]. À partir de groupes bactériens appartenant aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium hiranonis*, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium*, *Streptococcus* et *Turicibacters*, le même algorithme mathématique a été utilisé pour déterminer l'indice de dysbiose [84, 130-135]. Les résultats du calcul de l'indice de dysbiose chez le chat est interprété de la même façon que chez le chien (ID > 0 = dysbiose ; ID < 0 = eubiose).

L'index pourrait être un outil intéressant en médecine vétérinaire pour effectuer le suivi de l'évolution d'un patient ou lorsqu'une dysbiose intestinale est suspectée. Cependant, des analyses supplémentaires dans le cadre d'études cliniques prospectives sont nécessaires pour obtenir la preuve qu'un indice de dysbiose positif peut être considéré comme un biomarqueur prédictif.

1.2 La barrière intestinale

La muqueuse gastro-intestinale forme une barrière entre le corps et l'environnement extérieur. Elle permet un transport des nutriments à travers l'épithélium tout en empêchant le passage de molécules et d'organismes indésirables.

La première ligne de défense de la barrière est constituée par des couches de mucus qui sert de barrière physique contre les facteurs externes. Des techniques de mesure *in vivo* de l'épaisseur et de la composition moléculaire du mucus ont mené à des connaissances plus approfondies. En effet, l'identification de différentes mosaïques de mucus selon la localisation dans le tube digestif a été réalisée [136]. De plus, des études biochimiques menées chez la souris ont démontré la formation de deux couches distinctes de mucus en surface de la muqueuse du colon : l'une qui est en contact direct, fermement attachée aux entérocytes et dépourvue de la

présence bactérienne ; l'autre qui apporte des nutriments et qui sert de point d'ancrage pour les microorganismes [137].

Les jonctions serrées des cellules épithéliales permettent le transport sélectif de molécules par la voie transcellulaire (diffusion passive à travers les membranes cellulaires), la voie transcellulaire médiée par le transporteur/récepteur et la voie paracellulaire (diffusion passive entre les espaces à travers des cellules adjacentes). Les jonctions serrées sont constituées de protéines telles que l'occludine, les claudines et la zonula occludens. Elles scellent l'espace paracellulaire entre les cellules et empêchent la translocation des protéines, des lipides et des peptides d'origine microbienne [138, 139].

L'épithélium gastro-intestinal est constitué de différents types de cellules épithéliales telles que les entérocytes, les cellules de Paneth, les cellules caliciformes et les cellules micropliées [140, 141]. Certaines sont capables de phagocyter les bactéries et de neutraliser les toxines bactériennes. Ces cellules sont également spécialisées pour reconnaître les molécules d'origine bactérienne connues sous le nom de « motifs moléculaires associés aux antigènes » (MAMPs ; *Microbe-associated molecular pattern*). Elles ont des récepteurs de type Toll (*TLR ; Toll-like receptor*) à la surface de la membrane cellulaire et des récepteurs cytoplasmiques qui activent la défense cellulaire par la sécrétion de peptides antimicrobiens [142, 143]. Sous la couche épithéliale se trouve une fine couche de tissu conjonctif, la lamina propria, qui abrite des cellules immunitaires, notamment des cellules dendritiques, des lymphocytes T, des lymphocytes B et des macrophages.

Collectivement, l'ensemble des cellules épithéliales et des cellules immunitaires, ainsi que les couches de mucus forment une barrière physique contre les facteurs externes et maintiennent une relation symbiotique avec les bactéries commensales. La perte de l'intégrité de la barrière intestinale peut mener à des réactions immunitaires exacerbées et à l'augmentation de la translocation d'antigènes bactériens, comme résumé dans la Figure 7. [144-153].

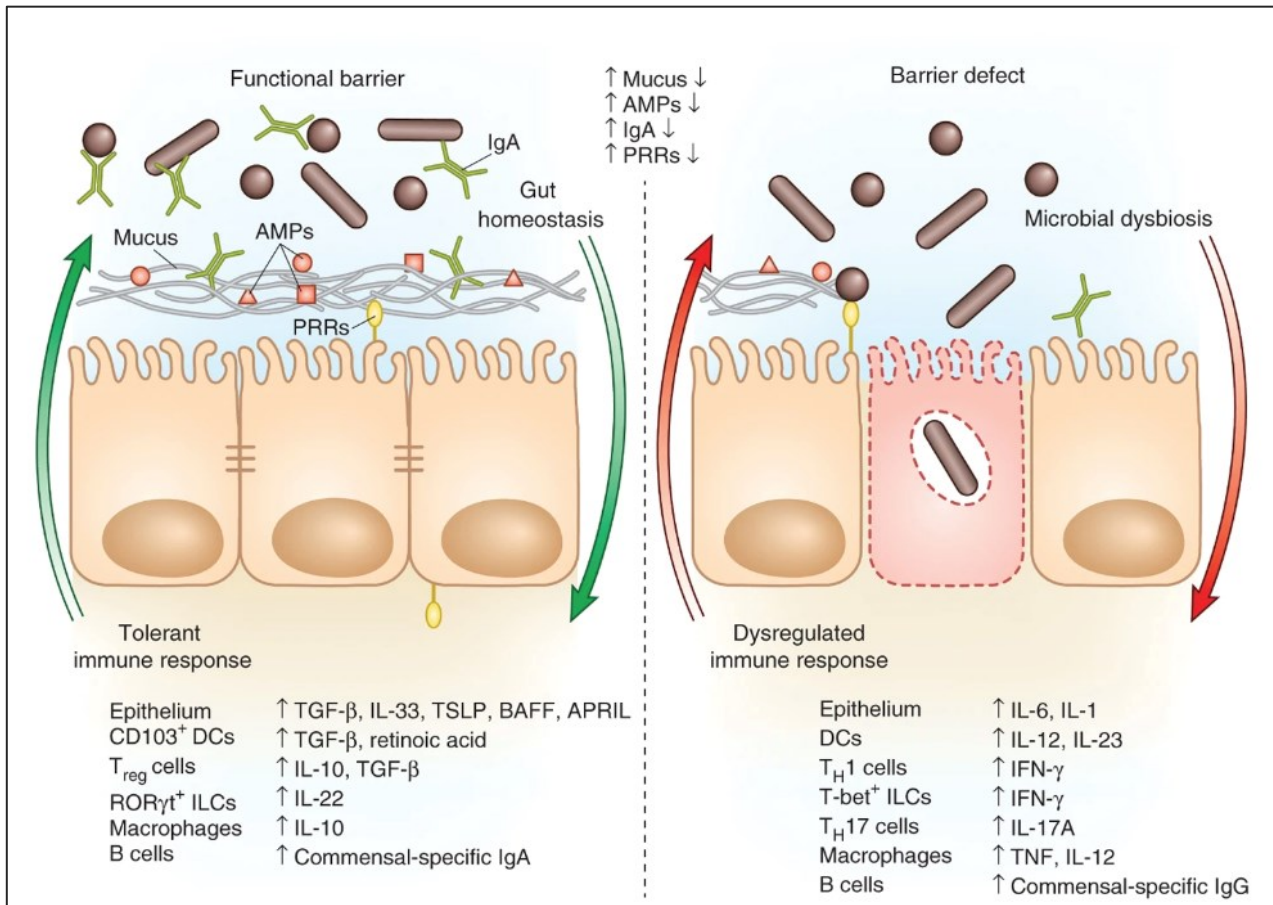


Illustration 6 - Représentation du maintien de la barrière intestinale. L'implication de différentes protéines telles que des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs; *pattern recognition receptors*) de mucus, d'immunoglobulines A (IgA) et de peptides antimicrobiens (AMPs; *antimicrobials peptides*) permet de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale. À droite est représentée une réduction de la couche de mucus au niveau des cellules épithéliales, causant une augmentation des contacts avec des antigènes. Ainsi, une cascade de réponses pro-inflammatoires est engendrée par la sécrétion de molécules telles que des interleukines-1,6. Les macrophages et les dendrocytes (DCs) provoquent une inflammation par le biais de la libération de d'interleukines-12,23 et la différenciation de Th17 et Th1. Ces dernières sécrètent également des molécules proinflammatoires [145]. Reproduit à partir de *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*, Duncan, S.H., et al., *International Journal of Obesity*, volume 32, page 1720-1724, © 2013, avec l'autorisation de Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited.

1.3 Les fonctions du microbiote

Les microorganismes du microbiote intestinal jouent des rôles cruciaux dans la régulation et le maintien de la santé de l'hôte. Ils sont impliqués dans la digestion des aliments et fournissent

ainsi différents métabolites et vitamines. Ils sont également impliqués dans la protection contre les agents pathogènes et dans le maintien de l'homéostasie immunitaire [8-13, 154, 155].

1.3.1 La tolérance immunitaire des bactéries commensales

La tolérance immunitaire est un processus fondamental permettant de réguler adéquatement les réponses immunitaires contre soi-même, la nourriture, les espèces bactériennes commensales (bénéfiques) et les espèces pathogènes. Le processus de tolérance immunitaire des espèces commensales repose sur un ensemble de réponses innées et adaptatives. En effet, un récepteur de type Toll situé au niveau de la membrane des cellules épithéliales et lymphoïdes permet la reconnaissance des MAMPs. Ce récepteur permet de différencier les espèces pathogènes et les espèces bénéfiques. Ainsi, il provoque une inhibition de la réponse inflammatoire lors d'une reconnaissance de l'espèce commensale par le biais de modifications au niveau de la membrane cellulaire des espèces commensales et une diminution de la reconnaissance par les TLR [156].

De plus, les lymphocytes B produisent des immunoglobulines A (IgA) qui exercent un contrôle sur la fonction et la régulation du microbiote. Par exemple, la liaison d'un IgA à une espèce commensale telle que *Bacteroides thetaiotaomicron* affecte l'expression de l'épitope bactérien pour empêcher une activation de la réponse immunitaire [157]. Cependant, ces processus de tolérance doivent être limités afin de préserver les réactions immunitaires face à la translocation d'un pathogène.

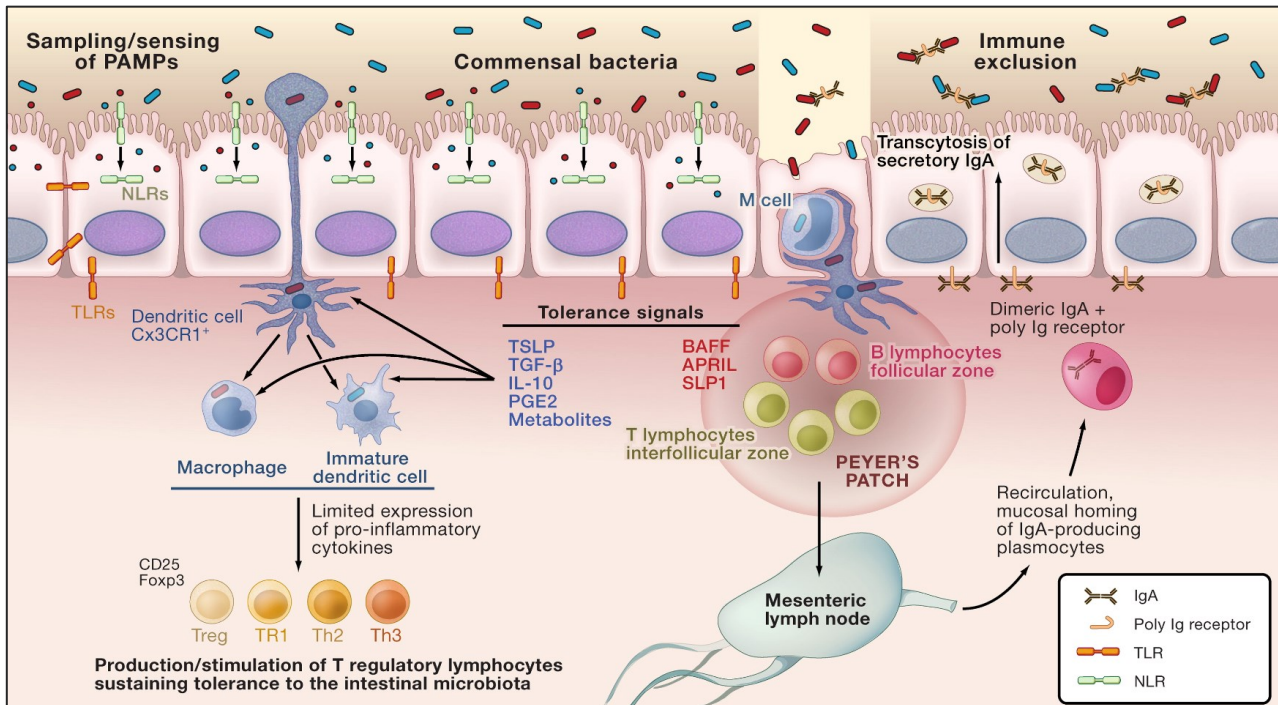


Illustration 7 - Processus de tolérance immunitaire du microbiote intestinal. Des récepteurs de type Toll (TLR ; *Toll-like receptors*) au niveau de la membrane des cellules intestinales sont en contact avec les antigènes provenant du microbiote. Selon la reconnaissance de l'antigène par le TLR, une réponse inflammatoire ou inhibitrice de l'inflammation aura lieu. Lors d'une réponse de tolérance immunitaire, des molécules telles que la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP ; *Thymic stromal lymphopoietin*), les facteurs de croissance bêta (TGF-β ; *Transforming growth factor beta*), l'interleukine-10 (IL-10) et la prostaglandine E2 (PGE2) agissent comme des médiateurs de l'inflammation. Leur libération entraîne une différenciation de cellules lymphocytaires en cellule lymphocytaire de type régulatrice T_{reg}. Les cellules dendritiques reconnaissent également les antigènes provenant du microbiote. En présence d'espèces commensales, les cellules épithéliales de l'intestin produiront des médiateurs tels que des activateurs de lymphocyte B (BAFF ; *B-cell activating factor*), des ligands d'induction de prolifération (APRIL ; *Proliferation-inducing ligand*) et de protéine SLP1. Ces facteurs ont pour fonction la maturation et la prolifération de lymphocytes B. La maturation des lymphocytes B enclenchera ensuite la production d'immunoglobulines A (IgA) participant au processus homéostasique [158]. *Reproduit à partir de Learning Tolerance while Fighting Ignorance*, Sansonetti, P.J. et R. Medzhitov, *Cell*, volume 138, page 416-420, © 2009, avec l'autorisation de Elsevier Inc.

1.3.2 L'équilibre entre les cellules lymphocytaires Th17 et Treg

L'équilibre entre les cellules lymphocytaires, notamment les cellules pro-inflammatoires Th17 et les cellules anti-inflammatoires T régulatrices (T_{reg}), est indispensable au contrôle de l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale [8, 159, 160]. En effet, les cellules T_{reg} produisent l'interleukine-10, une cytokine anti-inflammatoire. Les cellules T_{reg} sont produites en réponse à un signal venant du microbiote et des entérocytes [161]. En temps normal, les cellules T_{reg} sont produites alors que la production de cellules Th17 est inhibée. Lors d'une rencontre avec une espèce pathogène, les cellules Th17 assurent une défense immunitaire par le biais de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-17A (IL-17A), IL-17F et IL-22 [160]. Sans la présence des cellules T_{reg} , les antigènes du microbiote causeraient une réponse importante des cellules Th17. L'absence d'inflammation est donc attribuable au contrôle par les cellules T_{reg} . Par exemple, dans un projet de recherche, des souris déficientes en IL-10 ont développé une colite chronique causée par une production d'interleukines-23 (IL-23) et la voie d'activation du Lymphocyte Th17 [161].

Une étude menée chez des souris axéniques indique que les espèces commensales contribuent au développement du système immunitaire. En effet, ces souris étaient caractérisées par des plaques de Peyer (agrégat de follicules lymphoïdes) altérées, par une réduction des cellules T_{reg} et par une diminution de la production d'immunoglobulines [155, 157]. Par ailleurs, l'exposition au microbiote commensal induit le développement de structures telles que des cryptopatches. Il s'agit de sites de production et de maturation de lymphocytes qui sont localisés dans la muqueuse intestinale [162].

1.3.3 La défense contre les entéropathogènes

Les espèces pathogènes et commensales sont en compétition pour la même niche écologique. Les espèces commensales possèdent des mécanismes permettant de freiner la colonisation de l'hôte par les espèces pathogènes.

Par exemple, certaines espèces commensales diminuent le pH ce qui rend l'environnement défavorable au développement des entéropathogènes [163, 164]. D'autres forment des peptides antimicrobiens qui diminuent la prolifération et la viabilité des espèces pathogènes [10]. Des chercheurs ayant mené une étude *in vivo* chez un modèle murin ont rapporté qu'une espèce productrice de bactériocine, telle que *Lactobacillus salivarius*, permettait de protéger de façon significative contre une infection à *Listeria monocytogenes*. En effet, la production du peptide antimicrobien a permis d'inhiber le pathogène, alors qu'une souche mutée pour le gène codant ce peptide n'a pas permis de protéger les souris contre l'infection [165].

Un autre frein est exercé sur les pathogènes grâce à une compétition pour l'utilisation des nutriments. En effet, la présence majoritaire d'espèces bénéfiques cause une réduction des nutriments disponibles limitant ainsi les ressources énergétiques favorables à la croissance des espèces pathogènes [11, 12].

De plus, certains métabolites produits par les espèces désirables ont un effet inhibiteur sur l'expression de gènes de virulence. Par exemple, le butyrate régule à la baisse l'expression du gène codant pour les protéines du système de sécrétion de type-3 chez des espèces nuisibles du genre *Salmonella*, comme démontré par Gantois et al. [166].

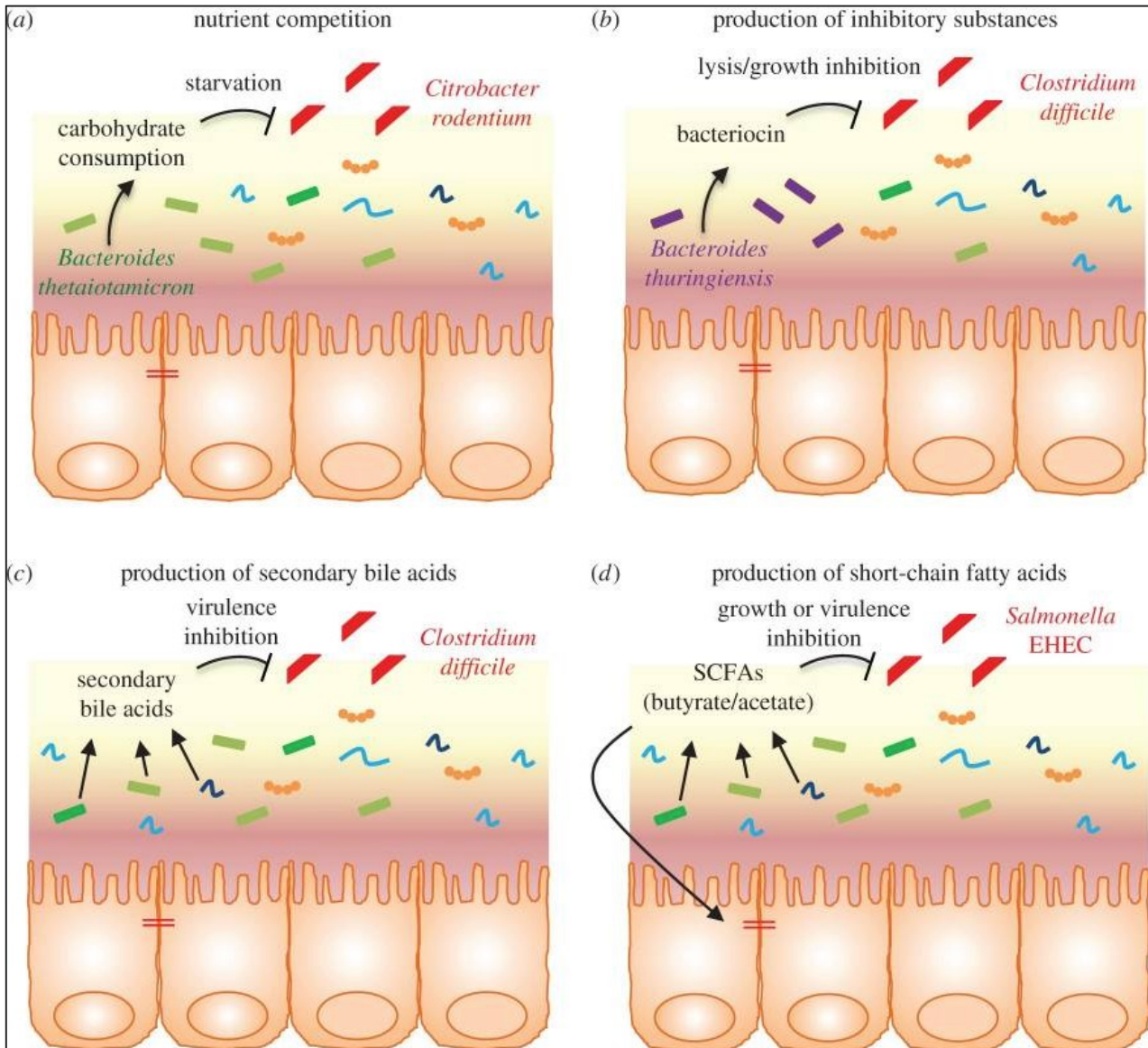


Illustration 8 - Résistance à la colonisation d'espèces pathogènes médiée par les espèces commensales. Dans cette illustration, les différents processus impliqués dans la résistance contre les espèces pathogènes sont représentés. La compétition pour l'accès au nutriment cause une diminution de la prolifération d'espèces pathogènes : a) certaines espèces produisent des peptides antimicrobiens tels que la bactériocine menant à la lyse cellulaire ou l'inhibition de la croissance de pathogènes ; b) la production de métabolites tels que l'acide biliaire secondaire permet d'inhiber l'expression de gènes de virulence ; c) La production d'acides gras à chaîne courte (SCFAs ; *short chain fatty acids*) permet également d'inhiber l'expression de gènes de virulence d'espèces telles que *Salmonella* [167]. Reproduit à partir de *When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota*, Rolhion, N. et B. Chassaing, *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, volume 371, ©2016, avec l'autorisation de *Royal Society*.

1.3.4 La production d'acides gras à chaîne courte

Des preuves abondantes indiquent que les métabolites produits par le microbiote ont un impact majeur sur la santé intestinale de l'hôte. Entre autres, certaines espèces bactériennes fermentent des nutriments en SCFAs qui seront ensuite absorbés par les cellules intestinales [168]. Les principaux SCFAs sont le formiate, l'acétate, le propionate et le butyrate. Ils constituent une source majeure d'énergie pour les entérocytes. Notamment, l'absorption du butyrate favorise la production de mucus en surface de la muqueuse intestinale et la sécrétion de peptides antimicrobiens [137, 169]. La sécrétion de mucus permet de réduire les contacts avec les antigènes, et les peptides antimicrobiens, de réduire la prolifération et la translocation des espèces pathogènes [154, 169]. Ainsi, l'absorption de butyrate permet de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale. Également, la synthèse des SCFAs induit une réduction du pH, ce qui favorise les espèces bactériennes bénéfiques dans l'environnement [13]. Le butyrate est un métabolite identifié comme un élément améliorant la fonction de la barrière intestinale par le biais d'expression de gènes codants pour des protéines qui composent les jonctions serrées de la barrière intestinale telles que la Claudine-1 et de Zonula Occludens-1 (ZO-1) [30, 84, 170]. De plus, ils exercent un effet anti-inflammatoire autant au niveau systémique qu'au niveau local [171].

1.3.5 La déconjugaison de l'acide biliaire primaire

Les acides biliaires secondaires sont obtenus par la déconjugaison d'acides biliaires primaires qui est effectuée par le biais d'une activité enzymatique de *Clostridium Hiranonis* [172]. Les acides biliaires secondaires contribuent à l'homéostasie des lipides, du glucose et d'autres substrats métaboliques [173]. Ils ont un effet anti-inflammatoire et permettent de réduire les niveaux de glucose grâce à leur liaison avec différents récepteurs tels que le Farnesoid X (récepteur nucléaire) et le Takeda (couplé à une protéine G) [15, 16]. Les résultats obtenus dans le cadre d'une étude récente effectuée par Blake et al. indiquent que les acides biliaires secondaires sont inférieurs chez des chiens atteints d'insuffisance pancréatique exocrine par rapport aux individus en bonne santé. D'ailleurs, une altération de la conversion d'acides biliaires secondaire a été observée chez des chiens atteints d'entéropathies chroniques [17, 84, 174, 175].

Cependant, des travaux de recherche supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le lien entre les maladies gastro-intestinales et la déconjugaison de l'acide biliaire primaire par *C. hiranonis*.

1.3.6 La production de vitamines

Chez l'homme, il a été démontré que les microorganismes composant le microbiote intestinal synthétisent différentes vitamines telles que la vitamine K ainsi que la plupart des vitamines B hydrosolubles (biotine, la cobalamine, les folates, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique, la pyridoxine, la riboflavine et la thiamine) [176-181].

Une carence en cobalamine ou en folate pourrait mener au développement d'importants troubles gastro-intestinaux (GI), reproductifs, neurologiques et hématologiques chez l'homme [182-184]. En outre, certaines bifidobactéries pourraient contribuer à la production de folate [185]. Une étude pilote impliquant 23 volontaires sains a été menée par Strozzi et al. ces derniers ont évalué la capacité de 3 souches probiotiques appartenant au genre *Bifidobacterium* à produire le folate [181]. Les souches *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ont mené à une augmentation significative de la concentration en folates fécaux chez les individus [181]. Des augmentations correspondantes du folate sérique ont également été observées d'une étude effectuée sur un modèle murin ayant reçu un probiotique contenant 3 souches de Bifidobactéries produisant le folate [186].

1.4 Les facteurs ayant un impact sur le microbiote

De plus en plus d'études démontrent l'existence de facteurs pouvant affecter le microbiote intestinal. Entre autres, le stress semble induire des altérations de différents paramètres physiologiques ainsi que dans la composition du microbiote intestinal. En effet, une étude menée chez des militaires exposés à un stress intense causé par l'entraînement a montré une augmentation significative de la perméabilité intestinale découlant de changements importants de la composition bactérienne [187]. Également, une étude menée chez des chiens d'assistance exposés à des vols en hélicoptère a montré des changements significatifs de différents métabolites sanguins, de l'abondance et de la composition bactérienne ainsi que l'altération de la consistance des selles [188].

L'environnement, ainsi que les individus qui y vivent, peut avoir un impact sur le microbiote. Des analyses du microbiote cutané et intestinal de plusieurs familles effectuées par Song et al. ont rapporté des similitudes entre les individus humains cohabitants, mais également des similitudes entre ces humains et leurs animaux de compagnie. Les impacts de ce partage étaient beaucoup plus importants au niveau cutané qu'au niveau intestinal [189]. De plus, des analyses longitudinales métagénomiques et par le séquençage du gène ribosomal 16S d'échantillons fécaux de 903 enfants âgés de 3 à 46 mois suggèrent que des facteurs environnementaux tels que la localisation géographique, les individus qui composent la résidence familiale et l'exposition à des animaux à fourrure affectent le microbiote fécal [190]. Une étude menée chez des porcelets a démontré des différences sur le plan de leur microbiote intestinal en fonction du milieu dans lequel ils ont été élevés. Les porcelets qui ont été élevés à l'intérieur dans un milieu hygiénique ont montré une abondance inférieure du genre *Lactobacillus* et une abondance supérieure de phylums potentiellement pathogènes, comparativement aux individus qui ont été exposés à l'extérieur dans un milieu naturel. De plus, les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* montraient une implication dans le maintien de la barrière intestinale et dans le contrôle d'espèces pathogènes [191].

De façon plus importante, d'autres facteurs provoquent des changements dans la composition bactérienne, tels que l'usage d'antibiotiques et la diète [192, 193].

1.4.1 L'usage des antibiotiques

Dans le domaine de la médecine vétérinaire, les antibiotiques sont majoritairement utilisés comme traitement de première ligne chez les patients atteints de diarrhées aiguës [194-197]. Cependant, plusieurs chercheurs ont rapporté que l'utilisation d'antibiotiques pourrait mener à des modifications défavorables de la composition du microbiote fécal de chiens [198-209]. Cattaneo et al. ont utilisé une approche métabolomique pour évaluer les changements induits par un traitement antibiotique sur un modèle murin. Les résultats indiquent que, parmi tous les métabolites détectés, les niveaux de plus de 87 % d'entre eux étaient affectés. Par conséquent, des voies métaboliques de haute importance pour le maintien de la santé, telles que le métabolisme d'acides biliaires et de la synthèse d'hormones eicosanoïdes et stéroïdes, étaient

affectés [206]. De plus, Buffie et al. ont rapporté qu'une dose unique de clindamycine a causé des changements radicaux dans la composition bactérienne du microbiote de la souris et a induit une prédisposition accrue lors de l'induction d'une colite à *Clostridioides difficile* [208].

Dans un essai thérapeutique prospectif effectué chez des chiens atteints de diarrhées aiguës, un traitement à l'aide d'un antibiotique tel que le métronidazole sur une période de 7 jours a été administré. La composition bactérienne des matières fécales a été comparée à celle observée chez des chiens sains. Les résultats indiquent que, malgré l'amélioration de la consistance des selles, les chiens atteints de diarrhées aiguës présentaient toujours une différence significative sur le plan de la diversité bactérienne et des profils métaboliques comparativement aux chiens sains [30]. D'autres analyses de la composition du microbiote fécal de chiens et d'humains traités avec un antibiotique appuient ces résultats [198-209].

Une étude randomisée à double aveugle contrôlée par placebo effectuée par Langlois et al. suggère que l'utilisation du métronidazole permet de raccourcir la durée des diarrhées aiguës. En effet, les individus traités au métronidazole souffraient de diarrhées durant 2,1 jours en moyenne contre 3,6 jours pour le groupe placebo. Cependant, les résultats observés dans une autre étude randomisée avec placebo indiquent que l'utilisation d'antibiotiques ne permet pas de réduire la durée des diarrhées comparativement au groupe placebo [210, 211]. De plus, de nombreux essais cliniques et rapports de cas ont rapporté l'échec de l'utilisation des antibiotiques pour le traitement de diverses entéropathies chroniques et aiguës chez des patients canins et humains [33, 42, 43, 45, 199, 212-216].

Bien que les antibiotiques aient sauvé d'innombrables vies, ils doivent être utilisés de manière responsable et restrictive pour minimiser la résistance et pour maintenir un microbiote intestinal sain et diversifié.

1.4.2 La diète

De nombreuses études indiquent que la diète a un impact sur la composition bactérienne du microbiote. En effet, une exposition à un certain type de nutriment pourrait favoriser la sélection de bactéries ayant la capacité de les métaboliser [217]. Par exemple, une étude

effectuée chez l'humain a révélé qu'une diète riche en produits d'origine animale favorise la prolifération d'espèces telles que *Alistipes*, *Bilophila*, et *Bacteroides* au détriment d'espèces telles que *Roseburia*, *Eubacterium rectale* et *Ruminococcus bromii* [218]. Ces dernières sont des espèces bénéfiques pour l'hôte, car elles métabolisent les polysaccharides végétaux en butyrate [218]. Comme mentionné précédemment, le butyrate améliore l'immunité intestinale en augmentant, par exemple, le nombre et la fonction des lymphocytes T_{reg} qui sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et au contrôle de l'inflammation [219].

Les études effectuées chez le chien suggèrent également que le microbiote intestinal est considérablement influencé par la diète [106, 192, 220-222]. Entre autres, Junhyung et al. ont rapporté des différences au niveau du microbiote chez des chiens nourris avec une diète dite « naturelle » (viande et végétaux crus) et des chiens nourris avec une diète commerciale [192]. Les résultats ont montré une diversité bactérienne plus importante pour les chiens nourris avec un régime naturel comparativement aux chiens nourris avec un aliment commercial [192]. Toutefois, cette étude soulève une possible augmentation des risques d'infection par des espèces pathogènes étant donné l'abondance plus importante de *Clostridium perfringens* et de *Fusobacterium varium* rapportée chez les chiens nourris avec la diète naturelle [192].

1.5 Les manipulations du microbiote intestinal

L'intérêt pour les manipulations du microbiote intestinal réside principalement dans les différences observées entre la composition du microbiote intestinal d'individus malades, par rapport aux individus en santé, dans de nombreuses maladies humaines et canines. Bien que la relation de cause à effet entre les altérations du microbiote intestinal et la maladie ne soit pas toujours claire, les manipulations du microbiote intestinal sont reconnues comme une avenue permettant de normaliser la composition et d'obtenir un bénéfice thérapeutique. Ainsi, l'usage des pré ou probiotiques et notamment la transplantation de microbiote fécale (TMF) suscitent l'intérêt.

1.5.1 Les probiotiques

En médecine vétérinaire, l'usage des probiotiques est de plus en plus répandu. Quelques études ayant évalué l'efficacité des probiotiques pour le traitement des troubles gastro-intestinaux ont été effectuées [223-226]. Les conclusions d'une revue systémique de la littérature suggèrent que les probiotiques ne permettent pas de diminuer les signes cliniques de maladies gastro-intestinales chroniques. Ils auraient un effet limité, voire absent, sur la prévention ou le traitement de maladies gastro-intestinales aiguës [227]. De plus, les probiotiques n'étant généralement pas définis comme des médicaments [228], pourraient contenir des concentrations et des organismes différents de ceux indiqués sur l'emballage. Par ailleurs, les manufacturiers n'ont aucune obligation de procéder aux différentes phases de développement prouvant l'efficacité et l'innocuité des probiotiques pour leur commercialisation [229].

Une évaluation microbiologique de 8 probiotiques vétérinaires et de 5 probiotiques humains a été effectuée afin de comparer le contenu réel avec celui indiqué sur l'emballage. Les résultats ont montré que les organismes et leur quantité correspondaient à ce qui était mentionné sur l'emballage seulement pour le 2/13 des probiotiques testés. De plus, la majorité des produits contenaient de faibles concentrations d'organismes viables. D'autres utilisaient des espèces n'ayant pas démontré d'effets probiotiques, voire des organismes potentiellement pathogènes [230].

Malgré l'absence de réglementation dans la commercialisation de ces produits, ils sont généralement sans danger, mais doivent être utilisés avec prudence chez des patients gravement malades ou immunosupprimés. En effet, l'utilisation de probiotiques chez des animaux et des humains gravement malades ou immunosupprimés pourrait engendrer un risque de développer des effets indésirables, selon une revue systématique de la littérature [231]. De plus, il a été rapporté que certains probiotiques auraient transféré des gènes de résistance [232, 233].

Des travaux de recherche plus approfondis sont nécessaires afin de bien comprendre l'impact de l'introduction d'un ou de plusieurs organismes dans le microbiote, de même qu'une régulation des probiotiques.

1.5.1 Les prébiotiques

Les prébiotiques sont des glucides non digestibles qui sont dégradés par les microorganismes du microbiote intestinal du colon. Ils sont des glucides oligosaccharidiques, des fructo-oligosaccharides, des galacto-oligosaccharides, des amidons et des oligosaccharides dérivés du glucose. Les prébiotiques constituent une source de nutriments pour les microorganismes bénéfiques et, ainsi, favorisent leur prolifération [234]. Lorsque les prébiotiques sont fermentés par l'intestin, différents acides gras à chaîne courte connus pour avoir des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte sont produits [235]. Malgré les bienfaits qu'ils peuvent potentiellement apporter, il existe très peu d'analyses dans la littérature des effets exacts des prébiotiques sur la composition du microbiote et de leur effet thérapeutique. Des essais randomisés contrôlés par placebo sont nécessaires afin de déterminer leur efficacité dans le traitement de maladies gastro-intestinales.

1.5.2 La transplantation de microbiote fécal (TMF)

La TMF est une méthode qui consiste en l'utilisation de la matière fécale provenant d'un donneur sain, suivie d'une transplantation dans le tube digestif d'un patient atteint de dysbiose à des fins thérapeutiques. Trois aspects importants doivent être considérés lors la TMF à savoir : la sélection des donneurs, l'entreposage des transplants fécaux et la voie d'administration [47]. À ce jour, aucun protocole vétérinaire n'a été établi pour la conservation des échantillons fécaux et l'administration de la TMF. Par contre, un consensus international a récemment été adopté pour la conservation des transplants fécaux chez les humains incluant la sélection des donneurs, la collecte, la préparation et le stockage des matières fécales [236]. De surcroît, un consensus européen pour la transplantation fécale a été élaboré, incluant la sélection des donneurs, la préparation des matières fécales et l'administration des transplants fécaux [237]. Dans les deux cas, les lignes directrices proposées concernaient uniquement le traitement de CDI. Néanmoins, parmi les essais cliniques effectués chez les humains et les chiens, il existe une grande variabilité parmi les voies d'administration ainsi que les méthodes de préparation et d'entreposage (Tableau 3.) [33, 199, 238-243].

Tableau 3 - Méthodes de préparation et d'entreposage d'échantillons fécaux pour la TMF. Ce tableau représente une liste non exhaustive, à titre d'exemple, des méthodes utilisées dans le cadre d'essais cliniques chez les humains [238-242] A) et les chiens [33, 199, 243] B).

A)

Condition	Voie d'administration	Concentration	Préparation	Entreposage	Référence
Syndrome métabolique	Tube naso-gastrique 1 fois	Fèces (quantité non indiquée) dans 500 ml de solution saline 0,9%	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Non	Vrieze et al 2012 ^[242]
Colite ulcéreuse	Lavement 50 ml de solution 1 fois par semaine durant 6 semaines	50g dans 50ml d'eau embouteillée	Homogénéisation manuelle Exposition à l'oxygène	Congélation à -20°C Eau embouteillée	Moayyedi et al 2015 ^[239]
Maladie de Crohn	Coloscopie 1 fois	50 g dans 250 ml de solution saline 0,9% Centrifugation durant 15 minutes à 6000 rpm Resuspension dans 125 ml de solution saline 0,9% et glycérol 10%	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Congélation à -80°C Glycérol 10%	Vaughn et al 2016 ^[241]
Colite ulcéreuse	Coloscopie et lavement 5 fois par semaine durant 8 semaines.	Fèces (quantité non indiquée) dans 150 ml de solution saline 0,9%	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Congélation à -80°C pour entreposage puis -20°C 24h avant l'administration	Paramsothy et al 2017 ^[238]
Constipation	Tube naso-gastrique 1 fois par jour durant 6 jours avec thérapie conventionnelle	100 g dans 500 mL de solution saline stérile 0,9 %	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Congélation à -20°C Glycérol 10%	Tian et al 2017 ^[240]

B)

Condition	Voie d'administration	Concentration	Préparation	Entreposage	Référence
Parvovirus	Lavement 1 fois aux 48h jusqu'à résolution des diarrhées ou un total de 5 applications	10g de matières fécales décongelées dans 10 ml de solution saline 0,9 %,	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Congélation des fèces non diluées à -20°C	Pereira et al 2017 ^[33]
Diarrhées associées à <i>Clostridioides difficile</i>	Voie orale 1 fois	60g dans 50 ml d'eau du robinet	Exposition à l'oxygène	Non	Sugita et al 2019 ^[243]
Diarrhées aiguës	Lavement 1 fois	2,5-5 g par kg de poids corporel de matières fécales décongelées dans 60-120 mL des solution saline 0.9%	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Congélation à -20°C	Chaitman et al 2020 ^[199]
Diarrhées chroniques	Coloscopie 1 fois	65 g dans 250 ml de Lactate de Ringer	Homogénéisation avec un mélangeur électrique Exposition à l'oxygène	Congélation à -80°C	Diniz et al 2021 ^[244]

L'usage de la TMF remonte au quatrième siècle en Chine pour le traitement de gastro-entérites et de diarrhées chez l'humain [244]. Plus récemment, elle a été utilisée avec succès comme traitement contre CDI récurrente qui ne répondait pas à un traitement par antibiotiques [212]. Le taux de succès pour la résolution des symptômes était d'environ 90 %. La TMF permet de rétablir la santé gastro-intestinale par le biais d'une augmentation de la diversité bactérienne et de la quantité des populations bénéfiques. D'ailleurs, ces changements créent un milieu défavorable au développement de *Clostridioides difficile*, causé, entre autres, par l'augmentation d'espèces productrices de peptides antimicrobiens [5]. Par conséquent, la TMF est maintenant considérée en premier lieu dans les centres hospitaliers pour le traitement de CDI [32].

L'utilisation de la TMF pour le traitement de maladies autres qu'une CDI telles que des maladies inflammatoires de l'intestin incluant la colite ulcéreuse [37] et la maladie de Crohn [38] suscite l'intérêt. En outre, plusieurs auteurs ont rapporté que la TMF semble efficace pour le traitement de maladies extra-intestinales telles que le diabète, l'obésité, des troubles de santé mentale et la dermatite atopique [35, 36, 47, 245-248]. Selon la majorité des études, la TMF agirait par le biais d'une augmentation de la diversité bactérienne et du nombre de populations bénéfiques ainsi que par la modulation du système immunitaire. La TMF semble également avoir une tendance à produire des changements menant à une similitude entre le microbiote du receveur et du donneur à la suite du traitement [5, 249]. Cependant, l'incertitude quant au mécanisme d'action exact de la TMF et à la complexité de l'écosystème du microbiote intestinal limite l'établissement d'un protocole de la TMF. Ainsi, de nombreux travaux de recherche sont nécessaires afin qu'elle puisse être utilisée de façon courante pour des applications autres que le traitement de CDI.

1.5.3 La TMF en médecine vétérinaire

Le succès de la transplantation du microbiote fécal chez l'humain dans de nombreux essais cliniques a suscité l'intérêt de son utilisation en médecine vétérinaire auprès des animaux de compagnie. Cependant, très peu d'études cliniques ont été réalisées chez les animaux afin de prouver son efficacité pour le traitement d'entéropathies ou de maladies extra-intestinales [250].

Parmi les essais cliniques effectués en médecine vétérinaire, Pereira et al. ont testé la TMF chez des chiots atteints de parvovirus. Les chiots ont été divisés en deux groupes de façon aléatoire : l'un regroupant les chiots ayant reçu le traitement médical standard (STD) et l'autre, ceux ayant reçu la TMF et le traitement standard (STD+FMT). Le traitement standard consiste en l'administration par voie intraveineuse d'une solution saline à laquelle ont été ajoutés du chlorure de potassium (Lactate de Ringer), des antiémétiques, des protecteurs de la muqueuse gastrique et des antibiotiques (céphalothine, triméthoprime-sulfa et métronidazole). Le taux de mortalité pour le groupe ayant reçu la TMF était de 21,2 % contre 36,4 % pour le groupe ayant reçu le traitement standard. Cependant, la différence entre les taux de mortalité des deux groupes n'était pas significative. En contrepartie, le temps de résolution des diarrhées était significativement plus rapide chez les chiens ayant reçu la transplantation (durée médiane de 3 jours (STD+FMT) contre 6 pour le groupe STD) [33].

Chaitman et al. ont comparé les effets thérapeutiques d'un antibiotique avec la transplantation de microbiote fécal chez des chiens adultes atteints de diarrhées aiguës. Sept jours après la TMF, l'index de dysbiose était revenu à une valeur normale, contrairement aux chiens ayant reçu l'antibiotique [30]. De plus, des changements favorables se sont manifestés sur le plan de la composition bactérienne parmi le groupe ayant reçu la TMF contrairement au groupe ayant reçu les antibiotiques. Les chercheurs ont noté une augmentation de la diversité bactérienne et de la quantité d'espèces bactériennes bénéfiques telles que *C. hiranonis* et *Faecalibacterium* ainsi qu'une diminution d'espèces pathogènes telle qu'*Escherichia coli* [30]. De plus, le métabolome (ensemble des métabolites) fécal ainsi que la diversité bactérienne chez les chiens traités avec la TMF étaient similaires à celui des chiens sains ayant servi de groupe contrôle, contrairement à celui des chiens qui avaient reçu l'antibiotique [30]. Bien que les résultats de ces études soient très encourageants, il demeure que trop peu d'essais cliniques sont menés chez le chien. Pour optimiser la TMF, il est nécessaire d'établir un protocole pour la préparation et la transplantation des échantillons fécaux.

Dans une étude de série de cas non contrôlée récente, la TMF a été effectuée à l'aide de matières fécales encapsulées sur 8 chiens atteints de dermatite atopique [251]. Le traitement

consistait en l'administration orale de capsules 2 fois par jour pendant 4 semaines. Des évaluations des signes cliniques à l'aide de l'indice de gravité et d'étendue (version 4) (c.-à-d. érythème, lichénification et alopecie/excoriation), de l'échelle visuelle analogique du prurit (VAS) et de l'analyse de la composition du microbiote fécal ont été effectuées. L'index de sévérité et les scores de prurit étaient significativement diminués à la fin du traitement pour l'ensemble des individus. Aucune récurrence n'a été observée 18 mois après la fin du traitement lors du suivi. Dans l'ensemble, la TMF aurait significativement amélioré la condition de tous les individus. De plus, les résultats de l'analyse du microbiote intestinal suggèrent que la TMF a engendré l'augmentation de la diversité et de la richesse bactérienne.

Bien que cet essai clinique présente des résultats encourageants, celui-ci comporte certaines limitations. En effet, l'auteur a rapporté avoir des conflits d'intérêts en lien avec le sujet de recherche (investissement et développement). De plus, il a été mentionné par l'auteur qu'au début de l'étude, tous les chiens ont été soumis à une alimentation composée de protéines hydrolysées durant au moins 2 mois. Il n'est donc pas certain si les résultats obtenus sont attribuables à la diète, à la TMF ou à la combinaison des deux traitements. Finalement, l'étude n'a pas été contrôlée par placebo et par aveugle, ce qui n'était pas possible selon l'auteur. Les évaluations faites par les propriétaires ou par le chercheur pourraient donc être biaisées [252].

1.6 L'importance de la viabilité bactérienne

De nombreux travaux de recherche indiquent que l'utilisation de la TMF engendre des modifications dans la composition du microbiote intestinal du receveur [30, 44, 216, 249, 253]. De plus, certains chercheurs suggèrent qu'une ressemblance de la composition bactérienne entre le donneur et le receveur est associée à une amélioration des signes cliniques ou une rémission complète de la maladie [43, 215, 254-256].

Par exemple, la caractérisation de la composition bactérienne chez des patients humains atteints de CDI a été effectuée [255]. Comparativement à la composition initiale, une augmentation de différentes populations appartenant au phylum des Bacteroidetes et des Firmicutes a été observée à la suite de la TMF. La comparaison de la composition bactérienne du

donneur et du receveur indique que la composition bactérienne du receveur était similaire à celle du donneur à la suite de la TMF. De plus, ces changements étaient associés à une rémission complète de la maladie [255]. Ceci indique que les microorganismes doivent demeurer viables au moment de la transplantation.

1.7 La préparation des échantillons pour la TMF

De nombreuses études suggèrent que les conditions dans lesquelles les échantillons sont préparés et entreposés ont un impact sur la viabilité bactérienne et la qualité des échantillons fécaux humains [46, 49, 63, 257-261].

1.7.1 L'exposition à l'oxygène

Le microbiote intestinal de l'humain contient majoritairement des espèces anaérobies particulièrement sensibles à l'exposition à l'oxygène [262]. Certaines études se sont donc penchées sur les effets de l'oxygène sur la viabilité bactérienne. Entre autres, Papanicolas et al. ont comparé la viabilité des échantillons préparés en absence d'oxygène ou à l'air ambiant, puis soumis à une température de -80 °C dans une solution avec glycérol à une concentration finale de 10 % durant 48 heures [49]. Les analyses ont été effectuées à partir des selles provenant de 8 donneurs sélectionnés à partir de critères utilisés pour l'identification de donneurs potentiels de matières fécales. Pour la détermination des taux de viabilité, les chercheurs ont utilisé le monoazide de propidium (PMA ; *propidium monoazide*), qui a été combiné avec la PCR quantitative suivie du séquençage des amplicons du gène ARNr 16 S. L'analyse des métabolites bactériens a été effectuée à l'aide d'un modèle de fermentation *in vitro*. Initialement, l'ensemble des échantillons frais en condition anaérobie avaient une viabilité d'environ 50 %. À la suite de l'homogénéisation à l'air ambiant, la viabilité était de 19 % contre 50 % initialement. En présence d'oxygène, l'abondance des taxons commensaux comprenant des espèces produisant le butyrate telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum variable* et *Eubacterium hallii* était inférieure. À l'inverse, le genre *Escherichia*, normalement associé au développement d'entéropathies, a été favorisé par la présence d'oxygène. D'ailleurs une production inférieure de butyrate et d'acétate a été observée dans les échantillons exposés à l'oxygène. À la suite de

la congélation, la viabilité des échantillons était de 23 %. Cependant, la congélation n'a pas modifié de manière significative la composition du microbiote viable [49].

Bien que le microbiote intestinal du chien soit lui aussi composé majoritairement d'espèces anaérobies strictes [48], aucune étude n'a évalué l'impact de l'oxygène sur la viabilité bactérienne lors de la préparation d'échantillons fécaux canins. Il est donc nécessaire de tester si les impacts de l'oxygène sur la composition et sur la viabilité bactérienne seraient les mêmes que ceux observés pour les échantillons fécaux humains.

1.8 L'entreposage des transplants fécaux

La préparation d'échantillons congelés est une option intéressante, car elle permet de faciliter l'accès à la transplantation fécale en usage clinique [50]. Par ailleurs, elle permet de préparer plusieurs échantillons en réserve à partir d'un donneur de qualité. Ainsi, dans le domaine médical, cette méthode de préparation pourrait être un atout intéressant qui faciliterait l'usage thérapeutique de la TMF [263].

1.8.1 La congélation

Plusieurs chercheurs ont testé l'usage d'un cryoprotecteur lors de la congélation de transplants fécaux afin de limiter les dommages associés à la cristallisation. L'entreposage des transplants fécaux est généralement effectué par la congélation à une température de -80 °C avec un cryoprotecteur contenant du glycérol à une concentration finale de 10 %. Costello et al. ont rapporté que la congélation dans le glycérol menait à une préservation de la viabilité bactérienne pour une période allant jusqu'à 6 mois [264]. Cependant, Papanicolas et al. ont rapporté une viabilité bactérienne inférieure pour les échantillons congelés avec un cryoprotecteur au glycérol comparativement aux échantillons frais [49]. Bellali et al. ont testé l'usage d'un cryoprotecteur contenant du saccharose (10 %), du tréhalose (10 %), du lait écrémé (10 %) et des antioxydants pour préserver la viabilité bactérienne lors de la congélation [63]. Les antioxydants permettent de préserver les espèces anaérobies du stress oxydatif [265], alors que les autres éléments permettent de protéger la membrane cellulaire en diminuant les dommages associés à la congélation [266]. La viabilité bactérienne était de 89,47 % pour les échantillons

congelés avec le cryoprotecteur, ce qui était similaire à la viabilité des échantillons frais [63]. À l'inverse, la viabilité des échantillons congelés en solutions salines a chuté à 19,01 %. Des analyses morphologiques par microscopie électronique à balayage ont été effectuées et les échantillons n'ayant pas été congelés avec le cryoprotecteur présentaient des dommages cellulaires importants. Inversement, ceux ayant été congelés avec le cryoprotecteur ont conservé une membrane cellulaire intacte [63].

Bien que la méthode de congélation utilisée par Bellali et al. et la congélation avec du glycérol soient prometteuses, les études sur la préservation de viabilité bactérienne à l'aide d'un cryoprotecteur sont peu nombreuses. Par ailleurs, jusqu'à présent, aucune étude prospective n'a été publiée en ce qui concerne l'évaluation de l'impact de la congélation, à partir d'échantillons fécaux canins. Considérant que la composition bactérienne n'est pas exactement la même que celle de l'humain [267], il serait nécessaire d'évaluer si l'utilisation d'un cryoprotecteur permettrait d'obtenir ces mêmes résultats chez le chien.

Dans la littérature, il est mentionné que l'efficacité clinique de la TMF pour le traitement d'entéropathies ne serait pas affectée par la congélation. Cependant, il semble qu'une seule étude comparative ait été effectuée pour le traitement de CDI chez l'humain [268]. Cette affirmation repose donc sur des méta-analyses plutôt que sur des analyses comparatives [269]. De plus, l'efficacité de la TMF semble variable en fonction du problème de santé qui est traité ainsi que selon la méthode de congélation (température, temps d'entreposage, etc.) [270]. Par conséquent, des recherches visant l'optimisation de la viabilité des échantillons ainsi que l'élaboration d'un protocole d'entreposage sont requises.

1.8.2 Les autres méthodes d'entreposage

La lyophilisation est la technique la plus couramment utilisée pour l'élaboration des probiotiques et pour assurer leur stabilité lors de l'entreposage. D'ailleurs, elle est maintenant de plus en plus utilisée pour effectuer l'entreposage de transplants fécaux [261, 271-277]. La majorité des travaux de recherches ont rapporté que l'utilisation de la lyophilisation apportait une stabilité comparable ou supérieure aux échantillons fécaux congelés [261, 278-280].

Cependant, sans l'utilisation d'un cryoprotecteur approprié, la lyophilisation endommagerait les membranes cellulaires et les protéines et, ainsi, elle ferait diminuer la viabilité bactérienne [257-261]. De plus, les résultats de travaux antérieurs ont suggéré que la lyophilisation pouvait mener à une plus grande perte de métabolites comparativement à la cryopréservation [280]. D'autres chercheurs ont rapporté que la lyophilisation permettait, au contraire, d'obtenir une plus grande stabilité de certains métabolites tels que les acides gras à chaîne courte [278, 279]. Ces contradictions indiquent la nécessité d'effectuer des évaluations de la viabilité bactérienne et de l'intégrité des métabolites des transplants fécaux lyophilisés. Néanmoins, le produit final de la lyophilisation permet l'élaboration de capsules pour effectuer la TMF par voie orale, qui est moins invasive que les autres voies d'administration. Elle permet ainsi une administration par le propriétaire et, au besoin, une répétition de l'administration.

L'azote liquide est utilisé pour conserver plusieurs types cellulaires (embryonnaires, immunitaires, végétales, germinales, etc.) [281-285]. De plus, l'azote liquide est une méthode largement utilisée depuis plusieurs décennies pour effectuer l'entreposage de microorganismes incluant des bactéries [286-290]. La cryopréservation des transplants fécaux à l'azote liquide a fait l'objet de très peu d'études jusqu'à présent, mais les résultats obtenus suggèrent qu'elle est également efficace pour conserver adéquatement les échantillons fécaux à leur état initial [286, 288, 290-293]. Cependant, elle a pour désavantage d'entraîner des risques de contamination par les microorganismes de l'environnement présents sur les contenants qui sont placés dans le conteneur d'azote. L'accumulation de ces microorganismes au fil du temps peut constituer un risque de contamination croisée. Des précautions doivent donc être prises afin de limiter le plus possible le transport des contaminants [294].

La cryopréservation à l'azote liquide ainsi que la lyophilisation présentent des avantages et des inconvénients. Leur efficacité pour la conservation de la viabilité bactérienne semble varier en fonction des différentes espèces contenues dans les échantillons [295-299]. Le développement de protocoles standardisés pour l'entreposage des transplants fécaux de qualité pourrait sans aucun doute faciliter l'utilisation de ces transplants en clinique et permettre

l'élaboration de banques fécales. Toutefois, très peu de recherches ont été menées au sujet des différentes méthodes d'entreposage, et des recherches supplémentaires sont donc nécessaires.

1.9 Les donneurs et le protocole de sélection

Jusqu'à présent, la normalisation dans l'identification d'un donneur optimal n'a jamais été développée et aucun protocole pour effectuer la sélection de donneurs canins n'a été mis sur pied. Cependant, les donneurs passent normalement une quantité importante de tests de santé pour éviter la transmission de maladies infectieuses. Dans une étude clinique où la TMF a été employée chez des chiens atteints de parvovirus, le contrôle de l'état de santé des donneurs était effectué par la vérification de l'historique vaccinal, de l'usage récent d'antimicrobiens, de vomissements ou de diarrhées, par des analyses biochimiques et hématologiques ainsi que par des analyses parasitologiques et de cultures virales [33]. Néanmoins, les critères de sélection divergent parmi les différentes études effectuées jusqu'à présent. Récemment, Chaitman et al. ont relevé une liste de critères proposés pour effectuer la sélection, résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 - Critères de sélection recommandés pour la sélection de donneurs fécaux canins. Les critères de sélection d'un donneur de microbiote fécal canin pour la TMF, traduits en français et suggérés par Chaitman et al., sont représentés dans ce tableau [300]. Traduit à partir de *Fecal microbiota transplantation in dogs*, Jennifer Chaitman et Frédéric Gaschen, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, volume 51, pages 219-233, ©2021 avec l'autorisation de Elsevier Inc.

Critères de sélection recommandés pour la sélection de donneurs fécaux canins

Antécédents et examen physique

- De préférence entre 1 et 10 ans
- De préférence pas d'antécédents de voyage en dehors de la zone locale
- Aucun problème de santé au cours des 6 ou 12 derniers mois
- Aucun antécédent de maladies gastro-intestinales chroniques, d'allergies et de maladies à médiation immunitaire
- N'a pas reçu d'antibiotiques au cours des 12 derniers mois
- Régulièrement vacciné selon les directives existantes
- Nourri d'une alimentation équilibrée
- Pas d'embonpoint ou d'insuffisance pondérale (indice d'état corporel sur 9 points entre 4 et 6)
- Consistance fécale normale
- Jugé en bonne santé à l'examen physique

Dépistage en laboratoire

- Formule sanguine complète et biochimie sérique
- Envisager une évaluation du cortisol basal, de la thyroxine
- Négatif pour les œufs de parasites lors de la flottaison fécale, envisager un déparasitage empirique avec un vermifuge à large spectre
- Négatif pour les oocystes de *Giardia* lors de la flottaison fécale et du test fécal par dosage immuno-enzymatique
- Envisager de tester les agents pathogènes fécaux tels que *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, etc.

Évaluation du microbiote fécal

- Indice de dysbiose inférieur à 0 [22]
-

Il existe une banque de matières fécales commerciale aux États-Unis nommée *Animal Biome* [301]. Cette entreprise s'appuie sur des critères similaires, mais moins nombreux que ceux de la liste suggérée par Chaiteman et al. Entre autres, les critères de cette entreprise impliquent l'absence de problèmes de comportements et d'obésité, une bonne consistance fécale et une diversité bactérienne élevée, l'absence de quelconque problème de santé et, finalement, l'absence de parasites détectés par PCR. Un indice de dysbiose négatif (eubiose) ne semble pas pris en considération par l'entreprise. Pourtant, il s'agit d'une analyse pouvant appuyer l'absence de problèmes gastro-intestinaux. En effet, les analyses qu'ils effectuent ne permettent pas de déterminer si l'animal présente certains symptômes non rapportés par le propriétaire tels que des douleurs abdominales, un ralentissement du transit intestinal, etc. Toutefois, les critères d'*Animal Biome* permettent d'assurer un contrôle limitant la transmission de maladies infectieuses.

Dans l'ensemble, l'étendue des analyses de santé semble reposer sur les préférences du vétérinaire à défaut d'avoir un protocole de sélection. Puisqu'il n'existe pas de normes pour la sélection d'un donneur, la préparation et l'administration des échantillons [47], il est difficile de comparer l'efficacité de la TMF dans le cadre d'études cliniques.

1.9.1 La diversité bactérienne et la TMF

La diversité bactérienne est variable d'un individu à l'autre et pourrait potentiellement mener à des écarts quant à l'efficacité de la TMF. En effet, un essai prospectif ouvert de transplantation répétée de microbiote fécal effectué par Kump et al. suggère que la composition du microbiote intestinal du donneur pourrait influencer la rémission de la TMF chez les patients humains atteints de rectocolite hémorragique [216]. Parmi les individus ayant montré une réponse clinique à la TMF, 59 % des patients voyaient leur condition améliorée, et ce, sans rémission, et 24 % connaissaient une rémission complète. Les individus ayant reçu les selles provenant de donneurs ayant une richesse bactérienne élevée (nombre d'espèces observées 946 ± 93) obtenaient une rémission complète comparativement aux individus n'ayant pas connu de rémission (nombre d'espèces observées 797 ± 181). En outre, l'abondance relative élevée d'*Akkermansia muciniphila* ($3,3 \pm 3,1$ % contre $0,1 \pm 0,2$ %), de *Ruminococcaceae* non classées

($13,8 \pm 5,0$ % contre $7,5 \pm 3,7$ %), et de *Ruminococcus spp.* ($4,9 \pm 3,5$ % contre $1,0 \pm 0,7$ %) était plus susceptible d'induire une rémission [216].

Certaines études menées auprès de patients humains atteints de maladies inflammatoires de l'intestin suggèrent l'existence d'un « super-donneur ». Ce dernier est défini comme un individu sain ayant un microbiote qui présente une composition bactérienne favorable à une bonne santé (c.-à-d. abondance élevée d'espèces productrices d'acides gras à chaîne courte et diversité bactérienne élevée) [302]. Dans une étude randomisée avec contrôle effectué par Moayyedi et al., la TMF ou un placebo a été attribué à 70 patients atteints de colite ulcéreuse durant une période de 6 semaines. Au total, 38 donneurs ont été sélectionnés pour la préparation de la TMF. Cette dernière s'est avérée supérieure au placebo, entraînant des taux significativement plus élevés de rémission. Au total 9 patients ont obtenu une rémission dont 7 avaient reçu une TMF provenant du même donneur. Par conséquent, il a été suggéré que le succès de la TMF dépendait du donneur[239].

1.10 Les voies d'administration de la TMF

En médecine humaine, la TMF est administrée soit par lavement au cours d'une coloscopie, par sonde naso-gastrique ou par l'administration orale de capsules. D'ailleurs, de nombreuses études ont été effectuées afin de déterminer la voie d'administration idéale. Une étude pilote randomisée comparant l'efficacité clinique de l'administration du microbiote fécal par voies gastro-intestinales supérieures et inférieures n'a pas révélé de différence significative entre ces deux méthodes [303]. Cependant, une revue systématique et des méta-analyses ont rapporté des contradictions dans ces résultats. En effet, la voie gastro-intestinale inférieure présentait généralement une efficacité clinique plus élevée que la voie gastro-intestinale supérieure chez les patients atteints de CDI [304, 305].

Récemment, l'utilisation de capsules orales lors de TMF à partir de microbiote fécal humain lyophilisé a suscité un intérêt [305-309]. Certains travaux de recherche suggèrent que l'administration orale de capsules mène à une efficacité similaire ou même supérieure à l'administration par coloscopie pour le traitement de CDI récurrentes [307-309]. Cependant, une

étude menée par Staley et al. semble contredire ces résultats. Ils ont utilisé des doses identiques de matières fécales lyophilisées administrées par coloscopie ou par voie orale. Il s'est avéré que la voie d'administration inférieure était associée à une colonisation plus élevée ainsi qu'une abondance relative supérieure de *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* et *Porphyromonadaceae* [310]. D'ailleurs, une faible abondance de ces bactéries était associée à un échec de la réponse clinique de la TMF [311]. L'administration de capsules orales pour la TMF présente des avantages comparativement à la TMF par les autres voies d'administration. En effet, les capsules orales sont plus faciles à transporter et à entreposer. De plus, leur ingestion est beaucoup moins invasive, ne nécessite pas d'intervention médicale lors de leur administration et peut être répétée au besoin [312].

Chez le chien, très peu de travaux de recherche sur l'utilisation de la TMF à des fins thérapeutiques ont été effectués. Parmi ceux-ci, 4 essais cliniques et quelques rapports de cas ont été publiés (représentés dans le Tableau 5) [33, 41, 42, 199, 243, 313-316]. Toutefois, aucune étude comparative ne porte sur les différentes voies d'administration des transplants fécaux.

En somme, la méthode de transplantation optimale de du microbiote fécal demeure inconnue tant chez le chien que l'humain. Les différentes voies d'administration présentent toutes certains avantages, mais des recherches supplémentaires sur les facteurs affectant le succès de la transplantation sont nécessaires pour identifier la voie d'administration optimale.

Tableau 5 - Essais cliniques utilisant la TMF chez le chien. Dans ce tableau sont représentés les essais cliniques (publiés et révisés par les pairs) effectués pour le traitement de maladies chez le chien [33, 41, 42, 199, 243, 313-316].

Indication	Préparation et entreposage	Voie(s) d'administration	Résultat(s)	Référence
Diarrhées post-sevrage TMF (n=1) Placebo (n=12) Essais cliniques randomisés	1 donneur 100g de fèces dans 200 ml de lait de vache faible en matières grasses Réfrigération à 3-5°C entre chaque traitement	Administration orale 5 jours consécutifs	Clinique Absence de diarrhées dans les deux groupes (Placebo + TMF) Microbiote Absence de similitudes entre les donneurs et les receveurs	Burton et al 2016 [313]
Maladie inflammatoire de l'intestin (n=16) Série de cas	1 donneur 60-80 g dans 100-150 ml de solution saline à 0,9% mélangée avec du yaourt faible en matières grasses (ratio 1:1). Congélation à température inconnue	Administration orale + endoscopie (n=9) Capsules (n=7) 1 administration	Clinique ↓ symptômes Microbiote Non évalué	Bottero et al 2017 [41]
Parvovirus TMF+ STD (n=33) STD (n=33) Essais cliniques randomisés	1 donneur 10g dans 10 ml de solution saline à 0,9 % Congélation à -20°C	Lavement 1 fois aux 48h jusqu'à résolution des diarrhées ou un total de 5 administrations	Clinique Résolution des diarrhées plus rapide Période plus courte d'hospitalisation Pas de différence dans les taux de mortalité Microbiote Non évalué	Pereira et al 2017 [33]
Maladie inflammatoire de l'intestin (n=1) Rapport de cas	1 donneur 3g fèces/kg de poids corporel dans une solution de lactate de Ringer (9ml/kg) Pas d'entreposage	Lavement 1 fois	Clinique ↓ fréquence des vomissements ↓ fréquence de défécation ↓ score CIDBAI (9 à 4) ↓ score Waltham (5 à 2) Microbiote ↑ diversité bactérienne	Niina et al 2019 [42]
Diarrhées intermittentes associées à <i>Clostridoides difficile</i> (n=1) Rapport de cas	1 donneur Frais 60g dans 50 ml d'eau du robinet Pas d'entreposage	Orale (infusion) 1 fois	Clinique ↑ consistance des selles ↓ fréquence des selles Résolution des symptômes Microbiote Toxines A/B et de <i>C. difficile</i> négatifs	Sugita et al 2019 [243]
Diarrhées aiguës TMF (n=11) une dose Contrôles sains (n=14) MET (n=7) Essais clinique non randomisé	1 donneur 2.5-5 g fèces per kg de poids corporel dans 60 mL de solution saline 0.9% Pas d'entreposage	Lavement 1 fois	Clinique ↓ score fecal Microbiote ↑ <i>C. hiranonis</i> ↑ diversité bactérienne	Chaitman et al 2020 [199]
Dermatite atopique (n=8) Séries de cas en ouvert non contrôlés	1 donneur Capsules orales préparées avec glycérol à 15% (lyophilisation) Congélation à -80°C	Orale (capsule) 2 fois par jour durant 4 semaines	Clinique ↓ CADESI-04 ↓ score VAS ↑ fonctionnement de la barrière épidermique Microbiote ↑ diversité et de la richesse	Ural 2020 [314]
Diarrhées hémorragiques aiguës (n=8) Essai randomisé, contrôlé par placebo, ouvert, longitudinal, prospectif	4 donneurs Ratio de 1:4 dans une solution saline 0,9% (10-15 mL/kg) Pas d'entreposage	Coloscopie 1 fois	Clinique Aucun effet clinique Microbiote ↑ diversité bactérienne ↑ abondance de bactéries productrices de SCFA	Gal et al 2020 [316]
Infection à <i>C. Difficile</i> (n= 1) Rapport de cas	1 donneur 65 g dans 250 ml de LRS Congelé à -80°C	Endoscopie 1 fois	Clinique Résolution des diarrhées Microbiote Toxines A/B et <i>C. difficile</i> négatifs	Diniz et al 2021 [317]
Diarrhées chroniques (n=1) Rapport de cas	1 donneur Capsules orales préparées avec glycérol à 15% (Lyophilisation; 8,6 (±0,8) x 10 ¹¹ CFU) Cinq capsules/10 kg de poids Congélation à -80°C	Orale (capsule) 5 jours consécutifs	Clinique ↓ CIDBAI Microbiote Non évalué	Cerquetella et al 2022 [315]

TMF= transplantation de microbiote fécal ; STD= traitement standard ; MET= metronidazole ; CCECAI= indice de classification clinique ; CIDBAI=index clinique et d'activité pour les maladies ; CADESI-04= indice d'étendue et de gravité de dermatite version 4 ; ↑ = augmentation, ↓= diminution ; VAS= échelle analogique visuelle, SCFA= acide gras à chaîne courte (*short chain fatty acid*) ; CIDBAI= index d'activité de maladie inflammatoire de l'intestin canine ; LRS= Lactate de Ringer.

1.11 Hypothèses et objectifs

Hypothèse 1 : La préparation des échantillons en absence d'oxygène préservera la viabilité bactérienne.

Hypothèse 2 : L'utilisation d'un cryoprotecteur contenant des antioxydants aura le meilleur taux de viabilité bactérienne à la suite de la congélation.

Hypothèse 3 : Le microbiote de chaque individu n'a pas la même capacité de résistance aux effets de la préparation et de l'entreposage.

Objectif 1 : Comparer la viabilité bactérienne lors de la préparation des échantillons fécaux en présence et en absence d'oxygène.

Objectif 2 : Comparer la viabilité bactérienne lors d'une congélation effectuée avec deux cryoprotecteurs différents.

Objectif 3 : Analyser la composition bactérienne de la matière fécale de chaque individu afin d'identifier les microbiotes associés à une plus grande viabilité bactérienne.

Chapitre 2- Manuscrit scientifique

Optimization of bacterial viability for fecal microbiota transplantation in dogs

2.1 Abstract

Background: There is no standard or guidelines for the preparation of fecal transplants in dogs. **Objective:** The objective of this study was to compare the impact of oxygen exposure and freezing on the bacterial viability in dogs' feces diluted in two different cryoprotectants. **Methods:** Feces from 10 healthy dogs were collected and immediately transferred into an anaerobic chamber. Aliquots of 1.8 g were diluted in 7.2 mL of a cryoprotectant containing glycerol (Gly) or containing antioxidants (Cryo). The samples were homogenized and filtered in aerobic conditions (Ae) and anaerobic conditions (An) in an anaerobic chamber, simulating FMT solutions preparation. To assess the impact of storage, samples were frozen at -20°C for 90 days (F). Bacterial viability was estimated by flow cytometry. The bacterial composition analysis of donors was performed using Illumina sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene. **Results:** Among fresh samples, the ones prepared anaerobically with Cryo had the greatest viability rate (66.78%; $p < 0.05$). In aerobic conditions, the bacterial viability was lower ($p < 0.01$) and samples in Gly (55.20%) had lower viability than Cryo (65.26%; $p < 0.001$). Overall, the bacterial viability decreased to 22.68% following freezing ($p < 0.001$). However, samples that were frozen using Gly showed higher viability (30.61%; $p < 0.001$). The abundance of *Prevotella* was strongly correlated with viability (AeGly; $R = 0.731$; $p < 0.05$, AnGly; $R = 0.833$; $p < 0.01$, AnCryo; $R = 0.756$; $p < 0.05$, AnGly_F; $R = 0.752$; $p < 0.05$). **Conclusions and clinical importance:** Bacterial viability in FMT solutions is optimal when prepared in anaerobic conditions and using a solution containing antioxidants. Freezing significantly decreased bacterial viability, but glycerol seems to better preserve bacteria.

2.2 Introduction

The mammalian digestive tract is home to trillions of microorganisms that make up the microbiota, including viruses, archaea, protozoa, fungi, and bacteria. They have developed a

symbiotic relationship with their host by being involved in maintaining its health while taking advantage of the ecological niche it provides [1, 2]. Among other things, they allow the development of the immune system and the integrity of the intestinal mucosa, they protect against enteropathogens and are a source of nutrient supply through the metabolites they produce. Studies on the microbiota are focusing on the bacteria although there many microorganisms belonging to other kingdoms (e.g., fungi, viruses, etc.). Indeed, the emergence of the new technologies has favored the identification and classification of procaryotes by the DNA sequencing [3, 4] leading to the discovery of many bacterial phyla such as Firmicutes, Bacteriodes, Fusobacteria and Actinobacteria in the digestive tract of dogs.

The intestinal microbiota provides several metabolites that are essential to the host, such as vitamins, short chain fatty acids and secondary bile acids [5]. An imbalance in the bacterial ecosystem, which is called intestinal dysbiosis, is generally observed in gastrointestinal diseases, and there is increasing evidence of its involvement in extra-gastrointestinal diseases. Dysbiosis is characterized by low bacterial diversity, compositional and functional (metabolite production) changes, and by increased abundance of pathogenic species [6]. Currently, it is not clear whether these changes are the cause or effect of disease development, but their implication is evident [7, 8].

In humans, fecal microbiota transplantation (FMT) is currently considered the treatment of choice for recurrent *Clostridioides difficile* infection [9]. This involves the transplantation of fecal matter from a healthy donor into the digestive tract of a patient with intestinal dysbiosis [1], which leads to an increase in bacterial diversity and in abundance of beneficial populations [1]. Randomized controlled studies have shown that FMT appears effective for the treatment of enteropathies such as ulcerative colitis and irritable bowel syndrome in humans. In addition, there is an emerging interest in humans for its application in extra-intestinal diseases such as diabetes [10], obesity [10], atopic dermatitis [11] and even mental health disorders [12]. To date, clinical trials performed for the treatment of enteropathies in dogs are scarce despite the encouraging results obtained in numerous clinical trials in humans [13].

Sample preparation and storage can significantly impact the viability and bacterial diversity [14]. Among others, the intestines harbor mainly anaerobic species particularly sensitive to oxygen [15]. Therefore, human studies showed that exposure to oxygen caused a substantial decrease in bacterial viability in addition to changes in composition, such as an increase in pathogenic species and a decrease in beneficial species [16]. Whereas the dog's microbiota is also composed mainly of strict anaerobic species [17], there is a lack of studies that have evaluated the impact of oxygen in canine fecal samples. Freezing fecal samples for transplantation is an attractive option for the therapeutic use of FMT, as it allows easier access when needed [18, 19]. Nevertheless, freezing induces cell damage and therefore a decrease in bacterial viability [16]. For this reason, Bellali et al. tested the use of a cryoprotectant containing sucrose (10%), trehalose (10%), skim milk (10%) and antioxidants, in order to preserve viability during freezing [20]. The antioxidants protect anaerobic species from oxidative stress [21], while the other elements reduce crystallization damages associated with freezing [22]. The results showed that the bacterial viability in human fecal samples frozen with this cryoprotectant remained similar to that of fresh samples (89.47%), while the viability of samples frozen without the cryoprotectant dropped to 19.01% [20]. Their morphological analyzes supported these results, as samples without cryoprotectant showed significant cellular damages. Although this freezing method is promising, studies on the preservation of bacterial viability using a cryoprotectant containing antioxidants remain to be evaluated in dogs.

Currently there is no standardization in donor selection criteria or in sample preparation and administration of FMT in dogs [23]. Hence, it is difficult to obtain convincing evidence for the effectiveness of FMT in clinical studies. Furthermore, the use of fresh faecal samples is difficult in a medical context and generates significant delays between collection and transplantation. The storage of fecal transplant allows a reserve of quality faecal samples while facilitating their access if necessary. In this sense it is necessary to deepen the knowledge on the impacts of the different storage methods on the bacterial viability. Therefore, the objective of this study was to compare the impact of oxygen exposure and freezing on the bacterial viability in dogs' feces diluted in two different cryoprotectants.

2.3 Material and methods

2.3.1 Sample collecting and fecal processing

The study was approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (#21-rech-2106). To assess bacterial viability and composition, fresh feces were collected from ten healthy teaching dogs housed at the Faculty of Veterinary Medicine at the Université de Montréal in Canada. All dogs were female Beagles approximately two years old, housed in the same room and fed with the same commercial balanced diet. None of the dogs received antibiotics within the previous three months and feces had normal consistency. The stools were obtained at the time of defecation, placed in a zip tie plastic bag avoiding contact with the ground. The bags were immediately transferred into an anaerobic chamber (BactronEZ, Seldon) containing a gas mixture of 90% nitrogen, 5% hydrogen, and 5% CO². To assess the effect of oxygen on bacterial viability, two aliquots were removed from the chamber to be exposed to oxygen during fecal processing, and the two others were kept inside of the anaerobic chamber. The stools were manually homogenized then vortexed for 30 seconds and divided into four aliquots of 1.8 g within 15 minutes.

To assess bacterial viability following three months of freezing, samples were frozen at -20 °C with two different solutions, which consisting of a commonly used cryoprotectant containing glycerol and a cryoprotectant containing antioxidants. A 25% (w / v) fecal suspension was produced from 1.8g of feces in 7.2 ml of each cryoprotectant. Gly contained 10% of glycerol in a saline solution (NaCl 0.9%). Cryo contained 10X phosphate buffered saline (PBS) and the following ingredients (g / L): sucrose (10 g); sterile skimmed milk (10 g); trehalose (5 g); CaCl² (0.1 g); MgCl² (0.1 g); KOH (0.3 / 0.6 g); Ascorbic acid (1 g); Uric acid (0.4 g); Glutathione (0.1 g). Both cryoprotectants and the glassware used were sterilized before the samples processing.

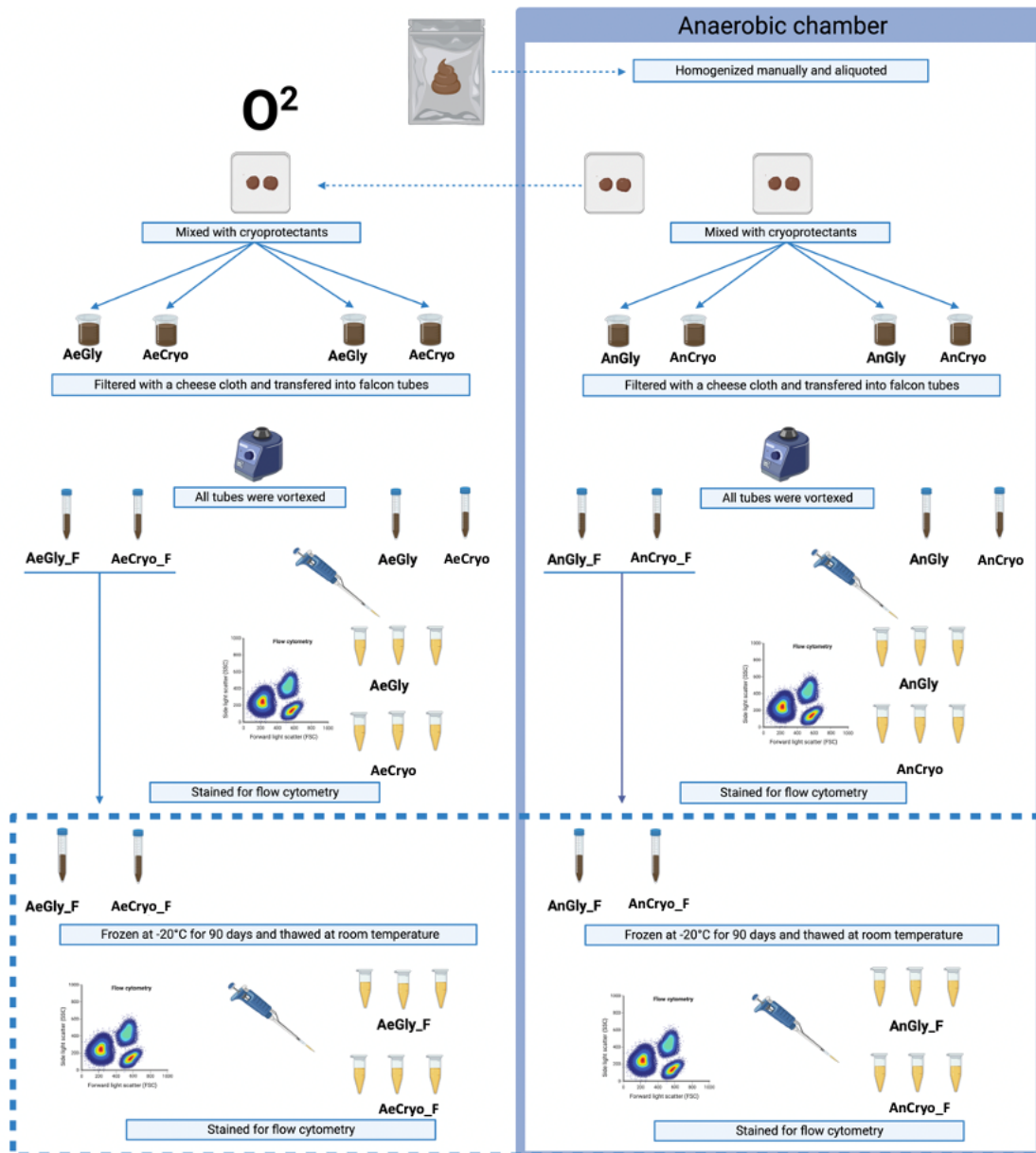


Figure 1 - Sample processing. Fresh feces were obtained at the time of defecation, placed in a zip tie plastic bag, and immediately transferred into an anaerobic chamber. The feces were manually homogenized, and two aliquots were removed from the chamber to be exposed to oxygen (Ae) during fecal processing, and the two others were kept inside of the anaerobic chamber (An). All aliquots were diluted in a cryoprotectant containing glycerol (Gly) or a cryoprotectant containing antioxidants (Cyo). The solutions were then vortexed for 30 seconds. One aliquot from each ambient condition (Ae and An) and cryoprotectant (Gly and Cryo) were frozen at -20°C for 90 days (F). The bacterial viability analysis of all samples was performed by flow cytometry using the LIVE/DEAD[®] BacLight™. All staining procedures were performed under aerobic and anaerobic conditions and in triplicate. This figure was created with <http://biorender.com/>.

2.3.2 Bacterial viability and enumeration

Bacterial cells considered viable were characterized by intact cell membranes, impermeable to propidium iodide. Conversely, damaged cells were considered non-viable. Bacterial viability of each group was determined using the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability and Counting Kit for flow cytometry (Waltham, Massachusetts, United States). Serial dilutions were made to establish the best dilution for the optimal event rate for absolute enumeration. The commercially available bacterial viability and counting kit consists of two stains, propidium iodide (PI) and SYTO9, which both stain nucleic acids. To determine the total number of cells, green, fluorescent SYTO9 which penetrates all cells is used while the proportion of dead cells was determined using fluorescent red PI, which only penetrates cells with damaged cytoplasmic membrane. Untreated living cells and heat-treated cells from a fecal suspension were used as controls. A 10³ fecal suspension dilution for optimal flow and number of events was stained with 1.5 μL of SYTO9 and 1.5 μL of PI followed by 15 min incubation in the dark at room temperature. Subsequently, data acquisition was performed on a Fortessa X-20 LSR (BD) using the Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) Diva v9.0 (BD) software.

Using FlowJo v10.7.0 software (FlowJo, LLC) the total number of bacteria per 10⁻⁶ ml in the flow cytometric analysis tube was determined using the number of signals in the bacterial region (bac region) divided by the number of signals in the region of the beads. To determine number of live bacteria, the number of events in the region of living bacteria divided by the number of events in the bac region was taken and the proportion of live bacteria was determined using the following equation:

$$\frac{(\# \text{ of events in bac region}) \times (\text{dilution factors})}{(\# \text{ of events in bead region}) \times 10^{-6}} = \text{bacteria/mL}$$

The ratio of live bacteria/mL on the total bacteria/mL was then performed to establish the percentage of viability.

All staining procedures were performed under aerobic and anaerobic conditions. For anaerobic conditions, the sample preparation steps were performed inside the anaerobic

chamber and only the acquisition process on the flow cytometer was outside the chamber. All experiments were performed in triplicate for each stool sample. Data acquisition was performed within 20 minutes following staining procedures for all samples, except freeze-thawed samples from dogs 7 and 8, that had data excluded from the analysis because of technical issues with the cytometer.

2.3.3 Analysis of bacterial composition

The bacterial DNA was extracted from 0.2 g of fresh feces from all 10 dogs using the PowerSoil DNA Isolation Kit (Quiagen, Toronto, ON, Canada) following the manufacturer's recommendations. Purified DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotide primers 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) for the V4 region of the 16S rRNA gene [56]. Briefly, amplification was performed for three minutes at 95°C, followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 55°C for 90 seconds and 72°C for 30 seconds; and final extension was performed at 72°C for five minutes. Amplicons were then sequenced using an Illumina MiSeq platform, at the Genome Quebec Innovation Center. Rough data were analyzed using mothur (version 1.46.1) [24] following MiSeq SOP. Contig assembly was performed from the original fastq files excluding sequences longer than 300 bp, containing base pair ambiguities and having polymers longer than 8 bp. The sequences were aligned using the SILVA 16S rRNA reference database and clustered at 97% of similarity before chimeras were removed [25]. Reads belonging to the same genus were grouped based on taxonomic classification obtained from the Ribosomal Database Project (RDP) database [26]. The Shannon diversity index was calculated.

2.3.4 Statistical analysis

Viability was determined using the mean of a biological triplicate. Based on the raw data, a calculation of the coefficient of variation was performed and some data were arbitrarily excluded to obtain a coefficient of variation of less than 13%. The obtained mean values were then used to carry out the statistical tests. The viability of fresh samples was calculated from ten dogs whereas two freeze-thawed samples (dog#:7-8) were excluded from data analysis for reasons related to technical problems as previously mentioned.

All statistical analyses were performed using R version 4.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing). A descriptive statistic was performed, and data were expressed as median and interquartile range. Normality of the data distribution was tested using the Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity was tested using Levene's test. A mixed linear model was used with viability as the dependent variable. Ambient conditions and type of cryoprotector were determined as fixed effects, with an interaction between the two variables to obtain the results for the four groups within frozen and fresh samples. A pairwise comparison was used as a post-hoc test with Benjamini-Hochberg correction. Repeated-measures structures were considered in these analyses, and animals was determined as a random factor. For comparison before and after freezing, a T-test was performed. A p value < 0.05 was considered statistically significant. To determine if there was an association between bacterial diversity (Shannon index) and bacterial viability rates a Pearson correlation test was performed. Also, the latter test was used for *post-hoc* analyses, to find an association between the relative abundance of the genus *Prevotella* and viability rates.

2.4 Results

2.4.1 Bacterial viability

The bacterial viability rates of fresh and frozen samples are summarized in Table 1. The lowest viability rate in fresh samples were observed in the presence of oxygen and diluted in Gly ($55.20\% \pm 10.95\%$) while samples in Cryo prepared in the anaerobic chamber showed the highest viability ($66.78\% \pm 11.38\%$). Among all frozen groups, the highest viability rate was observed in samples from Gly anaerobically prepared ($33.29\% \pm 11.93\%$) while the lowest viability rate was observed in samples from Cryo exposed to oxygen ($18.25\% \pm 10.02\%$).

Table 1 - Bacterial viability of all experimental groups. The data is expressed as % viability before and after exposure to oxygen, and before and after 90 days of freezing at -20°C. All median values were determined after calculating a coefficient of variation of less than 13% based on triplicate analysis. Freeze-thawed samples of dogs 7 and 8 were excluded from data analysis for reasons related to issues with the cytometer.

Dog #	AeGly	AeCryo	AnGly	AnCryo	AeGly_F	AeCryo_F	AnGly_F	AnCryo_F
1	36.04	61.97	50.53	43.39	6.93	4.92	22.18	14.07
2	60.44	72.43	66.34	71.74	38.42	19.94	51.20	23.02
3	60.08	66.54	71.25	79.02	27.41	16.08	29.48	23.99
4	48.61	63.97	58.69	64.66	31.74	19.96	34.80	20.21
5	34.15	40.91	53.68	55.67	23.39	16.56	31.77	24.41
6	54.63	55.27	60.62	66.44	25.42	11.46	19.05	19.46
7	48.07	63.21	59.06	67.12	10.33	3.46	3.58	23.89
8	55.77	72.44	56.64	62.48	10.36	27.14	28.23	1.82
9	61.03	72.86	67.67	77.66	2.39	22.35	39.27	11.70
10	73.53	82.53	73.94	80.21	57.25	39.52	51.03	22.02
Median	55.20 ± 10.95	65.25 ± 11.40	59.84 ± 7.67	66.78 ± 11.38	26.41 ± 17.28	18.25 ± 10.02	33.29 ± 11.93	21.11 ± 4.67

Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; F = freeze-thawed, Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants.

The effects of environmental conditions and type of cryoprotectant are shown in Figure 2a, 2b, and Table 2., and pairwise comparisons are shown in Figure 3. Among all fresh samples, the type of cryoprotectant (Gly x Cryo; $p < 0.01$) and the environmental condition, with or without exposure to oxygen, (Ae x An; $p < 0.001$) had a significant effect on bacterial viability. There was also a significant interaction between oxygen exposure and type of cryoprotectant ($p < 0.05$).

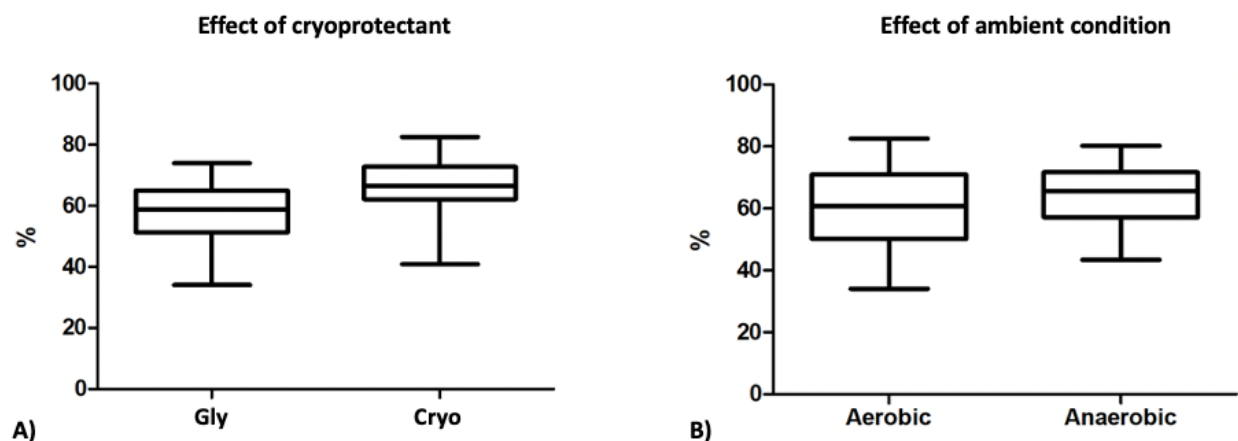


Figure 2 - The effect of ambient condition and cryoprotectants on bacterial viability among fresh samples. The effect of cryoprotectant and ambient condition on the viability of all fresh samples is represented by the box plot. The effect of the type of cryoprotectant is represented in A) for samples in Gly (AeGly, AnGly) and samples in Cryo (AeCryo, AnCryo). The effect of the ambient condition is represented in B) for samples exposed to oxygen (AeGly, AeCryo) and prepared in anaerobic chamber (AnGly, AnCryo). The median and interquartile range expressed in % of viability. The error bars represent the minimum and maximum values. Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants; Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition.

Table 2 - Analysis of deviance table with estimate standard errors of the mixed linear model of fresh samples. The table represent the effect of two variables such as ambient condition (Ae x An) and type of cryoprotectant (Gly x Cryo) on bacterial viability.

Factor fresh samples	Intercept	Estimate	Standard error	Pr (> Chisq)
Ambient condition (Ae x An)	Ae	-8.607	2.299	0.001**
Cryoprotectant (Gly x Cryo)	Gly	4.998	2.299	0.000***
Ambient condition : Cryoprotectant	Ae:Gly	6.981	3.251	0.031*

Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

The pairwise comparisons showed a significantly lower viability for samples in Gly prepared in the presence of oxygen compared to all samples. The viability rates in Gly decreased from 59.84% to 55.20% after exposure to oxygen ($p < 0.05$), whereas the viability of the samples in Cryo remained stable. However, the samples in Gly (55.20%) had lower viability than Cryo (65.23%; $p < 0.001$) in the presence of oxygen.

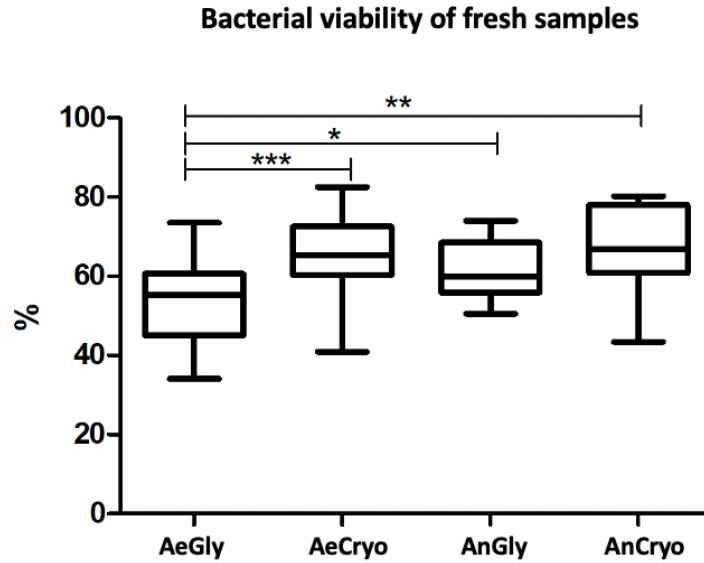


Figure 3 - Pairwise comparisons of bacterial viability of fresh samples. The box plot shows the median percentage of bacterial viability after Pairwise comparisons for all fresh groups. Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants. All groups were compared to each other to determine the effect of the ambient conditions and the cryoprotectant. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

2.4.2 The bacterial viability of freeze-thawed samples

Compared to the overall viability of fresh samples (AeGly, AeCryo, AnGly and AnCryo) freezing for 90 days at -20°C significantly decreased viability in dogs' feces ($p < 0.001$) from 61.79% to 25.05% following freezing (Figure 4). The effect of the type of cryoprotectant during freezing is summarized in Figure 5 and Table 3. Among all frozen samples, the type of cryoprotectant had a significant effect on bacterial viability ($p < 0.001$), whereas the ambient condition had no effect. Overall bacterial viability of fresh samples in Gly was 58.87% compared to 30.61% after freezing, while samples in Cryo was 66.49% compared to 19.95%.

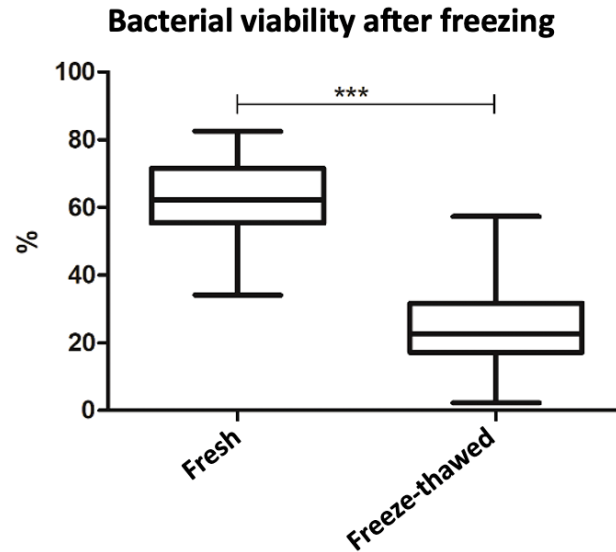


Figure 4 - Bacterial viability of all samples before and after freezing 90 days at -20°C. The box plot shows the overall median percentage of the viability of all fresh samples (AeGly, AeCryo, AnGly and AnCryo) compared to all freeze-thawed samples (AeGly_F, AeCryo_F, AnGly_F and AnCryo_F). Statistically significant differences between fresh and frozen samples were analyzed by T-test. ***p<0.001. A p-value lower than 0.05 was considered significant. Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; F= freeze-thawed, Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants.

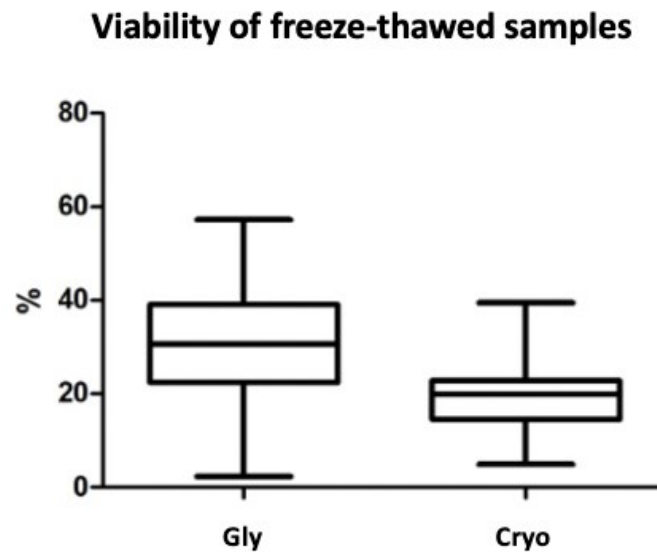


Figure 5 - The effect of the cryoprotectant on the viability of frozen samples. The effect of the cryoprotectant on the viability of all freeze-thawed samples in Gly (AeGly_F, AnGly_F) and in Cryo (AeCryo_F, AnCryo_F) are represented by the box plot. The effect of the type of cryoprotectant is represented in % of viability. Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; F= freeze-thawed, Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants.

Table 3 - Analysis of deviance table with estimate standard errors from mixed linear model of freeze-thawed samples. The table represent the effect of two variables (ambient condition, Ae x An; cryoprotectant, Gly x Cryo) on bacterial viability.

Factor freeze-thawed Samples	Intercept	Estimate	Standard error	Pr (> Chisq)
Ambient condition (Ae x An)	Ae	-8.230	4.226	0.124
Cryoprotectant (Gly x Cryo)	Gly	-15.055	4.226	0.000***
Ambient condition : Cryoprotectant	Ae:Gly	7.284	5.977	0.222

Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; Gly= cryoprotectant containing glycerol; Cryo= cryoprotectant containing antioxidants; *** $p < 0.001$.

2.4.3 The correlation analysis between bacterial composition and viability

A *post-hoc* correlation test showed that there was a strong positive correlation for fresh samples AeGly, AnGly, AnCryo, and freeze-thawed AnGly and viability rates (respectively; $R = 0.731, p < 0.05$; $R = 0.833, p < 0.01$; $R = 0.756, p < 0.05$; $R = 0.752, p < 0.05$). The results from correlation analysis between bacterial diversity and viability are presented in Table 4. The AnGly and AnCryo groups showed a negative correlation between bacterial diversity and viability while the other groups showed no significant correlations.

Table 4 - Pearson correlation between the Shannon diversity index and bacterial viability. The Pearson correlation test was performed using the Shannon diversity index and bacterial viability to determine if there was an association between bacterial diversity and bacterial viability.

Samples	Correlation coefficient	P-values
AeGly	-0.612	0.079
AeCryo	-0.332	0.382
AnGly	-0.780*	0.013
AnCryo	-0.689*	0.040
AeGly_F	-0.162	0.731
AeCryo_F	-0.656	0.114
AnGly_F	-0.594	0.159
AnCryo_F	0.209	0.652

Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; F = freeze-thawed, Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants. * $p < 0.05$.

The relative abundance of the most abundant bacterial genera (> 1%) present in the fecal microbiota of donors, at the moment of sampling are shown in Figure 6. Dogs number 2, 3, 9 and 10 had visually higher abundance of the genus *Prevotella* compared to the others. Viability rates were also higher for these individuals compared to the others (Table 5.).

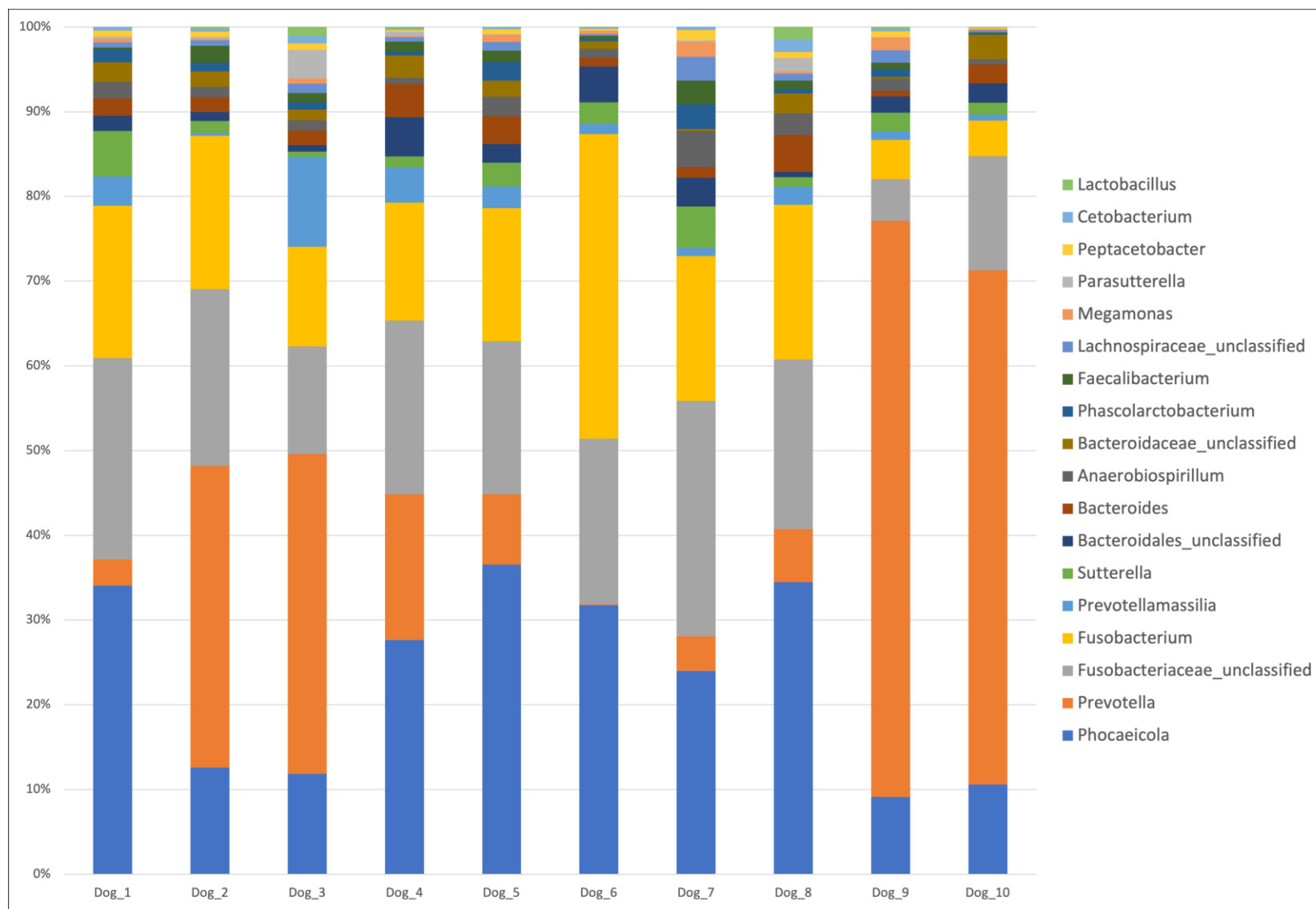


Figure 6 - Relative abundance of the 18 most abundant bacteria. The figure represents the relative abundance of 18 most abundant bacteria (abundance > 0.1%) at the genus level of taxonomic classification.

Table 5 - Pearson correlation between relative abundance of Prevotella and bacterial viability rates.

Samples	Correlation coefficient	P-values
AeGly	<i>0.731*</i>	0.025
AeCryo	<i>0.647</i>	0.059
AnGly	<i>0.833**</i>	0.005
AnCryo	<i>0.756*</i>	0.018
AeGly_F	<i>0.322</i>	0.397
AeCryo_F	<i>0.658</i>	0.053
AnGly_F	<i>0.752*</i>	0.019
AnCryo_F	<i>0.038</i>	0.092

Ae= aerobic condition; An= anaerobic condition; F = freeze-thawed, Gly= cryoprotectant with glycerol; Cryo= cryoprotectant with antioxidants; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.5 Discussion

2.5.1 Summary

The preparation of fecal samples in ambient air is the common method currently used to prepare FMT solutions for humans, as described in consensus guidelines [27-29]. Although there are no guidelines for dogs, the preparation of samples is generally carried out according to these same methods [30-32]. However, the conditions under the samples are prepared and stored have an impact on the viability and bacterial composition [14, 16]. Studies on the preservation of bacterial viability in fecal transplant are scarce in humans, and none have been published to date in dogs. Therefore, the main objective of this study was to compare different conditions for FMT preparations using dogs' feces.

2.5.2 The exposure to oxygen causes a loss of viability

For both humans and dogs, the intestinal tract is dominated by strict anaerobic organisms from the Firmicutes and Bacteroidetes, phyla [15, 33]. Thus, the oxygen level in the intestinal tract appears to be less than 1 mmHg as shown by a recent study in mice [34]. In the current study, we showed that exposure to oxygen lead to a significant loss of viability. Indeed, the bacterial viability in samples diluted in Gly was significantly lower following exposure to oxygen compared to samples prepared inside the anaerobic chamber. Furthermore, in human studies the bacterial

viability of oxygen-sensitive species was maintained through the utilization of anaerobic conditions [16, 35]. These results suggest that processing fecal slurry in ambient air decreases the bacterial viability.

Other researchers have reported a bacterial viability of 25% after exposure to oxygen [16, 36]. In the current study, viability rates remained above 50% for all fresh samples despite the presence of oxygen. This could be due to different composition and the presence of more resistant bacteria in the dog feces. Furthermore, methodological differences such as the use of manual homogenization instead of a blender to mixture the solutions or the flow cytometry to estimate viability could explain these differences. Indeed, the high speed of the blender seems to create a massive air intake and cause greater exposure to oxygen for anaerobic species, compared to manual homogenization [36].

2.5.3 The use of antioxidants and anaerobic conditions yield higher viability rates

Interestingly, despite the presence of oxygen, the viability of Cryo (65.26%) was significantly higher than Gly (55.20%). Besides, another study in humans reported similar results in which the samples containing antioxidants had a higher viability (58.51%, \pm 14.28%) compared to samples in saline solution (55.52% \pm 13.78%), in the presence of the oxygen [37]. Moreover, in the context of the present study, the viability rate of Cryo did not show a significant difference with (65.26%) and without (66.78%) exposure to oxygen.

In a study done by Bellali et al., the viability rates were determined using flow cytometry and then compared using a culture-based method. Samples mixed with antioxidants and exposed to oxygen showed no significant difference with samples prepared with the same cryoprotectant in an anaerobic chamber. However, these two samples had a significant difference with plate counting method. Samples exposed to oxygen, had 39.55% of cultivability while it was increased to 54% for the samples prepared in anaerobic condition [37]. This indicates that the use of a cryoprotectant containing antioxidants combined with anaerobic conditions, could lead to optimal viability to carry out faecal dilution for FMT.

2.5.4 The bacterial viability was affected by freezing at -20°C in cryoprotectants

Compared to the fresh state, the bacterial viability decreased significantly after three months of freezing at -20°C for all groups. However, the viability of samples diluted in Gly had significantly higher viability than samples in Cryo. Overall viability of samples diluted in Gly decreased from 58.87% to 30.62% after freezing. Conflicting results were observed in recent studies in humans, in which samples were frozen at -20°C in 10% of glycerol did not have a significant difference in bacterial viability followed by freezing [38], while others observed a significant decrease in viability [39]. For the preparation of frozen fecal transplants, glycerol is one of the most used cryoprotectants in a temperature of -80 °C [29, 40]. In the current study, a temperature of -20°C was used considering its practical aspect in a clinical veterinarian context. However, the results vary from one study to another, and this could be explained by the use of different cryoprotectant media, viability counting techniques, and storage conditions. In addition, a study made by Gavriiliuc et al. showed that a long period of freezing does not seem to change the bacterial composition in both temperatures [41]. The results obtained in the present study suggest that glycerol would be more effective than the cryoprotectant containing antioxidants in preserving bacterial viability during freezing of dogs' fecal transplants. However, due to its viscosity, it is not recommended for lyophilization as it may result in a viscous end-product difficult to encapsulate. The cryoprotectant containing the antioxidants would be more suitable in this case to preserve the bacterial viability during the freezing step of lyophilization [42].

2.5.5 The impact of the microbiota composition in bacterial viability

In the current study, the bacterial viability was affected by oxygen exposure and freezing, but it is not known which species were the most affected. Among the different bacteria, the structure and composition of the cell membrane can play a major role in cell viability [43]. Also, the proportion identified as dead having a damaged cell membrane does not necessarily mean they are no longer viable. Indeed, the limitation of staining method is the possibility of being identified as dead, but still metabolically active [44]. To prevent the inherent limitations of using one single viability assay, combining different tests, such as enzyme activity and redox potential with membrane permeability test could yield a more thorough assessment of bacterial viability.

In contradiction to some studies in humans, the present study used feces collected from individuals with many similarities such as age, living environment, nutrition, breed, and gender. These elements are factors known to have an impact on the composition of the intestinal microbiota [45-47]. In the context of our experimental design, these elements would allow us to reduce the effect of interindividual variations among the experimental groups. Interestingly, despite the uniform population of canine fecal donor used, we observed marked difference in the most abundant taxa between dogs. This underlines the effect of interindividual variation and the complexity of the ecosystem composing the microbiota. All the dogs used in this project were female Beagles, which limits the extrapolation of our results to other dog breeds. Furthermore, the small number of dogs used ($n = 10$) in this study may also limit the extrapolation of the results to the entire canine population.

A decreased diversity is normally present during dysbiosis caused by diseases and antimicrobials. The negative correlation between diversity and viability observed in this study was interesting. Noteworthy, the low diversity observed in some dogs could be attributed to the high abundance of *Prevotella* [48]. Moreover, the viability rates were highest in these individuals, suggesting that *Prevotella* could be more resilient to freezing and processing for FMT solutions. For this reason, a post-hoc correlation test was performed, and *Prevotella* was positively correlated with bacterial viability for most fresh samples and one freeze-thawed sample. In a recent study, the viability of *Prevotella* was one of the highest in human feces [16]. Among anaerobic species, there is a variation in oxygen sensitivity, which depends mainly on the production of protective enzymes against the toxic products of partial oxygen reduction [26, 27]. These enzymes have a protective effect against the toxic effects of oxygen reduction products such as superoxide dismutase, catalase and peroxidases [49], suggesting that *Prevotella* could be more resilient to FMT preparation, but this hypothesis remains to be tested.

This bacterial genus makes up the microbiota of a healthy dog and is associated with good gut health [43]. Moreover, a decrease in the abundance of *Prevotellaceae*, the family that harbours the genus *Prevotella*, has been associated with inflammatory bowel disease in dogs [44]. It is also associated with the efficient digestion of carbohydrates [45, 46] that normally makes up

a canine diet that meets AAFCO standards. *Prevotella spp.* can be favoured by cereal supplementation and its presence resulted in improved glucose metabolism in humans [50-52]. However, the effect of these bacteria in health is unclear since some studies show beneficial effects while other studies suggest that it could play a role in certain inflammatory diseases in humans [53-55]. To the knowledge of the authors, there is little information on the physiological effects associated with a dominance of *Prevotella* within the canine intestinal microbiota.

2.6 Conclusion

The results obtained in the current study indicate that antioxidant-containing cryoprotectant appears to protect bacteria against oxygen exposure. In addition, fresh feces diluted in cryoprotectants had greater viability than freeze-thawed feces. However, in the context where freezing is necessary, the use of glycerol as cryoprotectant seems to be more effective to protect fecal bacteria of dogs. Samples with high abundance of *Prevotella* had greater viability, but further studies are necessary to investigate the role of microbiota composition in bacterial viability and efficiency of FMT to the different diseases to which this procedure is recommended.

2.7 Funding

This study was supported by the Fonds du Centenaire of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

2.8 Acknowledgements

We would like to acknowledge Mélanie Lehoux and Frédéric Berthiaume for their precious help during the experimental process.

2.9 Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

2.10 References

1. Khoruts, A. and M.J. Sadowsky, Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. 13(9): p. 508-16.

2. Pilla, R. and J.S. Suchodolski, The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020. 6 (498).
3. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 2016. 164 (3): p. 337-40.
4. Handl, S., et al., Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011. 76(2): p. 301-10.
5. Wong, J.M., et al., Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 2006. 40(3): p. 235-43.
6. Vázquez-Baeza, Y., et al., Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol*, 2016. 1: p. 16177.
7. Marsilio, S., et al., Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Scientific Reports*, 2019. 9(1): p. 19208.
8. Giaretta, P.R., et al., Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy. *Vet Pathol*, 2020. 57(2): p. 258-265.
9. Rokkas, T., et al., A network meta-analysis of randomized controlled trials exploring the role of fecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection. *United European Gastroenterol J*, 2019. 7(8): p. 1051-1063.
10. Aron-Wisnewsky, J., K. Clément, and M. Nieuwdorp, Fecal Microbiota Transplantation: a Future Therapeutic Option for Obesity/Diabetes? *Curr Diab Rep*, 2019. 19(8): p. 51.
11. Huang, H.L., et al., Fecal microbiota transplantation as a novel approach for the treatment of atopic dermatitis. *J Dermatol*, 2021. 48(12): p. e 574-e576.
12. Sanada, K., et al., Gut microbiota and major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*, 2020. 266: p. 1-13.
13. Chaitman, J., et al., Commentary on key aspects of fecal microbiota transplantation in small animal practice. *Vet Med (Auckl)*, 2016. 7: p. 71-74.
14. Cardona, S., et al., Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiology*, 2012. 12(1): p. 158.
15. Loesche, W.J., Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl Microbiol*, 1969. 18(5): p. 723-7.
16. Papanicolas, L.E., et al., Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine*, 2019. 41: p. 509-516.

17. Suchodolski, J.S., J. Camacho, and J.M. Steiner, Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008. 66(3): p. 567-78.
18. Cammarota, G., et al., European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 2017. 66(4): p. 569-580.
19. Hamilton, M.J., et al., Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol*, 2012. 107 (5): p. 761-7.
20. Bellali, S., et al., A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*, 2020. 236: p. 126454.
21. Herdeiro, R.S., et al., Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1760(3): p. 340-6.
22. Fowler, A. and M. Toner, Cryo-injury and biopreservation. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1066: p. 119-35.
23. Wang, J.W., et al., Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*, 2019. 118 Suppl 1: p. S 23-s31.
24. Schloss, P.D., et al., Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. 75(23): p. 7537-7541.
25. Quast, C., et al., The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(Database issue): p. D 590-6.
26. Cole, M., et al., Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, 2014. 4(1): p. 4528.
27. Kim, P., et al., Fecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: A retrospective single-center chart review. *JGH open : an open access journal of gastroenterology and hepatology*, 2018. 3(1): p. 4-9.
28. Mullish, B.H., et al., The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *Gut*, 2018. 67(11): p. 1920-1941.
29. Cammarota, G., et al., European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 2017. 66(4): p. 569-580.
30. Pereira, G.Q., et al., Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *J Vet Intern Med*, 2018. 32(2): p. 707-711.

31. Bottero, E. and P. Ruggiero, Fecal microbiota transplantation (FMT) in 16 dogs with idiopathic IBD. *Veterinaria*, 2017. 31: p. 31-45.
32. Sugita, K., et al., Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a dog: a case report. *BMC Veterinary Research*, 2019. 15(1): p. 11.
33. Suchodolski, J.S., J. Camacho, and J.M. Steiner, Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008. 66(3): p. 567-578.
34. Albenberg, L., et al., Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 2014. 147(5): p. 1055-63.e8.
35. Martínez, N., et al., Filling the gap between collection, transport and storage of the human gut microbiota. *Scientific Reports*, 2019. 9(1): p. 8327.
36. Shimizu, H., et al., Stool preparation under anaerobic conditions contributes to retention of obligate anaerobes: potential improvement for fecal microbiota transplantation. *BMC Microbiology*, 2021. 21(1): p. 275.
37. Bellali, S., et al., Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components. *Frontiers in Microbiology*, 2019. 10.
38. Costello, S.P., et al., Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: clinical efficacy and bacterial viability data. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2015. 42(8): p. 1011-1018.
39. Takahashi, M., et al., Faecal freezing preservation period influences colonization ability for faecal microbiota transplantation. *J Appl Microbiol*, 2019. 126(3): p. 973-984.
40. Costello, S.P., et al., Establishing a Fecal Microbiota Transplant Service for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis*, 2016. 62 (7): p. 908-14.
41. Gavriiliuc, S., et al., Long-term storage of feces at -80°C versus -20°C is negligible for 16S rRNA amplicon profiling of the equine bacterial microbiome. *PeerJ*, 2021. 9: p. e 10837.
42. Abadias, M., et al., Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int J Food Microbiol*, 2001. 65(3): p. 173-82.
43. Sarnaik, A., et al., Novel perspective on a conventional technique: Impact of ultra-low temperature on bacterial viability and protein extraction. *PLOS ONE*, 2021. 16(5): p. e 0251640.
44. Taguer, M., O. Quillier, and C.F. Maurice, Effects of oxygen exposure on relative nucleic acid content and membrane integrity in the human gut microbiota. *PeerJ*, 2021. 9: p. e 10602.

45. Kim, J., et al., Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. *Gut Pathogens*, 2017. 9(1): p.68
46. Song, S.J., et al., Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife*, 2013. 2: p. e 00458.
47. Simpson, J.M., et al., Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb Ecol*, 2002. 44(2): p. 186-97.
48. Costa, M. and J.S. Weese, Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet J*, 2019. 249: p. 10-15.
49. Gregory, E.M., W.E. Moore, and L.V. Holdeman, Superoxide dismutase in anaerobes: survey. *Appl Environ Microbiol*, 1978. 35 (5): p. 988-91.
50. Fehlner-Peach, H., et al., Distinct Polysaccharide Utilization Profiles of Human Intestinal *Prevotella copri* Isolates. *Cell Host Microbe*, 2019. 26 (5): p. 680-690.e5.
51. Kovatcheva-Datchary, P., et al., Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab*, 2015. 22(6): p. 971-82.
52. Sandberg, J., et al., Abundance of gut *Prevotella* at baseline and metabolic response to barley prebiotics. *Eur J Nutr*, 2019. 58(6): p. 2365-2376.
53. Chang, C.J., et al., Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal*, 2019. 27(3): p. 615-622.
54. Pianta, A., et al., Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2017. 69(5): p. 964-975.
55. Scher, J.U., et al., Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*, 2013. 2: p. e 01202.
56. Walters, W., et al., Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems*, 2016. 1(1).

Chapitre 3 – Discussion générale

De nombreux travaux de recherche effectués chez l'humain indiquent que la préparation et l'entreposage affectent la viabilité bactérienne des transplants fécaux. L'efficacité de la transplantation dépend de la capacité des bactéries bénéfiques à coloniser le microbiote intestinal du receveur [43-45]. Ainsi, les microorganismes doivent demeurer viables au moment de la transplantation. À ce jour, il n'existe aucune publication révisée par les pairs ayant analysé la viabilité bactérienne lors de l'utilisation des différentes méthodes de préparation et d'entreposage à partir d'échantillons fécaux canins. Par conséquent, l'objectif de ce projet de maîtrise était d'optimiser la viabilité bactérienne lors de la préparation des transplants fécaux par l'utilisation d'une chambre anaérobique et d'effectuer la congélation des transplants fécaux canins à l'aide de deux cryoprotecteurs différents.

3.1 L'étude de la viabilité bactérienne

La viabilité bactérienne se définit par la capacité des bactéries à former des colonies visibles en milieu de culture ou de présenter des activités métaboliques telles qu'une production de métabolites, de photosynthèse, de respiration cellulaire, etc. [317-320].

La détermination de la viabilité bactérienne par méthodes de culture peut mener à une sous-estimation du nombre de microorganismes viables et ne permet qu'une détermination de la viabilité bactérienne de façon rétroactive [321-323]. Par conséquent, des méthodes moléculaires permettant d'effectuer le décompte de viabilité ont été développées. Ces alternatives incluent les analyses basées sur la teneur en acide nucléique ou l'activité métabolique [324-326] ainsi que l'utilisation de la cytométrie de flux avec fluorophores basée sur l'intégrité de la membrane cellulaire [327-330].

Dans la présente étude, la cytométrie de flux combiné à deux fluorophores (c.-à-d. le SYTO-9 et l'iodure de propidium) a été utilisée. Les cellules bactériennes considérées comme viables étaient caractérisées par des membranes cellulaires intactes, imperméables à l'iodure de propidium. À l'inverse, les cellules endommagées ont été considérées comme non viables [331].

Le calcul du rapport entre nombre de bactéries ayant des dommages à la membrane cellulaire (colorée par iodure de propidium) et le nombre total de bactéries (colorées par le SYTO-9) a permis de déterminer le pourcentage de viabilité bactérienne. Cette méthode de coloration a pour avantage de permettre la quantification en temps quasi réel contrairement aux méthodes de culture [330, 332].

Certains auteurs considèrent que la cytométrie de flux permet la détection de cellules intermédiaires incluant des cellules endommagées demeurant viables lors de l'utilisation du SYTO-9 et de l'iodure de propidium [330, 332-337]. Cependant, le guide du fabricant stipule que deux populations peuvent être identifiées, soit une population viable et une population non viable. Celle qui est considérée comme endommagée ou intermédiaire par les autres auteurs correspond plutôt à une population « non identifiée » selon le guide. Dans le cadre de ce projet, seules des populations viables et non viables ont été observées. Toutefois, à notre connaissance, la nature de ces états intermédiaires n'a pas été entièrement clarifiée.

Bien que cette méthode de coloration soit considérée comme l'une des analyses de viabilité la plus efficace, elle comporte certaines limitations [332, 338-342]. Certaines espèces bactériennes peuvent conserver des activités métaboliques et une membrane cellulaire intactes sans toutefois avoir la capacité de former des colonies sur un milieu de culture, ce qui limite l'analyse de la viabilité [317-320]. De plus, les cellules viables peuvent également être identifiées à tort comme non viables. Certains processus physiologiques tels que la division cellulaire et la synthèse de la paroi cellulaire peuvent mener à une altération de la membrane cellulaire sans toutefois rendre la bactérie non viable [58-61]. De plus, il a été rapporté que le SYTO9 n'est pas efficace pour colorer certaines bactéries Gram négatives intactes [46]. En somme, ces facteurs sont susceptibles d'entraîner une sous-estimation de la viabilité bactérienne et d'engendrer une limitation dans l'analyse de viabilité dans la présente étude.

Pour surmonter ces limitations, il faudrait étendre le concept de la viabilité à la capacité de maintenir une forme active. Codony et al. proposent une nouvelle approche recourant au monoazide d'éthidium (EM ; *ethidium monoazide*) en concomitance avec la PCR quantitative [343]. L'EMA peut traverser à la fois une membrane cellulaire intacte, mais également une

membrane cellulaire endommagée. Cependant, seules les bactéries viables ont la capacité d'expulser l'EMA hors du cytoplasme à l'aide d'un transport actif. Lors d'une photoactivation, l'EMA s'intercale uniquement à l'ADN des bactéries n'ayant plus d'activité biochimique. Une fois que l'EMA s'est intercalé à l'ADN, l'amplification de cet ADN n'est plus possible. Ainsi, il serait possible de quantifier la proportion de bactéries viables ayant une membrane cellulaire endommagée à partir de la quantification de l'ADN amplifiée et non amplifiée [343].

Dans la majorité des travaux de recherche effectués sur la viabilité bactérienne, cette dernière était généralement de 50 à 90 % à l'état initial (en condition anaérobie), ce qui implique que la majorité des transplants fécaux pourraient contenir une certaine quantité de bactéries non viables [49, 271, 344-346]. Par exemple, Papanicolas et al. ont évalué la viabilité bactérienne à l'aide d'une méthode basée sur l'intégrité de la membrane cellulaire. Au total, les fèces de 8 individus ont été sélectionnées selon des critères similaires à ceux utilisés pour la sélection de donneurs. Les échantillons de selles ont été collectés sur place et traités dans les 15 minutes suivant la défécation. Le mélange des selles et la préparation pour les analyses de viabilité ont été effectués dans une chambre anaérobie. Les analyses ont montré que la viabilité bactérienne était au départ d'environ 50 %, ce qui indique que seule la moitié des bactéries présentes dans les échantillons fécaux étaient viables initialement. Cependant, comme mentionné précédemment, l'adoption d'une méthode basée sur l'intégrité de la membrane cellulaire pourrait mener à une sous-estimation de la viabilité bactérienne.

3.2 L'exposition à l'oxygène

La préparation des transplants fécaux en présence d'oxygène est la méthode la plus couramment utilisée dans la majorité des essais cliniques effectués à ce jour [33, 41, 50, 243, 347, 348]. Or, le microbiote intestinal des chiens est colonisé en majorité par des espèces sensibles à l'oxygène [48, 262]. Comme attendu, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de maîtrise indiquent qu'une préparation en présence d'oxygène peut affecter la viabilité des transplants fécaux. En effet, les échantillons dilués dans la solution avec glycérol avaient une viabilité inférieure en présence d'oxygène. D'ailleurs, de nombreux travaux de recherche dans lesquels

une diminution de la viabilité bactérienne a été observée en présence d'oxygène appuient ces résultats [49, 344, 349].

La viabilité des échantillons dilués dans la solution avec antioxydants est demeurée stable par rapport à la viabilité initiale malgré la présence d'oxygène. D'ailleurs, certaines études indiquent que l'utilisation d'antioxydants assure la préservation de la viabilité d'espèces sensibles à l'oxygène et favorise le développement d'espèces bénéfiques [350, 351]. La collecte des transplants fécaux canins se fait généralement à la maison par le propriétaire, et les selles sont ensuite apportées chez le vétérinaire pour l'administration de la TMF. Le transfert immédiat des selles en chambre anaérobique est donc limité par ce contexte, et les fèces sont alors inévitablement exposées à l'oxygène. Ceci indique que l'utilisation d'une solution composée, entre autres, d'antioxydants pourrait être une option de rechange intéressante à la chambre anaérobique dans un contexte où l'utilisation d'une telle chambre n'est pas possible.

Le cryoprotecteur avec antioxydants utilisé dans le cadre de ce projet contenait du lait écrémé et des antioxydants. Le lait a été ajouté pour une protection contre les effets de la congélation. Les résultats obtenus suggèrent que l'utilisation du glycérol lors de la congélation serait préférable au cryoprotecteur contenant des antioxydants. Considérant que certains chiens peuvent réagir à la protéine bovine contenue dans le lait [352], il serait envisageable de ne pas ajouter le lait et de conserver uniquement les antioxydants, si cette solution est utilisée exclusivement comme protection contre les effets néfastes de l'oxygène.

Dans la majorité des essais cliniques utilisant la TMF, un mélangeur électrique a été utilisé pour effectuer l'homogénéisation des échantillons fécaux humains et canins [199, 238, 240-243, 313], de même que dans certaines études évaluant la viabilité bactérienne lors de la préparation de la TMF [49, 271, 349, 353]. Cependant, des travaux effectués par Shimizu et al. indiquent que l'utilisation d'un mélangeur électrique induit une entrée d'air importante causant davantage la diminution de la viabilité bactérienne [349]. Dans la présente étude, cet appareil n'a pas été utilisé et les fèces ont été mélangées manuellement, puis agitées quelques secondes à l'aide d'un vortex. Bien que le mélange ait été effectué manuellement, les échantillons étaient tous homogènes. Il

apparaît donc inutile, voire nuisible, d'utiliser un mélangeur électrique dans un contexte où l'homogénéisation ne peut être faite en chambre anaérobie.

3.3 La nécessité d'entreposer les échantillons fécaux

L'emploi d'échantillons fécaux frais pose des difficultés en contexte médical et engendre des délais importants entre la collecte et la transplantation. De plus, les donneurs de matières fécales, considérés comme sains, peuvent éventuellement développer des problèmes de santé. Cette situation peut ainsi mener à une instabilité de l'approvisionnement en transplants fécaux provenant de ces donneurs. L'établissement de banques de matières fécales permettrait d'effectuer une réserve d'échantillons fécaux de qualité tout en facilitant leur accès en cas de besoin [50-58]. Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances sur les impacts des différentes méthodes d'entreposage sur la viabilité et la composition microbienne, pour l'établissement d'éventuelles banques de matières fécales.

3.3.1 Les cryoprotecteurs

La cryopréservation peut mener à un déséquilibre osmotique induisant des changements biophysiques tels qu'une perturbation des organites et une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire. Ainsi, l'apparition de lésions et éventuellement la mort cellulaire peuvent survenir [354, 355]. Différents agents protecteurs peuvent être utilisés pour effectuer la congélation des microorganismes vivants afin d'augmenter leur taux de survie et leur stabilité lors de la conservation [59-62]. D'ailleurs, les deux cryoprotecteurs utilisés dans ce projet semblent limiter la diminution de la viabilité bactérienne d'échantillons fécaux et de différents microorganismes, comparativement à des échantillons congelés sans cryoprotecteur dans plusieurs projets de recherche [59, 261, 271, 353]. Cependant aucune étude comparative ne semble exister dans la littérature au sujet des différents cryoprotecteurs employés pour la préservation de la viabilité bactérienne d'échantillons fécaux canins. Dans la présente étude, les analyses de la viabilité bactérienne ont été effectuées à partir d'échantillons mélangés dans deux différents cryoprotecteurs, à l'état frais et à la suite de la congélation. Par conséquent, la non-utilisation d'échantillons congelés sans une solution saline pourrait constituer une limitation à l'étude. Cependant, les taux de viabilité initiaux (avant la congélation) en solution saline, également

rapportés par d'autres chercheurs, étaient similaires à ceux observés pour les échantillons frais (mélangés aux cryoprotecteurs) dans la présente étude [59, 261, 271, 353]. Ceci suggère que les deux cryoprotecteurs n'avaient pas d'effets défavorables sur la viabilité bactérienne à l'état frais. Cependant, l'objectif de cette étude était de comparer deux cryoprotecteurs mentionnés dans la littérature afin d'optimiser la cryopréservation des transplants fécaux canins.

Le glycérol est généralement utilisé pour effectuer la congélation des échantillons fécaux à une concentration finale entre 10 % et 15 % [263, 356, 357]. Il s'agit d'un agent cryoprotecteur pénétrant qui empêche la cristallisation à l'intérieur des cellules en favorisant les liaisons hydrogène [266, 291, 355, 358]. Le cryoprotecteur composé d'antioxydants, aussi nommé « nouveau cryoprotecteur » par Bellali et al., contient différents ingrédients ayant un effet protecteur lors de la congélation et des processus de lyophilisation [359-363]. Ce cryoprotecteur contient des disaccharides (tréhalose, sucrose), des polyols (mannitol, sorbitol), des protéines (lait écrémé) et des antioxydants. La combinaison de ces ingrédients permet de prévenir la formation de glace intra et extracellulaire [266, 364], le remplacement de l'eau par la formation de liaisons hydrogène [359] et favorise la formation de matrice protectrice de tréhalose [365].

Le cryoprotecteur contenant des antioxydants a préservé la viabilité bactérienne à des taux similaires à ceux des échantillons fécaux frais dans des recherches antérieures [271]. De plus, il contient de nombreux éléments qui empêchent l'apparition de dommages cellulaires lors de la congélation, c'est pourquoi nous avons comme hypothèse que ce cryoprotecteur pourrait être supérieur au glycérol pour la conservation de la viabilité bactérienne lors de la congélation. De manière inattendue, il s'est avéré moins efficace que le glycérol pour la préservation de la viabilité bactérienne lors de la congélation. Ceci indique qu'il serait préférable de maintenir l'utilisation du glycérol pour effectuer la cryopréservation des échantillons fécaux canins.

3.3.2 La cryopréservation à l'azote liquide

Plusieurs études, incluant la présente, suggèrent que l'utilisation d'une température à -20 °C affecte la qualité des transplants fécaux [291, 366]. Cependant, dans le cadre de ce projet, une température de -20 °C a été choisie compte tenu de son aspect pratique dans un contexte

clinique. En effet, des méthodes de conservations connues pour leur efficacité à préserver la viabilité bactérienne telle que la congélation à -80 °C et la lyophilisation nécessitent des appareils très dispendieux et occupent beaucoup d'espace [288, 289, 291, 367]. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer la possibilité d'utiliser une méthode plus accessible qu'un congélateur à -80 °C et un lyophilisateur.

La congélation à des températures inférieures à -80 °C , comme une congélation dans l'azote liquide (-196 °C) ou en phase gazeuse (-135 °C à -150 °C), entraîne l'arrêt des activités biochimiques et physiologiques des cellules bactériennes. Ainsi, les protéines et l'ADN peuvent être conservés sur de longues périodes [288, 289, 291]. Fonseca et al. ont évalué l'effet de différentes cinétiques de congélation et de températures de congélation sur l'activité biologique et la viabilité d'une souche bactérienne lactique conservée dans le glycérol. Les résultats indiquent que les effets néfastes de la cryopréservation étaient les plus élevés à une température de -20 °C suivie de la température de -80 °C . La congélation dans l'azote liquide était la méthode ayant le plus limité les dommages cellulaires [291]. Des études effectuées à partir d'échantillons fécaux humains indiquent que l'utilisation de température au-dessus de -80 °C limite la conservation à quelques mois, alors que l'azote liquide permet de prolonger la période de conservation [286, 292, 293]. De plus, une viabilité de 50 % a été rapportée lors d'une cryopréservation à l'azote liquide en absence de cryoprotecteur [288]. L'azote liquide est couramment utilisé pour effectuer la conservation de plusieurs types cellulaires (embryonnaires, immunitaires, végétales, germinales, etc.) et de certains microorganismes [281-285]. Cependant, la cryopréservation des transplants fécaux à l'azote liquide a fait l'objet de très peu d'études jusqu'à présent. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant suggèrent qu'elle est très efficace pour conserver adéquatement les échantillons fécaux humains [271, 288]. Il serait donc intéressant d'effectuer des analyses de viabilité et de composition bactérienne sur des échantillons fécaux canins comparativement aux méthodes de congélation plus courantes.

3.4 L'analyse de la composition bactérienne

Les caractéristiques physiologiques des nombreuses espèces bactériennes ainsi que la composition de leur membrane cellulaire mènent à différentes capacités à résister aux effets de

la congélation et de l'exposition à l'oxygène [368, 369]. De plus, des travaux antérieurs indiquent que la présence d'oxygène peut causer une diminution d'espèces bénéfiques et ainsi favoriser le développement des espèces pathogènes [49, 349].

Des analyses de la composition bactérienne effectuées sur des échantillons congelés durant quatre années à une température de -20 °C et de -80 °C ont révélé que ces échantillons présentaient une composition bactérienne similaire dans les deux groupes [370]. Cependant, dans ces travaux de recherches, la totalité de l'ADN bactérien extrait a été séquencée, ce qui implique que les analyses reposaient exclusivement sur la présence des différents taxons, qu'ils soient viables ou non. Ainsi, cette méthode possède une capacité limitée à identifier les bactéries viables et capables de coloniser le receveur. L'évaluation de la viabilité bactérienne des différentes espèces qui composent le microbiote intestinal peut être difficile à effectuer à l'aide de méthode de culture ou par séquençage génétique. La culture des espèces viables limite l'analyse de la composition, puisque seulement un petit sous-ensemble du microbiote intestinal total peut être isolé [371]. De plus, le séquençage ne permet pas de faire la distinction entre l'ADN qui provient d'une bactérie viable ou d'une bactérie non viable [372].

Les analyses de viabilité effectuées dans le cadre de ce projet étaient limitées à l'analyse de l'ensemble des bactéries contenues dans les échantillons (les commensaux et les pathogènes). Il n'était donc pas possible d'identifier les espèces d'intérêt (commensales) qui ont été les plus affectées lors de l'exposition aux différentes conditions expérimentales, ce qui limite les analyses de viabilité de la présente étude. L'usage de techniques moléculaires telles que le séquençage de nouvelle génération combinée à des tests PCR quantitatifs ciblés ainsi qu'un traitement préalable au monoazide de propidium (PMA ; *propidium monoazide*) des échantillons permettrait de surmonter cette limitation [49]. Le PMA est un colorant rouge fluorescent qui pénètre de façon sélective les membranes cellulaires endommagées [373]. Lors d'une exposition à des rayons lumineux monochromatiques, une liaison covalente se forme entre le colorant et l'ADN des cellules endommagées. Ainsi, l'amplification est inhibée et seul l'ADN provenant des bactéries ayant une membrane cellulaire intacte est amplifié. Le rapport entre la quantité d'ADN provenant des bactéries intactes et la quantité totale d'ADN bactériens permet alors d'obtenir un

pourcentage de viabilité. De plus, l'emploi concomitant du séquençage offre la possibilité de connaître l'identité des bactéries viables et de la totalité des bactéries (viables et non viables) présentes dans les échantillons [373].

Pour des raisons financières, cette méthode n'a pas été utilisée dans le cadre de ce projet. En contrepartie, une analyse de la composition bactérienne de chaque individu a été effectuée afin d'identifier les microbiotes associés à une plus grande viabilité bactérienne. Il s'est avéré que le genre *Prevotella* dominait l'ensemble de la communauté bactérienne chez plusieurs individus. De plus, les taux de viabilité les plus élevés étaient associés aux individus présentant les plus grandes abondances relatives de *Prevotella*. Pour cette raison, des analyses *post-hoc* ont été effectuées. Elles ont révélé une corrélation positive entre l'abondance relative de *Prevotella* et les taux de viabilité pour plusieurs groupes expérimentaux. Cependant, l'hypothèse que *Prevotella* est plus résistant aux manipulations des transplants fécaux doit être testée. Bien que ces constatations soient intéressantes, la méthode d'analyse de la composition décrite précédemment offrirait la possibilité d'effectuer des analyses plus approfondies sur les changements de la composition bactérienne. En effet, elle mènerait à l'obtention de comparaisons quantitatives des changements de la composition bactérienne comparativement à l'analyse de l'abondance relative, qui, elle, ne permet que d'observer l'abondance des uns par rapport aux autres.

3.5 Les donneurs de matières fécales

Théoriquement, nous avons limité les variations des résultats dans chacune de nos conditions expérimentales par l'utilisation d'une population homogène comme donneur de matières fécales. En effet, la diète, l'âge, la race, le genre sont des facteurs pouvant avoir un impact sur la composition du microbiote intestinal [189, 374, 375]. Dans ce projet, ces facteurs étaient similaires parmi l'ensemble des donneurs. Curieusement, nous avons tout de même observé une différence importante entre les individus. En effet, plusieurs d'entre eux présentaient une abondance nettement plus élevée du genre *Prevotella* par rapport aux autres. Ceci souligne l'effet de la variation interindividuelle et la complexité de l'écosystème composant le microbiote. De plus, tous les chiens impliqués dans ce projet étaient des Beagles, ce qui limite

l'extrapolation de nos résultats aux autres races de chien. La faible quantité de chiens participants (n = 10) à ce projet de maîtrise peut également limiter les analyses des effets de la préparation et de la congélation des échantillons ainsi que l'extrapolation des résultats à l'entièreté de la population canine.

3.6 Les perspectives de la TMF

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe constitué de différents microorganismes ayant des interactions avec l'hôte. Afin d'identifier un échantillon fécal optimal, il est nécessaire d'effectuer encore beaucoup de travaux de recherche. Notamment, il serait important de bien caractériser les autres microorganismes qui composent le microbiote, incluant les métabolites qu'ils produisent, et d'identifier la méthode d'entreposage permettant de les préserver. De plus, le mécanisme d'action exacte du microbiote dans le rétablissement clinique ou dans la maladie n'est pas entièrement compris.

3.6.1 L'utilisation des éléments autres que les microorganismes

Ott et al. ont effectué une série de cas cliniques pour évaluer les effets de l'utilisation de la TMF chez 5 patients atteints de CDI récurrente [376]. Des analyses de l'ADN bactérien, viral, ainsi que des analyses protéomiques ont été effectuées chez les donneurs et les patients. L'infusion de selles a été filtrée à l'aide d'un filtre muni de pores à 0.2 µm pour l'élimination des bactéries. Le filtrat a ensuite été transféré aux patients en une seule administration à l'aide d'une sonde naso-jéjunale. Les chercheurs ont rapporté une résolution des symptômes chez tous les patients (n = 5) [376]. Lors de la TMF, tout le contenu des fèces est transplanté, ce qui implique que des éléments autres que les bactéries vivantes sont transférés au receveur. En effet, une quantité non négligeable de bactéries non viables incluant leurs spores, des métabolites (endogènes et exogènes) et des enzymes, mais également d'autres microorganismes [323, 377-379] est présente dans les transplants fécaux.

Les spores sont produites par de nombreuses espèces bactériennes et celles-ci ont la capacité de coloniser le tube digestif. Certaines espèces appartenant au phylum des *Firmicutes* produisent des spores hautement résistantes dans des conditions défavorables et ont la capacité

de germer une fois qu'elles sont exposées en condition anaérobie ou à l'intérieur d'un hôte [380-383]. Peu de bactéries ayant la capacité de sporuler ont été obtenues par les méthodes de culture. Bien que certaines études métagénomiques aient identifié certains gènes de sporulation potentiels, un manque de connaissance demeure sur leurs mécanismes d'action [384, 385]. Browne et al. ont procédé à des analyses par le séquençage du génome entier et de métagénomique combinées à une analyse informatique et phénotypique. Les résultats obtenus suggèrent que 50 à 60 % des genres bactériens provenant du microbiote intestinal ont la capacité de produire des spores [323].

Des travaux de recherche antérieurs indiquent que les métabolites peuvent avoir un impact positif sur les résultats cliniques d'individus atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin [386-389]. De plus, les résultats observés dans de nombreuses études indiquent que les métabolites sont essentiels au maintien de la santé [166, 170, 330]. Ceci met en lumière la nécessité de mener de futurs travaux de recherche visant à caractériser l'ensemble du contenu des transplants fécaux pour l'emploi efficace de la TMF.

L'analyse des métabolites contenus dans les transplants fécaux nécessite l'adoption de méthodes coûteuses telles que la résonance magnétique nucléaire, la chromatographie en phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse [379]. Plus récemment, Nam et al. ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle complète combinée à la spectrométrie de masse à temps de vol pour comparer les effets de la congélation à -80 °C et de la lyophilisation sur l'abondance et le profil métabolomique d'échantillons fécaux [280]. La lyophilisation a entraîné une quantité de métabolites plus élevée attribuable à des dommages ou à la désintégration de la membrane cellulaire. Ceci indique que la congélation à -80 °C serait préférable à la lyophilisation pour préserver les échantillons dans leur état initial. Ces méthodes n'ont pas été utilisées dans ce projet. Cependant, il pourrait être intéressant d'effectuer, dans une prochaine étape, des analyses comparatives entre différentes méthodes d'entreposage en utilisant l'une de ces méthodes afin d'optimiser la qualité des transplants fécaux canins.

3.6.2 Les autres microorganismes de la TMF

Le microbiote intestinal comprend des bactéries commensales et pathogènes, mais également des champignons, des virus, des archées et des helminthes [4, 390-398]. Chez le chien, les connaissances sur la prévalence et la classification phylogénétique des organismes autres que les bactéries présentes dans le tractus gastro-intestinal sont limitées.

Néanmoins, Suchodolski et al. ont comparé l'ADN fongique contenu chez des individus sains et des chiens atteints d'entéropathies chroniques à l'aide du séquençage de l'ADN fongique. Toutes les séquences appartenaient à deux phylums tels que *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Trois grandes classes ont été identifiées à savoir : les *Saccharomycètes*, les *Dothideomycètes* et les *Hyménomycètes* [391]. D'autres analyses du microbiote intestinal ont également révélé que, chez le chien, 85,46 % de l'abondance fongique était principalement composée des genres *Nakaseomyces* et *Candida castellii* appartenant à la classe des saccharomycètes [4].

Zuo et al. ont suggéré la présence d'une dysbiose fongique chez des humains ayant une CDI [395]. L'analyse de la composition fongique des patients ayant une CDI était caractérisée par une surreprésentation de *Candida albicans* et une infériorité de la diversité, de la richesse (nombre d'espèces observées) et de l'uniformité (proportion des uns par rapport aux autres) fongique. Ils ont également effectué un essai randomisé avec contrôle suggérant que la TMF était associée à une colonisation de taxons fongiques observés chez les donneurs tels que *Saccharomyces* et *Aspergillus*, alors que les individus n'ayant pas répondu à la TMF ou les individus traités avec antibiotiques présentaient une composition fongique dominée par *Candida albicans* [395].

Le séquençage métagénomique de préparations de particules pseudovirales (VLPs ; *viral-like particles*) a également été effectué par Zuo et al. chez 24 sujets atteints de CDI et de 20 témoins sains [396]. Dans cette étude, des changements au niveau du virome entérique tels qu'une diminution de la diversité (au niveau de l'espèce), de la richesse et de l'uniformité étaient reliés à une CDI comparativement aux individus sains. Ils ont également effectué un essai randomisé avec contrôle à l'aide de 9 individus traités avec TMF et 5 individus traités par

antibiotique (vancomycine). La réponse au traitement était définie par l'absence de diarrhée ou des diarrhées persistantes qui pourraient s'expliquer par d'autres causes (test de selles négatif pour la toxine *Clostridioides difficile*). La rechute était définie par la présence de diarrhées avec un test de selles positif pour la toxine *Clostridioides difficile*. Les auteurs ont rapporté que la réponse au traitement dans la TMF était associée à un niveau élevé de colonisation des taxons de *Caudovirales* dérivés du donneur [396]. D'ailleurs, les analyses effectuées par d'autres chercheurs appuient ces résultats [397, 398], ce qui suggère que les bactériophages *Caudovirales* pourraient jouer un rôle dans l'efficacité de la FMT pour le traitement de CDI.

Les analyses de viabilité effectuées dans la présente étude n'ont pas permis de comptabiliser la viabilité associée aux autres microorganismes ainsi que la quantité de spores intactes contenues dans les échantillons. Dans le cadre d'études ultérieures, il serait intéressant d'évaluer la viabilité et la composition de l'ensemble des microorganismes qui composent le microbiote, incluant les spores, afin de sélectionner la méthode de préparation et de conservation permettant de conserver les transplants fécaux à leur état initial (frais). Les connaissances sur les rôles des populations microbiennes autres que les bactéries sont limitées et davantage d'études sont nécessaires. Cependant, de toute évidence, les autres microorganismes constituent une place importante dans l'écosystème intestinal et participent aux interactions avec l'hôte.

3.6.3 L'utilisation de donneurs multiples

Certains chercheurs ont utilisé la combinaison de différents donneurs dans le but d'accroître la diversité bactérienne pour le traitement de maladies inflammatoires de l'intestin [399-402]. Ces chercheurs ont rapporté que la diversité bactérienne était augmentée lors de la combinaison des échantillons. Le suivi des individus ayant reçu la TMF indique également l'absence d'effets secondaires reliés au nombre plus élevé de donneurs. Selon une étude randomisée contrôlée avec placebo à double aveugle effectué sur 42 patients humains atteints de colite ulcéreuse, la TMF avec multidonneurs pourrait engendrer une rémission clinique et une amélioration des signes cliniques qui serait associée à une diversité bactérienne [399]. Bien que ces résultats soient encourageants, aucune étude à ce jour ne semble avoir observé l'amélioration de signes cliniques ou la rémission de patients en comparant l'efficacité des transplants élaborés

à partir d'un seul donneur ou de plusieurs donneurs. Dans des recherches ultérieures, il pourrait donc être intéressant d'effectuer ces comparaisons pour déterminer si le traitement d'entéropathies canines à l'aide de donneurs multiples serait cliniquement plus efficace.

3.6.4 La médecine personnalisée et les biomarqueurs

La prochaine étape de la TMF consisterait à identifier les espèces bactériennes, les métabolites ainsi que les autres microorganismes qui sont bénéfiques au rétablissement de différentes maladies et d'effectuer seulement la transplantation de ces éléments.

Des chercheurs ayant employé des technologies de séquençage à haut débit et des approches multiomiques (métagénomique, métatranscriptomique, métabolomique et métabolomique) ont identifié certains biomarqueurs du microbiote intestinal impliqués dans certaines maladies gastro-intestinales humaines [403-405]. Par exemple, des espèces appartenant au genre *Prevotella* étaient associées avec une digestion efficace des hydrates de carbone [189, 374]. D'ailleurs, des essais cliniques effectués chez l'humain suggèrent qu'une supplémentation en prébiotiques favorisant *Prevotella* était associée à une amélioration du métabolisme du glucose [406-408]. Ces résultats impliquent que *Prevotella spp.* pourrait être utilisé de façon spécifique dans le cadre d'essais cliniques pour la gestion de la glycémie chez des patients canins atteints de diabète. *Prevotella* a été identifié comme un genre bactérien constituant normalement le microbiote d'un chien en bonne santé et est associé à une bonne santé intestinale [43]. De plus, une diminution de l'abondance des *Prevotellaceae*, la famille qui abrite le genre *Prevotella*, est associée à une maladie intestinale inflammatoire chez le chien [409]. Cependant, lors de l'élaboration de l'indice de dysbiose, *Prevotella* ne figurait pas parmi les sept groupes bactériens affectés chez les chiens atteints de maladies inflammatoires chroniques [22]. Par conséquent, il est nécessaire d'acquérir plus de connaissances sur leurs rôles dans le maintien de la santé intestinale chez le chien.

Certains biomarqueurs du microbiote intestinal sont associés à des maladies. Par exemple, des travaux antérieurs ont rapporté une abondance inférieure de *Firmicutes* et une plus grande abondance de *Proteobacteria*, de *Gammaproteobacteria*, et d'*Enterobacteria* chez des patients

ayant une neuro-dégénération comparativement à des sujets sains [410, 411]. De plus, Cattaneo et al. ont rapporté que des patients atteints de l'Alzheimer avaient une abondance supérieure d'espèces pro-inflammatoires telles que *Escherichia/Shigella* ainsi qu'une abondance inférieure d'espèces anti-inflammatoires telles que *E. rectale*. D'ailleurs, ces modifications étaient associées à l'amylose cérébrale et à l'inflammation périphérique en lien avec la physiopathologie de la maladie [412]. Bien que de nombreuses études se concentrent sur l'identification de biomarqueurs pour la détection précoce des maladies, davantage de recherches sont requises afin de pouvoir les utiliser dans la pratique clinique [413].

L'identification de biomarqueurs et d'espèces microbiennes spécifiques chez des patients atteints de maladie gastro-intestinale ou extra-intestinale pourrait mener à l'élaboration d'une thérapie sur mesure. Ainsi, il deviendrait possible de traiter les patients de façon spécifique, soit par l'administration de TMF provenant d'un profil microbien spécifique au rétablissement de la maladie, soit par l'élaboration de capsules à partir de cultures microbiennes. Cependant, beaucoup de travaux de recherche sont nécessaires pour l'identification de ces éléments ainsi que la voie idéale d'administration.

3.7 La conclusion générale

Les échantillons préparés en condition anaérobie présentaient des taux de viabilité supérieurs aux échantillons exposés à l'oxygène. De plus, la viabilité bactérienne a diminué de façon importante à la suite de la congélation, et ce, malgré l'utilisation d'un cryoprotecteur. Ceci indique la nécessité d'effectuer des analyses comparatives afin de déterminer la méthode de congélation la moins délétère sur la viabilité bactérienne. Néanmoins, l'utilisation du glycérol semble avoir eu un effet protecteur supérieur au cryoprotecteur contenant des antioxydants. *Prevotella* était positivement corrélé aux taux de viabilité de plusieurs groupes expérimentaux. Ceci indique que l'hypothèse voulant que *Prevotella* soit plus résistant pourrait être testée dans de futurs travaux de recherche. Ultérieurement, il pourrait être intéressant d'effectuer des analyses de viabilité à l'aide de PMA concomitante à la PCR quantitative, ce qui permettrait de caractériser les changements sur le plan de la composition bactérienne en différentes conditions expérimentales. Ainsi, il serait possible de mener des analyses plus approfondies et d'optimiser

la viabilité d'espèces bactériennes commensales lors de la préparation et de l'entreposage des transplants fécaux canins.

Références

1. Arpaia, N. and A.Y. Rudensky, *Microbial metabolites control gut inflammatory responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(6): p. 2058-9.
2. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
3. Johnston, K.L., *Small intestinal bacterial overgrowth*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1999. **29**(2): p. 523-50, vii.
4. Handl, S., et al., *Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats*. FEMS Microbiol Ecol, 2011. **76**(2): p. 301-10.
5. Khoruts, A. and M.J. Sadowsky, *Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016. **13**(9): p. 508-16.
6. Redfern, A., J. Suchodolski, and A. Jergens, *Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease*. Vet Rec, 2017. **181**(14): p. 370.
7. Pilla, R. and J.S. Suchodolski, *The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease*. Frontiers in Veterinary Science, 2020. **6**(498).
8. Kamada, N., et al., *Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 321-35.
9. Rowland, I., et al., *Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components*. Eur J Nutr, 2018. **57**(1): p. 1-24.
10. Dobson, A., et al., *Bacteriocin production: a probiotic trait?* Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(1): p. 1-6.
11. Momose, Y., K. Hirayama, and K. Itoh, *Competition for proline between indigenous Escherichia coli and E. coli O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against E. coli O157:H7*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008. **94**(2): p. 165-71.
12. Fabich, A.J., et al., *Comparison of Carbon Nutrition for Pathogenic and Commensal Escherichia coli Strains in the Mouse Intestine*. Infection and Immunity, 2008. **76**(3): p. 1143-1152.
13. Liévin-Le Moal, V. and A.L. Servin, *The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota*. Clinical Microbiology Reviews, 2006. **19**(2): p. 315-337.
14. Baquero, F. and C. Nombela, *The microbiome as a human organ*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 4**: p. 2-4.
15. Pavlidis, P., et al., *Systematic review: bile acids and intestinal inflammation-luminal aggressors or regulators of mucosal defence?* Aliment Pharmacol Ther, 2015. **42**(7): p. 802-17.
16. Sansome, D.J., et al., *Mechanism of glucose-lowering by metformin in type 2 diabetes: Role of bile acids*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2020. **22**(2): p. 141-148.
17. Li, T. and J.Y. Chiang, *Bile acids as metabolic regulators*. Curr Opin Gastroenterol, 2015. **31**(2): p. 159-65.

18. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
19. Vázquez-Baeza, Y., et al., *Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks*. Nat Microbiol, 2016. **1**: p. 16177.
20. Honneffer, J.B., Y. Minamoto, and J.S. Suchodolski, *Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(44): p. 16489-97.
21. Alshawaqfeh, M., et al., *Consistent metagenomic biomarker detection via robust PCA*. Biol Direct, 2017. **12**(1): p. 4.
22. AlShawaqfeh, M.K., et al., *A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy*. FEMS Microbiol Ecol, 2017. **93**(11).
23. Cenit, M.C., Y. Sanz, and P. Codoñer-Franch, *Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(30): p. 5486-5498.
24. Gotkine, M., D. Kviatcovsky, and E. Elinav, *Amyotrophic lateral sclerosis and intestinal microbiota—toward establishing cause and effect*. Gut Microbes, 2020. **11**(6): p. 1833-1841.
25. Sun, M.F. and Y.Q. Shen, *Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease*. Ageing Res Rev, 2018. **45**: p. 53-61.
26. Gerhardt, S. and M.H. Mohajeri, *Changes of Colonic Bacterial Composition in Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases*. Nutrients, 2018. **10**(6).
27. Jiang, H., et al., *Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder*. Brain, Behavior, and Immunity, 2015. **48**: p. 186-194.
28. Levy, M., et al., *Dysbiosis and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(4): p. 219-232.
29. Marsella, R., *Atopic Dermatitis in Domestic Animals: What Our Current Understanding Is and How This Applies to Clinical Practice*. Vet Sci, 2021. **8**(7).
30. Chaitman, J., et al., *Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole*. Front Vet Sci, 2020. **7**: p. 192.
31. Manchester, A.C., et al., *Long-term impact of tylosin on fecal microbiota and fecal bile acids of healthy dogs*. J Vet Intern Med, 2019. **33**(6): p. 2605-2617.
32. Rokkas, T., et al., *A network meta-analysis of randomized controlled trials exploring the role of fecal microbiota transplantation in recurrent Clostridium difficile infection*. United European Gastroenterol J, 2019. **7**(8): p. 1051-1063.
33. Pereira, G.Q., et al., *Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection*. J Vet Intern Med, 2018. **32**(2): p. 707-711.
34. Quraishi, M.N., et al., *Immunological mechanisms underpinning faecal microbiota transplantation for the treatment of inflammatory bowel disease*. Clinical & Experimental Immunology, 2020. **199**(1): p. 24-38.
35. Aron-Wisnewsky, J., K. Clément, and M. Nieuwdorp, *Fecal Microbiota Transplantation: a Future Therapeutic Option for Obesity/Diabetes?* Curr Diab Rep, 2019. **19**(8): p. 51.
36. Sanada, K., et al., *Gut microbiota and major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis*. J Affect Disord, 2020. **266**: p. 1-13.

37. Blanchaert, C., B. Strubbe, and H. Peeters, *Fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis*. Acta Gastroenterol Belg, 2019. **82**(4): p. 519-528.
38. Borody, T.J., G.D. Eslick, and R.L. Clancy, *Fecal microbiota transplantation as a new therapy: from Clostridioides difficile infection to inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, and colon cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2019. **49**: p. 43-51.
39. Furmanski, S. and T. Mor, *First case report of fecal microbiota transplantation in a cat in Israel*. Israel Journal of Veterinary Medicine, 2017. **72**: p. 35-41.
40. Niederwerder, M.C., *Fecal microbiota transplantation as a tool to treat and reduce susceptibility to disease in animals*. Vet Immunol Immunopathol, 2018. **206**: p. 65-72.
41. Bottero, E., E. Benvenuti, and P. Ruggiero, *Fecal microbiota transplantation (FMT) in 16 dogs with idiopathic IBD*. Veterinaria, 2017. **31**: p. 31-45.
42. Niina, A., et al., *Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease*. Vet Med (Auckl), 2019. **10**: p. 197-201.
43. Khoruts, A., et al., *Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea*. J Clin Gastroenterol, 2010. **44**(5): p. 354-60.
44. Seekatz, A.M., et al., *Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation*. mBio, 2014. **5**(3): p. e00893-14.
45. van Nood, E., et al., *Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2013. **368**(5): p. 407-15.
46. Cardona, S., et al., *Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis*. BMC Microbiology, 2012. **12**(1): p. 158.
47. Wang, J.W., et al., *Fecal microbiota transplantation: Review and update*. J Formos Med Assoc, 2019. **118 Suppl 1**: p. S23-s31.
48. Suchodolski, J.S., J. Camacho, and J.M. Steiner, *Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis*. FEMS Microbiol Ecol, 2008. **66**(3): p. 567-78.
49. Papanicolas, L.E., et al., *Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive?* EBioMedicine, 2019. **41**: p. 509-516.
50. Cammarota, G., et al., *European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice*. Gut, 2017. **66**(4): p. 569-580.
51. Panchal, P., et al., *Scaling Safe Access to Fecal Microbiota Transplantation: Past, Present, and Future*. Curr Gastroenterol Rep, 2018. **20**(4): p. 14.
52. Kim, K.O. and M. Gluck, *Fecal Microbiota Transplantation: An Update on Clinical Practice*. Clin Endosc, 2019. **52**(2): p. 137-143.
53. Choi, H.H. and Y.S. Cho, *Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives*. Clin Endosc, 2016. **49**(3): p. 257-65.
54. Bakker, G.J. and M. Nieuwdorp, *Fecal Microbiota Transplantation: Therapeutic Potential for a Multitude of Diseases beyond Clostridium difficile*. Microbiol Spectr, 2017. **5**(4).
55. Smits, L.P., et al., *Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation*. Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 946-53.
56. Bakken, J.S., et al., *Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(12): p. 1044-9.

57. Paramsothy, S., et al., *Donor Recruitment for Fecal Microbiota Transplantation*. *Inflamm Bowel Dis*, 2015. **21**(7): p. 1600-6.
58. Vindigni, S.M. and C.M. Surawicz, *Fecal Microbiota Transplantation*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2017. **46**(1): p. 171-185.
59. Biclôt, A., et al., *Effect of cryopreservation medium conditions on growth and isolation of gut anaerobes from human faecal samples*. *Microbiome*, 2022. **10**(1): p. 80.
60. Majidzadeh Heravi, R., et al., *Assessing the viability of three Lactobacillus bacterial species protected in the cryoprotectants containing whey and maltodextrin during freeze-drying process*. *Letters in Applied Microbiology*, 2022. **74**(4): p. 505-512.
61. Qiao, Y., et al., *Effects of natural deep eutectic solvents on lactic acid bacteria viability during cryopreservation*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. **102**(13): p. 5695-5705.
62. Tedeschi, R. and P. De Paoli, *Collection and Preservation of Frozen Microorganisms*, in *Methods in Biobanking*, J. Dillner, Editor. 2011, Humana Press: Totowa, NJ. p. 313-326.
63. Bellali, S., et al., *A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying*. *Microbiol Res*, 2020. **236**: p. 126454.
64. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans*. *Cell*, 2016. **164**(3): p. 337-40.
65. Swanson, K.S., et al., *Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice*. *Isme j*, 2011. **5**(4): p. 639-49.
66. Greetham, H.L., et al., *Bacteriology of the Labrador dog gut: a cultural and genotypic approach*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002. **93**(4): p. 640-646.
67. Stewart, E.J., *Growing Unculturable Bacteria*. *Journal of Bacteriology*, 2012. **194**(16): p. 4151-4160.
68. Weinstock, G.M., *Genomic approaches to studying the human microbiota*. *Nature*, 2012. **489**(7415): p. 250-6.
69. Costa, M. and J.S. Weese, *Methods and basic concepts for microbiota assessment*. *The Veterinary Journal*, 2019. **249**: p. 10-15.
70. Morton, J.T., et al., *Establishing microbial composition measurement standards with reference frames*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2719.
71. Rhoads, A. and K.F. Au, *PacBio Sequencing and Its Applications*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015. **13**(5): p. 278-89.
72. Costa, M.C., et al., *Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs*. *BMC Vet Res*, 2015. **11**: p. 19.
73. Huang, Z., et al., *Faecal microbiota transplantation from metabolically compromised human donors accelerates osteoarthritis in mice*. *Ann Rheum Dis*, 2020. **79**(5): p. 646-656.
74. Dray, S., P. Legendre, and P.R. Peres-Neto, *Spatial modelling: a comprehensive framework for principal coordinate analysis of neighbour matrices (PCNM)*. *Ecological Modelling*, 2006. **196**(3): p. 483-493.
75. Fujishiro, M.A., et al., *Evaluation of the effects of anthelmintic administration on the fecal microbiome of healthy dogs with and without subclinical Giardia spp. and Cryptosporidium canis infections*. *PLOS ONE*, 2020. **15**(2): p. e0228145.

76. Schmidt, M., et al., *The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201279.
77. Guard, B.C. and J.S. Suchodolski, *HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Canine intestinal microbiology and metagenomics: From phylogeny to function*. J Anim Sci, 2016. **94**(6): p. 2247-61.
78. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 235-43.
79. Suchodolski, J.S., et al., *Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease*. Vet Microbiol, 2010. **142**(3-4): p. 394-400.
80. Suchodolski, J.S., et al., *The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease*. PLOS ONE, 2012. **7**(12): p. e51907.
81. Allenspach, K., et al., *Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies*. Vet Microbiol, 2010. **146**(3-4): p. 326-35.
82. Guard, B.C., et al., *Characterization of Microbial Dysbiosis and Metabolomic Changes in Dogs with Acute Diarrhea*. PLOS ONE, 2015. **10**(5): p. e0127259.
83. Park, J.S., et al., *Intestinal Microbial Dysbiosis in Beagles Naturally Infected with Canine Parvovirus*. J Microbiol Biotechnol, 2019. **29**(9): p. 1391-1400.
84. Blake, A.B., et al., *Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease*. PLOS ONE, 2019. **14**(10): p. e0224454.
85. Kim, H., et al., *Obese dogs exhibit different fecal microbiome and specific microbial networks compared with normal weight dogs*. 2022, Research Square.
86. Jergens, A.E., et al., *Microbiota-Related Changes in Unconjugated Fecal Bile Acids Are Associated With Naturally Occurring, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Dogs*. Frontiers in Veterinary Science, 2019. **6**.
87. Rajilić-Stojanović, M., et al., *Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome*. Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1792-801.
88. Wacklin, P., et al., *Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet*. Am J Gastroenterol, 2014. **109**(12): p. 1933-41.
89. Kang, S., et al., *Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray*. Inflammatory Bowel Diseases, 2010. **16**(12): p. 2034-2042.
90. Berkell, M., et al., *Microbiota-based markers predictive of development of Clostridioides difficile infection*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 2241.
91. Pulikkan, J., et al., *Gut Microbial Dysbiosis in Indian Children with Autism Spectrum Disorders*. Microb Ecol, 2018. **76**(4): p. 1102-1114.
92. Aizawa, E., et al., *Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder*. J Affect Disord, 2016. **202**: p. 254-7.

93. Abrahamsson, T.R., et al., *Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012. **129**(2): p. 434-440.e2.
94. Verdam, F.J., et al., *Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity*. Obesity, 2013. **21**(12): p. E607-E615.
95. Ubeda, C., et al., *Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4332-41.
96. Hidron, A.I., et al., *Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007*. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
97. Guzman Prieto, A.M., et al., *Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones?* Frontiers in Microbiology, 2016. **7**.
98. Miquel, S., et al., *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 255-61.
99. Fukae, J., et al., *Butyrate suppresses tumor necrosis factor α production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element*. Arthritis & Rheumatism, 2005. **52**(9): p. 2697-2707.
100. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
101. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(43): p. 16731-16736.
102. Forster, G.M., et al., *A Comparative Study of Serum Biochemistry, Metabolome and Microbiome Parameters of Clinically Healthy, Normal Weight, Overweight, and Obese Companion Dogs*. Topics in Companion Animal Medicine, 2018. **33**(4): p. 126-135.
103. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(31): p. 11070-11075.
104. Handl, S., et al., *Faecal microbiota in lean and obese dogs*. FEMS Microbiology Ecology, 2013. **84**(2): p. 332-343.
105. Kieler, I.N., et al., *Gut microbiota composition may relate to weight loss rate in obese pet dogs*. Veterinary Medicine and Science, 2017. **3**(4): p. 252-262.
106. Salas-Mani, A., et al., *Fecal microbiota composition changes after a BW loss diet in Beagle dogs*. Journal of Animal Science, 2018. **96**(8): p. 3102-3111.
107. Ley, R.E., et al., *Human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-1023.
108. De Bandt, J.-P., A.-J. Waligora-Dupriet, and M.-J. Butel, *Intestinal microbiota in inflammation and insulin resistance: relevance to humans*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2011. **14**(4): p. 334-340.
109. Ridaura, V.K., et al., *Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
110. Hanbeen Kim, Jakyem Seo, Tansol Park et al. *Obese dogs exhibit different fecal microbiome and specific microbial networks compared with normal weight dogs*, 06

111. Koliada, A., et al., *Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population*. BMC Microbiology, 2017. **17**(1): p. 120.
112. Kolida, A., et al., *Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population*. BMC Microbiol, 2017. **17**(1): p. 120.
113. Verdam, F.J., et al., *Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(12): p. E607-15.
114. Kasai, C., et al., *Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing*. BMC Gastroenterol, 2015. **15**: p. 100.
115. Duncan, S.H., et al., *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*. International Journal of Obesity, 2008. **32**(11): p. 1720-1724.
116. Schwartz, A., et al., *Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects*. Obesity, 2010. **18**(1): p. 190-195.
117. Patil, D.P., et al., *Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals*. Journal of Biosciences, 2012. **37**(4): p. 647-657.
118. Yasir, M., et al., *Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia*. Nutr Diabetes, 2015. **5**(4): p. e153.
119. Rahat-Rozenbloom, S., et al., *Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans*. International Journal of Obesity, 2014. **38**(12): p. 1525-1531.
120. Selma, M.V., et al., *The human gut microbial ecology associated with overweight and obesity determines ellagic acid metabolism*. Food Funct, 2016. **7**(4): p. 1769-74.
121. Andoh, A., et al., *Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population*. J Clin Biochem Nutr, 2016. **59**(1): p. 65-70.
122. Million, M., et al., *Correlation between body mass index and gut concentrations of Lactobacillus reuteri, Bifidobacterium animalis, Methanobrevibacter smithii and Escherichia coli*. International Journal of Obesity, 2013. **37**(11): p. 1460-1466.
123. Zuo, H.J., et al., *Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(8): p. 1076-81.
124. Schwartz, A., et al., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(1): p. 190-5.
125. Escobar, J.S., et al., *The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians*. BMC Microbiol, 2014. **14**: p. 311.
126. Patil, D.P., et al., *Molecular analysis of gut microbiota in obesity among Indian individuals*. J Biosci, 2012. **37**(4): p. 647-57.
127. Gao, X., et al., *Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1250.
128. Day, M.J., et al., *Histopathological Standards for the Diagnosis of Gastrointestinal Inflammation in Endoscopic Biopsy Samples from the Dog and Cat: A Report from the*

- World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. Journal of comparative pathology, 2008. **138 Suppl 1**: p. S1-43.
129. Sung, C.-H., et al., *Dysbiosis index to evaluate the fecal microbiota in healthy cats and cats with chronic enteropathies*. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2022. **24**(6): p. e1-e12.
 130. Janeczko, S., et al., *The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease*. Vet Microbiol, 2008. **128**(1-2): p. 178-93.
 131. Marsilio, S., et al., *Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 19208.
 132. Garraway, K., et al., *Relationship of the mucosal microbiota to gastrointestinal inflammation and small cell intestinal lymphoma in cats*. J Vet Intern Med, 2018. **32**(5): p. 1692-1702.
 133. Inness, V.L., et al., *Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp.* J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2007. **91**(1-2): p. 48-53.
 134. Minamoto, Y., et al., *Feline gastrointestinal microbiota*. Anim Health Res Rev, 2012. **13**(1): p. 64-77.
 135. Minamoto, Y., et al., *Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy*. J Vet Intern Med, 2019. **33**(4): p. 1608-1618.
 136. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G922-9.
 137. Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**(Suppl 1): p. 4659-65.
 138. Berkes, J., et al., *Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation*. Gut, 2003. **52**(3): p. 439-51.
 139. González-Mariscal, L., et al., *Tight junction proteins*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2003. **81**(1): p. 1-44.
 140. Groschwitz, K.R. and S.P. Hogan, *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(1): p. 3-20; quiz 21-2.
 141. Kagnoff, M.F., *The intestinal epithelium is an integral component of a communications network*. J Clin Invest, 2014. **124**(7): p. 2841-3.
 142. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
 143. Salzman, N.H., et al., *Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin*. Nature, 2003. **422**(6931): p. 522-6.
 144. Frantz, A.L., et al., *Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides*. Mucosal Immunology, 2012. **5**(5): p. 501-512.

145. Brown, E.M., M. Sadarangani, and B.B. Finlay, *The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine*. Nature Immunology, 2013. **14**(7): p. 660-667.
146. Belkaid, Y. and T.W. Hand, *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell, 2014. **157**(1): p. 121-41.
147. De Mey, J.R. and J.N. Freund, *Understanding epithelial homeostasis in the intestine: An old battlefield of ideas, recent breakthroughs and remaining controversies*. Tissue Barriers, 2013. **1**(2): p. e24965.
148. Catalioto, R.M., C.A. Maggi, and S. Giuliani, *Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions*. Curr Med Chem, 2011. **18**(3): p. 398-426.
149. Birchenough, G.M., et al., *New developments in goblet cell mucus secretion and function*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(4): p. 712-9.
150. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
151. Saenz, S.A., B.C. Taylor, and D. Artis, *Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 172-90.
152. Eri, R. and M. Chieppa, *Messages from the Inside. The Dynamic Environment that Favors Intestinal Homeostasis*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 323.
153. Rescigno, M., *The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(6): p. 256-64.
154. Shimotoyodome, A., et al., *Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2000. **125**(4): p. 525-31.
155. Smith, K., K.D. McCoy, and A.J. Macpherson, *Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota*. Semin Immunol, 2007. **19**(2): p. 59-69.
156. Thaiss, C.A., et al., *The microbiome and innate immunity*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 65-74.
157. Peterson, D.A., et al., *IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 328-39.
158. Sansonetti, P.J. and R. Medzhitov, *Learning Tolerance while Fighting Ignorance*. Cell, 2009. **138**(3): p. 416-420.
159. Tizard, I.R. and S.W. Jones, *The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2018. **48**(2): p. 307-322.
160. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 845-58.
161. Ohnmacht, C., et al., *MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ t⁺ T cells*. Science, 2015. **349**(6251): p. 989-93.
162. Bouskra, D., et al., *Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 507-510.

163. Cherrington, C.A., et al., *Short-chain organic acids at pH 5.0 kill Escherichia coli and Salmonella spp. without causing membrane perturbation*. J Appl Bacteriol, 1991. **70**(2): p. 161-5.
164. Shin, R., M. Suzuki, and Y. Morishita, *Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. J Med Microbiol, 2002. **51**(3): p. 201-206.
165. Corr, S.C., et al., *Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7617-21.
166. Gantois, I., et al., *Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 946-9.
167. Rolhion, N. and B. Chassaing, *When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2016. **371**(1707): p. 20150504.
168. Roediger, W.E., *Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon*. Gastroenterology, 1982. **83**(2): p. 424-9.
169. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.
170. Wang, H.B., et al., *Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(12): p. 3126-35.
171. Corrêa-Oliveira, R., et al., *Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids*. Clin Transl Immunology, 2016. **5**(4): p. e73.
172. Doerner, K.C., et al., *Assessment of fecal bacteria with bile acid 7 alpha-dehydroxylating activity for the presence of bai-like genes*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(3): p. 1185-8.
173. Trauner, M., et al., *Bile Acids as Regulators of Hepatic Lipid and Glucose Metabolism*. Digestive Diseases, 2010. **28**(1): p. 220-224.
174. AlShawaqfeh, M., et al., *A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy*. FEMS Microbiology Ecology, 2017. **93**(11).
175. Giaretta, P.R., et al., *Comparison of intestinal expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter between dogs with and without chronic inflammatory enteropathy*. J Vet Intern Med, 2018. **32**(6): p. 1918-1926.
176. Magnúsdóttir, S., et al., *Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes*. Frontiers in Genetics, 2015. **6**.
177. Karl, J.P., et al., *Fecal concentrations of bacterially derived vitamin K forms are associated with gut microbiota composition but not plasma or fecal cytokine concentrations in healthy adults*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2017. **106**(4): p. 1052-1061.
178. Perkins, J.B. and J. Pero, *Vitamin Biosynthesis, in Bacillus subtilis and Its Closest Relatives*. 2001. p. 271-286.
179. Martens, J.H., et al., *Microbial production of vitamin B12*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **58**(3): p. 275-285.
180. Yoshii, K., et al., *Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity*. Frontiers in Nutrition, 2019. **6**.

181. Strozzi, G.P. and L. Mogna, *Quantification of folic acid in human feces after administration of Bifidobacterium probiotic strains*. J Clin Gastroenterol, 2008. **42 Suppl 3 Pt 2**: p. S179-84.
182. Stabler, S.P., *Vitamin B12 Deficiency*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(2): p. 149-160.
183. Briani, C., et al., *Cobalamin Deficiency: Clinical Picture and Radiological Findings*. Nutrients, 2013. **5**(11): p. 4521-4539.
184. Andrès, E., et al., *Current hematological findings in cobalamin deficiency. A study of 201 consecutive patients with documented cobalamin deficiency*. Clin Lab Haematol, 2006. **28**(1): p. 50-6.
185. D'Aimmo, M.R., et al., *The potential of bifidobacteria as a source of natural folate*. J Appl Microbiol, 2012. **112**(5): p. 975-84.
186. Pompei, A., et al., *Administration of folate-producing bifidobacteria enhances folate status in Wistar rats*. J Nutr, 2007. **137**(12): p. 2742-6.
187. Karl, J.P., et al., *Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2017. **312**(6): p. G559-G571.
188. Eb, V., et al., *Effects of Air Travel Stress on the Canine Microbiome: A Pilot Study*. International Journal of Veterinary Health Science & Research, 2016: p. 132-139.
189. Song, S.J., et al., *Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs*. eLife, 2013. **2**: p. e00458.
190. Stewart, C.J., et al., *Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study*. Nature, 2018. **562**(7728): p. 583-588.
191. Mulder, I.E., et al., *Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces*. BMC Biology, 2009. **7**(1): p. 79.
192. Kim, J., et al., *Differences in the gut microbiota of dogs (Canis lupus familiaris) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform*. Gut Pathog, 2017. **9**: p. 68.
193. Buffie, C.G., et al., *Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to Clostridium difficile-induced colitis*. Infection and immunity, 2012. **80**(1): p. 62-73.
194. De Briyne, N., et al., *Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe*. Veterinary Record, 2014. **175**(13): p. 325-325.
195. German, A.J., L.J. Halladay, and P.-J.M. Noble, *First-choice therapy for dogs presenting with diarrhoea in clinical practice*. Veterinary Record, 2010. **167**(21): p. 810-814.
196. Singleton, D.A., et al., *Pharmaceutical Prescription in Canine Acute Diarrhoea: A Longitudinal Electronic Health Record Analysis of First Opinion Veterinary Practices*. Frontiers in Veterinary Science, 2019. **6**.
197. German, A.J., L.J. Halladay, and P.J. Noble, *First-choice therapy for dogs presenting with diarrhoea in clinical practice*. Vet Rec, 2010. **167**(21): p. 810-4.
198. Igarashi, H., et al., *Effect of Oral Administration of Metronidazole or Prednisolone on Fecal Microbiota in Dogs*. PLOS ONE, 2014. **9**(9): p. e107909.

199. Chaitman, J., et al., *Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole*. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020. **7**.
200. Suchodolski, J.S., et al., *The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing*. *BMC Microbiology*, 2009. **9**(1): p. 210.
201. Jernberg, C., et al., *Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota*. *Microbiology*, 2010. **156**(11): p. 3216-3223.
202. Buffie, C.G., et al., *Profound Alterations of Intestinal Microbiota following a Single Dose of Clindamycin Results in Sustained Susceptibility to Clostridium difficile-Induced Colitis*. *Infection and Immunity*, 2012. **80**(1): p. 62-73.
203. Zhang, L., et al., *Antibiotic Administration Routes Significantly Influence the Levels of Antibiotic Resistance in Gut Microbiota*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013. **57**(8): p. 3659-3666.
204. Sullivan, Å., C. Edlund, and C.E. Nord, *Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2001. **1**(2): p. 101-114.
205. Rashid, M.-U., A. Weintraub, and C.E. Nord, *Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora*. *Anaerobe*, 2012. **18**(2): p. 249-253.
206. Antunes, L.C., et al., *Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(4): p. 1494-503.
207. Jernberg, C., et al., *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. *Isme j*, 2007. **1**(1): p. 56-66.
208. Buffie, C.G., et al., *Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to Clostridium difficile-induced colitis*. *Infect Immun*, 2012. **80**(1): p. 62-73.
209. Zimmermann, P. and N. Curtis, *The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota - a systematic review*. *Journal of Infection*, 2019. **79**(6): p. 471-489.
210. Shmalberg, J., et al., *A Randomized Double Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial of a Probiotic or Metronidazole for Acute Canine Diarrhea*. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019. **6**.
211. Langlois, D.K., A.M. Koenigshof, and R. Mani, *Metronidazole treatment of acute diarrhea in dogs: A randomized double blinded placebo-controlled clinical trial*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2020. **34**(1): p. 98-104.
212. Hota, S.S., et al., *Regional variability in fecal microbiota transplantation practices: a survey of the Southern Ontario Fecal Microbiota Transplantation Movement*. *CMAJ Open*, 2018. **6**(2): p. E184-e190.
213. Tvede, M. and J. Rask-Madsen, *Bacteriotherapy for chronic relapsing Clostridium difficile diarrhoea in six patients*. *Lancet*, 1989. **1**(8648): p. 1156-60.
214. Pilla, R., et al., *Effects of metronidazole on the fecal microbiome and metabolome in healthy dogs*. *J Vet Intern Med*, 2020. **34**(5): p. 1853-1866.
215. van Nood, E., et al., *Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, 2013. **368**(5): p. 407-415.

216. Kump, P., et al., *The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018. **47**(1): p. 67-77.
217. Bermingham, E.N., et al., *Key bacterial families (Clostridiaceae, Erysipelotrichaceae and Bacteroidaceae) are related to the digestion of protein and energy in dogs*. *PeerJ*, 2017. **5**: p. e3019.
218. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 559-63.
219. Thorburn, Alison N., L. Macia, and Charles R. Mackay, *Diet, Metabolites, and "Western-Lifestyle" Inflammatory Diseases*. *Immunity*, 2014. **40**(6): p. 833-842.
220. Schauf, S., et al., *Effect of dietary fat to starch content on fecal microbiota composition and activity in dogs*. *J Anim Sci*, 2018. **96**(9): p. 3684-3698.
221. Mori, A., et al., *Comparison of the effects of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs*. *J Vet Med Sci*, 2019. **81**(12): p. 1783-1790.
222. Bresciani, F., et al., *Effect of an extruded animal protein-free diet on fecal microbiota of dogs with food-responsive enteropathy*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018. **32**(6): p. 1903-1910.
223. Herstad, H.K., et al., *Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis--a controlled clinical trial*. *J Small Anim Pract*, 2010. **51**(1): p. 34-8.
224. Gómez-Gallego, C., et al., *A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: A double-blind placebo-controlled efficacy study*. *Vet Microbiol*, 2016. **197**: p. 122-128.
225. Bybee, S.N., A.V. Scorza, and M.R. Lappin, *Effect of the probiotic Enterococcus faecium SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter*. *J Vet Intern Med*, 2011. **25**(4): p. 856-60.
226. Arslan, H., et al., *Therapeutic effects of probiotic bacteria in parvoviral enteritis in dogs*. *Rev Med Vet-Toulouse*, 2012. **2**(163): p. 55-9.
227. Jensen, A.P. and C.R. Bjørnvad, *Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review*. *J Vet Intern Med*, 2019. **33**(5): p. 1849-1864.
228. Kolaček, S., et al., *Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017. **65**(1): p. 117-124.
229. de Simone, C., *The Unregulated Probiotic Market*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019. **17**(5): p. 809-817.
230. Weese, J.S., *Microbiologic evaluation of commercial probiotics*. *J Am Vet Med Assoc*, 2002. **220**(6): p. 794-7.
231. Didari, T., et al., *A systematic review of the safety of probiotics*. *Expert Opin Drug Saf*, 2014. **13**(2): p. 227-39.
232. Ammor, M.S., et al., *Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2008. **14**(1-3): p. 6-15.

233. Mayrhofer, S., et al., *Antibiotic susceptibility of members of the Lactobacillus acidophilus group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants*. Int J Food Microbiol, 2010. **144**(1): p. 81-7.
234. Davani-Davari, D., et al., *Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications*. Foods, 2019. **8**(3).
235. Baxter, N.T., et al., *Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions with Three Fermentable Fibers*. mBio, 2019. **10**(1).
236. Cammarota, G., et al., *International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice*. Gut, 2019. **68**(12): p. 2111.
237. Cammarota, G., et al., *European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice*. Gut, 2017. **66**(4): p. 569.
238. Paramsothy, S., et al., *Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial*. The Lancet, 2017. **389**(10075): p. 1218-1228.
239. Moayyedi, P., et al., *Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial*. Gastroenterology, 2015. **149**(1): p. 102-109.e6.
240. Tian, H., et al., *Fecal microbiota transplantation in patients with slow-transit constipation: A randomized, clinical trial*. PLOS ONE, 2017. **12**(2): p. e0171308.
241. Vaughn, B.P., et al., *Increased Intestinal Microbial Diversity Following Fecal Microbiota Transplant for Active Crohn's Disease*. Inflammatory Bowel Diseases, 2016. **22**(9): p. 2182-2190.
242. Vrieze, A., et al., *Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome*. Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 913-916.e7.
243. Sugita, K., et al., *Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog: a case report*. BMC Veterinary Research, 2019. **15**(1): p. 11.
244. Zhang, F., et al., *Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation?* Am J Gastroenterol, 2012. **107**(11): p. 1755; author reply p.1755-6.
245. Lee, P., B.R. Yacyshyn, and M.B. Yacyshyn, *Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT)*. Diabetes Obes Metab, 2019. **21**(3): p. 479-490.
246. Yu, E.W., et al., *Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity: The FMT-TRIM double-blind placebo-controlled pilot trial*. PLoS Med, 2020. **17**(3): p. e1003051.
247. Crovesy, L., D. Masterson, and E.L. Rosado, *Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review*. Eur J Clin Nutr, 2020. **74**(9): p. 1251-1262.
248. Kim, J.-H., K. Kim, and W. Kim, *Gut microbiota restoration through fecal microbiota transplantation: a new atopic dermatitis therapy*. Experimental & Molecular Medicine, 2021. **53**(5): p. 907-916.
249. Li, S.S., et al., *Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation*. Science, 2016. **352**(6285): p. 586-9.

250. Chaitman, J., et al., *Commentary on key aspects of fecal microbiota transplantation in small animal practice*. Vet Med (Auckl), 2016. **7**: p. 71-74.
251. Ural, K. (2022). Fecal microbiota transplantation capsule therapy via oral route for combatting atopic dermatitis in dogs . Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi , 69 (2) , 211-219 . DOI: 10.33988/auvfd.822971
252. Ural, K. (2022). Fecal microbiota transplantation capsule therapy via oral route for combatting atopic dermatitis in dogs . Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi , 69 (2) , 211-219 . DOI: 10.33988/auvfd.822971
253. Smillie, C.S., et al., *Strain Tracking Reveals the Determinants of Bacterial Engraftment in the Human Gut Following Fecal Microbiota Transplantation*. Cell Host & Microbe, 2018. **23**(2): p. 229-240.e5.
254. Staley, C., et al., *Durable Long-Term Bacterial Engraftment following Encapsulated Fecal Microbiota Transplantation To Treat Clostridium difficile Infection*. mBio, 2019. **10**(4).
255. Khoruts, A., et al., *Changes in the Composition of the Human Fecal Microbiome After Bacteriotherapy for Recurrent Clostridium difficile-associated Diarrhea*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2010. **44**(5): p. 354-360.
256. Khanna, S., et al., *Changes in microbial ecology after fecal microbiota transplantation for recurrent C. difficile infection affected by underlying inflammatory bowel disease*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 55.
257. Wolfe, J. and G. Bryant, *Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane– Solute– Water Systems*. Cryobiology, 1999. **39**(2): p. 103-129.
258. Panoff, J.-M., et al., *Cold Stress Responses in Mesophilic Bacteria*. Cryobiology, 1998. **36**(2): p. 75-83.
259. Carpenter, J.F., L.M. Crowe, and J.H. Crowe, *Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1987. **923**(1): p. 109-115.
260. Crowe, J.H., et al., *Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules*. Cryobiology, 1990. **27**(3): p. 219-231.
261. Bircher, L., et al., *Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes*. Microbial Biotechnology, 2018. **11**(4): p. 721-733.
262. Loesche, W.J., *Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria*. Appl Microbiol, 1969. **18**(5): p. 723-7.
263. Hamilton, M.J., et al., *Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent Clostridium difficile infection*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(5): p. 761-7.
264. Costello, S.P., et al., *Faecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection using long-term frozen stool is effective: clinical efficacy and bacterial viability data*. Aliment Pharmacol Ther, 2015. **42**(8): p. 1011-8.
265. Herdeiro, R.S., et al., *Trehalose protects Saccharomyces cerevisiae from lipid peroxidation during oxidative stress*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(3): p. 340-6.
266. Fowler, A. and M. Toner, *Cryo-injury and biopreservation*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1066**: p. 119-35.

267. Jarett, J.K., et al., *Diets with and without edible cricket support a similar level of diversity in the gut microbiome of dogs*. PeerJ, 2019. **7**: p. e7661.
268. Lee, C.H., et al., *Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2016. **315**(2): p. 142-149.
269. Tang, G., W. Yin, and W. Liu, *Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory Clostridium difficile infection: A meta-analysis?* Diagn Microbiol Infect Dis, 2017. **88**(4): p. 322-329.
270. Schrenzel, J., *Revue Médicale Suisse : Transplantation de microbiote fécal : état actuel et perspectives*. Revue Médicale Suisse, 2019. **15**(650): p. 976-983.
271. Bellali, S., et al., *A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying*. Microbiological Research, 2020. **236**: p. 126454.
272. Bensch, H.M., et al., *Freeze-drying can replace cold-chains for transport and storage of fecal microbiome samples*. PeerJ, 2022. **10**: p. e13095.
273. Tian, H., et al., *Freeze-dried, Capsulized Fecal Microbiota Transplantation for Relapsing Clostridium difficile Infection*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2015. **49**(6).
274. Shen, W., et al., *Evaluation of freeze-drying for quantification of the microbiome and metabolome in neonatal faecal samples*. Medicine in Microecology, 2021. **8**: p. 100044.
275. Reygner, J., et al., *Freeze-dried fecal samples are biologically active after long-lasting storage and suited to fecal microbiota transplantation in a preclinical murine model of Clostridioides difficile infection*. Gut Microbes, 2020. **11**(5): p. 1405-1422.
276. Jiang, Z.-D., et al., *Safety and preliminary efficacy of orally administered lyophilized fecal microbiota product compared with frozen product given by enema for recurrent Clostridium difficile infection: A randomized clinical trial*. PLOS ONE, 2018. **13**(11): p. e0205064.
277. Jiang, Z.D., et al., *Stability and efficacy of frozen and lyophilized fecal microbiota transplant (FMT) product in a mouse model of Clostridium difficile infection (CDI)*. Anaerobe, 2017. **48**: p. 110-114.
278. Hsu, Y.-L., et al., *Evaluation and Optimization of Sample Handling Methods for Quantification of Short-Chain Fatty Acids in Human Fecal Samples by GC-MS*. Journal of Proteome Research, 2019. **18**(5): p. 1948-1957.
279. Cheng, K., et al., *An LC-QToF MS based method for untargeted metabolomics of human fecal samples*. Metabolomics, 2020. **16**(4): p. 46.
280. Nam, S.L., et al., *Evaluation of fresh, frozen, and lyophilized fecal samples by SPME and derivatization methods using GC×GC-TOFMS*. Metabolomics, 2022. **18**(4): p. 25.
281. DIAMOND, L.S., *Cryopreservation and Storage of Parasitic Protozoa in Liquid Nitrogen*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1995. **42**(5): p. 585-590.
282. Isachenko, E., et al., *Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2003. **108**(2): p. 186-193.
283. Lionetti, F.J. and S.M. Hunt, *Cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch*. Cryobiology, 1975. **12**(2): p. 110-118.
284. Hafez, E.S.E., *Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos, in Reproduction in Farm Animals*. 2000. p. 431-442.

285. Dahmen, H., T. Staub, and F. Schwinn, *Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen*. *Phytopathology*, 1983. **73**(2): p. 241-246.
286. Prakash, O., Y. Nimonkar, and Y.S. Shouche, *Practice and prospects of microbial preservation*. *FEMS Microbiology Letters*, 2013. **339**(1): p. 1-9.
287. Dan, M., et al., *Comparison of preservation media and freezing conditions for storage of specimens of faeces*. *Journal of Medical Microbiology*, 1989. **28**(2): p. 151-154.
288. Zalomova, L.V., et al., *The Efficiency of the Preservation of Human Gut Microbiota in Liquid Nitrogen Depending on the Composition of the Cryoprotective Medium*. *Biophysics*, 2020. **65**(5): p. 788-794.
289. Hansman, D., *PRESERVATION OF BACTERIA OVER LIQUID NITROGEN*. *Medical Journal of Australia*, 1974. **1**(18): p. 715-716.
290. Burz, S.D., et al., *A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 8897.
291. Fonseca, F., M. Marin, and G.J. Morris, *Stabilization of frozen Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(10): p. 6474-82.
292. Barzegari, A., N. Saeedi, and A.A. Saei, *Shrinkage of the human core microbiome and a proposal for launching microbiome biobanks*. *Future Microbiology*, 2014. **9**(5): p. 639-656.
293. Bircher, L., et al., *Cryopreservation of artificial gut microbiota produced with in vitro fermentation technology*. *Microbial Biotechnology*, 2018. **11**(1): p. 163-175.
294. Grout, B.W.W. and G.J. Morris, *Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer*. *Theriogenology*, 2009. **71**(7): p. 1079-1082.
295. De Kievit, T.R., et al., *Quorum-sensing genes in Pseudomonas aeruginosa biofilms: their role and expression patterns*. *Appl Environ Microbiol*, 2001. **67**(4): p. 1865-73.
296. Hubálek, Z., *Protectants used in the cryopreservation of microorganisms*. *Cryobiology*, 2003. **46**(3): p. 205-29.
297. Ren, D., et al., *Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(4): p. 2038-43.
298. Morgan, C.A., et al., *Preservation of micro-organisms by drying; a review*. *J Microbiol Methods*, 2006. **66**(2): p. 183-93.
299. Bircher, L., et al., *Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes*. *Microb Biotechnol*, 2018. **11**(4): p. 721-733.
300. Chaitman, J. and F. Gaschen, *Fecal Microbiota Transplantation in Dogs*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2021. **51**(1): p. 219-233.
301. <https://www.animalbiome.com/fecal-microbiota-transplant-capsules-aka-poo-pills>
302. Wilson, B.C., et al., *The Super-Donor Phenomenon in Fecal Microbiota Transplantation*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 2.
303. Youngster, I., et al., *Fecal microbiota transplant for relapsing Clostridium difficile infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study*. *Clin Infect Dis*, 2014. **58**(11): p. 1515-22.
304. Kassam, Z., et al., *Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2013. **108**(4): p. 500-8.

305. Jiang, Z.D., et al., *Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection - fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy*. Aliment Pharmacol Ther, 2017. **45**(7): p. 899-908.
306. Hecker, M.T., et al., *Fecal Microbiota Transplantation by Freeze-Dried Oral Capsules for Recurrent Clostridium difficile Infection*. Open Forum Infect Dis, 2016. **3**(2): p. ofw091.
307. Hirsch, B.E., et al., *Effectiveness of fecal-derived microbiota transfer using orally administered capsules for recurrent Clostridium difficile infection*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 191.
308. Kao, D., et al., *Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2017. **318**(20): p. 1985-1993.
309. Youngster, I., et al., *Oral, frozen fecal microbiota transplant (FMT) capsules for recurrent Clostridium difficile infection*. BMC Medicine, 2016. **14**(1): p. 134.
310. Staley, C., et al., *Lower endoscopic delivery of freeze-dried intestinal microbiota results in more rapid and efficient engraftment than oral administration*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 4519.
311. Staley, C., et al., *Predicting recurrence of Clostridium difficile infection following encapsulated fecal microbiota transplantation*. Microbiome, 2018. **6**(1): p. 166.
312. Staley, C., et al., *Successful Resolution of Recurrent Clostridium difficile Infection using Freeze-Dried, Encapsulated Fecal Microbiota; Pragmatic Cohort Study*. Am J Gastroenterol, 2017. **112**(6): p. 940-947.
313. Burton, E.N., et al., *Evaluation of Fecal Microbiota Transfer as Treatment for Postweaning Diarrhea in Research-Colony Puppies*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016. **55**(5): p. 582-7.
314. Kerem, U., *Fecal microbiota transplantation capsule therapy via oral route for combatting atopic dermatitis in dogs*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2022. **69**(2): p. 211-219.
315. Cerquetella, M., et al., *Case Report: Oral Fecal Microbiota Transplantation in a Dog Suffering From Relapsing Chronic Diarrhea—Clinical Outcome and Follow-Up*. Frontiers in Veterinary Science, 2022. **9**.
316. Gal, A., et al., *One dog's waste is another dog's wealth: A pilot study of fecal microbiota transplantation in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome*. PLOS ONE, 2021. **16**(4): p. e0250344.
317. Besnard, V., M. Federighi, and J.M. Cappelier, *Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol, 2000. **31**(1): p. 77-81.
318. Nilsson, L., J.D. Oliver, and S. Kjelleberg, *Resuscitation of Vibrio vulnificus from the viable but nonculturable state*. J Bacteriol, 1991. **173**(16): p. 5054-9.
319. Grey, B. and T.R. Steck, *Concentrations of copper thought to be toxic to Escherichia coli can induce the viable but nonculturable condition*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(11): p. 5325-7.
320. Roszak, D. and R. Colwell, *Survival strategies of bacteria in the natural environment*. Microbiological reviews, 1987. **51**(3): p. 365-379.

321. Sachidanandham, R., K.Y. Gin, and C.L. Poh, *Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry*. Biotechnol Bioeng, 2005. **89**(1): p. 24-31.
322. Ward, D.M., R. Weller, and M.M. Bateson, *16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 63-65.
323. Browne, H.P., et al., *Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation*. Nature, 2016. **533**(7604): p. 543-546.
324. Lleò, M.M., et al., *mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an Enterococcus faecalis viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4564-7.
325. McCarty, S.C. and R.M. Atlas, *Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine*. PCR Methods Appl, 1993. **3**(3): p. 181-5.
326. Sheridan, G.E., et al., *Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in Escherichia coli cells*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(4): p. 1313-8.
327. Caron, G.N., P. Stephens, and R.A. Badley, *Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting*. J Appl Microbiol, 1998. **84**(6): p. 988-98.
328. Diaper, J.P. and C. Edwards, *Survival of Staphylococcus aureus in lakewater monitored by flow cytometry*. Microbiology (Reading), 1994. **140 (Pt 1)**: p. 35-42.
329. Turner, K., et al., *Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of Salmonella typhimurium measured by flow cytometry*. J Appl Microbiol, 2000. **89**(1): p. 90-9.
330. Berney, M., et al., *Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(10): p. 3283-90.
331. Grégori, G., et al., *Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4662-70.
332. Stiefel, P., et al., *Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide*. BMC Microbiology, 2015. **15**(1): p. 36.
333. Barbesti, S., et al., *Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria*. Cytometry, 2000. **40**(3): p. 214-8.
334. Virta, M., et al., *Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(2): p. 515-9.
335. Roussel, C., et al., *Comparison of conventional plating, PMA-qPCR, and flow cytometry for the determination of viable enterotoxigenic Escherichia coli along a gastrointestinal in vitro model*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(22): p. 9793-9802.
336. Davis, C., *Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria*. J Microbiol Methods, 2014. **103**: p. 9-17.
337. Léonard, L., et al., *Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**.
338. Park, S.Y., & Kim, C. G. , *A comparative study of three different viability tests for chemically or thermally inactivated Escherichia coli*. Environmental Engineering Research, (2018, February 26). **vol. 23**(Korean Society of Environmental Engineering): p. pp. 282–287.

339. Berney, M., H.-U. Weilenmann, and T. Egli, *Flow-cytometric study of vital cellular functions in Escherichia coli during solar disinfection (SODIS)*. Microbiology, 2006. **152**(6): p. 1719-1729.
340. Nebe-von-Caron, G., et al., *Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting*. J Microbiol Methods, 2000. **42**(1): p. 97-114.
341. Joux, F. and P. Lebaron, *Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level*. Microbes Infect, 2000. **2**(12): p. 1523-35.
342. Trevors, J.T., *Can dead bacterial cells be defined and are genes expressed after cell death?* J Microbiol Methods, 2012. **90**(1): p. 25-8.
343. Codony, F., G. Agustí, and A. Allué-Guardia, *Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR*. Molecular and Cellular Probes, 2015. **29**(3): p. 190-192.
344. Martínez, N., et al., *Filling the gap between collection, transport and storage of the human gut microbiota*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 8327.
345. Bellali, S., et al., *Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**.
346. Bellali, S., et al., *Running after ghosts: are dead bacteria the dark matter of the human gut microbiota?* Gut Microbes, 2021. **13**(1): p. 1-12.
347. Kim, P., et al., *Fecal microbiota transplantation in recurrent Clostridium difficile infection: A retrospective single-center chart review*. JGH Open, 2019. **3**(1): p. 4-9.
348. Mullish, B.H., et al., *The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory Clostridium difficile infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines*. Gut, 2018. **67**(11): p. 1920-1941.
349. Shimizu, H., et al., *Stool preparation under anaerobic conditions contributes to retention of obligate anaerobes: potential improvement for fecal microbiota transplantation*. BMC Microbiology, 2021. **21**(1): p. 275.
350. Khan, M.T., J.M. van Dijk, and H.J. Harmsen, *Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium Faecalibacterium prausnitzii alive at ambient air*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96097.
351. Khan, M.T., et al., *The gut anaerobe Faecalibacterium prausnitzii uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases*. Isme j, 2012. **6**(8): p. 1578-85.
352. MARTÍN, Á., et al., *Identification of allergens responsible for canine cutaneous adverse food reactions to lamb, beef and cow's milk*. Veterinary Dermatology, 2004. **15**(6): p. 349-356.
353. Bellali, S., et al., *Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 1606.
354. Lovelock, J.E., *The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing*. Biochem J, 1954. **56**(2): p. 265-70.
355. Fuller, B.J., *Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state*. Cryo Letters, 2004. **25**(6): p. 375-88.

356. Smirnova, D.V., et al., *Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives*. International Journal of Medical Microbiology, 2019. **309**(5): p. 259-269.
357. Smirnova, D.V., et al., *Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives*. Int J Med Microbiol, 2019. **309**(5): p. 259-269.
358. *Fertility Cryopreservation*. 2010, Cambridge: Cambridge University Press.
359. Leslie, S.B., et al., *Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(10): p. 3592-3597.
360. Carvalho, A.S., et al., *Survival of freeze-dried Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosus during storage in the presence of protectants*. Biotechnology Letters, 2002. **24**(19): p. 1587-1591.
361. Carvalho, A.S., et al., *Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria*. Lait, 2003. **83**(3): p. 203-210.
362. Efiuvwevwere, B.J.O., et al., *Mannitol-enhanced survival of Lactococcus lactis subjected to drying*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. **51**(1): p. 100-104.
363. Castro, H.P., P.M. Teixeira, and R. Kirby, *Evidence of membrane damage in Lactobacillus bulgaricus following freeze drying*. Journal of Applied Microbiology, 1997. **82**(1): p. 87-94.
364. Baumann, D.P., *Preservation of lactic cultures*. 1964: Iowa State University.
365. Crowe, J.H., et al., *Interactions of sugars with membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1988. **947**(2): p. 367-384.
366. Takahashi, M., et al., *Faecal freezing preservation period influences colonization ability for faecal microbiota transplantation*. J Appl Microbiol, 2019. **126**(3): p. 973-984.
367. Garrett, W.S., et al., *Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system*. Cell, 2007. **131**(1): p. 33-45.
368. Gregory, E.M., W.E. Moore, and L.V. Holdeman, *Superoxide dismutase in anaerobes: survey*. Appl Environ Microbiol, 1978. **35**(5): p. 988-91.
369. Sarnaik, A., et al., *Novel perspective on a conventional technique: Impact of ultra-low temperature on bacterial viability and protein extraction*. PLOS ONE, 2021. **16**(5): p. e0251640.
370. Gavriiliuc, S., et al., *Long-term storage of feces at -80 °C versus -20 °C is negligible for 16S rRNA amplicon profiling of the equine bacterial microbiome*. PeerJ, 2021. **9**: p. e10837.
371. Costello, S.P., et al., *Establishing a Fecal Microbiota Transplant Service for the Treatment of Clostridium difficile Infection*. Clin Infect Dis, 2016. **62**(7): p. 908-14.
372. Fouhy, F., et al., *The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations*. PLOS ONE, 2015. **10**(3): p. e0119355.
373. Nocker, A., et al., *Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(16): p. 5111-7.
374. Kim, J., et al., *Differences in the gut microbiota of dogs (Canis lupus familiaris) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform*. Gut Pathogens, 2017. **9**(1): p. 68.
375. Simpson, J.M., et al., *Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber*. Microb Ecol, 2002. **44**(2): p. 186-97.

376. Ott, S.J., et al., *Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection*. Gastroenterology, 2017. **152**(4): p. 799-811.e7.
377. Bojanova, D.P. and S.R. Bordenstein, *Fecal Transplants: What Is Being Transferred?* PLOS Biology, 2016. **14**(7): p. e1002503.
378. Gratton, J., et al., *Optimized Sample Handling Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(9): p. 4661-4668.
379. Karu, N., et al., *A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database*. Anal Chim Acta, 2018. **1030**: p. 1-24.
380. Abecasis, A.B., et al., *A genomic signature and the identification of new sporulation genes*. Journal of bacteriology, 2013. **195**(9): p. 2101-2115.
381. Galperin, M.Y., et al., *Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: towards the minimal set of sporulation-specific genes*. Environ Microbiol, 2012. **14**(11): p. 2870-90.
382. Rajilić-Stojanović, M. and W.M. de Vos, *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. FEMS Microbiol Rev, 2014. **38**(5): p. 996-1047.
383. Setlow, P., *I will survive: DNA protection in bacterial spores*. Trends Microbiol, 2007. **15**(4): p. 172-80.
384. Janoir, C., et al., *Adaptive strategies and pathogenesis of Clostridium difficile from in vivo transcriptomics*. Infect Immun, 2013. **81**(10): p. 3757-69.
385. Lawley, T.D., et al., *Antibiotic treatment of clostridium difficile carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts*. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 3661-9.
386. van Best, N., et al., *Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 3692.
387. Nusbaum, D.J., et al., *Gut microbial and metabolomic profiles after fecal microbiota transplantation in pediatric ulcerative colitis patients*. FEMS Microbiology Ecology, 2018. **94**(9).
388. Paramsothy, S., et al., *Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis*. Gastroenterology, 2019. **156**(5): p. 1440-1454.e2.
389. Paramsothy, S., et al., *Specific Bacteria and Metabolites Associated With Response to Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Ulcerative Colitis*. Gastroenterology, 2019. **156**(5): p. 1440-1454.e2.
390. Giacomini, P., Z. Agha, and A. Loukas, *Helminths and Intestinal Flora Team Up to Improve Gut Health*. Trends in Parasitology, 2016. **32**(9): p. 664-666.
391. Suchodolski, J.S., et al., *Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies*. Veterinary Microbiology, 2008. **132**(3): p. 379-388.
392. Li, L., et al., *Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 11): p. 2534-2541.
393. Zuo, T., et al., *Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection is associated with treatment outcome*. Gut, 2018. **67**(4): p. 634-643.

394. Lam, S., et al., *Roles of the gut virome and mycobiome in faecal microbiota transplantation*. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2022. **7**(5): p. 472-484.
395. Zuo, T., et al., *Gut fungal dysbiosis correlates with reduced efficacy of fecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection*. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 3663.
396. Zuo, T., et al., *Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection is associated with treatment outcome*. *Gut*, 2018. **67**(4): p. 634.
397. Chehoud, C., et al., *Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation*. *mBio*, 2016. **7**(2): p. e00322.
398. Broecker, F., et al., *Long-term changes of bacterial and viral compositions in the intestine of a recovered Clostridium difficile patient after fecal microbiota transplantation*. *Molecular Case Studies*, 2016. **2**(1): p. a000448.
399. Paramsothy, S., et al., *Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2017. **389**(10075): p. 1218-1228.
400. Kazerouni, A. and L.M. Wein, *Exploring the Efficacy of Pooled Stools in Fecal Microbiota Transplantation for Microbiota-Associated Chronic Diseases*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0163956.
401. Fan, Y., et al., *IDDF2019-ABS-0252 Effect of multidonor intensive fecal microbiota transplantation by capsules for active uncreative colitis: a prospective trial*. *Gut*, 2019. **68**(Suppl 1): p. A109.
402. El-Salhy, M., et al., *Efficacy of faecal microbiota transplantation for patients with irritable bowel syndrome in a randomised, double-blind, placebo-controlled study*. *Gut*, 2020. **69**(5): p. 859-867.
403. Castellarin, M., et al., *Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma*. *Genome Res*, 2012. **22**(2): p. 299-306.
404. Kostic, A.D., et al., *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma*. *Genome Res*, 2012. **22**(2): p. 292-8.
405. Willing, B., et al., *Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(5): p. 653-60.
406. Fehlner-Peach, H., et al., *Distinct Polysaccharide Utilization Profiles of Human Intestinal Prevotella copri Isolates*. *Cell Host Microbe*, 2019. **26**(5): p. 680-690.e5.
407. Kovatcheva-Datchary, P., et al., *Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella*. *Cell Metab*, 2015. **22**(6): p. 971-82.
408. Sandberg, J., et al., *Abundance of gut Prevotella at baseline and metabolic response to barley prebiotics*. *Eur J Nutr*, 2019. **58**(6): p. 2365-2376.
409. Taguer, M., O. Quillier, and C.F. Maurice, *Effects of oxygen exposure on relative nucleic acid content and membrane integrity in the human gut microbiota*. *PeerJ*, 2021. **9**: p. e10602.
410. Vogt, N.M., et al., *Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 13537.

411. Liu, P., et al., *Altered microbiomes distinguish Alzheimer's disease from amnesic mild cognitive impairment and health in a Chinese cohort*. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2019. **80**: p. 633-643.
412. Cattaneo, A., et al., *Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly*. *Neurobiology of Aging*, 2017. **49**: p. 60-68.
413. Mullane, K. and M. Williams, *Alzheimer's disease beyond amyloid: Can the repetitive failures of amyloid-targeted therapeutics inform future approaches to dementia drug discovery?* *Biochemical Pharmacology*, 2020. **177**: p. 113945.