

Université de Montréal

Effets des traitements antiprurigineux et de l'immunothérapie allergénique sur le microbiote bactérien et sur les cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux de chiens sains et atopiques.

Par

Camylle C Bergeron

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre 2022

© Camylle C Bergeron, 2022

Université de Montréal

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Effets des traitements antiprurigineux et de l'immunothérapie allergénique sur le microbiote bactérien et sur les cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux de chiens sains et atopiques.

Présenté par

Camille C Bergeron

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marie-Lou Gaucher

Présidente-rapporteuse

Frédéric Sauvé

Directeur de recherche

Mariela Segura

Codirectrice

Marcio Carvalho Costa

Codirecteur de recherche

Marilène Paquet

Membre du jury

Résumé

La pathogénèse de la sacculite anale demeure incomprise. Cette condition semble cependant être plus fréquente chez les chiens atopiques. La sacculite anale se traite principalement avec un antibiotique. Avec la montée de l'antibiorésistance, il est important de mieux comprendre sa pathogénèse afin de prévenir la maladie et trouver des traitements alternatifs aux antibiotiques. Cette étude visait donc à comparer le microbiote bactérien et les cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux de chiens sains à ceux de chiens atopiques, afin de déterminer si des changements pourraient être à l'origine des sacculites anales chez les chiens atopiques. L'hypothèse de ce projet était que le microbiote bactérien et les cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux des chiens sains diffèrent de ceux des chiens atopiques traités ou non traités. Les principaux objectifs de cette étude étaient donc de caractériser le microbiote bactérien (MB) des sacs anaux des chiens atopiques recevant ou non un traitement (oclocitinib, cetirizine ou immunothérapie allergénique) et de déterminer si la concentration de certaines cytokines pro-inflammatoires libérées dans les sacs anaux variait entre les chiens sains et les chiens atopiques non traités (CANT) et les chiens atopiques traités (CAT).

Des écouvillons floqués ont été utilisés pour échantillonner le rectum et les sécrétions provenant des sacs anaux de 15 chiens sains, six CAT et 14 CANT pour l'analyse du microbiote bactérien. L'extraction de l'acide désoxyribonucléique a été effectuée avec le kit commercial DNeasy PowerSoil. Le séquençage de la région V4 du gène de l'acide ribonucléique ribosomique 16S a ensuite été réalisé avec la plateforme Illumina MiSeq. Pour l'analyse des cytokines, le contenu des sacs anaux de 15 chiens sains, 12 CANT et cinq CAT a été prélevé dans un microtube. Chaque microtube a été mélangé au vortex. Le surnageant a ensuite été prélevé. Les microtubes contenant le surnageant ont ensuite été congelés à -80°C jusqu'à leur analyse. La concentration de l'interféron gamma, des interleukines (IL)-2, 6, 8, 10 et 12/23p40, de la protéine chimiotactique 1 des monocytes, du facteur de croissance des nerfs bêta, du facteur de cellules souches, du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A a été mesurée avec le test multiplex de Luminex.

L'appartenance à la communauté était différente entre les sacs anaux des chiens sains et des CANT, des chiens sains et des CAT et des CANT et des CAT ($P = 0,002$, $P = 0,013$ et $P = 0,012$, respectivement). La structure de la communauté était différente entre les chiens sains et les CANT ($P = 0,003$) et entre les CANT et les CAT ($P = 0,017$), mais pas entre les chiens sains et les CAT ($P = 0,332$). Toutes les cytokines pro-inflammatoires évaluées ont été détectées dans les sacs anaux de chiens sains, de CANT et de CAT. Il n'y avait aucune différence significative entre les groupes, excepté pour l'IL-8 et le TNF- α , où l'IL-8 était plus élevée dans les sacs anaux des CANT en comparaison avec ceux des CAT ($P = 0,02$), et le TNF- α était en concentration plus faible dans les sacs anaux des chiens sains comparativement aux sacs anaux des CAT ($P = 0,04$).

Il y a une dysbiose dans les sacs anaux de chiens atopiques, ce qui pourrait expliquer pourquoi les chiens atopiques semblent prédisposés à développer des sacculites anales bactériennes. Les traitements (oclocitinib, cetirizine et immunothérapie allergénique) semblent également modifier la composition du microbiote bactérien dans les sacs anaux des chiens atopiques pour qu'elle se rapproche de celle des chiens sains. L'IL-8 pourrait également jouer un rôle dans le développement de la sacculite anale. D'autres études évaluant un plus large nombre de cytokines permettraient possiblement de mettre en évidence des cytokines ayant un rôle important lors de sacculite anale chez les chiens atopiques.

Mots-clés: microbiote bactérien, sacs anaux, chien, dermatite atopique, cytokines, séquençage de nouvelle génération, test multiplex de Luminex.

Abstract

The pathogenesis of anal sacculitis is not well understood. However, this condition appears to be more common in atopic dogs. Anal sacculitis is primarily treated with antibiotic therapies. With the rise of antimicrobial resistance, it is important to better understand the pathogenesis of anal sacculitis in order to prevent the disease and find alternative treatments to antibiotics. The present study aimed to compare the bacterial microbiota and pro-inflammatory cytokines in the anal sacs of healthy dogs with those of atopic dogs, in order to determine if there are changes that could explain anal sacculitis in atopic dogs. The hypothesis of this project was that the bacterial microbiota and proinflammatory cytokines in the anal sacs of healthy dogs differ from those of treated and untreated atopic dogs. The main objectives of this study were therefore to characterize the bacterial microbiota of the anal sacs of atopic dogs receiving or not a treatment (oclacitinib, cetirizine or allergen-specific immunotherapy) and to determine if the concentration of certain proinflammatory cytokines released in the anal sacs differed between healthy, untreated atopic dogs (UAD) and treated atopic dogs (TAD).

Flocked swabs were used to sample the rectum and secretions from the anal sacs of 15 healthy dogs, six TAD and 14 UAD for bacterial microbiota analysis. Deoxyribonucleic acid extraction was performed with the commercial DNeasy PowerSoil kit. Sequencing of the V4 region of the 16S ribosomal ribonucleic acid gene was then performed with the Illumina MiSeq platform. For cytokine analysis, the contents of the anal sacs of 15 healthy dogs, 12 UAD, and five TAD were collected in a microtube. Each microtube was vortexed before the supernatant was collected. The microtubes containing the supernatant were then frozen at -80°C until analysis. The concentration of interferon gamma, interleukin (IL)-2, 6, 8, 10, and 12/23p40, monocyte chemotactic protein 1, nerve growth factor beta, stem cell factor, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and vascular endothelial growth factor-A were measured with the Luminex multiplex assay.

Community membership was different between the anal sacs of healthy dogs and UAD, healthy dogs and TAD, and UAD and TAD ($P = 0.002$, $P = 0.013$, and $P = 0.012$, respectively). Community structure was different between healthy dogs and UAD ($P = 0.003$) and between UAD and TAD ($P = 0.017$), but not between healthy dogs and TAD ($P = 0.332$). All proinflammatory cytokines assessed were detected in the anal sacs of healthy dogs, UAD, and TAD. There were no significant differences between groups except for IL-8 and TNF- α . IL-8 was higher in UAD anal sacs compared to TAD anal sacs ($P = 0.02$) and TNF- α was in lower concentration in healthy dog anal sacs compared to TAD anal sacs ($P = 0.04$).

There is a dysbiosis between the anal sacs of UAD and TAD which might explain why atopic dogs seem predisposed to bacterial anal sacculitis. Treatments received by atopic dogs (oclacitinib, cetirizine and allergen-specific immunotherapy) shift the microbiota of the anal sacs towards that of healthy dogs. IL-8 may also play a role in the development of anal sacculitis. Further studies on a larger number of cytokines may identify cytokines that are important in the pathogenesis of anal sacculitis in atopic dogs.

Keywords: bacterial microbiota, anal sacs, dog, atopic dermatitis, cytokines, next generation sequencing, Luminex multiplex assay.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Liste des sigles et abréviations	13
Remerciements	16
Chapitre 1 – Revue de littérature.....	17
1.1 Le sac anal	17
1.1.1 Anatomie	17
1.1.2 Contenu des sacs anaux	18
1.1.2.1 Apparence macroscopique	18
1.1.2.2 Apparence microscopique	18
1.1.3 Fonction.....	19
1.1.4 Maladie des sacs anaux.....	19
1.1.4.1 Impaction	19
1.1.4.2 Sacculite anale.....	20
1.1.4.2.1 Signes cliniques	20
1.1.4.2.2 Diagnostic.....	21
1.1.4.2.3 Traitements	21
1.2 La dermite atopique	22
1.2.1 La réaction d’hypersensibilité de type I	23
1.2.1.1 Interféron gamma (IFN- γ)	27

1.2.1.2 Interleukine – 12 (IL-12)	29
1.2.1.3 Interleukine – 2 (IL-2)	29
1.2.1.4 Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)	30
1.2.1.5 Interleukine – 6 (IL-6)	31
1.2.1.6 Interleukine – 10 (IL-10)	32
1.2.1.7 Autres cytokines évaluées dans ce projet de recherche	33
1.3 Le microbiote bactérien	36
1.3.1 Les termes utilisés en relation avec le microbiote bactérien	37
1.3.1.1 Taxon	37
1.3.1.2 Communauté bactérienne	37
1.3.1.3 Diversité alpha.....	37
1.3.1.4 Diversité bêta	38
1.3.2 Techniques utilisées pour caractériser le microbiote bactérien.....	38
1.3.2.1 La culture bactérienne	38
1.3.2.2.....	39
Le séquençage d'ADN à haut débit	39
1.3.3 Facteurs influençant le microbiote bactérien cutané	40
1.3.3.1 L'individu et l'âge	41
1.3.3.2 Site d'échantillonnage.....	41
1.3.3.3 Le sexe et la couleur du pelage	42
1.3.3.4 Région géographique et style de vie.....	42
1.3.3.5 Les traitements.....	43
1.3.4 Le microbiote bactérien des sacs anaux et du rectum	43
1.3.5 Le microbiote bactérien cutané	44

1.3.5.1 Les principaux phyla et genres bactériens retrouvés sur la peau de chiens sains et atopiques.....	46
1.3.5.2 Les différences entre le microbiote bactérien cutané des chiens sains versus celui des chiens atopiques.....	47
1.3.6 Le rôle du microbiote.....	48
1.4 Relation entre les sacs anaux, la dermatite atopique et le microbiote.....	49
1.5 Hypothèse et objectifs.....	50
Chapitre 2 – Manuscrit scientifique.....	52
2.1 Abstract.....	53
2.2 Introduction.....	53
2.3 Material and methods.....	55
2.3.1 Animal selection.....	56
2.3.2 Sample selection.....	58
2.3.3 DNA extraction and sequencing.....	58
2.3.4 Assessment of anal sac proinflammatory cytokines.....	59
2.3.5 Statistical analysis.....	60
2.4 Results.....	60
2.4.1 Relative abundances.....	61
2.4.2 Alpha diversity.....	63
2.4.3 Beta diversity.....	65
2.4.4 Anal sac concentrations of proinflammatory cytokines.....	67
2.5 Discussion.....	68
2.6 Conclusion.....	72
2.7 Acknowledgements.....	73

2.8 References.....	73
Chapitre 3 – Discussion générale	78
3.1 Cytokines pro-inflammatoires présentes dans les sacs anaux	78
3.2 Le microbiote bactérien	81
3.2.1 Comparaison du microbiote bactérien des sacs anaux et du rectum chez les chiens sains et atopiques.....	81
3.2.2 Comparaison du microbiote bactérien des sacs anaux entre les chiens sains, les chiens atopiques non traités et les chiens atopiques traités.....	81
3.2.3 Comparaison du microbiote bactérien du rectum entre les chiens sains, les chiens atopiques non traités et les chiens atopiques traités.....	82
3.2.4 Analogie du microbiote bactérien des sacs anaux avec celui du microbiote bactérien cutané.....	84
3.3 Conclusion	85
Références bibliographiques.....	87
Annexe A – Article publié sur le microbiote bactérien des sacs anaux de chiens sains	99
Annexe B – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés au niveau de l’aspect concave du pavillon auriculaire des chiens sains et atopiques.....	115
Annexe C – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés à la région axillaire des chiens sains et atopiques.....	116
Annexe D – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés à la région inguinale des chiens sains et atopiques.....	118
Annexe E – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés aux espaces interdigités des chiens sains et atopiques.....	119

Liste des tableaux

Tableau 1. – Cytokines, molécules vasoactives, enzymes et molécules chimiotactiques libérées par les mastocytes, basophiles et éosinophiles	26
Tableau 2. – Cytokines pro-inflammatoires dans la peau et le sang périphérique des chiens atopiques	35
Tableau 3. – L'abondance relative moyenne des principaux genres de bactéries retrouvés dans le rectum de chiens sains, de chiens atopiques non traités et de chiens atopiques recevant de l'ocloacitinib	44
Tableau 4. – Liste des principales études sur le MB cutané avec la méthodologie utilisée	45

Manuscript

Table 1. - Signalment and treatment of enrolled dogs	56
Table 2. - Cytokine concentrations (median and range) in pg/mL measured in anal sacs of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis with or without treatment	68

Liste des figures

Manuscript

Figure 1. – Mean relative abundance of the main bacterial genera (>1%) found in the anal sacs and rectum of healthy dogs and atopic dogs treated or not.62

Figure 2. – Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) indicating the bacterial taxa significantly representative of the rectal microbiota in healthy dogs and atopic dogs treated or not63

Figure 3. – Alpha diversity measurements in different sites (anal sacs and rectum) in healthy dogs and untreated and treated atopic dogs.64

Figure 4. – Principal Coordinate Analysis plots of the community membership comparing the anal sacs microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (A) and the rectum microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (B).65

Figure 5. – Principal Coordinate Analysis plots of the community structure comparing the anal sacs microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (A) and the rectum microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (B)6666

Liste des sigles et abréviations

ARNr 16S : Acide ribonucléique ribosomique 16S

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CANT : Chiens atopiques non traités

CAT : Chiens atopiques traités

CCR2 : C-C chemokine receptor type 2 (récepteur aux chimiokines C-C de type 2)

CCR3 : C-C chemokine receptor type 3 (récepteur aux chimiokines C-C de type 3)

CCR4 : C-C chemokine receptor type 4 (récepteur aux chimiokines C-C de type 4)

CCR5 : C-C chemokine receptor type 5 (récepteur aux chimiokines C-C de type 5)

CCR8 : C-C chemokine receptor type 8 (récepteur aux chimiokines C-C de type 8)

CD : Classe de différenciation

CED : Cellule dendritique

CL : Cellule de Langerhans

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CXCR3 : C-X-C chemokine receptor type 3 (récepteur de chimiokines C-X-C de type 3)

FcεRI : High-affinity IgE receptor (récepteur de haute affinité de type I)

IFN-γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IL-31Rα : Interleukin-31 receptor subunit alpha (sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine 31)

JAK : Janus kinase

MB : Microbiote bactérien

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1 (protéine chimiotactique 1 des monocytes)

NCBI : National Center for Biotechnology information

NGF- β : Facteur de croissance des nerfs bêta

NGS : Next-generation sequencing (séquençage de nouvelle génération)

NK : Natural killer cell (cellule tueuse naturelle)

OSMR β : Oncostatin M receptor beta subunit (sous-unité bêta du récepteur spécifique à l'oncostatine M)

PAR : Protease-activated receptor (récepteur activé par les protéases)

PCR : Polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)

pH : Potentiel hydrogène

QIIME : Quantitative Insights Into Microbial Ecology

SCF : Stem cell factor (facteur de croissance de cellules souches)

STAT : Signal transducer and activator of transcription (transducteur de signal et activateur de la transcription)

TARC/CCL17 : Thymus and activation-regulated chemokine (chimiokine régulée par le thymus et l'activation)

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TGF- β : Transforming growth factor beta (facteur de croissance transformant bêta)

Th : Lymphocyte T helper (lymphocyte T auxiliaire)

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)

TNFR1 : Tumor necrosis factor receptor 1 (récepteur de facteur de nécrose tumorale de type 1)

TNFR2 : Tumor necrosis factor receptor 2 (récepteur de facteur de nécrose tumorale de type 2)

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSLP : Thymic stromal lymphopietin (lymphopoiétine stromale thymique)

TYK : Tyrosine kinase

V1-V9 : Séquences variables 1 à 9

VEGF-A : Vascular endothelial growth factor A (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A)

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Frédéric Sauvé, une personne exceptionnelle comme j'en ai rarement rencontré dans ma vie. Grâce à ses encouragements, son aide, ses précieux conseils, sa patience et son écoute, j'ai pu mener à terme ce mémoire. Je ne pourrai jamais te dire à quel point je te suis reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi et pour m'avoir permis de me rendre où je suis présentement.

Je voudrais également remercier Marcio Carvalho Costa et Mariela Segura, mes co-directeurs de maîtrise, pour tout le support, l'aide et les conseils qu'ils m'ont apportés.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement les membres du jury de prendre de leur temps précieux pour réviser mon mémoire. C'est très apprécié!

Je voudrais également remercier Marêva Bleuzé et Laura pour leur aide et leur patience en laboratoire.

Un énorme merci à la Fondation MIRA qui a permis la réalisation de ce projet grâce à leur collaboration et celle de leurs chiens. Merci aussi à tous ceux qui ont participé au financement de ce projet, soient le Fonds du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et le Fonds en santé des animaux de compagnie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal en partenariat avec Zoetis.

Pour terminer, je voudrais remercier les membres de ma famille qui ont toujours été présents pour moi. Je suis choyée de vous avoir!

Chapitre 1 – Revue de littérature

1.1 Le sac anal

Les carnivores possèdent un sac anal de part et d'autre de l'anus [1-3]. Aussi appelés *sinus paranal*, les sacs anaux sont considérés comme des invaginations cutanées [2, 3]. Dans la littérature, le terme glande anale est parfois utilisé comme synonyme de sac anal, bien qu'il soit utilisé de façon erronée. Le terme « glande anale » réfère plutôt à des glandes présentes dans le canal anal, la partie qui joint le rectum à l'anus [2, 4-6]. La description ci-dessous s'applique aux sacs anaux des chiens domestiques.

1.1.1 Anatomie

Les sacs anaux sont positionnés entre le muscle lisse du sphincter interne et le muscle strié du sphincter externe de l'anus [1, 3, 4]. Lors de la défécation, le muscle strié du sphincter externe de l'anus presse le sac anal contre le canal anal, ce qui permet d'évacuer une partie du contenu du sac anal via un conduit mesurant environ entre 3 et 10 mm de long [4, 7]. Les conduits débouchent à la jonction ano-cutanée. L'ouverture des conduits, ainsi que les sacs anaux, se situent environ à 4-5 heures et à 7-8 heures au pourtour de l'anus. Plus rarement, les sacs anaux peuvent évacuer leur contenu lors d'excitation [5]. Lorsqu'ils sont remplis, la taille et la forme des sacs anaux varient d'un individu à l'autre. Ils sont alors de forme ovale à circulaire et leur taille peut atteindre jusqu'à 4 cm de diamètre [3].

Les sacs anaux et les conduits reliant les sacs anaux à la jonction ano-cutanée sont tapissés d'un épithélium pavimenteux stratifié. Chaque sac anal est composé d'un fundus et d'un « cou ». En plus d'un tissu conjonctif fibreux, des glandes apocrines sont présentes dans la paroi du fundus et des glandes sébacées sont retrouvées dans la paroi du cou. Les glandes sébacées sont également présentes dans la paroi du conduit reliant le sac anal à la jonction ano-cutanée [1, 4, 8].

1.1.2 Contenu des sacs anaux

L'apparence macroscopique et microscopique des sacs anaux est variable d'un individu à l'autre. Il semblerait que le sexe de l'animal et l'œstrus n'influencent pas la composition chimique des sécrétions des sacs anaux [3, 9]. Afin de déterminer si l'âge et la race influencent les sécrétions provenant des sacs anaux, des études prospectives et longitudinales seraient nécessaires.

1.1.2.1 Apparence macroscopique

L'apparence macroscopique normale du contenu des sacs anaux est très variable d'un chien à l'autre et elle peut varier chez un même individu. En effet, la consistance peut être liquide, visqueuse, pâteuse, mucoïde, granulaire ou mixte, tout comme la couleur peut varier de crème à brune, voire noire [3, 10, 11]. Un contenu de couleur rouge ou teinté de sang est toutefois considéré comme étant anormal, bien que des globules rouges aient été rapportés en très petite quantité à la cytologie de sacs anaux considérés sains [3, 4, 11].

1.1.2.2 Apparence microscopique

L'apparence microscopique normale du contenu des sacs anaux est similaire chez un même chien, mais varie d'un chien à l'autre [10]. Le contenu des sacs anaux est composé de sécrétions provenant des glandes apocrines et sébacées, de kératinocytes desquamés, de microorganismes, tels que les bactéries et levures, et de cellules inflammatoires [2, 3, 10-12]. À la cytologie, des cornéocytes sont souvent observés et des kératinocytes nucléés sont parfois visualisés. Différents types de bactéries (coques Gram positifs et bâtonnets Gram positifs et/ou Gram négatifs) peuvent également être présents. Leur quantité est très variable et il peut être normal d'en retrouver en très grand nombre dans les sacs anaux. Dans de rares cas, des figures de phagocytose peuvent être visualisées à la cytologie. Entre 12,5% et 63% des sacs anaux sains ont au moins une levure à la cytologie; il peut être normal d'en retrouver plus de 20 par champ à l'immersion (1000X) [3, 10, 11]. Parmi les cellules inflammatoires, des neutrophiles intacts sont rapportés dans 12,5 à 28% des sacs anaux [3, 10, 12, 13]. L'étude de Robson *et al.* rapporte la présence de leucocytes

dans tous les sacs anaux de 17 chiens en santé, incluant des neutrophiles intacts et dégénérés. Plus rarement, des lymphocytes, des macrophages et des éosinophiles peuvent être retrouvés [10-12].

1.1.3 Fonction

La fonction des sacs anaux est toujours incertaine à ce jour [2, 4]. Quelques études ont analysé les constituants chimiques présents dans les sacs anaux des chiens, afin de mieux comprendre leur utilité [9, 14]. La présence dans les sacs anaux, entre autres, d'hydrocarbures, d'acides, d'alcools, de cétones, d'aldéhydes, de composés sulfureux et de composés azotés a été démontrée [14]. Parmi ces différentes molécules, la triméthylamine, un composé azoté, semble être un constituant majeur. Ces composés volatiles auraient un rôle à jouer dans la communication olfactive et seraient à l'origine de l'odeur nauséabonde caractéristique des sacs anaux [9, 15]. Il a également été démontré que les sécrétions des sacs anaux, contrairement à l'urine, ne semblent pas avoir de rôle à jouer dans l'attraction sexuelle des mâles envers les femelles, qu'elles soient stérilisées ou non [16].

1.1.4 Maladie des sacs anaux

Les sacs anaux peuvent être affectés par différentes conditions, telles qu'une impaction, une infection ou un néoplasme [2, 4, 5]. Bien que les signes cliniques reliés aux impactions et aux infections soient similaires, les traitements sont différents [4].

1.1.4.1 Impaction

Lorsqu'un sac anal n'est pas en mesure d'excréter normalement son contenu, les sécrétions s'y accumulent. Le sac anal est alors qualifié comme étant impacté. Si cette impaction persiste, cela peut mener à une inflammation, une infection ou une abcédation du sac anal. [4] La cause exacte de cette condition est inconnue [2, 4, 17]. Certains facteurs prédisposants sont toutefois

suspectés, tels que la présence de diarrhée, l'obésité ou la constipation [4, 5, 13, 18]. Une diminution de l'efficacité du sphincter de l'anus et l'obstruction du conduit permettant aux sécrétions de s'écouler due à un changement de la consistance du contenu des sacs anaux sont d'autres hypothèses pouvant mener à une impaction [2, 4, 18]. Le traitement d'une impaction consiste à vidanger les sacs anaux en les comprimant via un toucher rectal et à traiter les facteurs prédisposants s'ils sont identifiés [2, 4, 12, 18-20].

1.1.4.2 Sacculite anale

Le terme sacculite anale désigne une inflammation du sac anal associée la plupart du temps à une infection [2]. Cette condition est relativement fréquente chez les chiens avec une incidence pouvant aller jusqu'à 12,5% [21]. La physiopathologie de la sacculite anale est toujours non élucidée à ce jour. Toutefois, en plus des facteurs prédisposants aux impactions, les dysendocrinies et la dermatite atopique sembleraient également prédisposer les chiens à développer une sacculite anale [4, 5, 18].

1.1.4.2.1 Signes cliniques

Les chiens dont les sacs anaux sont affectés peuvent démontrer différents signes cliniques. Parmi ces derniers, notons un léchage ou mordillage de la région périanale, un mordillage de la queue, un comportement de traîneau où le chien frotte sa région anale au sol, un ténesme, un inconfort lorsque le chien s'assoit, un changement de comportement, une odeur nauséabonde provenant de la région anale, une dyschésie et une hématochésie [2, 4, 5, 12, 13, 19]. Dans les cas chroniques, les sacs anaux peuvent abcéder. Une enflure et un érythème peuvent alors être visualisés dans la région du sac anal affecté et le patient présente de la douleur parfois accompagnée de pyrexie. Le sac anal formant un abcès peut éventuellement perforer et former une fistule [2].

1.1.4.2.2 Diagnostic

Bien qu'il n'y ait pas de critères clairement définis, le diagnostic de la sacculite anale repose sur les signes cliniques et l'apparence macroscopique et microscopique des sécrétions. Lorsque ces dernières sont purulentes (de couleur jaunâtre-verdâtre) ou teintées de sang, cela est habituellement suggestif d'une sacculite anale [2, 5]. À la cytologie, il peut être difficile de faire la différence entre un sac anal infecté et un sac anal sain, puisqu'un grand nombre de bactéries, de rares bactéries phagocytées et des leucocytes peuvent être observés à la cytologie d'un sac anal sain [3, 10, 11]. Lorsqu'un nombre élevé de bactéries phagocytées ou de globules rouges est présent, cela est toutefois en faveur d'une sacculite anale [4].

1.1.4.2.3 Traitements

Le sac anal affecté doit tout d'abord être vidangé à l'aide d'une expression manuelle. Un rinçage local avec de la saline est ensuite effectué, suivi d'une instillation locale d'antibiotique ou l'administration d'une antibiothérapie systémique [4, 20, 22]. Une sacculite anale sans abcédation devrait habituellement être traitée avec des instillations locales. Un antimicrobien, associé ou non à un anti-inflammatoire, est choisi en fonction des signes cliniques, des résultats de la cytologie et parfois des résultats d'une culture bactérienne avec antibiogramme. Les abcédations nécessitent toutefois une antibiothérapie systémique [2, 4, 5]. Il est également important de contrôler les facteurs pouvant prédisposer à la sacculite anale pour diminuer les risques de récurrence [4]. Une diète riche en fibres peut être utile en rendant les selles plus volumineuses. En effet, en étirant l'anus lors de la défécation, cela peut aider à compresser les sacs anaux sur le canal anal et ainsi faciliter l'expulsion des sécrétions des sacs anaux [5].

Lorsque le traitement médical n'est pas suffisant, une sacculéctomie peut s'avérer nécessaire. Cela consiste au retrait chirurgical des sacs anaux affectés. Cette chirurgie comporte toutefois des risques non négligeables, tels qu'un rétrécissement du canal anal, une incontinence fécale ou l'apparition d'un trajet fistulaire [5, 23]. Certaines de ces complications peuvent

malheureusement être permanentes. À court terme, les complications possibles incluent, entre autres, une déhiscence de plaie, une infection ou la formation d'un sérome [5, 23, 24].

1.2 La dermatite atopique

La dermatite atopique est une maladie génétique, cutanée, inflammatoire, allergique et chronique qui se manifeste par du prurit [25]. Bien que la prévalence exacte de cette condition soit inconnue dans la population canine, il est estimé que cette maladie affecte entre 20 à 30% des chiens domestiques [26]. La dermatite atopique est « associée à des immunoglobulines (Ig)E le plus souvent dirigées contre les allergènes environnementaux » [25].

La pathogenèse de la dermatite atopique n'est pas totalement connue chez les chiens. Il est toutefois bien établi qu'elle est multifactorielle et que la génétique ainsi que l'environnement y ont un rôle important [27]. Ces facteurs influencent, entre autres, l'intégrité de la barrière cutanée, notamment la matrice extracellulaire de lipides du *stratum corneum* et la filaggrine, et la réponse immunologique, ce qui prédispose certains patients à développer la dermatite atopique [28]. La présente section s'attardera davantage sur la réponse immunologique lors de dermatite atopique, puisqu'une partie de ce projet vise à évaluer la présence de cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux de chiens atopiques.

Bien qu'elle soit anormale, la réponse immunologique lors de la dermatite atopique est complexe et n'est pas complètement élucidée [4, 29, 30]. La dermatite atopique extrinsèque est la forme classique de cette condition où des anticorps IgE sont dirigés contre des allergènes le plus souvent environnementaux. La dermatite « atopique-like » ou intrinsèque est une forme où l'aspect immunologique est moins connu [30]. À la base de la réponse immunologique anormale, il y a une réaction d'hypersensibilité de type I [31, 32]. Cela mène à une infiltration cellulaire au niveau cutané composée essentiellement de cellules de Langerhans (CL), de cellules dendritiques (CED) et de lymphocytes T [30]. On retrouve dans la peau lésionnelle, entre autres, l'interleukine (IL)-1,

l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), la lymphopoiétine stromale thymique (TSLP), la chimiokine régulée par le thymus et l'activation (TARC/CCL17), le facteur de croissance de cellules souches (SCF) et le facteur de croissance des nerfs [33-40]. Selon la phase de la maladie (aigüe versus chronique), il y a une expression variable dans la peau de certaines cytokines, dont l'interféron gamma (IFN- γ), l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-12 [38, 41].

1.2.1 La réaction d'hypersensibilité de type I

La réaction d'hypersensibilité de type I débute avec les cellules dendritiques. Ces dernières sont des cellules présentatrices d'antigènes et elles ont un rôle important dans l'immunité innée, l'immunité adaptative et la tolérance périphérique [30]. Les CED se retrouvent à différents endroits, dont l'épiderme. Il existe différentes sous-populations de CED. Ces dernières n'expriment pas nécessairement les mêmes récepteurs et ne sécrètent pas forcément les mêmes cytokines et chimiokines. L'une de ces sous-populations est la CL qui se retrouve exclusivement au niveau des épithélia, dont l'épiderme [30, 42].

Lorsque la barrière cutanée est altérée, des antigènes peuvent pénétrer dans l'épiderme [27, 31, 43]. Les antigènes reconnus dans la dermatite atopique peuvent provenir de bactéries, de fungi, de parasites, d'aliments ou principalement de substances environnementales qui induisent une réponse immunitaire [4, 30]. Les CL ont des prolongements cytoplasmiques (dendrites) qui permettent de capturer les antigènes étrangers [30]. Une fois capturé, la CL internalise l'antigène et le dégrade en fragments de peptide. Selon le type d'antigène, ces fragments de peptide sont ensuite couplés à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), soit le CMH I ou le CMH II. La CL migre ensuite au nœud lymphatique régional et présente les fragments d'antigène aux lymphocytes T naïfs, ce qui permet l'activation de ces derniers [30, 31]. Selon la nature de l'antigène, une fois lié au lymphocyte T naïf, des signaux vont mener la CL à produire des cytokines qui, avec les cytokines et chimiokines environnantes, résulteront à la différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte T auxiliaire (Th)1, Th2 ou Th17, pour ne nommer que ceux-là. Lorsque l'antigène est un allergène ou un parasite, la CL va sécréter de l'IL-1 et de l'IL-6, ce qui

mènera à la différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte Th2, ou elle sécrètera de l'IL-23, ce qui mènera à la différenciation du lymphocyte T naïf en lymphocyte Th17. Par la suite, en fonction des chimiokines présentes au site inflammatoire, les lymphocytes Th1, Th2 ou autres seront attirés [30]. Les lymphocytes Th2 expriment différents récepteurs aux chimiokines, tels que les récepteurs aux chimiokines C-C de type 3 (CCR3), 4 (CCR4) et 8 (CCR8), tandis que les lymphocytes Th1 expriment les récepteurs de chimiokines C-X-C de type 3 (CXCR3) et le récepteur aux chimiokines C-C de type 5 (CCR5) [40, 44].

Une étude a démontré que les CL canins expriment la classe de différenciation (CD)1c, la CD11c, la CD80 et le CMH II. Dans le derme, certaines CED expriment également le marqueur CD11b [42]. La peau lésionnelle de chiens atopiques et la peau enflammée par une maladie inflammatoire cutanée non allergique contiennent davantage de CL et de CED dans l'épiderme et le derme, respectivement, comparativement à la peau de chiens sains et la peau non lésionnelle de chiens atopiques [42, 45]. Ces trouvailles laissent supposer que les CED ont un rôle notable dans la pathogenèse de la dermatite atopique canine.

Les lymphocytes sont l'autre classe importante de cellules inflammatoires impliquée dans la réaction d'hypersensibilité de type I. Il existe deux grandes classes de lymphocytes, soient les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les lymphocytes T sont divisés en plusieurs catégories, dont les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) qui détruisent les cellules anormales, et les lymphocytes Th et T régulateur (Treg) qui modulent la réponse du système immunitaire. Quant aux lymphocytes B, ils produisent des anticorps [30]. Les lymphocytes Th ont un rôle important à jouer dans la pathogenèse de la dermatite atopique. Tel que mentionné précédemment, il existe différentes sous-populations de lymphocytes Th, dont les lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Ces sous-populations se caractérisent par les différentes cytokines qu'elles sécrètent. Les lymphocytes Th1 mènent à l'activation des lymphocytes Tc via la sécrétion de certaines cytokines, telles que l'IL-2 et l'IFN- γ , tandis que les lymphocytes Th2 mènent à l'activation des lymphocytes B via la sécrétion de d'autres cytokines [30]. La réponse immunitaire menée par les lymphocytes Th1 inhibe dans

une certaine mesure la réponse immunitaire menée par les lymphocytes Th2 et vice versa [30, 38]. Chez les chiens sains, les lymphocytes Tc et Th sont retrouvés en faible quantité dans la peau, tandis que chez les chiens atopiques, leur quantité est plus importante dans l'épiderme (peau lésionnelle et non lésionnelle) et le derme (peau lésionnelle). Les lymphocytes Th ne semblent toutefois pas augmentés dans le derme de la peau non lésionnelle [38].

Une fois les lymphocytes Th2 activés, ils sécrètent des cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Ces cytokines activent les lymphocytes B en stimulant leur prolifération et la production d'Ig, dont l'IgE. Par la suite, la présence concomitante d'IgE et d'antigènes mène à l'activation des mastocytes et, dans une moindre mesure, des basophiles. Les mastocytes sont retrouvés, entre autres, dans l'épiderme et les basophiles sont présents dans la circulation sanguine. Les mastocytes et les basophiles ont des récepteurs de haute affinité de type I (FcεRI) qui lient les IgE [30]. Lorsqu'un antigène lie deux IgE fixés à un mastocyte ou à un basophile, cela déclenche une cascade de signalisation menant à la synthèse et la libération de facteurs inflammatoires, tels que l'histamine et plusieurs cytokines d'abord préformées, puis par la suite nouvellement synthétisées (ex. IL-4, IL-6, IL-13 etc.) [30, 31]. Il est à noter que les mastocytes peuvent aussi libérer leurs granules via des mécanismes indépendants aux IgE qui impliquent le SCF se liant au récepteur c-Kit ou les protéases se liant aux récepteurs activés par les protéases (PARs) [45]. Parmi les molécules pro-inflammatoires relâchées par les mastocytes, certaines d'entre elles peuvent générer du prurit (histamine, neuropeptides, protéases, prostaglandines, leucotriène B4), signe clinique principal de la dermatite atopique. Les médiateurs se lient à des récepteurs sensoriels spécifiques au prurit (pruricepteurs) présents dans l'épiderme, ce qui envoie des signaux au cerveau et induit la sensation de prurit [30]. Certains des facteurs inflammatoires libérés attirent les éosinophiles au site lésionnel où les éosinophiles libèrent d'autres molécules pro-inflammatoires (Tableau 1). Ces dernières créent de l'inflammation localement et des dommages tissulaires, afin d'éliminer ce qui agresse la peau [30, 45].

Tableau 1. – Cytokines, molécules vasoactives, enzymes et molécules chimiotactiques libérées par les mastocytes, basophiles et éosinophiles

	Mastocytes	Basophiles	Éosinophiles
Cytokines	IL-3 ^[30] , IL-4 ^[30] , IL-5 ^[30] , IL-6 ^[30] , IL-13 ^[30] , IL-16 ^[30] , IL-22 ^[30] , IL-25 ^[30] , facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages ^[30] , TNF- α ^[30] , SCF ^[46]	IL-4 ^[30] , IL-6 ^[30] , IL-13 ^[30] , TSLP ^[30]	IL-1 α ^[30] , IL-3 ^[30] , IL-4 ^[30] , IL-5 ^[30] , IL-6 ^[30] , IL-8 ^[47] , facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages ^[30] , TNF- α ^[30] , facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) ^[30]
Molécules vasoactives	Prostaglandines D ₂ et E ₂ ^[30, 45] , histamine ^[30] , facteur d'activation plaquettaire ^[30]	Histamine ^[30] , facteur d'activation plaquettaire ^[30]	Facteur d'activation plaquettaire ^[30]
Molécules chimiotactiques	Leucotriènes B ₄ et C ₄ ^[30, 45] , protéine chimiotactique 1 des monocytes (MCP-1) ^[45] , chimiokine du ligand 3 à motif C-C ^[45] , chimiokine du ligand 5 à motif C-C ^[45]		Leucotriènes [30]
Enzymes	Tryptases ^[30] , protéases ^[30] , kallicroïnes ^[30] , chitinases ^[30] , chymases ^[45]	Protéases ^[30]	Protéine cationique des éosinophiles ^[30] , peroxydase d'éosinophile ^[30] , arylsulfatase ^[30] , phosphatase acide ^[30]
Autres	Protéoglycanes ^[30] , sérotonine ^[30] , héparine ^[30]	Facteur d'activation plaquettaire ^[30]	Protéine basique majeure ^[30]

Chez les chiens atopiques, cette réaction est exagérée et est appelée une réaction d'hypersensibilité de type I. Avant de développer une réaction d'hypersensibilité, l'individu doit tout d'abord se sensibiliser à l'allergène, c'est-à-dire que son système immunitaire doit l'identifier et produire suffisamment d'IgE pour qu'une réaction ultérieure ait lieu (phase de sensibilisation) [30]. L'atopie implique principalement des allergènes provenant de l'environnement (pollens d'arbres et de graminées, acariens, moisissures, etc.) [30, 31, 48]. Les allergènes stimulent également d'autres types de cellules qui sécrètent différents médiateurs du prurit, d'où la réponse immunologique de la dermatite atopique est plus complexe qu'une simple réaction

d'hypersensibilité de type I. Parmi les plus importantes, notons les lymphocytes T qui sécrètent l'IL-31 et les kératinocytes qui sécrètent la TSLP [36, 38].

Ce projet visait à évaluer la présence de diverses cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-10, IL-12/IL-23p40, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, facteur de croissance des nerfs bêta (NGF- β), SCF et facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A)) dans les sacs anaux de chiens sains et atopiques. Les prochaines sous-sections décrivent donc le rôle connu de ces cytokines pro-inflammatoires dans la dermatite atopique canine.

1.2.1.1 Interféron gamma (IFN- γ)

Concernant la réponse immunitaire dans la dermatite atopique, il est maintenant connu que la réponse Th2 prédomine lors de la phase aiguë d'une lésion (12-24 heures), tandis qu'une réponse mixte (Th1, Th2, TH17 et Th22) est présente dans les lésions chroniques [38, 40, 41, 49].

L'IL-12 et l'IFN- γ induisent le facteur de transcription T-bet, ce qui promeut la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1. Une fois activé, le lymphocyte Th1 sécrète, entre autres, l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2 [30]. L'IFN- γ est un interféron de type II et est sécrété principalement par les lymphocytes Th1, les cellules tueuses naturelles (NK) et les lymphocytes Tc. Les lymphocytes B peuvent également en produire. L'IFN- γ active les macrophages et les cellules NK via la signalisation du Janus kinase (JAK)/transducteur de signal et activateur de la transcription (STAT) et inhibe l'activité des lymphocytes Th2. Son action principale est toutefois de favoriser une réponse de type Th1 en augmentant, entre autres, la production de l'IL-12 par les macrophages [30].

L'IFN- γ augmente également l'expression de la sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine 31 (IL-31R α) sur les cellules mononucléaires [49]. L'IL-31R α se lie à la sous-unité bêta du récepteur

spécifique à l'oncostatine M (OSMR β) pour former un récepteur hétérodimère pour l'IL-31 [50]. Le récepteur se trouve, entre autres, sur les cellules mononucléaires, les kératinocytes, les fibres nerveuses dermiques et dans les ganglions de la racine dorsale des neurones périphériques [30, 49, 51]. Chez les humains, lorsque l'IL-31 se lie à ce récepteur dans les ganglions de la racine dorsale, cela stimule la libération de neuropeptides. En plus de faire parvenir une perception de prurit au cerveau, les neuropeptides stimulent *in vitro* les kératinocytes et les CED à produire des cytokines pro-inflammatoires [51]. Puisque la dermatite atopique canine et la dermatite atopique humaine ont beaucoup de similarités immunologiques et que les chiens possèdent le récepteur de l'IL-31 au niveau des ganglions de la racine dorsale, un processus similaire pourrait être présent chez les chiens atopiques [49, 51, 52]. Ainsi, l'augmentation de l'expression de l'IL-31R α peut expliquer en partie la perpétuation du prurit dans la phase chronique de la dermatite atopique [49].

L'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'IFN- γ est davantage exprimé dans la peau lésionnelle de chiens atopiques comparativement à la peau non lésionnelle de chiens atopiques et à la peau de chiens sains [33, 41, 53]. Une autre étude révèle une expression plus importante de l'ARNm de l'IFN- γ dans la peau de modèles expérimentaux de chiens atopiques post-exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison [34].

Une diminution de l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ dans les cellules mononucléaires du sang périphérique a été notée chez les chiens atopiques comparativement aux chiens sains [54, 55]. Cette différence a également été démontrée chez des modèles expérimentaux de chiens atopiques en comparaison avec des chiens sains après une exposition aux extraits de pollen du cèdre du Japon [56]. L'expression de l'ARNm de l'IFN- γ dans les cellules mononucléaires du sang périphérique semblait également moindre chez les chiens atopiques dans l'étude de Koury *et al.*, mais la différence n'était pas significative [57].

1.2.1.2 Interleukine – 12 (IL-12)

Les macrophages, les CED, les lymphocytes B, les kératinocytes, les éosinophiles et les neutrophiles sont les cellules immunitaires qui produisent l'IL-12 [30, 34, 58]. Cette dernière est une protéine hétérodimère composée de deux chaînes (p35 et p40) [34, 38, 59]. Elle fait partie de la même famille que l'IL-23, l'IL-27, l'IL-35 et l'IL-39 [30]. L'IL-23 est aussi une protéine hétérodimère dont une de ses chaînes est la p40 [38]. Plusieurs types de cellules expriment l'ARNm de la protéine p35 sans nécessairement produire l'IL-12, tandis que les cellules qui expriment l'ARNm de p40 produisent l'IL-12. Ainsi, s'il y a une augmentation de l'ARNm de p35, cela ne signifie pas nécessairement qu'il y a davantage de production d'IL-12 [41]. L'IL-12 se lie à son récepteur sur les lymphocytes T et les cellules NK, ce qui mène à l'activation du STAT4, un facteur de transcription [60]. L'IL-12 stimule la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 et inhibe la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes Th2 [30]. Elle stimule également la production d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 et les cellules NK [30, 59].

Une étude n'a révélé aucune différence significative dans l'expression de l'ARNm de l'IL-12 dans la peau lésionnelle de chiens atopiques, la peau non lésionnelle de chiens atopiques et la peau de chiens sains [35]. Une autre étude a démontré une expression de l'ARNm de l'IL-12p40 diminuée dans la peau lésionnelle de chiens atopiques comparativement à la peau non lésionnelle de chiens atopiques, mais aucune différence au niveau de l'expression de l'ARNm de l'IL-12p35 entre les trois groupes (peau lésionnelle et non lésionnelle de chien atopiques et peau de chiens sains) [41]. Une dernière étude a démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-12p35 dans la peau de modèles expérimentaux de chiens atopiques post-exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison, tandis qu'il n'y avait aucune différence significative pour l'expression de l'ARNm de l'IL-12p40 pré- et post-provocation [34].

1.2.1.3 Interleukine – 2 (IL-2)

L'IL-2 est sécrétée principalement par les lymphocytes Th1, bien que d'autres cellules immunitaires, telles que les CED, les mastocytes, les lymphocytes Tc et les cellules NK, peuvent

également en produire [30]. L'IL-2 agit en se liant au récepteur IL-2 sur les lymphocytes et les kératinocytes [30, 45, 61]. L'IL-2 agit cependant principalement sur les lymphocytes : elle stimule la prolifération des lymphocytes T, favorise la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes Th (Th1 et Th2, mais pas Th17) et stimule la prolifération des lymphocytes B, ainsi que leur production d'Ig [30, 61]. L'IL-2 semble également être essentielle pour le maintien et la fonction des lymphocytes Treg. L'IL-2 stimule enfin la production d'IFN- γ via l'activation des lymphocytes Th1 et des macrophages. La cytotoxicité des lymphocytes Tc et des cellules NK est renforcée par l'IL-2 [30].

Une étude n'a pas été en mesure de mettre en évidence une différence significative de l'expression de l'ARNm de l'IL-2 dans la peau de modèles expérimentaux de chiens atopiques pré- et post-exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison [34]. L'étude de Fujiwara *et al.* conclut dans le même sens puisqu'aucune différence dans l'expression de l'ARNm de l'IL-2 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique entre des chiens sains et des modèles expérimentaux de chiens atopiques exposés aux extraits de pollen du cèdre du Japon n'a été mise en évidence [56]. L'étude de Nuttall *et al.* a cependant détecté une expression plus importante de l'ARNm de l'IL-2 dans la peau lésionnelle de chiens atopiques comparativement à la peau non lésionnelle de chiens atopiques et à la peau de chiens sains [35].

1.2.1.4 Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)

Le TNF- α est produit principalement par les macrophages et les monocytes [30]. Il y a cependant d'autres types de cellules, notamment les lymphocytes T et B, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les kératinocytes et les mastocytes, qui peuvent en produire [30, 40, 45]. Le TNF- α est une protéine transmembranaire. Elle peut se retrouver sous forme soluble, lorsque la protéase TNF- α convertase clive la protéine transmembranaire [30]. Les deux formes du TNF- α sont biologiquement actives. Le TNF- α lié à la membrane se lie au récepteur de facteur de nécrose tumorale de type 1 (TNFR1) ou 2 (TNFR2) pour médier ses actions, tandis que la forme soluble se lie au TNFR1 [30]. Ces récepteurs sont exprimés, entre autres, sur les kératinocytes [40, 58].

Le TNF- α est une molécule principalement pro-inflammatoire qui affecte surtout les petits vaisseaux sanguins. Il est responsable des signes d'inflammation locale (chaleur, enflure, douleur et érythème) [30]. Le TNF- α active, entre autres, les mastocytes, les macrophages, les neutrophiles, les CED et les lymphocytes [30, 38, 45]. Le TNF- α induit également l'apoptose des cellules tumorales via son action cytotoxique [40].

L'ARNm du TNF- α est davantage exprimé dans la peau lésionnelle de chiens atopiques comparativement à la peau non lésionnelle de chiens atopiques et à la peau de chiens sains [33, 53]. Les études de Kanwal *et al.* et de Fujiwara *et al.* concluent également à une expression plus importante de l'ARNm du TNF- α dans les cellules mononucléaires du sang périphérique de chiens atopiques comparativement aux chiens sains, et une expression plus importante de l'ARNm du TNF- α dans les cellules mononucléaires du sang périphérique après une exposition à des extraits de pollen du cèdre du Japon chez des modèles expérimentaux de chiens atopiques comparativement à des chiens sains [56, 62]. Dans l'étude de Koury *et al.*, l'expression de l'ARNm du TNF- α semble aussi plus importante dans les cellules mononucléaires du sang périphérique chez les chiens atopiques comparativement aux chiens sains, bien que la différence ne soit pas significative [57]. Une autre étude n'a cependant démontré aucune différence dans l'expression de l'ARNm du TNF- α dans la peau de modèles expérimentaux de chiens atopiques pré- et post-exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison [34]. Malgré cette dernière étude, il est suggéré dans la littérature que le TNF- α aurait un rôle important dans la pathogenèse de la dermatite atopique [62].

1.2.1.5 Interleukine – 6 (IL-6)

Ce sont principalement les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes T, dont les lymphocytes Th17, qui produisent l'IL-6. La production de l'IL-6 est stimulée par le TNF- α , l'IL-1 et les endotoxines bactériennes. L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui a aussi des propriétés anti-inflammatoires. En effet, l'IL-6 a une action suppressive sur le TNF- α et l'IL-1, des cytokines pro-inflammatoires, et elle stimule la libération de l'IL-10, une cytokine inhibant la réponse

inflammatoire. Parmi les effets de l'IL-6 sur les lymphocytes T, notons la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17, la stimulation de la réponse Th2 et l'inhibition des lymphocytes Treg. L'IL-6 active également les lymphocytes B [30].

Une étude a démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans la peau de modèles expérimentaux de chiens atopiques après une exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison [34]. Une autre étude n'a cependant révélé aucune différence dans l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique entre des chiens sains et des modèles expérimentaux de chiens atopiques exposés aux extraits de pollen du cèdre du Japon [56].

1.2.1.6 Interleukine – 10 (IL-10)

L'IL-10 est principalement sécrétée par les lymphocytes Treg, bien que les macrophages, les CED classiques, certains lymphocytes Th et, dans une moindre mesure, les neutrophiles, les mastocytes, les kératinocytes, les lymphocytes B et les cellules NK participent également à sa production [30, 45]. Les cellules impliquées dans les réactions allergiques (mastocytes, éosinophiles, basophiles) voient leurs effets indirectement inhibés via la suppression des lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Plus spécifiquement, la synthèse de certaines cytokines par les lymphocytes Th1 (IL-1, IL-2, IFN- γ et TNF- α) et Th2 (IL-4 et IL-5) est inhibée par l'IL-10. L'IL-10 inhibe également la production de l'IL-6 et du TNF- α par les macrophages, ainsi que la production de l'IFN- γ et du TNF- α par les cellules NK [30]. Il est à noter que l'IL-10, en plus de ses propriétés immunosuppressives, aurait des propriétés pro-inflammatoires en favorisant une réponse de type Th2. Ainsi, lorsque l'IL-10 est détectée dans la peau ou le sang de chiens atopiques, il est difficile de savoir si elle contribue à l'inflammation ou si elle tente de diminuer l'inflammation. Cela pourrait aussi expliquer en partie les résultats contradictoires obtenus de différentes études [38].

L'expression de l'IL-10 n'est pas différente dans la peau lésionnelle ou non lésionnelle d'un chien atopique versus la peau d'un chien sain, ni même au niveau de la peau pré- et post-exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison chez des modèles expérimentaux de chiens atopiques [34, 35]. Une étude a cependant conclu à une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-10 dans la peau lésionnelle et non lésionnelle de chiens atopiques comparativement à la peau de chiens sains [41].

Une autre étude n'a révélé aucune différence dans l'expression de l'ARNm de l'IL-10 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique entre des chiens sains et des modèles expérimentaux de chiens atopiques exposés aux extraits de pollen du cèdre du Japon [56]. Ces conclusions sont similaires à celles de l'étude d'Hayashiya *et al.* qui comparait des chiens atopiques à des chiens sains [54]. L'étude de Koury *et al.* a cependant démontré une expression moindre de l'ARNm de l'IL-10 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique chez des chiens atopiques en comparaison avec des chiens sains [57].

1.2.1.7 Autres cytokines évaluées dans ce projet de recherche

D'autres cytokines pro-inflammatoires ayant une importance moindre dans la dermatite atopique canine ou qui ont été moins étudiées ont été évaluées dans ce projet: l'IL-8, le NGF- β , la MCP-1, le SCF et le VEGF-A. Cette section vise à faire un bref résumé de leur nature.

L'IL-8 est une chimiokine pro-inflammatoire produite principalement par les macrophages et les cellules endothéliales, mais aussi par les kératinocytes [30, 45]. Elle participe au recrutement des neutrophiles et à leur activation. L'IL-8 favorise la dégranulation des neutrophiles, ainsi que leur explosion oxydative qui mène à la destruction des bactéries phagocytées [30]. Une étude n'a démontré aucune différence dans l'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans la peau de modèles expérimentaux de chiens atopiques pré- et post-exposition aux extraits d'acariens de poussière de maison [34]. Une autre étude a cependant démontré une expression plus importante de

l'ARNm de l'IL-8 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique en réponse à une exposition aux extraits de pollen du cèdre du Japon chez des modèles expérimentaux de chiens atopiques comparativement à des chiens sains [56].

Le NGF peut stimuler la croissance des nerfs. Il est produit principalement par les kératinocytes, mais aussi dans une moindre mesure par les fibroblastes. Une immunofluorescence indirecte a démontré une réactivité au NGF plus importante dans l'épiderme de la peau de chiens atopiques que dans la peau de chiens sains. En effet, chez les chiens sains, le NGF semble localisé seulement dans le *stratum granulosum*, tandis que le NGF semble s'étendre jusqu'au *stratum spinosum* de l'épiderme des chiens atopiques. Le nombre et la densité des fibres nerveuses intra-épidermiques sont également plus importants chez les chiens atopiques que les chiens sains [37]. Le rôle du NGF reste toutefois à définir dans la pathogenèse de la dermatite atopique.

La MCP-1, une chimiokine, est produite par les neutrophiles et les cellules endothéliales lorsqu'ils sont stimulés par l'IL-6 [30]. La MCP-1 se lie au récepteur aux chimiokines C-C de type 2 (CCR2) sur les monocytes et macrophages, afin de réguler leur migration et leur infiltration [63]. Chez les humains atopiques, la MCP-1 est aussi produite par les kératinocytes stimulés par l'IFN- γ et le TNF- α . La MCP-1 est également augmentée dans le sérum des humains atopiques [63]. Son rôle dans la dermatite atopique canine est cependant peu connu.

Le SCF est une cytokine qui se lie au récepteur tyrosine kinase c-Kit [64]. Le SCF est produit par les fibroblastes et les kératinocytes [39]. Il joue un rôle dans le développement, la différenciation et la prolifération des mastocytes, en plus d'être un agent chimiotactique pour eux [39, 64]. Le SCF est retrouvé en quantité plus importante dans la peau de chiens atopiques comparativement à la peau de chiens sains [39].

Le VEGF-A est une cytokine produite par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. Il a un rôle dans l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, la guérison tissulaire et le développement de tumeur. Une étude n'a pas détecté le VEGF-A dans le sérum de chiens atopiques et sains. Dans cette même étude, la concentration du VEGF-A était similaire dans le *stratum corneum* de chiens atopiques et celui de chiens sains [65].

Le Tableau 2 présente un résumé des études ayant évalué les cytokines pro-inflammatoires dans la peau et le sang périphérique des chiens atopiques.

Tableau 2. – Cytokines pro-inflammatoires dans la peau et le sang périphérique des chiens atopiques.

	Peau			Sérum ou sang entier		
	Augmenté dans la peau lésionnelle (L) ou non lésionnelle (NL)	Diminué dans la peau lésionnelle (L) ou non lésionnelle (NL)	Aucun changement ou non détecté dans la peau lésionnelle (L) ou non lésionnelle (NL)	Augmenté dans le sérum ou le sang entier	Diminué dans le sérum ou le sang entier	Aucun changement ou non détecté dans le sérum ou le sang entier
Chiens atopiques						
Transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase	TARC (L) ^[33, 44] , IL-1 β (L) ^[33] , IFN- γ (L) ^[33, 35, 41] , TNF- α (L) ^[33, 35] , CCR4 (L) ^[44] , IL-4 (L, NL) ^[35] , IL-2 (L) ^[35] , IL-13 (L, NL) ^[41] , IL-10 (L, NL) ^[41] , IL-33 (L) ^[66] , TSLP (L, NL) ^[36]	TFG- β (L, NL) ^[35]	IL-4 (L, NL) ^[33, 41] , IL-6 (L, NL) ^[35] , IL-10 (L, NL) ^[35] , IFN- γ (NL) ^[33, 35] , TNF- α (NL) ^[33, 35] , IL-12p35 (L, NL) ^[35, 41] , IL-12p40 (L, NL) ^[35] , TFG- β (L, NL) ^[41] , IL-31 (L, NL) ^[67] , IL-1 β (NL) ^[33] , TARC (NL) ^[33] , PAR-2 (L, NL) ^[68] , IL-31 ^[67] , IL-2 (NL) ^[35]	IL-5 ^[54] , IL-31 ^[57, 62] , TFG- β 1 ^[57] , IL-13 ^[62] , TNF- α ^[62]	IL-4 ^[55] , IFN- γ ^[54, 55] , IL-10 ^[57]	IL-4 ^[54, 57] , IL-10 ^[54] , IL-13 ^[57] , TNF- α ^[57] , IFN- γ ^[57]
ELISA				TARC ^[69] , IL-34 ^[70]		

Immunoessai				IL-31 ^[50] , IL-8 ^[71] , IL-7 ^[71] , IL-15 ^[71]	SCF ^[71]	MCP-1 ^[71] , chimiokine du ligand 10 à motif C-X-C ^[71] , facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages ^[71] , IFN- γ ^[71] , IL-2 ^[71] , IL-4 ^[71] , IL-6 ^[71] , IL-10 ^[71] , IL-18 ^[71] , chimiokine du ligand 1 à motif C-X-C ^[71] , TNF- α ^[71] , NGF- β ^[71] , IL-12p40 ^[71] , VEGF-A ^[71] , TGF- β ^[71]
Immunohistochimie	TARC/CCL17 (L) ^[72]					
Cytométrie de flux				CCR4 ^[73]		
Modèles expérimentaux de chiens atopiques						
Transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase	IFN- γ ^[34] , IL-6 ^[34] , IL-12p35 ^[34] , IL-13 ^[34] , IL-18 ^[34] , TARC ^[34]		TNF- α ^[34] , IL-12p40 ^[34] , IL-10 ^[34] , chimiokine du ligand 5 à motif C-C ^[34] , IL-5 ^[34] , IL-2 ^[34] , IL-4 ^[34] , IL-8 ^[34]	IL-8 ^[56] , TNF- α ^[56]	IFN- γ ^[56]	IL-18 ^[56] , IL-1 β ^[56] , IL-6 ^[56] , IL-10 ^[56] , TGF- β ₁ ^[56] , IL-4 ^[56] , IL-2 ^[56]
ELISA				IL-4 ^[49] , IL-31 ^[49]		

1.3 Le microbiote bactérien

Le microbiote représente l'ensemble des micro-organismes (archées, virus, champignons, bactéries, eucaryotes) présents dans un environnement spécifique, tandis que le microbiome représente l'ensemble des gènes des micro-organismes retrouvés dans cet environnement, ainsi que leurs métabolites [74, 75]. Lorsqu'une étude évalue seulement la classification taxonomique, celle-ci devrait donc se limiter au terme microbiote [74, 75]. Le microbiote bactérien (MB) se limite à l'ensemble des bactéries, ce qui signifie qu'il n'inclut pas les autres micro-organismes. Puisqu'une partie de ce projet visait à évaluer le MB dans les sacs anaux de chiens atopiques, cette section se concentra sur le MB.

1.3.1 Les termes utilisés en relation avec le microbiote bactérien

Cette sous-section vise à définir les différents termes utilisés dans les études du MB.

1.3.1.1 Taxon

En biologie, les êtres vivants (bactéries, mammifères, etc.) sont classifiés en différents rangs taxonomiques du règne à l'espèce (règne, phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce). Lorsqu'on réfère au terme taxon, cela signifie que le rang taxonomique n'est pas précisé [75].

1.3.1.2 Communauté bactérienne

Lorsqu'il y a au moins deux espèces bactériennes présentes dans un environnement, le terme communauté bactérienne peut être employé [75].

1.3.1.3 Diversité alpha

La diversité alpha représente des indices utilisés pour définir les espèces bactériennes retrouvées dans une communauté [75]. La richesse et l'équitabilité (ou *evenness* en anglais) sont des composantes de la diversité alpha. La richesse représente le nombre d'espèces bactériennes retrouvées dans une communauté, tandis que l'équitabilité représente dans quelle proportion on retrouve ces différentes espèces bactériennes dans la même communauté [74-76].

Il y a différents indices (Chao, Shannon, Simpson) utilisés dans les études de microbiote pour mesurer la diversité alpha. L'indice de Chao est un estimateur de la richesse, tandis que les indices de Shannon et de Simpson sont des estimateurs de l'équitabilité [74, 76].

1.3.1.4 Diversité bêta

Pour comparer la diversité entre plusieurs communautés ou dans une même communauté, mais à des moments différents, la diversité bêta est utilisée. Elle évalue la similarité ou la dissimilarité entre les communautés [75, 77]. L'appartenance à la communauté est une mesure de la diversité bêta qui évalue quels taxa sont présents ou absents dans les communautés. La structure de la communauté est une autre mesure de la diversité bêta qui évalue l'abondance relative des taxa entre les différentes communautés [75]. Ces différentes mesures peuvent être représentées par des méthodes d'ordinations, telles que l'analyse en composantes principales et l'analyse en coordonnées principales. Ces figures multidimensionnelles permettent de visualiser les similarités entre les différentes communautés. D'autres méthodes visuelles peuvent être utilisées pour comparer les similarités et les dissimilarités entre les communautés, telles que le dendrogramme ou la courbe de raréfaction [75]. L'indice de Jaccard peut également être utilisé pour évaluer l'appartenance à la communauté, tandis que les indices de Bray-Curtis, et Yue et Clayton peuvent être utilisés pour évaluer la structure de la communauté [74, 78].

1.3.2 Techniques utilisées pour caractériser le microbiote bactérien

Au cours des dernières décennies, de nouvelles méthodes moléculaires, telles que le séquençage d'acide désoxyribonucléique (ADN) à haut débit, aussi appelé technique de séquençage de nouvelle génération (NGS), ont vu le jour afin de mieux identifier l'ensemble des bactéries présentes dans un échantillon. La culture bactérienne était auparavant la méthode utilisée pour déterminer les bactéries présentes dans un milieu spécifique [75].

1.3.2.1 La culture bactérienne

La culture bactérienne est un moyen *in vitro* utilisé pour isoler les bactéries présentes dans un échantillon. L'échantillon est étalé sur un milieu de culture solide ou mélangé à un milieu de culture liquide, puis incubé pendant un certain temps [79]. Il est bien connu que les bactéries ont des propriétés biochimiques distinctes qui permettent de les différencier. Il existe donc plusieurs

milieux de culture avec différentes propriétés, afin de favoriser la croissance de bactéries distinctes. Parmi les principaux facteurs influençant la croissance d'une bactérie dans un milieu de culture, notons l'atmosphère (le taux d'oxygène dans l'incubateur), le potentiel hydrogène (pH), la température, le temps d'incubation, les inhibiteurs de croissance sélectifs, tels que les antibiotiques et antiseptiques, et les nutriments essentiels ajoutés [79-81]. Malgré les différents milieux de culture existants, il est estimé que moins de 20% des bactéries sont isolées en milieu de culture [81, 82]. Cela a pour conséquence de sous-estimer la richesse d'un échantillon et de surestimer la présence d'une bactérie. La bactérie qui croît en milieu de culture n'est donc pas nécessairement celle qui est la plus abondante [75].

1.3.2.2 Le séquençage d'ADN à haut débit

Le NGS se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ADN est extrait d'un échantillon. Des amorces sont ensuite utilisées pour amplifier un gène spécifique. Pour l'étude du MB, c'est le gène de l'acide ribonucléique ribosomique 16S (ARNr 16S) qui est amplifié par la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Le gène de l'ARNr 16S code pour une protéine de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ce gène, en plus d'évoluer lentement, est commun à tous les procaryotes, dont les bactéries et les archées, et comprend neuf séquences conservées et neuf séquences variables (V1-V9). Les séquences conservées sont des séquences d'acides nucléiques identiques ou très similaires qui sont, dans ce cas-ci, retrouvées chez tous les procaryotes. Les amorces reconnaissent les séquences conservées. Le séquençage des régions variables permet ensuite la classification taxonomique de la bactérie [83].

La PCR comprend trois phases, soient la phase de dénaturation, celle d'appariement des amorces et la phase d'élongation. Au cours de la phase de dénaturation, les brins d'ADN sont séparés. Cela permet aux amorces sens et antisens de se lier aux brins d'ADN (2^e phase). Une enzyme de polymérase d'ADN synthétise ensuite le nouveau brin complémentaire à partir de l'amorce liée à son brin d'ADN (3^e phase). Ce cycle peut se répéter à plusieurs reprises et à chaque cycle, la quantité de matériel génétique dans l'échantillon double [84].

Une fois la PCR terminée, les amplicons sont ensuite séquencés [83]. Différentes plateformes de séquençage, telles que l'Illumina, sont disponibles [85]. La classification se fait souvent selon le genre de la bactérie et non selon l'espèce, car le gène de l'ARNr 16S n'est pas séquencé dans son intégralité; habituellement, une à trois régions variables sont séquencées [83, 85]. La composition bactérienne d'un échantillon peut donc varier selon les régions variables séquencées. Les régions V4, V5 et V6 seraient les plus fiables pour déterminer la composition bactérienne d'un échantillon lors de profilage taxonomique avec la technologie de séquençage Illumina [85]. Les séquences obtenues sont classées en unités taxonomiques opérationnelles et sont comparées à une base de données publiques, telles que le National Center for Biotechnology information (NCBI), afin d'identifier les bactéries [83, 86]. Des plateformes logicielles, telles que Mothur ou Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME), sont ensuite utilisées pour l'analyse bio-informatique des données [83, 85].

En plus de ne pas être en mesure de déterminer si le matériel génétique mis en évidence est mort ou vivant, cette méthode ne permet pas de déterminer si les bactéries mises en évidence sont résidentes ou transitoires. Ainsi, la méthode ne permet pas de savoir si les bactéries présentes font partie intégrante du microbiote résident [75].

1.3.3 Facteurs influençant le microbiote bactérien cutané

Différents facteurs techniques ou biologiques peuvent influencer les résultats obtenus lors de l'évaluation du MB, ce qui rend difficile la comparaison entre les différentes études. Parmi les facteurs techniques pouvant affecter les résultats de la composition du MB, notons l'échantillonnage, l'entreposage des échantillons, la méthode d'extraction de l'ADN, la sélection des amorces pour la PCR, la méthode utilisée pour le séquençage et la plateforme logicielle utilisée [83, 85].

Il y a très peu d'études sur le MB cutané chez les chiens et celles existantes s'appuient pour la plupart sur un petit nombre de cas et utilisent rarement la même méthodologie. Les candidats sélectionnés sont également très variables (race, âge, etc.). Il en résulte donc quelques contradictions sur les facteurs biologiques. Par exemple, certaines études concluent que la race n'affecte pas significativement la composition du MB cutané chez les chiens, tandis que d'autres arrivent à la conclusion inverse [87-90]. D'autres études sur un plus grand nombre de cas incluant davantage de races et d'individus à différents stades de leur vie, et utilisant la même méthodologie seraient nécessaires pour avoir un meilleur aperçu des facteurs biologiques influençant réellement le MB cutané.

1.3.3.1 L'individu et l'âge

Il y a une variation interindividuelle importante du MB cutané [87-93]. L'individu serait le facteur qui influencerait le plus la composition du MB cutané chez les chiens [87, 88, 91, 92].

Plusieurs études ont conclu que l'âge n'influencerait pas le MB cutané chez les chiens [89, 90, 94]. Ces études n'avaient cependant pas pour objectif de comparer le MB cutané des chiots à celui des chiens adultes, contrairement à l'étude de Rodriguez-Campos *et al.* où le MB cutané de 143 terriers blancs du West Highland, dont 109 chiots et 34 adultes, a été évalué. Cette étude a démontré que les adultes avaient une diversité bactérienne plus importante que les chiots au niveau du MB cutané [89, 90, 95].

1.3.3.2 Site d'échantillonnage

Le site d'échantillonnage influence également la composition du MB cutané [87, 88, 90, 91, 96]. En effet, le nombre d'espèces bactériennes présent est moins important au niveau des muqueuses, telles que la conjonctive oculaire et la muqueuse nasale, et des jonctions muco-cutanées chez un même chien comparativement aux endroits avec pilosité, tels que les régions inguinale, axillaire, lombaire et péri-oculaire, l'aspect concave du pavillon auriculaire, le museau

et les espaces interdigités [90, 91]. Au sein des régions poilues, certaines études démontrent une différence entre les différents sites [90, 91]. Une autre étude a cependant démontré que le site d'échantillonnage n'affectait pas de façon significative le MB cutané chez les chiens. Cette étude a néanmoins évalué le MB de seulement trois régions (cou dorsal, région axillaire et abdomen), excluant les jonctions muco-cutanées et les muqueuses [89].

1.3.3.3 Le sexe et la couleur du pelage

Deux études ont démontré une différence dans la composition du MB cutané chez les chiens entre les mâles et les femelles [91, 96]. Entre autres, l'abondance relative de la famille des *Enterobacteriaceae* semble plus importante chez les femelles au niveau de l'abdomen et de la région axillaire comparativement aux mâles [91]. Il y a par contre quelques études qui n'ont démontré aucune différence du MB cutané entre les mâles et les femelles [89, 90, 95]. Quant à elles, la couleur de la robe et la longueur du pelage ne semblent pas affecter la composition du MB cutané [89, 91].

1.3.3.4 Région géographique et style de vie

La région géographique où vit l'animal semble impacter le MB cutané, tout comme la saison où les échantillons sont prélevés [89, 95]. En effet, il semble que la composition du MB cutané pourrait varier à seulement quelques semaines d'écarts [92]. Les communautés bactériennes sont également davantage similaires chez les chiens qui vivent ensemble versus les chiens qui ne partagent pas le même environnement [89].

Une différence significative de la diversité bêta du MB cutané a été notée entre les chiots ayant accès à l'extérieur et ceux sans accès [95]. La quantité de temps passée à l'extérieur ne semble cependant pas influencer la composition du MB cutané [90]. Le niveau d'hygiène où les chiots vivent, plus précisément le nombre de nettoyages effectués par semaine (entre un et sept), affecterait également la diversité bêta du MB cutané [95].

1.3.3.5 Les traitements

Certains traitements semblent influencer la composition du MB cutané, tandis que d'autres non. La diversité du MB cutané est accrue par l'utilisation du shampoing Malaseb®, contenant de la chlorhexidine et du miconazole, deux fois par semaine pour trois semaines consécutives chez des chiens sains et atopiques, tandis qu'il n'y a aucun changement au niveau du MB cutané avec l'utilisation de la cyclosporine ou de la prednisone par voie orale pendant un mois chez des chiens atopiques [88, 92]. Il n'y a également aucun changement du MB cutané entre les bergers allemands atopiques traités avec l'occlacitinib et ceux n'en recevant pas [96]. Cette dernière étude est cependant en contradiction avec celle de Thomsen *et al.* où il a été démontré que l'occlacitinib affecte la composition du microbiote bactérien de la peau et du rectum chez des shiba inus atopiques [97]. La composition du MB de la peau et du rectum des shiba inus recevant de l'occlacitinib se rapprochait même de celle des shiba inus sains [97].

1.3.4 Le microbiote bactérien des sacs anaux et du rectum

La seule étude évaluant le MB des sacs anaux de chiens sains est celle de Bergeron *et al.* retrouvée à l'Annexe A. Cette étude ne sera cependant pas discutée ici, puisque les mêmes 15 chiens en santé ont été utilisés dans ce projet. Il y a une étude qui a cependant évalué le MB du rectum chez des shiba inus [97]. Dans cette étude, il y avait trois groupes : chiens sains, chiens atopiques non traités et chiens atopiques recevant de l'occlacitinib. Les principaux genres bactériens retrouvés dans le rectum de l'étude de Thomsen *et al.* sont listés dans le Tableau 3 [97].

Tableau 3. – L’abondance relative moyenne des principaux genres de bactéries retrouvés dans le rectum de chiens sains, de chiens atopiques non traités et de chiens atopiques recevant de l’oclocitinib

Genres de bactéries	Chiens sains (%)	Chiens atopiques non traités (%)	Chiens atopiques recevant de l’oclocitinib (%)
<i>Escherichia/Shigella</i> spp.	2,5	19,4	15,8
<i>Bacteroides</i> spp.	4,8	18,1	5,2
<i>Fusobacterium</i> spp.	20,6	0,1	2,4
<i>Bacteroidaceae unclassified</i> spp.	16,2	8,7	18,9
<i>Megamonas</i> spp.	18,4	0,0	4,2

Cette étude a démontré une dysbiose au niveau du rectum chez les chiens atopiques. Avec le traitement d’oclocitinib, la dysbiose semblait toutefois s’atténuer, c’est-à-dire que la composition bactérienne du rectum semblait se rapprocher de celle des chiens sains [97].

1.3.5 Le microbiote bactérien cutané

Les bactéries résident à trois endroits au niveau de la peau, soient à sa surface épidermique, dans les glandes sébacées et dans les follicules pileux [86, 98]. L’ADN des bactéries retrouvées dans le derme et l’hypoderme est comparable à celui retrouvé dans les contrôles négatifs, ce qui suggère que le MB ne se trouve pas à ces endroits [93]. Depuis l’avènement du NGS, il a été établi que la peau est habitée par une population bactérienne beaucoup plus importante et diversifiée que ce qui avait été démontré avec les cultures bactériennes [89, 90]. Puisqu’il y a peu d’études sur le MB des sacs anaux et que les sacs anaux sont une invagination de la peau, il est intéressant de s’attarder sur le MB cutané des chiens sains et atopiques [2, 3, 99]. Dans les dernières années, quelques études ont vu le jour sur le sujet. Il est cependant difficile d’établir des comparaisons justes, puisque les études n’emploient pas toutes la même méthodologie [87-93, 95-97, 100, 101]. Les méthodologies utilisées des principales études ont été résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4. – Liste des principales études sur le MB cutané avec la méthodologie utilisée

Études	Nombre et profil des chiens à l'étude	Endroits échantillonnés	Méthode de séquençage utilisée	Régions variables (V) du gène ARNr 16S	Plateforme logicielle utilisée pour l'analyse bio-informatique
Rodrigues Hoffmann <i>et al.</i> , 2014	12 sains 6 atopiques	Muqueuse nasale droite, aspect dorsal du nez à droite, commissure des lèvres droite, conjonctive oculaire droite, région péri-oculaire droite, canal auriculaire droit, aspect concave du pavillon auriculaire droit, région lombaire droite, région axillaire droite, aine droite, région périanale dorsale, espace dorsale entre les doigts 4 et 5 du pied avant droit	Séquençage 454	V1-V3	QIIME
Bradley <i>et al.</i> , 2016	16 sains 14 atopiques	Aspect concave du pavillon auriculaire, gueule et régions axillaire et inguinale	Illumina Miseq	V1-V3	QIIME
Pierezan <i>et al.</i> , 2016	8 atopiques (modèles expérimentaux)	Régions inguinales droite et gauche	Illumina MiSeq	V4	QIIME
Torres <i>et al.</i> , 2017	40 sains	Région axillaire, cou dorsal et abdomen	Illumina Miseq	V1-V3	QIIME
Cuscó <i>et al.</i> , 2017	9 sains	Aspect concave du pavillon auriculaire, dos, région périanale, abdomen, espaces interdigités, région axillaire, menton, peau entre le nez et la lèvre supérieure	Ion Torrent Personal Genome Machine	V1-V2	QIIME
Cuscó <i>et al.</i> , Belanger, 2017	35 sains	Aspect concave du pavillon auriculaire droit, menton à droite, peau entre le nez et la lèvre supérieure à droite, dos à droite, région axillaire droite, abdomen à droite, région périanale, espaces interdigités du pied avant droit	Ion Torrent Personal Genome Machine	V1-V2	QIIME

Widmer <i>et al.</i> , 2018	6 atopiques (modèles expérimentaux)	Aspect concave du pavillon auriculaire et région inguinale	Illumina MiSeq	V1, V2	Mothur
Chermprapai <i>et al.</i> , 2019	6 sains 3 atopiques	Régions axillaire, inguinale et péri-oculaire et aspect latéral du thorax	Illumina Miseq	V3-V6	QIIME
García-Fonticoba <i>et al.</i> , 2020	7 sains	Abdomen	Ion Torrent Personal Genome Machine	V4	QIIME 2
Rodriguez-Campos <i>et al.</i> , 2020	34 adultes sains 109 chiots sains	Région axillaire et gueule	Illumina MiSeq	V3-V4	SILVA
Apostolopoulos <i>et al.</i> , 2021	12 sains 12 atopiques	Régions axillaire et inguinale gauche, espaces interdigités dorsaux à gauche, conduit auditif gauche	Illumina Miseq	V3-V6	SILVA
Thomsen <i>et al.</i> , 2022	20 sains 20 atopiques	Abdomen, régions axillaire gauche, péri-labiale, périnéale et inguinale gauche, pavillon auriculaire gauche, carpe gauche, flanc gauche, pied avant gauche, pied arrière gauche, aspect palmaire des métacarpes à gauche et aspect ventral de la queue	Illumina MiSeq	V1-V2	Mothur et SILVA

1.3.5.1 Les principaux phyla et genres bactériens retrouvés sur la peau de chiens sains et atopiques

Les endroits les plus fréquemment échantillonnés au niveau de la peau sont l'aspect concave des pavillons auriculaires, les régions axillaire et inguinale et les espaces interdigités. Les principaux phyla et genres bactériens retrouvés à ces différents endroits sont présentés sous forme de tableaux dans les Annexes B, C, D et E.

Globalement, quelques points importants et communs se dégagent des études sur le MB cutané. D'abord, les Protéobactéries sont en général le principal phylum retrouvé sur la peau de chiens

sains et atopiques, suivi par les phyla des Firmicutes, des Actinobactéries et des Bactéroïdètes. Les deux autres phyla retrouvés couramment sur la peau sont ceux des Fusobactéries et des Cyanobactéries. Puis, parmi les principaux genres bactériens retrouvés sur la peau de chiens sains et atopiques, il y a les *Sphingomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Porphyromonas* spp. et *Bacillus* spp. L'abondance relative de ces différents phyla et genres varie cependant d'une étude à l'autre, d'un site anatomique à l'autre et parfois même du chien allergique à non allergique [87, 90-92, 96, 97].

1.3.5.2 Les différences entre le microbiote bactérien cutané des chiens sains versus celui des chiens atopiques

Bien qu'il ne soit pas clair si la dysbiose cutanée notée chez les chiens atopiques est une conséquence directe de la maladie ou une cause, il semble clair que le MB cutané des chiens atopiques diffère de celui des chiens sains [88, 90, 97, 100]

La peau de chiens sains est plus riche en espèces bactériennes comparativement à la peau de chiens atopiques et elle a un MB plus diversifié [90, 100]. Une tendance similaire a été observée dans l'étude de Chermrapai *et al.* [88]. Il a été suggéré que l'inflammation de la peau des chiens atopiques pourrait entraîner des changements menant à une richesse diminuée [90]. De façon intéressante, les antibiothérapies orales et l'utilisation d'antiseptiques localement semblent augmenter la diversité bactérienne chez les chiens atopiques. Par contre, lorsque les traitements sont cessés, la diversité bactérienne diminue de nouveau [88, 100]. Une autre étude a cependant énoncé des conclusions un peu différentes [96]. En effet, bien que l'étude d'Apostolopoulos *et al.* ait conclu que la composition du MB cutané était différente entre 12 bergers allemands sains et 12 bergers allemands atopiques au niveau du conduit auditif et des régions inguinale et axillaire, la différence n'était pas significative au niveau des espaces interdigités dorsaux contrairement à l'étude de Hoffmann *et al.* [90, 96]. La richesse n'était également pas différente entre les chiens atopiques et les chiens sains, sauf pour la région axillaire où la richesse bactérienne était significativement moindre chez les chiens atopiques comparativement aux chiens sains [96]. Une

étude a également démontré que la bactérie *Ralstonia* spp. était plus abondante sur la peau de chiens sains versus celle de chiens atopiques [90]. Aucune autre étude n'a cependant corroboré ce fait [87, 91, 96, 97, 100].

Une étude a démontré que l'abondance relative du *Staphylococcus* spp. (particulièrement le *Staphylococcus pseudintermedius*) et du *Corynebacterium* spp. était plus importante lors d'un épisode aigu chez les chiens atopiques [100]. Cela a également été démontré chez des chiens ayant une dermatite atopique non spontanée (modèles expérimentaux de dermatite atopique après exposition locale à un extrait de *Dermatophagoides farinae*). Après 28 jours, l'abondance relative du *Staphylococcus pseudintermedius* à la région exposée semblait se normaliser à la valeur avant la provocation [101]. Par contre, d'autres études n'ont démontré aucune différence dans l'abondance relative du *Staphylococcus* spp. et du *Corynebacterium* spp. entre les chiens sains et les chiens atopiques [90, 96]. Ces différences pourraient s'expliquer par les différentes méthodologies utilisées, mais aussi par le fait que dans les études de Bradley *et al.* Et de Pierezan *et al.*, les échantillons ont été prélevés lors d'un épisode où il y avait une exacerbation des signes cliniques chez les chiens atopiques [100, 101].

1.3.6 Le rôle du microbiote

Le MB est composé d'une population bactérienne résidente et d'une population bactérienne transitoire. Le microbiote résident comprend les bactéries qui colonisent un endroit (par exemple, la peau) de façon permanente et habituellement de façon stable. Cette population se renouvelle rapidement lorsqu'elle est affectée. Le microbiote transitoire est composé, quant à lui, de bactéries qui colonisent le même endroit temporairement (de quelques heures à quelques jours). Ce sont habituellement des bactéries environnementales acquises par contact direct. Les bactéries pathogènes peuvent être à la base des bactéries résidentes (aussi appelées commensales) ou transitoires [98]. Le rôle du MB est encore peu compris et mal défini [98]. Il module l'immunité innée et l'immunité adaptative, tout en interagissant constamment avec les

cellules immunitaires et les kératinocytes, afin de maintenir l'intégrité de la peau et prévenir la colonisation de la peau par des agents pathogènes [26, 102].

Le MB joue un rôle important dans le développement de la tolérance du système immunitaire via l'activation de lymphocytes Treg [26, 74]. En effet, moins un MB est diversifié, moins le système immunitaire est exposé à des antigènes différents, ce qui affecte le développement de la tolérance du système immunitaire [26]. Cette dernière est la capacité du système immunitaire à faire la différence du soi et du non-soi. Cela est essentiel afin d'éviter les maladies auto-immunitaires, de prévenir les réactions inflammatoires exagérées et de permettre aux bactéries commensales de survivre au niveau des épithélia [74]. Récemment, un lien entre un MB moins diversifié et le développement de maladies inflammatoires chroniques et d'allergies a été établi [26]. Ainsi, en plus de participer à la protection de la peau contre les maladies, le MB cutané prend part au développement de maladies cutanées. Lors d'une maladie cutanée non infectieuse, il est cependant difficile de savoir si une dysbiose (déséquilibre dans la composition du microbiote) est à l'origine de la maladie ou si la maladie a mené à une dysbiose [26, 74, 86, 98]. Il est à noter que le MB cutané a été évalué chez 109 chiots terriers blancs du West Highland âgés de trois semaines et moins, et que de ce nombre, 44% ont développé des allergies dans les trois années suivantes. Il n'y avait alors aucune différence significative dans la composition du MB cutané chez les chiots ayant développé une allergie et ceux n'en ayant pas développé. Ainsi, si une dysbiose du MB cutané est à l'origine de la dermatite atopique, il semblerait que le changement ne soit pas présent dès les premières semaines de vie [95].

1.4 Relation entre les sacs anaux, la dermatite atopique et le microbiote

Bien que cela n'a jamais été étudié, les chiens atopiques semblent prédisposés à développer des sacculites anales bactériennes [4, 5, 18]. Des études ont démontré la présence de cytokines pro-inflammatoires dans la peau et le sang périphérique de chiens atopiques; les cytokines n'ont cependant pas été étudiées dans les sacs anaux de chiens sains ou allergiques [38]. De même, la barrière cutanée des sacs anaux n'a pas été étudiée. En connaissant les cytokines impliquées lors

de sacculites anales, cela pourrait éventuellement mener au développement de médicaments ciblant spécifiquement une cytokine, tel que le lokivetmab (anticorps caninisé ciblant l'IL-31) qui a été développé pour contrôler le prurit chez les chiens atopiques [26, 51].

Les chiens atopiques développent fréquemment des pyodermites bactériennes superficielles, des dermatites à levures ou des otites externes [26, 27]. *Staphylococcus pseudintermedius* est la bactérie la plus souvent impliquée lors d'une pyodermite bactérienne. Afin de guérir ces infections, l'usage d'antimicrobiens systémiques ou topiques est courant. La plupart des chiens atopiques sont donc exposés à davantage d'antibiotiques au cours de leur vie, ce qui les met plus à risque de développer des résistances bactériennes multiples aux antibiotiques [27]. Il a été démontré que le MB cutané des chiens atopiques est moins diversifié que celui des chiens sains et que *Staphylococcus* spp. a une abondance relative plus importante chez les chiens atopiques lors d'un épisode aigu. Cette même étude a démontré qu'un traitement antibiotique non seulement restaure la diversité du MB cutané, diminue la sévérité des signes cliniques et réduit la proportion de *Staphylococcus* spp., mais normalise également le pH cutané et la perte d'eau transépidermique [100]. Ainsi, avec la montée de la résistance antimicrobienne et l'utilisation judicieuse des antimicrobiens, il est d'autant plus important de trouver des alternatives aux traitements antibiotiques, incluant le traitement de la sacculite anale. Cela pourrait se faire, entre autres, par la prévention des infections en restaurant la barrière cutanée et le MB. À cette fin, il est important de bien comprendre la pathogenèse de la sacculite anale bactérienne dans un contexte de dermite atopique et cela débute par une meilleure compréhension des cytokines et du MB présents dans les sacs anaux de chiens sains et atopiques. C'est dans ce cadre que cette étude a été réalisée.

1.5 Hypothèse et objectifs

Ce projet avait pour hypothèse que le MB et les cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux des chiens sains diffèrent de ceux des chiens atopiques traités ou non avec des médicaments antiprurigineux ou une immunothérapie allergénique.

Les objectifs étaient: i) de caractériser le MB des sacs anaux des chiens atopiques recevant ou non un traitement antiprurigineux ou une immunothérapie allergénique; ii) d'évaluer si des cytokines pro-inflammatoires sont présentes dans les sacs anaux de chiens sains et de chiens atopiques recevant ou non un traitement antiprurigineux ou une immunothérapie allergénique; iii) de déterminer si le MB et la concentration des cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux des chiens atopiques diffèrent de ceux des chiens sains et si un traitement antiprurigineux ou l'immunothérapie allergénique peut influencer le MB et la concentration des cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux des chiens atopiques.

Chapitre 2 – Manuscrit scientifique

Effects of antipruritic and allergen-specific immunotherapy treatments on the bacterial microbiota and proinflammatory cytokines in the anal sacs of healthy and atopic dogs

Camylle C Bergeron^{1*}, Marcio Carvalho Costa², Mariela Segura³, Lucilene Bernardi de Souza⁴,
Marêva Bleuzé³, Frédéric Sauv  ¹

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

²Department of Veterinary Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

³Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

⁴Centre Hospitalier Universitaire V  t  rinaire, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

2.1 Abstract

The pathogenesis of anal sacculitis has not been extensively investigated, although atopic dogs seem to be predisposed to the disease. This study aimed to characterize the bacterial microbiota of the rectum and anal sacs and to measure proinflammatory cytokines in the anal sacs of healthy and atopic dogs with and without treatment. The rectum and secretions from the anal sacs of 15 healthy dogs and 14 untreated and six treated atopic dogs were sampled with flocked swabs. Following DNA extraction, the V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced using Illumina technology. Proinflammatory cytokines in anal sac secretions were analyzed with the Luminex multiplex test. Community membership and structure were significantly different between the anal sacs of healthy and untreated atopic dogs ($P = 0.002$ and $P = 0.003$, respectively). The anal sac microbiota membership and structure were also significantly different between untreated and treated atopic dogs ($P = 0.012$ and $P = 0.017$, respectively), but structure was similar in healthy and treated atopic dogs ($P = 0.332$), suggesting that treatment positively affected the anal sac environment. Among the proinflammatory cytokines assessed, there was no significant difference between groups, except for interleukin 8 that was higher in the anal sacs of untreated atopic dogs compared to treated atopic dogs ($P = 0.02$), and tumor necrosis factor alpha that was lower in the anal sacs of healthy dogs compared to treated atopic dogs ($P = 0.04$). These results reveal a dysbiosis in anal sacs of atopic dogs, which may partially explain the predisposition of atopic dogs to develop bacterial anal sacculitis. Treatments received by atopic dogs (oclacitinib, cetirizine and allergen-specific immunotherapy) shift the microbiota of the anal sacs towards that of healthy dogs. Further studies are required to identify significant cytokines contributing to anal sacculitis in atopic dogs.

2.2 Introduction

Dogs have skin invaginations on either side of the anus, called anal sacs. The role of the anal sacs is uncertain, but they appear to be involved in olfactory communication in dogs [1]. Inflamed anal sacs in dogs, named anal sacculitis, is usually secondary to infection or impaction of these

structures. This condition could affect up to 12.5% of domestic dogs [2-3]. In presence of bacterial infection, local or systemic antimicrobial therapy is recommended [1-2, 4]. Known predisposing factors to anal sacculitis include obesity, constipation, anal laxity, and chronic diarrhea [1-2,5]. Several diseases have also been reported to predispose to the development of anal sacculitis, such as dysendocrinia and atopic dermatitis [2,4-5]. However, the exact etiopathogenesis of anal sacculitis remains unclear [1,6].

Atopic dermatitis is a genetically programmed chronic inflammatory and pruritic skin disease mainly associated with IgE antibodies to environmental allergens [7-8]. It is estimated that this disease can affect up to 30% of domestic dogs [8]. To better understand the pathogenesis of this disease, several studies have evaluated the cutaneous bacterial microbiota, as well as the cytokines released in the skin and peripheral blood of atopic dogs [9-13]. Cutaneous bacterial microbiota dysbiosis was reported in atopic dogs. Indeed, atopic dogs have a less diversified and less rich bacterial microbiota compared to healthy dogs [10-11]. Currently, it is not clear whether dysbiosis is a consequence or a cause of the disease [8]. A recent study using DNA sequencing technologies has revealed high inter-individual variation in the bacterial microbiota of the anal sacs of healthy dogs. The dogs of the latter study carried a richer and more diverse microbiota than that reported in studies using culture-based methods [14]. This study also concluded that the anal sac harbors a specific microbiota, different from that of the rectum [14].

Marked differences in the cytokine profiles from peripheral blood and skin have been reported between atopic and healthy dogs [9]. However, there are several divergent results [9]. For example, Marsella *et al.* did not find a significant difference in the expression of interleukin (IL)-2 mRNA in the skin of experimental models of atopic dogs before and after exposure to house dust mite extracts [15]. However, Nuttall *et al.* detected a greater expression of IL-2 mRNA in lesional skin of atopic dogs compared to non-lesional skin of atopic dogs and healthy dogs [12].

With the rise of antibiotic resistance and the high prevalence of canine atopic dermatitis, a better understanding of the etiopathogenesis of anal sacculitis would help finding alternative treatments to antimicrobials [11]. To the author's knowledge, no studies have evaluated the bacterial microbiota in the anal sacs of atopic dogs nor the cytokines in the anal sacs of healthy and atopic dogs.

The hypothesis of this study was that the bacterial microbiota and proinflammatory cytokine concentration in the anal sacs of healthy dogs differ from those of atopic dogs treated or not with antipruritic drugs or allergen-specific immunotherapy (ASIT). The aims of this study were therefore: 1) to characterize the bacterial microbiota of the anal sacs of atopic dogs receiving or not an antipruritic drugs or ASIT; 2) to evaluate proinflammatory cytokines in the anal sacs of atopic and healthy dogs; 3) to determine if the bacterial microbiota and proinflammatory cytokine concentration in the anal sacs of atopic dogs differ from those of healthy dogs and if an antipruritic drug or ASIT can influence the bacterial microbiota and proinflammatory cytokine concentration in the anal sacs of atopic dogs.

2.3 Material and methods

This study followed the rules of the Canadian Council on Animal Care and was approved by the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal's Animal Care Committee (Comité d'éthique de l'utilisation des animaux, project number 18-Rech-1964).

Dogs enrolled in this study were initially from MIRA Foundation [14]. The MIRA Foundation had signed a written consent form for participation in this study, as well as current owners of the dogs disqualified and no longer belonging to MIRA Foundation.

2.3.1 Animal selection

Twenty dogs with atopic dermatitis receiving (n=6) or not an antipruritic drug (oclocitinib or cetirizine) or ASIT (n=14) and 15 healthy dogs were enrolled in this study. Table 1 shows the signalment of the dogs enrolled in this study.

Table 1: Signalment and treatment of enrolled dogs.

	Breed	Sex	Age (year)	Treatment
Healthy dogs				
1	Labernese	MN	2.5	None
2	Labernese	MN	1.2	None
3	Labernese	MN	1.0	None
4	Labernese	MN	1.0	None
5	Labernese	FS	1.2	None
6	Labernese	FS	1.2	None
7	Labrador Retriever	FS	11.8	None
8	Labernese	MN	1.0	None
9	Labernese	MF	1.3	None
10	Labernese	FF	3.7	None
11	Labrador Retriever	MN	4.6	None
12	Labernese	FF	4.3	None
13	Labernese	FF	3.5	None
14	Labernese	MN	1.0	None
15	Labernese	FS	3.0	None
Untreated atopic dogs				
16	Labrador Retriever	MN	4.6	None
17	Labernese	FS	5.2	None
18	Labrador Retriever	MN	3.6	None
19	Labernese	FS	4.2	None
20	Labernese	FS	3.5	None
21	Labernese	FS	3.5	None
22	Labrador retriever	FS	1.2	None
23	Labrador retriever	FS	1.3	None
24	Labernese	FS	1.3	None
25	Labernese	FS	1.3	None

26	Labernese	FS	2.1	None
27	Labernese	FS	1.3	None
28	Labernese	FF	1.7	None
29	Labernese	FS	1.0	None
Treated atopic dogs				
30	Labrador Retriever	FS	4.4	Apoquel 16 mg once daily and ASIT
31	Labernese	FS	5.3	Apoquel 16 mg once daily and ASIT
32	Labrador Retriever	FS	7.5	Apoquel 16 mg once daily and ASIT
33	Labernese	FS	2.1	Apoquel 16 mg once daily
34	Labrador Retriever	MN	3.6	Apoquel 16 mg once daily
35	Labernese	MN	4.1	Cetirizine 10 mg once daily and ASIT

MN, Male neutered; FS, Female spayed; MF, Male fertile; FF, Female fertile; ASIT, Allergen-specific immunotherapy

The diagnosis of atopic dermatitis was based on the exclusion of other causes of pruritus (cutaneous infection, parasitic infestation, flea bite hypersensitivity, food allergy) in dogs showing compatible clinical signs. Prior enrollment in this study, a broad-spectrum antiparasitic treatment of a minimum duration of three months was administered and dogs were fed an eviction diet for eight weeks. An intradermal allergy test (IDT) was performed on dogs diagnosed with atopic dermatitis.

Inclusion criteria consisted of an absence of signs consistent with cancer, skin infection, and systemic diseases on physical examination. All dogs should not have received any topical treatment (antimicrobial, bath) within 30 days prior to the study nor have received a systemic

antibiotic within three months prior to the study. Dogs were allowed to receive oclacitinib, lokivetmab, glucocorticoids, cyclosporine, antihistamine or ASIT, except for healthy dogs.

2.3.2 Sample selection

Five samples per dog were collected on the same day, including three sterile flocked swabs (FLOQSwabs®, Murrieta, California, USA) from the rectum, right anal sac, and left anal sac, and two sterile microtubes containing secretions from each anal sac. All samples were collected between November 2018 and October 2021. The perianal area was first cleaned with sterile gauze soaked in 4% chlorhexidine (DermaChlor™ 4, Dechra, Pointe-Claire, Quebec, Canada) to dislodge organic material. After waiting two minutes, a sterile flocked swab was then gently inserted two cm into the rectum to collect a sample of material from the rectal mucosa. A pair of sterile gloves was then put on and sterile lubricant was applied to the index finger. The index finger was then gently inserted into the rectum and the contents of the left anal sac were expelled by pressing the anal sac with the index finger into the rectum and the thumb onto the skin covering the anal sac. A sample of the secretions from the left anal sac was collected at the opening of the left anal sac duct with a sterile flocked swab (the first few drops were not collected so that the sample would be representative of the anal sac contents). When possible, the remaining contents of the left anal sac were then collected in a sterile microtube. The perianal area was again cleaned with sterile gauze soaked in 4% chlorhexidine, then the same process, wearing new sterile gloves, was performed with the contralateral anal sac. The microtubes were then centrifuged for 10 minutes, and the supernatant was transferred to a new sterile microtube. All samples were then frozen at -80°C until DNA extraction or use of Luminex xMAP technology.

2.3.3 DNA extraction and sequencing

The commercial kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Germany) was used to extract DNA from all samples taken with a sterile flocked swab, as well as two unused sterile flocked swabs (negative controls). The first step for DNA extraction was to cut the tip of the swabs and put them in a tube

containing beads (one swab for each tube). The tubes were then vortexed. To allow lysis of the cells, a solution from the kit was then added to the tube. Subsequent steps were followed as recommended by the manufacturer [16]. The V4 hypervariable region of the bacterial 16S ribosomal RNA gene was then amplified by polymerase chain reaction with the primers 515 (forward) and 806 (reverse). The sequencing was done with the Illumina MiSeq IEMFile version 4 platform at the Genome Quebec McGill Innovation Centre. The V2 reagents kit (2 x 250 cycles) was used for sequencing.

Bioinformatic analyses were performed using mothur software following the standard operating procedure as recommended by Kozich *et al.* [17]. Alpha diversity assessing the number of different bacterial genera present in a community (richness) and their relative abundances (evenness) was investigated using the Chao index (richness) and the Simpson and the Shannon indices (diversity). Beta diversity measures were used to compare community similarities between samples by using the Jaccard index, a measure of community membership that considers only the presence or absence of each genus, and the Yue and Clayton index, a measure of community structure that considers the relative abundance of each genus.

2.3.4 Assessment of anal sac proinflammatory cytokines

Fluid samples from dogs' anal sacs were taken from the freezer until they reached room temperature. For each dog, 12.5 μL was taken from each anal sac (right and left) and mixed by vortex to obtain a total volume of 25 μL . These 25 μL samples per dog were used to measure the concentration of various proinflammatory cytokines using the Canine Cytokine/Chemokine/Growth Factor 11-Plex ProcartaPlex Panel (Invitrogen, Burlington, ON, Canada): interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$), IL-10, IL-12/IL-23p40, IL-2, IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), nerve growth factor beta ($\text{NGF-}\beta$), stem cell factor (SCF), tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$), and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). The kit was used according to the manufacturer's instructions [18]. The MAGPIX platform (Luminex

Corporation, TX, USA) was then used to read the plates and the analyses were performed by the xPONENT v.4.2 software (Luminex Corporation, TX, USA) and Bio-Plex Manager v.6.1 software (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Evaluations of the quality control samples, standard curves, and bead counts were performed.

2.3.5 Statistical analysis

Alpha diversity (number of genera and Chao, Simpson, and Shannon indices) were compared between the groups (healthy dogs versus untreated atopic dogs (UAD) versus treated atopic dogs (TAD)) with the analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's multiple comparisons test. A *P* value of < 0.05 was considered significant. Beta diversity (community membership and structure) were compared with the analysis of molecular variance (AMOVA) where a *P* value of < 0.05 was considered significant. Principal coordinate analyses were used to visualize the similarities between the different samples. Linear discriminant analysis effective size (LEfSe) was used to identify bacteria taxa significantly different between groups [19].

For cytokine concentrations, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used to determine whether the distribution of the data varied among groups (healthy dogs versus UAD versus TAD). When a significant difference was found, post-hoc comparisons between pairs of groups adjusting the alpha level downward with the sequential Benjamini-Hochberg procedure were performed. A *P* value of < 0.05 was considered significant.

2.4 Results

Fifteen healthy dogs, 14 UAD and six TAD were included for the bacterial microbiota analyses. The detailed results of the microbiota analysis of the anal sacs of the 15 healthy dogs have been published [14]. For the alpha diversity analyses, one dog in the group of TAD was excluded because its left anal sac contents had a low sequence number. Negative controls showed no

presence of bacterial DNA. In the TAD group, five and one dogs were treated with oclacitinib and cetirizine, respectively, and four dogs received concomitantly an ASIT.

2.4.1 Relative abundances

The relative abundance of the main bacterial genera is presented in Figure 1. The main genera found in the rectum of healthy dogs, UAD and TAD were *Prevotella* (13.83%, 13.75% and 10.80%, respectively), *Corynebacterium* (12.85%, 12.85% and 26.55%, respectively) and unclassified *Mycobacteriales* (13.52%, 11,09% and 19.57%, respectively), while *Enterococcus* (27.01%, 9,20% and 21,54%, respectively) and *Bacteroides* (13.35%, 24.12% and 7.82%, respectively) were among the main genera found in the anal sacs.

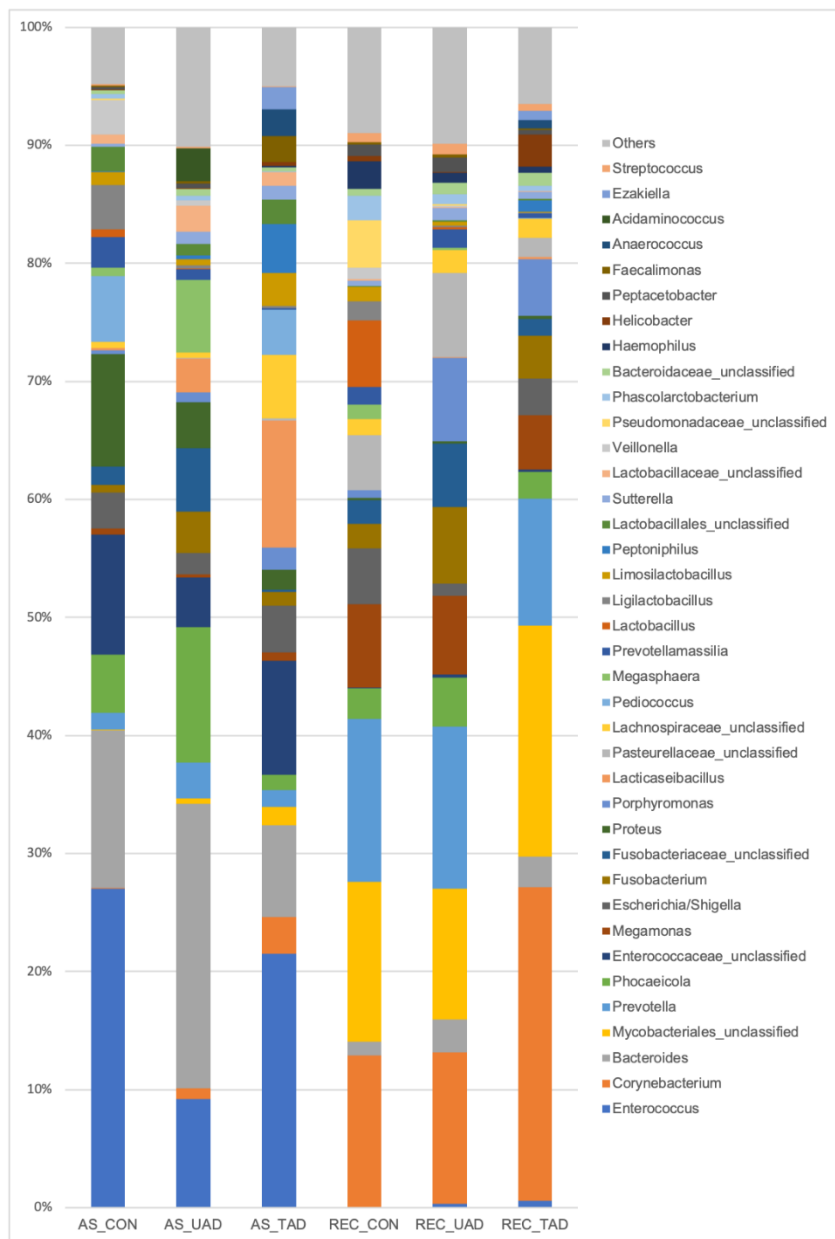


Figure 1. – Mean relative abundance of the main bacterial genera (>1%) found in the anal sacs and rectum of healthy dogs and atopic dogs treated or not. AS_CON, Anal sacs of healthy dogs; AS_UAD, Anal sacs of untreated atopic dogs; AS_TAD, Anal sacs of treated atopic dogs; REC_CON, Rectum of healthy dogs; REC_UAD, Rectum of untreated atopic dogs; REC_TAD, Rectum of treated atopic dogs

Figure 2 represents the taxa significantly more abundant in the rectum of healthy dogs, UAD and TAD addressed by the LEfSe analysis. In addition, *Veillonella* spp. was overrepresented in the anal sacs of healthy dogs, whereas *Helicobacter* spp. and *Pasteurella* spp. were overrepresented in the anal sacs of TAD (all $P < 0.05$).

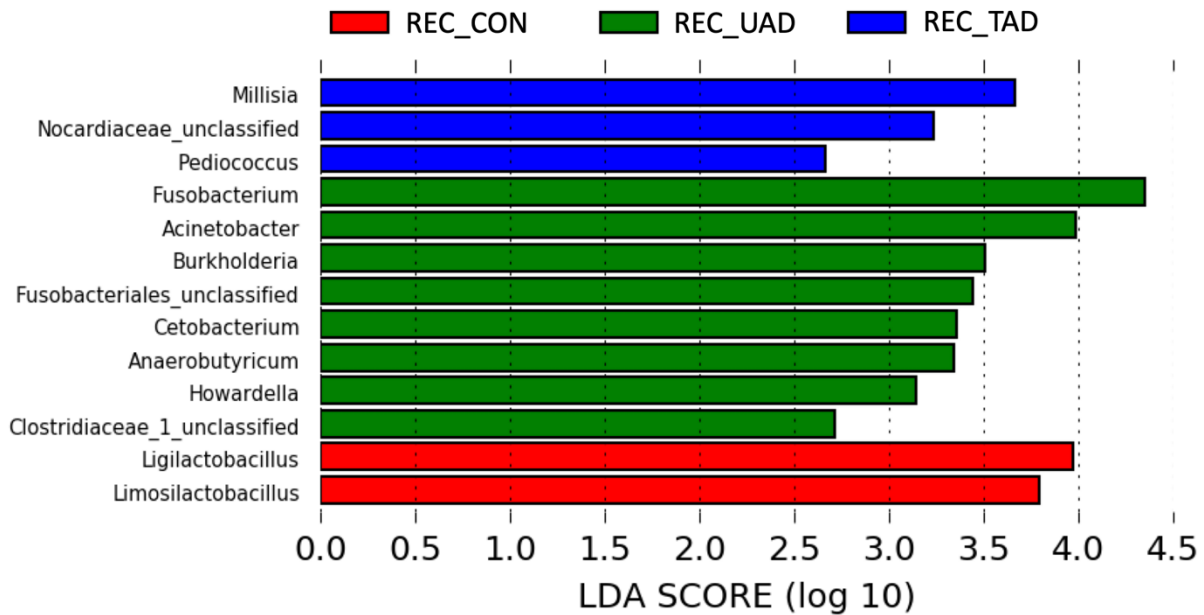


Figure 2. – Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) indicating the bacterial taxa significantly representative of the rectal microbiota in healthy dogs and atopic dogs treated or not. REC_CON, Rectum of healthy dogs; REC_UAD, Rectum of untreated atopic dogs; REC_TAD, Rectum of treated atopic dogs

2.4.2 Alpha diversity

Overall, richness (number of bacterial genera found and Chao index) and diversity (Simpson and Shannon indices) were significantly higher in the rectum compared to anal sacs ($P < 0.001$ for all comparisons). The Chao index was significantly higher in the rectal samples from UAD compared

to healthy dogs ($P = 0.012$), but not other significant differences were found in the comparisons between groups, including comparisons between anal sacs. Results are shown in Figure 3.

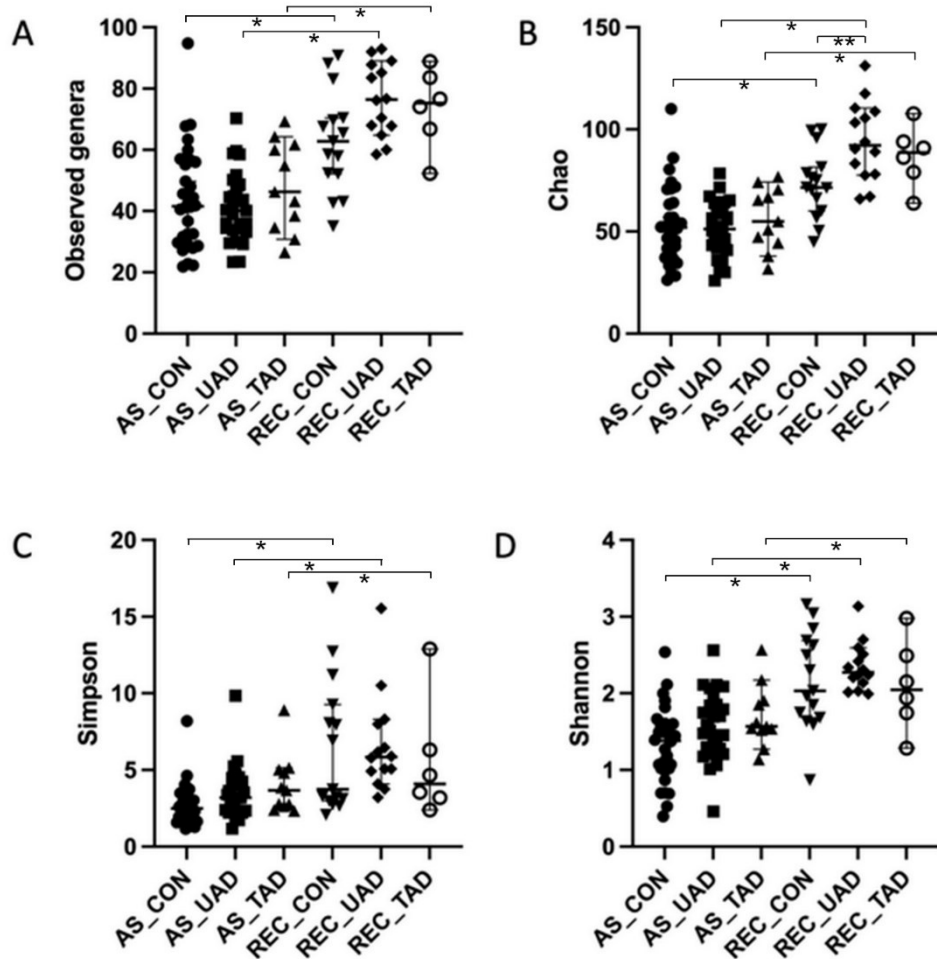


Figure 3. – Alpha diversity measurements in different sites (anal sacs and rectum) in healthy dogs and untreated and treated atopic dogs. A – number of genera observed. B – Chao index. C – Simpson index. D – Shannon index. * $P < 0.001$. ** $P = 0.012$. A P value lower than 0.05 was considered statistically significant. AS_CON, Anal sacs of healthy dogs, AS_UAD, Anal sacs of

untreated atopic dogs; AS_TAD, Anal sacs of treated atopic dogs; REC_CON, Rectum of healthy dogs; REC_UAD, Rectum of untreated atopic dogs; REC_TAD, Rectum of treated atopic dogs

2.4.3 Beta diversity

The community membership and community structure are represented by principal coordinate analyses (PCoA) in Figures 4 and 5, respectively. Community membership was significantly different between the anal sacs of healthy dogs and UAD ($P = 0.002$), healthy dogs and TAD ($P = 0.013$) and UAD and TAD ($P = 0.012$). A significant difference in the community membership was also observed between rectum of healthy dogs and UAD ($P = 0.001$), healthy dogs and TAD ($P < 0.001$), and UAD and TAD ($P = 0.042$). Community membership was also significantly different between anal sacs and rectal microbiota within each group (all $P < 0.001$).

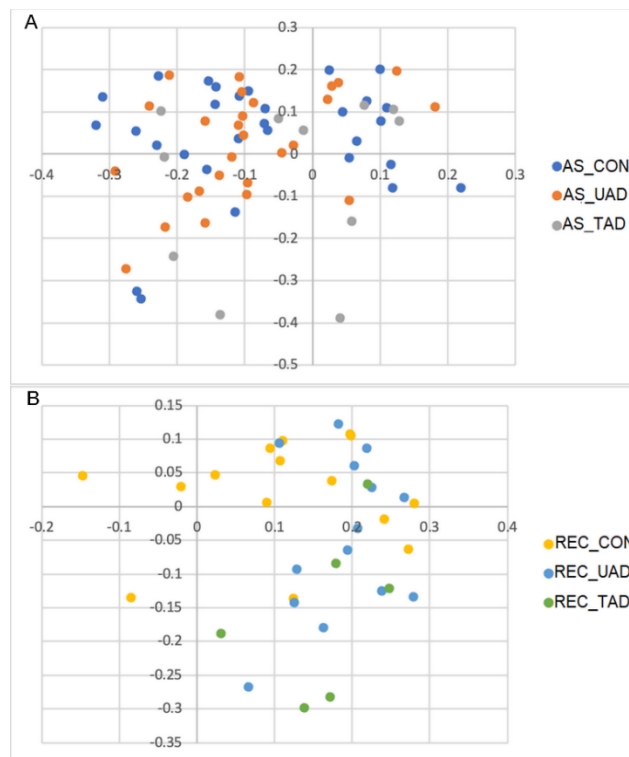


Figure 4. – Principal Coordinate Analysis plots of the community membership comparing the anal sacs microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (A) and the rectum

microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (B). AS_CON, Anal sacs of healthy dogs; AS_UAD, Anal sacs of untreated atopic dogs; AS_TAD, Anal sacs of treated atopic dogs; REC_CON, Rectum of healthy dogs; REC_UAD, Rectum of untreated atopic dogs; REC_TAD, Rectum of treated atopic dogs

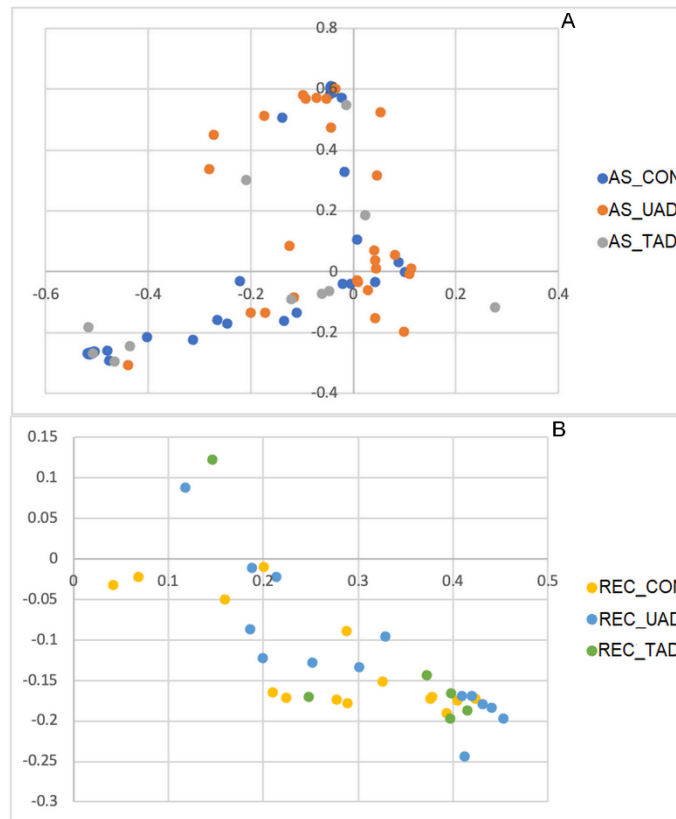


Figure 5. – Principal Coordinate Analysis plots of the community structure comparing the anal sacs microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (A) and the rectum microbiota of healthy dogs and untreated and treated atopic dogs (B). AS_CON, Anal sacs of healthy dogs; AS_UAD, Anal sacs of untreated atopic dogs; AS_TAD, Anal sacs of treated atopic dogs; REC_CON, Rectum of healthy dogs; REC_UAD, Rectum of untreated atopic dogs; REC_TAD, Rectum of treated atopic dogs

Statistical comparison of community structure showed a significant difference between the anal sac microbiota of healthy dogs and UAD ($P = 0.003$) and UAD and TAD ($P = 0.017$). However, the difference was not significant between the anal sac microbiota of healthy dogs and TAD ($P = 0.332$) and between the rectal microbiota of healthy dogs and UAD ($P = 0.460$), healthy dogs and TAD ($P = 0.405$), and UAD and TAD ($P = 0.492$). There was a significant difference in the community structure between anal sacs and rectum of healthy dogs ($P < 0.001$), UAD ($P < 0.001$), and TAD ($P < 0.001$).

2.4.4 Anal sac concentrations of proinflammatory cytokines

The proinflammatory cytokines were evaluated in 15 healthy dogs, 12 UAD, and five TAD. Two UAD and one TAD were excluded from these evaluations because they did not have enough secretion in their anal sacs at the time of sampling. In addition, the content of only one anal sac was collected in four dogs (two healthy dogs and two TAD), the contralateral anal sac containing not enough secretion when sampled and analyzed for the cytokine profiles.

The concentration of various canine proinflammatory cytokines, including chemokines and growth factors, identified in the anal sacs of healthy and atopic dogs are summarized in Table 2. All proinflammatory cytokines tested (IFN- γ , IL-10, IL-8, IL-12/IL-23p40, IL-2, IL-6, TNF- α , MCP-1, NGF- β , SCF, and VEGF-A) were detectable in the anal sacs of healthy and atopic dogs. There was no significant difference between healthy, UAD and TAD groups for all of them, but IL-8 and TNF- α . The level of IL-8 was significantly higher in the anal sacs of UAD compared to the anal sacs of TAD ($P = 0.02$). The concentration of TNF- α was also significantly lower in the anal sacs of healthy dogs compared to the anal sacs of TAD ($P = 0.04$).

Table 2: Cytokine concentrations (median and range) in pg/mL measured in anal sacs of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis with or without treatment.

Cytokines	Healthy dogs n = 15	Dogs with atopic dermatitis without treatment n = 12	Dogs with atopic dermatitis with treatment n = 5
IFN-g	4.25 (0.00 – 10.55)	6.97 (0.00 – 16.25)	8.32 (1.57 – 17.06)
IL-10	5.90 (0.00 – 21.57)	9.52 (1.12 – 18.53)	3.54 (1.44 – 18.53)
IL-12/IL-23p40	68.08 (20.73 – 458.89)	63.16 (35.03 – 165.70)	99.36 (23.09 – 381.51)
IL-2	12.32 (0.00 – 22.72)	11.34 (2.85 – 33.74)	10.49 (2.61 – 124.17)
IL-6	24.98 (10.71 – 44.43)	23.23 (11.05 – 43.05)	21.39 (14.25 – 41.23)
IL-8*	735.88 (84.77-30301.93)	1991.24 (298.61 – 15278.21)	253.96 (0.00 – 859.05)
MCP-1	164.30 (30.35 – 1629.70)	205.38 (61.97 – 2807.89)	348.83 (119.37 – 798.52)
NGF-β	2.55 (0.00 – 19.43)	9.74 (0.00 – 187.84)	10.37 (7.86 – 26.89)
SCF	22.87 (11.38 – 42.18)	27.89 (9.77 – 184.22)	19.55 (11.38 – 51.67)
TNF-α**	6.85 (3.70 – 11.81)	8.41 (2.59 – 110.28)	9.44 (8.06 – 17.07)
VEGF-A	7314.90 (2757.12 – 10989.15)	7210.52 (5015.85 – 8420.95)	7767.96 (6123.67 – 19339.63)

* A significant difference is present between UAD and TAD ($P = 0.02$)

** A significant difference is present between healthy dogs and TAD ($P = 0.04$)

2.5 Discussion

This study used next generation DNA sequencing (NGS) to show that the bacterial microbiota in the anal sacs of healthy dogs and atopic dogs is a rich and diverse environment. The main objective of the present study was to compare the anal sac microbiota between the three groups (healthy dogs versus UAD versus TAD). The significant difference observed in the composition of the bacterial microbiota of the anal sacs between healthy and UAD suggests that a dysbiosis was present in the anal sacs of atopic dogs. This dysbiosis could favor the development of bacterial anal sacculitis in atopic dogs. Indeed, skin dysbiosis has been proposed as a major predisposing factor to bacterial skin infection in human atopic dermatitis [20]. Furthermore, the community structure found in the anal sacs of UAD was different from that found in healthy dogs and TAD, but there was no difference in community structure between the anal sacs of healthy dogs and TAD. This suggests that the treatments (ocloacitinib, cetirizine or ASIT) received by the atopic dogs

alleviated the dysbiosis in the study population. LEfSe showed an overrepresentation of *Helicobacter* spp. and *Pasteurella* spp. in the anal sacs of TAD and an overrepresentation of *Veillonella* spp. in the anal sacs of healthy dogs. However, there was important variation in the data between dogs (data not shown), making interpretation difficult. Further studies with larger numbers of dogs would help determine whether these overrepresentations are real or not.

The composition of the bacterial microbiota of the anal sacs and rectum was significantly different in all groups (healthy dogs, UAD and TAD). Considering that the anal sacs are a specific microenvironment, the difference in the bacterial microbiota between the anal sacs and the rectum could be explained by different biological or environmental factors, such as the type of glands, the presence of stool in the rectum, temperature, and humidity [1,21]. The composition of rectal microbiota was also significantly different between groups (healthy dogs versus UAD versus TAD). The study by Thomsen *et al.* also found dysbiosis in the rectum of atopic dogs, as did the study by Rostaher *et al.* which found that the fecal microbiota was significantly different between healthy and atopic dogs [22-23]. Although atopic dermatitis does not manifest with gastrointestinal signs, differences between the fecal microbiota in healthy humans and those with atopic dermatitis have also been reported [24-25]. A study also assessed the fecal microbiota in one-week-old children and found that children who later developed atopic dermatitis had less diversity in their fecal microbiota [26]. This may suggest that the intestinal microbiota has a role to play in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs [27-28].

Fusobacterium spp. was among the genera overrepresented in the rectum of atopic dogs with a higher relative abundance. This result is in contradiction with the study of Thomsen *et al.* where the abundance of *Fusobacterium* spp. was lower in the rectum of atopic dogs compared to the rectum of healthy dogs and with the study of Rostaher *et al.* where the abundance of *Fusobacterium* spp. was lower in the fecal microbiota of atopic dogs compared to healthy dogs [22-23]. These conflicting results could be explained by the different methodologies used, such as the DNA extraction kit, the hypervariable region sequenced or the platform used for

bioinformatics analysis, as well as the biological factors, such as breed [29-30]. Healthy dogs had an overrepresentation of *Ligilactobacillus* spp. in the rectum. Interestingly, in atopic humans, the use of probiotics containing *Ligilactobacillus salivarius* (formely *Lactobacillus salivarius*) has been reported to improve the clinical manifestation of the disease and the quality of life of people by modulating the gut microbiota and the immune system (stimulates and decrease Th1 and Th2 response, respectively) [31-33]. *Limosilactobacillus* spp. was also more abundant in the rectum of healthy dogs. Studies on mice using probiotics composed of *Limosilactobacillus reuteri* have shown that it can prevent the development of atopic dermatitis in the offspring and attenuate the clinical signs of atopic dermatitis in mice by modulating the immune response [34-36]. Dysbiosis affecting the abundance of *Ligilactobacillus* spp. and *Limosilactobacillus* spp. may therefore have a role to play in the pathogenesis of atopic dermatitis. It is important to note that one limitation of this study was the use of a different DNA sequencing plate and a different lot of DNA extraction kit for healthy dogs and atopic dogs. Indeed, it has been reported that these technical factors can have an impact on the composition of the bacterial microbiota [29, 37-38].

This study also evaluated the proinflammatory cytokines in canine anal sacs of healthy and atopic dogs. The choice of cytokines panel used in this study was based on the commercially available panel that contained the most known proinflammatory cytokines involved in atopic dermatitis. This study showed that all tested proinflammatory cytokines were detected in the anal sacs of healthy and atopic dogs. However, for most of these proinflammatory cytokines, there was no significant difference between healthy and atopic dogs. The role of these proinflammatory cytokines in the development of anal sacculitis is not yet understood in atopic dogs. Interestingly, several studies reported divergent results for similar cytokines in the skin or peripheral blood of atopic dogs [9, 12]. Further studies would be necessary to better understand the role of these proinflammatory cytokines in the anal sacs of atopic dogs.

A significant difference was detected between the two groups of atopic dogs with respect to IL-8, a pro-inflammatory chemokine mainly involved in neutrophil recruitment and activation to

inflammatory sites [39]. Most TAD were receiving oclacitinib (four of five dogs). Oclacitinib preferentially inhibits Janus kinase (JAK) 1 by binding to its receptors and inhibiting the activation of the JAK-signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway. Oclacitinib also inhibits JAK2 and JAK3 to a lesser extent [40]. Specific cytokines bind to JAK-related receptors, triggering signal transduction via the JAK-STAT pathway that leads to the regulation of the expression of genes involved in inflammation [40]. In humans, the JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib has been shown to inhibit mast cell degranulation allegedly via JAK2-STAT5 signaling [41]. Upon degranulation, mast cells may release IL-8 [42]. In dogs, only one study evaluated the effect of oclacitinib on IL-8, but this study focused on the effect on mast cell tumor lines, which are not the ones involved in atopic dermatitis. This study showed that oclacitinib had anti-inflammatory effects and decreased the release of IL-8 from mast cell tumor lines [42]. Therefore, oclacitinib, which also inhibits JAK2, might affect IL-8 production and release in atopic dogs, reducing its expression in anal sacs of atopic dogs treated with this drug.

TNF- α , a predominantly pro-inflammatory cytokine [39], was elevated in TAD when compared to healthy dogs in the present study. Some studies reported increased TNF- α mRNA expression in the skin or peripheral blood of atopic dogs compared to healthy individuals, while others reported no difference [9, 13, 43]. However, we would have expected that the concentration would also be higher in the UAD compared to the healthy group, which was not the case. This discrepancy could be explained by the low number of cases. Further studies with larger groups are required to better define the role of TNF- α in the UAD. Factors such as race, breed and age, may also influence the composition and level of cytokines [44].

These results may suggest a certain degree of inflammation in anal sacs of atopic dogs that may contribute to or cause dysbiosis, which could lead to bacterial anal sacculitis. However, the low number of dogs enrolled and the low number of cytokines tested are limitations that preclude the establishment of a clear relationship between cytokines, atopic dermatitis and a predisposition to bacterial anal sacculitis. Another limitation of this study was the use of the

ProcartaPlex panel with the Luminex xMAP technology, which is designed to assess the canine cytokines in serum, plasma or cell culture supernatants [18]. The use of anal sac contents may therefore have affected the sensitivity and specificity of the test. With the plate used, it was possible to only evaluate 11 proinflammatory cytokines. However, a methodology used in human medicine can evaluate thousands of proteins simultaneously, namely the OLINK high-throughput proteomic platform. This technology is more specific and has a higher throughput than multiplex tests, but is also more expensive [45]. Another limitation of the present study is the way cytokines were measured. Indeed, the level of cytokines was assessed from the secretions of the anal sacs. With this method, it is possible that cytokines of importance in atopic dermatitis are not measured if, for example, they are not released from the epithelium in the secretions of anal sacs. In order to have a more accurate result of the cytokines involved in the anal sac of atopic dogs, it would have been interesting to perform biopsy of the anal sac and measure the cytokines within the epithelium. However, this method is invasive and involves risks, and therefore the collection of secretions was preferred.

2.6 Conclusion

In conclusion, there is a dysbiosis in the anal sacs of atopic dogs. The treatments (oclacitinib, cetirizine or ASIT) shifted the anal sac microbiota toward those of healthy dogs. The anal sacs of healthy and atopic dogs contain several proinflammatory cytokines. Amongst them, IL-8 might play a role in the development of disease and deserves further evaluation. The results of this study suggest that a certain degree of inflammation and dysbiosis may contribute to the development of bacterial anal sacculitis in dogs suffering from atopic dermatitis. Further studies on a larger number of cases and with extended antipruritic drugs (e.g. glucocorticoids, cyclosporine, lokivetmab) would be required to better understand the pathogenesis of anal sacculitis in atopic dogs, which could eventually lead to the development of new treatments to prevent the development of anal sacculitis.

2.7 Acknowledgements

The authors would like to thank the Companion Animals Health Fund of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal, Zoetis, and the Fonds du Centenaire of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal for their financial support. They would also like to say thank you to the MIRA Foundation for making this study possible by allowing their dogs to participate in this study.

2.8 References

1. Duijkeren EV. Disease conditions of canine anal sacs. *J Small Anim Pract.* 1995 Jan;36(1):12-6.
2. Radlinsky M, Fossum TW. Surgery of the digestive system. In: Fossum TW, Cho J, Dewey CW, et al., editors. *Small Animal Surgery Fifth Edition.* Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2019. p. 331-511.
3. Halnan CR. The frequency of occurrence of anal sacculitis in the dog. *J Small Anim Pract.* 1976 Aug;17(8):537-41.
4. Glaze MB. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: Miller WH, Griffin CE, Campbell KL, editors. *Small animal dermatology.* 7th ed. St. Louis:Elsevier Mosby; 2013. p. 724 à 773.
5. Corbee RJ, Woldring HH, van den Eijnde LM, Wouters EGH. A cross-sectional study on canine and feline anal sac disease. *Animals (Basel).* 2021 Dec 31;12(1):95.
6. O'Neill DG, Hendricks A, Phillips JA, Brodbelt DC, Church DB, Leoffler A. Non-neoplastic anal sac disorders in UK dogs: Epidemiology and management aspects of a research-neglected syndrome. *Vet Rec.* 2021 Jul;189(2):e203.
7. Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol immunopathol.* 2006 Dec 15;114(3-4):207-8.
8. Marsella R, Benedetto AD. Atopic dermatitis in animals and people: An update and comparative review. *Vet Sci.* 2017 Jul 26;4(3):37.

9. Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC. Review : Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2015 Apr;26(2):124-e32.
10. Hoffmann AR, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Stephenson CE, et al. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One*. 2014 Jan 8;9(1):e83197.
11. Bradley CW, Morris DO, Rankin SC, Cain CL, Misic AM, Houser T, et al. Longitudinal evaluation of the skin microbiome and association with microenvironment and treatment in canine atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2016 Jun;136(6):1182-1190.
12. Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2002 May;32(5):789-95.
13. Mazrier H, Vogelnest LJ, Taylor RM, Williamson P. Altered plasma cytokines in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2022 Apr;33(2):131-e38.
14. Bergeron CC, Costa MC, de Souza LB, Sauvé F. Description of the bacterial microbiota of anal sacs in healthy dogs. *Can J Vet Res*. 2021 Jan; 85(1):12-17.
15. Marsella R, Olivry T, Maeda S. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol*. 2006 Apr;17(2):111-20.
16. QIAGEN [Internet]. Germany: DNeasy PowerSoil Kit Handbook; c2013-2022 [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5a0517a7-711d-4085-8a28-2bb25fab828a&lang=en>.
17. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Sep;79(17):5112–20.
18. Thermo Fisher Scientific [Internet]. Austria: ProcartaPlex™ canine cytokine chemokine growth factor panel 1 11-plex user guide; c2021 [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS->

Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0024753_ProcartaPlexCanineCytokineChemokineGrowthFactorPanel_1_11-Plex_UG.pdf.

19. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011 Jun 24;12(6):R60.
20. Wang V, Boguniewicz J, Boguniewicz M, Ong PY. The infectious complications of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2021 Jan;126(1):3-12.
21. Albone ES, Grönnerberg TO. Lipids of the anal sac secretions of the red fox, *Vulpes vulpes* and of the lion, *Panthera leo*. *J Lipid Res.* 1977 Jul;18(4):474-9.
22. Thomsen M, Künstner A, Wohlers I, Olbrich M, Lenfers T, Osumi T, et al. A comprehensive analysis of gut and skin microbiota in canine atopic dermatitis in Shiba Inu dogs. *BioRxiv.* 2022 Jul 12: 497949.
23. Rostaher A, Morsy Y, Favrot C, Unterer S, Schnyder M, Scharl M, et al. Comparison of the gut microbiome between atopic and healthy dogs-preliminary data. *Animals (Basel).* 2022 Sep 12;12(18):2377.
24. Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y, et al. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Mar;111(3):587-91.
25. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011 Apr;3(2):67-73.
26. Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, Wold AE, Strachan DP, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jan;121(1):129-34.
27. Egawa G, Weninger W. Pathogenesis of atopic dermatitis: a short review. *Cogent Biology.* 2015 Oct 20;1(1):1103459.
28. Craig JM. Atopic dermatitis and the intestinal microbiota in humans and dogs. *Vet Med Sci.* 2016 Feb 23;2(2):95-105.

29. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Jun;38(6):1059-1070.
30. Chermprapai S, Ederveen THA, Broere F, Broens EM, Schlotter YM, van Schalkwijk S, et al. The bacterial and fungal microbiome of the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis and the impact of topical antimicrobial therapy, an exploratory study. *Vet Microbiol*. 2019 Feb;229:90-99.
31. Drago L, Rodighiero EL, Nicola L, Vecchi ED, Piconi S. Effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 (DSM 22775) treatment on adult atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Oct-Dec;24(4):1037-48.
32. Niccoli AA, Artesi AL, Candio F, Ceccarelli S, Cozzali R, Ferraro L, et al. Preliminary results on clinical effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* LS01 in children affected by atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Nov-Dec;48 Suppl 1:S34-6.
33. Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert J-M, et al. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol*. 2013 Dec;36(2):296-304.
34. Zhou J, Xu G, Li X, Tu H, Li H, Chang H, et al. *Limosilactobacillus reuteri* FN041 prevents atopic dermatitis in pup mice by remodeling the ileal microbiota and regulating gene expression in Peyer's patches after vertical transmission. *Front Nutr*. 2022 Sep 28;9:987400.
35. Fang Z, Pan T, Wang H, Zhu J, Zhang H, Zhao J, et al. *Limosilactobacillus reuteri* attenuates atopic dermatitis via changes in gut bacteria and indole derivatives from tryptophan metabolism. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 13;23(14):7735.
36. Qi C, Tu H, Zhao Y, Zhou J, Chen J, Hu H, et al. Breast milk-derived *Limosilactobacillus reuteri* prevents atopic dermatitis in mice via activating retinol absorption and metabolism in Peyer's patches. *Mol Nutr Food Res*. 2023 Jan;67(2):e2200444.
37. Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, Mattei L, Tanes C, Clarke E, et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome*. 2017 May 5;5(1):52.
38. Wen C, Wu L, Qin Y, Van Nostrand JD, Ning D, Sun B, et al. Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing with Illumina MiSeq platform. *PLoS One*. 2017 Apr 28;12(4):e0176716.
39. Tizard I. *Veterinary immunology*. 10th ed. St. Louis: Elsevier; 2018.

40. Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M. Oclacitinib (APOQUEL[®]) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther.* 2014 Aug;37(4):317-24.
 41. Hermans MAW, Schrijver B, van Holten-Neelen CCPA, van Wijk RG, van Hagen PM, Daele PLA, et al. The JAK1/JAK2- inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. *Clin Exp Allergy.* 2018 Nov;48(11):1412-1420.
 42. de Mello Souza CH, Shiomitsu K, Hwang B. Cytokine production and the effects of oclacitinib in three canine mast cell tumour cell lines. *Vet Dermatol.* 2022 Apr;33(2):159-e46.
 43. Kanwal S, Singh SK, Soman SP, Choudhury S, Kumari P, Ram PK, et al. Expression of barrier proteins in the skin lesions and inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of atopic dogs. *Sci Rep.* 2021 Jun 1;11(1):11418.
 44. Richter KR, Nasr AN, Mexas AM. Cytokine concentrations measured by multiplex assays in canine peripheral blood samples. *Vet Pathol.* 2018 Jan;55(1):53-67.
- Olink [Internet]. Sweden: Platform; c2022 [cited 2022 Oct 12]. The promise of proteomics; [about 4 screens]. Available from: <https://www.olink.com/our-platform/promise-of-proteomics/>.

Chapitre 3 – Discussion générale

3.1 Cytokines pro-inflammatoires présentes dans les sacs anaux

Cette étude est la première qui évalue les cytokines pro-inflammatoires présentes dans les sacs anaux de chiens sains et atopiques. Cette étude a démontré la présence de l'IFN- γ , de l'IL-10, de l'IL-12/IL-23p40, de l'IL-2, de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF- α , de la MCP-1, du NGF- β , du SCF et du VEGF-A dans les sacs anaux de chiens sains et atopiques. Parmi toutes les cytokines pro-inflammatoires évaluées, une différence significative entre les chiens sains, les CANT et les CAT a été observée seulement avec l'IL-8 et le TNF- α . En effet, la concentration de l'IL-8 était inférieure dans les sacs anaux des CAT comparativement aux CANT. Cette différence pourrait être expliquée par l'utilisation de l'oclocitinib par la majorité des chiens atopiques recevant un traitement antiprurigineux (quatre chiens sur cinq en recevaient lors des prélèvements). L'oclocitinib inhibe l'activation de la voie JAK/STAT. Les JAKs font partie de la famille des tyrosines kinases (TYK) [103]. Ce sont des molécules intracellulaires [104]. Différentes cytokines peuvent se lier à un récepteur qui est couplé à deux JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 ou TYK2) [103, 104]. Cela mène à l'envoi d'un signal de transduction, ce qui aboutit à la régulation de l'expression de différents gènes via la voie de signalisation JAK/STAT. Certains de ces gènes sont impliqués dans l'inflammation. L'oclocitinib se lie aux récepteurs couplés préférentiellement aux JAK1, ce qui inhibe l'envoi du signal de transduction. Il inhibe également dans une moindre mesure les JAK2 et les JAK3 [103]. Chez les humains, il a été démontré que le ruxolitinib, un inhibiteur des JAK1 et des JAK2, inhibe la dégranulation des mastocytes probablement via la voie de signalisation JAK2-STAT5 [105]. Lors de leur dégranulation, les mastocytes libèrent l'IL-8 [106]. À ce jour, il y a seulement une étude qui a évalué l'effet de l'oclocitinib sur l'IL-8 chez les chiens. Cette étude a cependant évalué l'effet de l'oclocitinib sur des lignées de cellules tumorales à mastocytes. Il a été démontré que l'oclocitinib a des propriétés anti-inflammatoires et qu'il diminue la production de l'IL-8 par les lignées de cellules tumorales à mastocytes [107]. Basé sur ces faits, il peut être supposé que la production et la libération d'IL-8 chez les chiens atopiques seraient affectées par l'oclocitinib, et, en ce sens, seraient réduites dans les sacs anaux de chiens atopiques traités avec ce médicament.

La présente étude a également démontré une concentration plus élevée du TNF- α dans les sacs anaux de CAT comparativement aux sacs anaux de chiens sains. Ce résultat est surprenant, puisque les traitements antiprurigineux et l'ASIT ont habituellement un effet anti-inflammatoire [103, 108-110]. Il aurait donc été attendu à ce que les traitements diminuent les facteurs pro-inflammatoires dans les sacs anaux des CAT comparativement aux CANT et donc qu'il y ait une différence significative entre ces deux groupes. D'autres études sur un plus grand nombre de chiens seraient nécessaires, afin de mieux comprendre le rôle du TNF- α dans les sacs anaux de chiens atopiques. Il est à noter qu'il a été démontré qu'il y a une grande variabilité dans les résultats obtenus selon la méthodologie utilisée pour mesurer la concentration des cytokines et que certains facteurs, tels que la race et l'âge, peuvent influencer les résultats [111].

Une hypothèse pour expliquer le peu de différence entre les résultats obtenus dans les différents groupes pour les cytokines pro-inflammatoires évaluées dans le cadre de cette étude (IFN- γ , IL-10, IL-12/IL-23p40, IL-2, IL-6, MCP-1, NGF- β , SCF et VEGF-A) serait l'absence de rôle de ces cytokines pro-inflammatoires dans la dermatite atopique au niveau des sacs anaux. En ce sens, elles ne seraient pas impliquées dans le développement d'une sacculite anale. Il y a cependant plusieurs résultats divergents par rapport à l'expression de certains gènes ou la présence de certaines cytokines dans la peau ou le sang périphérique chez les chiens atopiques, et aucune de ces études ne s'est penchée sur le contenu des sacs anaux (voir Tableau 2). D'autres études seraient donc nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de ces cytokines pro-inflammatoires dans les sacs anaux de chiens atopiques.

Il est à noter que plusieurs limitations doivent être considérées dans la présente étude avec le test multiplex de Luminex utilisé pour la détection des cytokines dans le contenu des sacs anaux. Le test utilisé a été conçu spécifiquement pour évaluer les cytokines à partir de sérum, de plasma ou de surnageants de culture cellulaire [112]. La sensibilité et la spécificité du test pourraient donc être affectées par l'utilisation du contenu de sacs anaux plutôt que ce qui est recommandé par le fabricant. Le nombre de cytokines pouvant être évalué, ainsi que le choix des cytokines

évaluées étaient également limités par les coûts et les plaques commerciales disponibles. En effet, pour des raisons de coûts, une plaque commerciale non personnalisée a été utilisée pour le test multiplex utilisant la technologie XMAP de Luminex. La plaque choisie était donc celle disponible commercialement qui comportait le plus de cytokines pro-inflammatoires connues comme étant impliquées dans la dermatite atopique canine. Il existe une plateforme protéomique à haut débit appelée OLINK utilisée en médecine humaine. Cette plateforme utilise une méthodologie qui peut évaluer la présence de milliers de protéines, telles que les cytokines, chimiokines, enzymes et facteurs de croissance, de façon simultanée. Ce test est donc plus spécifique que les tests multiplex et à un rendement plus élevé [113]. Il est cependant aussi plus dispendieux, en plus d'être standardisé pour les humains [113]. Une autre limitation de la présente étude est la façon dont les cytokines ont été mesurées. En effet, le niveau des cytokines a été évalué à partir des sécrétions des sacs anaux. Il se peut toutefois que des cytokines importantes impliquées dans la dermatite atopique ne soient pas relâchées dans le contenu des sacs anaux par les tissus. En prenant des biopsies des sacs anaux, il aurait été possible de mesurer la concentration des cytokines dans les tissus. Cette méthode est toutefois invasive et comporte des risques, tels qu'une infection de plaie, d'où le prélèvement des sécrétions via un écouvillon a été préféré [4].

Des études évaluant d'autres cytokines présentes dans les sacs anaux de chiens sains et de chiens atopiques seraient nécessaires. En connaissant mieux les différentes cytokines impliquées dans les sacs anaux chez les chiens atopiques, non seulement cela apporterait une lumière différente sur la pathogenèse de la dermatite atopique, mais ultimement, cela pourrait également contribuer à une meilleure compréhension de la pathogenèse de la sacculite anale chez les chiens atopiques. Un des sous-objectifs à la meilleure compréhension du lien possible entre la sacculite anale et la dermatite atopique est de développer éventuellement des traitements qui permettraient de limiter le développement de sacculite anale chez les chiens atopiques et ainsi réduire l'utilisation d'antibiotique.

3.2 Le microbiote bactérien

Cette étude est la première qui évalue le MB des sacs anaux de chiens atopiques avec le NGS. Dans la littérature, il y a une étude et un résumé qui évaluent le MB des sacs anaux de chiens sains avec le NGS [99, 114]. Il a été démontré que le MB des sacs anaux de chiens sains est plus riche et diversifié que ce qui avait été préalablement publié avec les cultures bactériennes [99, 114]. Les résultats de la présente étude démontrent également un MB des sacs anaux riche et diversifié chez les chiens atopiques. Il n'est cependant pas possible de comparer avec la culture bactérienne, puisqu'aucune étude ayant utilisé cette méthode pour évaluer les bactéries présentes dans les sacs anaux de chiens atopiques n'a été publiée à ce jour.

3.2.1 Comparaison du microbiote bactérien des sacs anaux et du rectum chez les chiens sains et atopiques

La composition bactérienne du microbiote était significativement différente entre le rectum et les sacs anaux chez les chiens sains, les CANT et les CAT. Les sacs anaux sont un microenvironnement spécifique [115]. Ainsi, la différence de la composition du MB entre les sacs anaux et le rectum pourrait s'expliquer par des facteurs biologiques et environnementaux, tels que le pH, le taux d'oxygénation, la présence de selles dans le rectum, les sécrétions des glandes apocrines et sébacées dans les sacs anaux, etc. [2, 3].

3.2.2 Comparaison du microbiote bactérien des sacs anaux entre les chiens sains, les chiens atopiques non traités et les chiens atopiques traités

Un des objectifs de cette étude était de comparer le MB des sacs anaux entre les chiens sains, les CANT et les CAT. Il a été démontré que la composition du MB diffère de façon significative entre les sacs anaux des chiens sains et des CANT, ce qui suggère une dysbiose au niveau des sacs anaux des chiens atopiques. Les humains atopiques sont connus pour être plus à risque de développer des infections bactériennes cutanées et la dysbiose cutanée est un des principaux facteurs qui contribuent au risque accru de développer des infections cutanées [116]. Ainsi, la dysbiose

observée dans les sacs anaux de chiens atopiques pourrait favoriser le développement de sacculite anale bactérienne chez les chiens atopiques. Une différence significative dans la structure de la communauté a également été démontrée entre les sacs anaux des CANT et des des CAT et entre les sacs anaux des CANT et des chiens sains, mais pas entre les sacs anaux des chiens sains et des CAT. Cela suggère que les traitements reçus par les chiens atopiques (oclocitinib, cetirizine ou immunothérapie allergénique) atténuent la dysbiose en influençant la composition bactérienne des sacs anaux des chiens atopiques pour qu'elle ressemble davantage à celle des sacs anaux des chiens sains. Il serait intéressant de comparer deux groupes de chiens atopiques ayant des sacculites anales récurrentes (un ne recevant aucun traitement et l'autre avec des chiens sous traitement), afin de déterminer si l'amélioration de cette dysbiose est suffisante pour diminuer la fréquence des sacculites anales. Les bactéries *Helicobacter* spp. et *Pasteurella* spp. étaient plus abondantes dans les sacs anaux des CAT, tandis que la bactérie *Veillonella* spp. était surreprésentée dans les sacs anaux des chiens sains. Il y avait cependant une grande variation dans les données entre les chiens. Cela rend donc l'interprétation de ses résultats difficile. D'autres études avec un plus grand nombre de chiens seraient nécessaires afin de mieux déterminer si ces surreprésentations sont réelles ou non. Il est également important de noter qu'une limitation de ce projet est l'utilisation d'une plaque de séquençage d'ADN et d'un lot de kit d'extraction d'ADN différents pour les chiens sains et les chiens atopiques. En effet, il est rapporté que ces facteurs techniques peuvent avoir un impact sur les résultats générés relatifs à la composition du microbiote bactérien [83, 117, 118].

3.2.3 Comparaison du microbiote bactérien du rectum entre les chiens sains, les chiens atopiques non traités et les chiens atopiques traités

La composition du MB du rectum était significativement différente entre les trois groupes (chiens sains, CANT et CAT). L'étude de Thomsen *et al.* a également comparé le MB du rectum entre des shiba inus sains et atopiques et elle est arrivée à la même conclusion [97]. Une autre étude a également révélé un microbiote fécal différent entre les chiens sains et atopiques [119]. Il semblerait donc que les chiens atopiques présentent une dysbiose au niveau intestinal. Chez les

humains, il est rapporté que le microbiote fécal diffère entre les humains sains et les humains atopiques [120]. L'étude de Wang *et al.* a évalué le microbiote fécal chez des nouveau-nés humains âgés d'une semaine et une diversité moins importante a été notée chez les nouveau-nés qui ont éventuellement développé une atopie [121]. Il est à noter que les symptômes gastro-intestinaux ne sont habituellement pas observés lors de dermatite atopique canine et humaine [4, 122, 123]. Cette dysbiose au niveau du rectum suggère donc que le microbiote intestinal a un rôle à jouer dans la pathogenèse de la dermatite atopique chez les humains et les chiens [119, 124].

Différentes bactéries sont surreprésentées dans le rectum des différents groupes. Parmi toutes ces bactéries, il y a en avait trois qui se démarquaient par leur abondance relative plus élevée, soient *Fusobacterium* spp. surreprésenté dans le rectum des CANT et *Ligilactobacillus* spp. et *Limosilactobacillus* spp. surreprésentés dans le rectum des chiens sains. Dans l'étude de Thomsen *et al.*, *Fusobacterium* spp. était plus abondant dans le rectum des shiba inus sains comparativement aux shiba inus atopiques [97]. Une autre étude a évalué le microbiote fécal chez des chiens atopiques et sains et a révélé que *Fusobacterium* spp. était également plus abondant chez les chiens sains [119]. Les résultats divergents de la présente étude pourraient être expliqués par des facteurs biologiques, tels que la race, ou des facteurs techniques, tels que le kit d'extraction d'ADN utilisé, la région hypervariable séquencée ou la plateforme utilisée pour les analyses bio-informatiques [83, 88].

Tel que mentionné plus haut, les *Ligilactobacillus* spp. et *Limosilactobacillus* spp. étaient plus abondants dans le rectum des chiens sains. En ce qui concerne le *Ligilactobacillus* spp., chez les humains atopiques, la qualité de vie et la manifestation clinique de la maladie seraient améliorées lors de l'utilisation de probiotiques à base de *Ligilactobacillus salivarius* (anciennement nommé *Lactobacillus salivarius*) [125, 126]. Ce probiotique aurait un effet modulateur sur le microbiote intestinal et sur le système immunitaire en augmentant la réponse Th1 et en diminuant la réponse Th2. [125]. Par rapport au *Limosilactobacillus* spp., des études ont été menées chez les souris avec un probiotique contenant la bactérie *Limosilactobacillus reuteri*. Il a été démontré que ce

probiotique peut prévenir le développement de dermatite atopique lorsqu'il est donné aux souris en gestation et aux nouveau-nés pendant quelques semaines suite à leur naissance [127, 128]. *Limosilactobacillus reuteri* administré sous forme de probiotique atténuerait également les signes cliniques de dermatite atopique chez les souris en modulant la réponse immunitaire [129]. Ainsi, une dysbiose affectant l'abondance des *Ligilactobacillus* spp. et *Limosilactobacillus* spp. pourrait avoir un rôle à jouer dans la pathogenèse de la dermatite atopique.

3.2.4 Analogie du microbiote bactérien des sacs anaux avec celui du microbiote bactérien cutané

Étant donné que les sacs anaux sont une invagination cutanée, il est intéressant de comparer la présente étude avec les études effectuées sur le MB cutané [3]. Une étude évaluant l'effet de la prednisone et de la cyclosporine sur le MB cutané de chiens croisés (maltais-beagle) atopiques n'a démontré aucune différence significative au niveau de la composition du MB cutané que les chiens reçoivent ou non un traitement [92]. Une autre étude n'a révélé aucune différence dans la composition du MB cutané entre deux groupes de bergers allemands atopiques : un traité avec l'ocloclitinib et l'autre non [96]. Les résultats de l'étude d'Apostolopoulos *et al.* divergent donc avec ceux obtenus dans la présente étude [96]. Cette différence pourrait être expliquée par des facteurs biologiques et environnementaux dissimilaires entre les sacs anaux et la peau, tels que la présence de poils sur la peau, la température, le pH, le taux d'oxygénation, etc. Contrairement aux sacs anaux, le MB cutané est également exposé au milieu extérieur, ce qui modifie constamment sa composition bactérienne. En effet, des bactéries provenant de l'environnement peuvent, par contact direct ou indirect, se déposer sur la peau et devenir un membre transitoire du MB [98]. Ce faisant, il se peut donc que les traitements aient au final moins d'influence sur le MB cutané. Le mode d'action des antiprurigineux pourrait également être un facteur influençant ou non le MB. Par exemple, les glucocorticoïdes, avec leur large spectre d'action, peuvent inhiber la synthèse de kératine par les kératinocytes, la prolifération des fibroblastes, la production de certaines cytokines, telles que l'IL-2, l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- γ et certaines cellules immunitaires [130]. Cela peut avoir pour conséquence d'affecter le MB, puisque ce dernier interagit

constamment avec le système immunitaire [86]. Par opposition, le lokivetmab a un spectre d'action beaucoup plus limité puisqu'il cible spécifiquement l'IL-31 [51]. Il est donc moins probable qu'il influence le MB. D'autres études avec un plus grand nombre de cas et évaluant davantage de traitements antiprurigineux seront cependant nécessaires pour mieux comprendre le rôle des médicaments sur la composition du MB des sacs anaux et de la peau.

Bien que le sac anal soit une invagination de la peau, il semblerait que le MB cutané au niveau de la région périanale diffère également de celui retrouvé dans les sacs anaux des chiens sains. Par exemple, l'abondance relative médiane du *Bacteroides* spp. dans les sacs anaux de chiens sains est de 13,35%, tandis que la médiane ou la moyenne est de moins de 6% au niveau de la région périanale chez les chiens sains [87, 91, 99]. Cette différence pourrait s'expliquer, encore une fois, par des facteurs biologiques et environnementaux, mais aussi par des facteurs techniques, tels que la méthode d'extraction de l'ADN, la sélection des amorces pour la PCR, la méthode utilisée pour le séquençage et la plateforme logicielle utilisée pour les analyses bio-informatiques [83, 85].

3.3 Conclusion

Cette étude a démontré qu'une dysbiose est présente dans les sacs anaux de chiens atopiques. Cette dysbiose semble s'atténuer lorsque les chiens affectés reçoivent de l'ocloctinib, de la cetirizine ou l'immunothérapie allergénique. En effet, la composition du microbiote bactérien des sacs anaux des chiens atopiques recevant un traitement se rapproche de celle des sacs anaux des chiens sains. Les sacs anaux des chiens sains et atopiques contiennent également plusieurs cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN- γ , l'IL-10, l'IL-12/IL-23p40, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, la MCP-1, le NGF- β , le TNF- α , le SCF et le VEGF-A. Parmi celles-ci, l'IL-8 était en concentration plus importante dans les sacs anaux des CANT comparativement à ceux des CAT et le TNF- α était en quantité plus importante dans les sacs anaux des CAT comparativement à ceux des chiens sains. Les résultats de la présente étude suggèrent donc qu'un certain degré d'inflammation et de

dysbiose pourrait contribuer au développement de sacculite anale bactérienne chez les chiens atopiques. D'autres études sur un plus large nombre de cytokines permettraient possiblement de mettre en évidence, dans les sacs anaux, des cytokines ayant un rôle important lors de la dermatite atopique canine. Cela pourrait éventuellement mener au développement d'un traitement qui pourrait viser une cytokine responsable de l'inflammation présente dans les sacs anaux lors de dermatite atopique dans le but de diminuer l'inflammation présente et ainsi de réduire les risques de développement de sacculites anales bactériennes. Il serait également intéressant d'effectuer d'autres études avec un plus grand nombre de cas et davantage d'antiprurigineux, tels que les glucocorticoïdes, la ciclosporine et le lokivetmab, afin de mieux comprendre la différence au niveau du MB des sacs anaux entre les chiens sains, les CANT et les CAT. Cela pourrait éventuellement mener au développement de médicaments permettant de restaurer le MB local lors de dermatite atopique et ainsi prévenir l'usage d'antimicrobiens lors de sacculite anale bactérienne dans un contexte de dermatite atopique.

Références bibliographiques

1. Goldschmidt MH, Zoltowski C. Anal sac gland adenocarcinoma in the dog: 14 cases. *J Small Anim Pract.* 1981;22(3):119-28.
2. van Duijkeren E. Disease conditions of canine anal sacs. *J Small Anim Pract.* 1995;36(1):12-6.
3. Pappalardo E, Martino PA, Noli C. Macroscopic, cytological and bacteriological evaluation of anal sac content in normal dogs and in dogs with selected dermatological diseases. *Vet Dermatol.* 2002;13(6):315-22.
4. Miller WH. *Muller & Kirk's small animal dermatology.* 7th edition / William H. Miller Jr., Craig E. Griffin, Karen L. Campbell.. ed. Muller and Kirk's small animal dermatology, ed. C.E. Griffin, et al. 2013: St. Louis, Missouri : Elsevier/Mosby.
5. Fossum TW, Duprey LP. *Small Animal Surgery E-Book.* Vol. Fifth edition. 2019, Philadelphia, PA: Mosby.
6. Tsukise A, Meyer W, Nagaoka D, Kikuchi K, Kimura J, Fujimori O. Lectin histochemistry of the canine anal glands. *Annals of Anatomy.* 2000;182(2):151-159.
7. Ashdown RR. Symposium on canine recto-anal disorders--I: Clinical anatomy. *J Small Anim Pract.* 1968;9(7):315-22.
8. Montagna W, Parks HF. A histochemical study of the glands of the anal sac of the dog. *Anatomical Record.* 1948;100(3):297-317.
9. Preti G, Muetterties EL, Furman JM, Kennelly JJ, Johns BE. Volatile constituents of dog (*Canis familiaris*) and coyote (*Canis latrans*) anal sacs. *Journal of Chemical Ecology.* 1976;2(2):177-186.
10. Lake AM, Scott DW, Miller WH, Erb HN. Gross and cytological characteristics of normal canine anal-sac secretions. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2004;51(5):249-53.
11. Robson DC, Burton GG, Lorimer MF. Cytological examination and physical characteristics of the anal sacs in 17 clinically normal dogs. *Aust Vet J.* 2003;81(1-2):36-41.
12. James DJ, Griffin CE, Polissar NL, Neradilek MB. Comparison of anal sac cytological findings and behaviour in clinically normal dogs and those affected with anal sac disease. *Vet Dermatol.* 2011;22(1):80-7.

13. Halnan CR. The diagnosis of anal sacculitis in the dog. *J Small Anim Pract.* 1976;17(8):527-35.
14. Natynczuk S, Bradshaw JWS, McDonald DW. Chemical constituents of the anal sacs of domestic dogs. 1989;17(1):83-87.
15. Miyazaki T, Nishimura T, Yamashita T, Miyazaki M. Olfactory discrimination of anal sac secretions in the domestic cat and the chemical profiles of the volatile compounds. *J Ethol.* 2018;36(1):99-105.
16. Dunbar IF. Olfactory preferences in dogs: the response of male and female beagles to conspecific odors. *Behav Biol.* 1977;20(4):471-81.
17. O'Neill DG, Hendricks A, Phillips JA, Brodbelt DC, Church DB, Loeffler A. Non-neoplastic anal sac disorders in UK dogs: Epidemiology and management aspects of a research-neglected syndrome. *Vet Rec.* 2021;189(2):e203.
18. Corbee RJ, Woldring HH, van den Eijnde LM, Wouters EGH. A Cross-Sectional Study on Canine and Feline Anal Sac Disease. *Animals (Basel).* 2021;12(1):95.
19. Monnet E. *Small animal soft tissue surgery.* 2013: Ames, Iowa : Wiley-Blackwell.
20. Paterson S, Steen S. *Anal sacs: a new approach to an old problem?* 2016.
21. Halnan CR. The frequency of occurrence of anal sacculitis in the dog. *J Small Anim Pract.* 1976;17(8):537-41.
22. Halnan CR. Therapy of anal sacculitis in the dog. *J Small Anim Pract.* 1976;17(10):685-91.
23. Hill LN, Smeak DD. Open versus closed bilateral anal sacculotomy for treatment of non-neoplastic anal sac disease in dogs: 95 cases (1969-1994). *J Am Vet Med Assoc.* 2002;221(5):662-5.
24. Charlesworth TM. Risk factors for postoperative complications following bilateral closed anal sacculotomy in the dog. *J Small Anim Pract.* 2014;55(7):350-4.
25. Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;114(3-4):207-8.
26. Marsella R, De Benedetto A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. *Vet Sci.* 2017;4(3):37.

27. Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Nuttall T, Bizikova P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):84-e25.
28. Marsella R, Olivry T, Carlotti DN. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2011;22(3):239-48.
29. Marsella R. Advances in our understanding of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2021;32(6):547-e151.
30. Tizard IR. *Veterinary immunology.* Tenth edition.. ed. 2018: St. Louis, Missouri : Elsevier.
31. Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ, Fadok VA. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. 2012;241(2):194-207.
32. Arcique MA, Bajwa J. Atopic dermatitis in humans and dogs. *Can Vet J.* 2020;61(1):82-84.
33. Maeda S, Fujiwara S, Omori K, Kawano K, Kurata K, Masuda K, et al. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;88(1-2):79-87.
34. Marsella R, Olivry T, Maeda S. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol.* 2006;17(2):111-20.
35. Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(5):789-95.
36. Klukowska-Rötzler J, Chervet L, Müller EJ, Roosje P, Marti E, Janda J. Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2013;24(1):54-9.e13-4.
37. Olivry T, Bizikova P. Investigations on the expression and relevance of nerve growth factor in dogs with atopic dermatitis. *Itch.* 2019;4(1):e22.
38. Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):124-e32.

39. Hammerberg B, Olivry T, Orton SM. Skin mast cell histamine release following stem cell factor and high-affinity immunoglobulin E receptor cross-linking in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2001;12(6):339-46.
40. Asahina R, Maeda S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Vet Dermatol.* 2017;28(1):16-e5.
41. Schlotter YM, Rutten VPMG, Riermers FM, Knol EF, Willemsse T. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;143(1-2):20-6.
42. Ricklin ME, Roosje P, Summerfield A. Characterization of canine dendritic cells in healthy, atopic, and non-allergic inflamed skin. *J Clin Immunol.* 2010;30(6):845-54.
43. Santoro D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: An Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2019;49(1):9-26.
44. Maeda S, Okayama T, Omori K, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, et al. Expression of CC chemokine receptor 4 (CCR4) mRNA in canine atopic skin lesion. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;90(3-4):145-54.
45. Pucheu-Haston CM, Santoro D, Bizikova P, Eisenschenk MNC, Marsella R, Nuttall T. Review: Innate immunity, lipid metabolism and nutrition in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):104-e28.
46. Olivry T. Pathogenesis of canine atopic dermatitis: 2004 hypothesis. *Veterinary Dermatology.* 2004;15:1-1.
47. Bloom PB. Canine and feline eosinophilic skin diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2006;36(1):141-60.
48. Di Tommaso M, Luciani A, Crisi PE, Beschi M, Rosi P, Rocconi F, et al. Detection of Serum Allergen-Specific IgE in Atopic Dogs Tested in Northern Italy: Preliminary Study. *Animals (Basel).* 2021;11(2):358.
49. McCandless EE, Rugg CA, Fici GJ, Messamore JE, Aleo MM, Gonzales AJ. Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;157(1-2):42-8.

50. Gonzales AJ, Humphrey WR, Messamore JE, Fleck TJ, Fici GJ, Shelly JA, et al. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2013;24(1):48-53.
51. Tamamoto-Mochizuki C, Olivry T. IL-31 and IL-31 receptor expression in acute experimental canine atopic dermatitis skin lesions. *Vet Dermatol.* 2021;32(6):631-e169.
52. Maeda S, Tsuchida H, Marsella R. Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Vet Dermatol.* 2007;18(6):422-6.
53. Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(3-4):379-84.
54. Hayashiya S, Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Hayasaki M, Nomura T, et al. Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2002;49(1):27-31.
55. Shida M, Kadoya M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;102(1-2):19-31.
56. Fujiwara S, Yasunaga S, Iwabuchi S, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from dogs experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;93(1-2):9-20.
57. Koury J, Ramirez A, Xie C, Harb J, Dong C, Maki C, et al. Phosphodiesterase 4D, miR-203 and selected cytokines in the peripheral blood are associated with canine atopic dermatitis. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218670.
58. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;88(1-2):1-12.
59. Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, Tozon N. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med.* 2012;10:234.
60. Kitamiya E, Iwasaki T, Momoi Y. Molecular cloning of interleukin-12 receptor beta2 chain and its expression in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;106(3-4):221-8.

61. Lemarié SL, Horohov DW. Evaluation of interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in dogs with generalized demodicosis. *Vet Dermatol.* 1996;7(4):213-219.
62. Kanwal S, Singh SK, Soman SP, Choudhury S, Kumari P, Ram PK, et al. Expression of barrier proteins in the skin lesions and inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of atopic dogs. *Sci Rep.* 2021;11(1):11418.
63. Vestergaard C, Just H, Nielsen JB, Thestrup-Pedersen K, Deleuran M. Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(5):353-8.
64. Hill PB, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;81(3-4):187-98.
65. Cobiella D, Gram D, Santoro D. Noninvasive evaluation of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) protein concentrations in the stratum corneum and serum of healthy and atopic dogs. *Vet Dermatol.* 2020;31(2):102-105.
66. Asahina R, Nishida H, Kamishina H, Maeda S. Expression of IL-33 in chronic lesional skin of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2018;29(3):246-e91.
67. Mizuno T, Kanbayashi S, Okawa T, Maeda S, Okuda M. Molecular cloning of canine interleukin-31 and its expression in various tissues. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;131(1-2):140-3.
68. Maeda S, Maeda S, Shibata S, Chimura N, Fukata T. Molecular cloning of canine protease-activated receptor-2 and its expression in normal dog tissues and atopic skin lesions. *J Vet Med Sci.* 2009;71(5):577-82.
69. Asahina R, Ueda K, Oshima Y, Kanei T, Kato M, Furue M, et al. Serum canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) concentrations correlate with disease severity and therapeutic responses in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2020;31(6):446-455.

70. Gow DJ, Jackson H, Forsythe P, Nuttall T, Gow AG, Mellanby RJ, et al. Measurement of serum Interleukin 34 (IL-34) and correlation with severity and pruritus scores in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2020;31(5):359-e94.
71. Mazrier H, Vogelnest LJ, Taylor RM, Williamson P. Altered plasma cytokines in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2022;33(2):131-e38.
72. Maeda S, Tsukui T, Saze KI, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H, et al. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;103(1-2):83-92.
73. Maeda S, Ohmori K, Yasuda N, Kurata K, Sakaguchi M, Masuda K, et al. Increase of CC chemokine receptor 4-positive cells in the peripheral CD4 cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(9):1467-73.
74. Rodrigues Hoffmann A. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. *Vet Dermatol.* 2017;28(1):60-e15.
75. Costa M, Weese JS. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet J.* 2019;249:10-15.
76. Marcon E. Mesures de la biodiversité. 2015.
77. Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J.* 2010;4(1):17-27.
78. Yue JC, Clayton MK. A Similarity Measure Based on Species Proportions. *Communications in Statistics - Theory and Methods.* 2005;34(11):2123-2131.
79. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 2020;34:100622.

80. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):208-36.
81. Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J.* 2015;56(2):228-40.
82. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 1990;345(6270):63-5.
83. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(6):1059-1070.
84. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2003;226:3-6.
85. Chappidi S, Villa EC, Cantarel BL. Using Mothur to Determine Bacterial Community Composition and Structure in 16S Ribosomal RNA Datasets. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2019;67(1):e83.
86. Tizard IR, Jones SW. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018;48(2):307-322.
87. Cuscó A, Sánchez A, Altet L, Ferrer L, Francino O. Individual Signatures Define Canine Skin Microbiota Composition and Variability. *Front Vet Sci.* 2017;4:6.
88. Chermprapai S, Ederveen THA, Broere F, Broens EM, Schlotter YM, van Schalkwijk S, et al. The bacterial and fungal microbiome of the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis and the impact of topical antimicrobial therapy, an exploratory study. *Vet Microbiol.* 2019;229:90-99.
89. Torres S, Clayton JB, Danzeisen JL, Ward T, Huang H, Knights D, et al. Diverse bacterial communities exist on canine skin and are impacted by cohabitation and time. *PeerJ.* 2017;5:e3075.
90. Rodrigues Hoffmann A, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Stephenson CE, et al. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One.* 2014;9(1):e83197.

91. Cuscó A, Belanger JM, Gershony L, Islas-Trejo A, Levy K, Medrano JF, et al. Individual signatures and environmental factors shape skin microbiota in healthy dogs. *Microbiome*. 2017;5(1):139.
92. Widmer G, Ferrer L, Favrot C, Paps J, Huynh K, Olivry T. Glucocorticosteroids and ciclosporin do not significantly impact canine cutaneous microbiota. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):51.
93. García-Fonticoba R, Ferrer L, Francino O, Cuscó A. The microbiota of the surface, dermis and subcutaneous tissue of dog skin. *Anim Microbiome*. 2020;2(1):34.
94. Rodrigues Hoffmann A, Proctor LM, Surette MG, Suchodolski JS. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet Pathol*. 2016;53(1):10-21.
95. Rodriguez-Campos S, Rostaher A, Zwickl L, Fischer N, Brodard I, Vidal S, et al. Impact of the early-life skin microbiota on the development of canine atopic dermatitis in a high-risk breed birth cohort. *Sci Rep*. 2020;10(1):1044.
96. Apostolopoulos N, Glaeser SP, Bagwe R, Janssen S, Mayer U, Ewers C, et al. Description and comparison of the skin and ear canal microbiota of non-allergic and allergic German shepherd dogs using next generation sequencing. *PLoS One*. 2021;16(5):e0250695.
97. Thomsen M, Künstner A, Wohlers I, Olbrich M, Lenfers T, Osumi T, et al. A comprehensive analysis of gut and skin microbiota in canine atopic dermatitis in Shiba Inu dogs. *BioRxiv*. 2022:2022.07.11.497949.
98. Weese JS. The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Vet Dermatol*. 2013;24(1):137-45.e31.
99. Bergeron CC, Costa MC, de Souza LB, Sauv e F. Description of the bacterial microbiota of anal sacs in healthy dogs. *Can J Vet Res*. 2021;85(1):12-17.
100. Bradley CW, Morris DO, Rankin SC, Cain CL, Mistic AM, Houser T, et al. Longitudinal Evaluation of the Skin Microbiome and Association with Microenvironment and Treatment in Canine Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2016;136(6):1182-1190.
101. Pierezan F, Olivry T, Paps JS, Lawhon SD, Wu J, Steiner JM, et al. The skin microbiome in allergen-induced canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2016;27(5):332-e82.

102. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(3):143-155.
103. Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M. Oclacitinib (APOQUEL[®]) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther.* 2014;37(4):317-24.
104. Roskoski Jr R. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. *Pharmacol Res.* 2016;111:784-803.
105. Hermans MAW, Schrijver B, van Holten-Neelen CCPA, van Wijk RG, van Hagen PM, van Daele PLA, et al. The JAK1/JAK2- inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(11):1412-1420.
106. Alevizos M, Karagkouni A, Vasiadi M, Sismanopoulos N, Makris M, Kalogeromitros D, et al. Rupatadine inhibits inflammatory mediator release from human laboratory of allergic diseases 2 cultured mast cells stimulated by platelet-activating factor. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;111(6):542-7.
107. de Mello Souza CH, Shiomitsu K, Hwang B. Cytokine production and the effects of oclacitinib in three canine mast cell tumour cell lines. *Vet Dermatol.* 2022;33(2):159-e46.
108. Corsico AG, Leonardi S, Licari A, Marseglia G, Giudice MMD, Peroni DG, et al. Focus on the cetirizine use in clinical practice: a reappraisal 30 years later. *Multidiscip Respir Med.* 2019 Dec 6;14:40.
109. Majewska A, Dembele K, Dziendzikowska K, Prostek A, Gajewska M. Cytokine and lymphocyte profiles in dogs with atopic dermatitis after allergen-specific immunotherapy. *Vaccines (Basel).* 2022 Jun 28;10(7):1037.
110. Moote W, Kim H, Ellis AK. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy asthma Clin Immunol.* 2018 Sep 12;14(Suppl 2):53.
111. Richter KR, Nasr AN, Mexas AM. Cytokine Concentrations Measured by Multiplex Assays in Canine Peripheral Blood Samples. *Vet Pathol.* 2018;55(1):53-67.
112. ThermoFisher Scientific. Cytokine/Chemokine/Growth Factor 11-Plex Canine ProcartaPlex™ Panel 1. 2006-2022; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EPX11A-50511->

124. Fang Z, Li L, Zhang H, Zhao J, Lu W, Chen W. Gut Microbiota, Probiotics, and Their Interactions in Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis: A Review. *Front Immunol.* 2021;12:720393.
125. Drago L, Lemoli E, Rodighiero V, Nicola L, De Vecchi E, Piconi S. Effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 (DSM 22775) treatment on adult atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled study. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(4):1037-48.
126. Niccoli AA, Artesi AL, Candio F, Ceccarelli S, Cozzali R, Ferraro L, et al. Preliminary results on clinical effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* LS01 in children affected by atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48 Suppl 1:S34-6.
127. Zhou J, Xu G, Li X, Tu H, Li H, Chang H, et al. *Limosilactobacillus reuteri* FN041 prevents atopic dermatitis in pup mice by remodeling the ileal microbiota and regulating gene expression in Peyer's patches after vertical transmission. *Front Nutr.* 2022;9:987400.
128. Qi C, Tu H, Zhao Y, Zhou J, Chen J, Hu H, et al. Breast Milk-Derived *Limosilactobacillus reuteri* Prevents Atopic Dermatitis in Mice via Activating Retinol Absorption and Metabolism in Peyer's Patches. *Mol Nutr Food Re.* 2023;67(2):e2200444.
129. Fang Z, Pan T, Wang H, Zhu J, Zhang H, Zhao J, et al. *Limosilactobacillus reuteri* Attenuates Atopic Dermatitis via Changes in Gut Bacteria and Indole Derivatives from Tryptophan Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7735.
130. Schafer-Korting M, Kleuser B, Ahmed M, Holtje HD, Korting HC. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action. *Skin Pharmacol Physiol.* 2005;18(3):103-14.

Annexe A – Article publié sur le microbiote bactérien des sacs anaux de chiens sains

Title: Characterization of the bacterial microbiota of anal sacs in healthy dogs.

Camylle C Bergeron*, Marcio Carvalho Costa[†], Lucilene Bernardi de Souza*, and Frédéric Sauvé*

* Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2

[†]Department of Veterinary Biomedical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2

Introduction

The dogs have a pair of anal sacs, which are skin invaginations positioned between muscles, specifically those of the internal and external anal sphincters (1-5). They are connected to the anocutaneous junction by a duct where the secretions produced by the apocrine and sebaceous glands in the anal sacs are evacuated during defecation. The full content of the anal sacs secretions results from a mixture of glandular secretions, desquamated keratinocytes from the stratified squamous epithelium lining the anal sacs and ducts, cellular debris, and resident microorganisms such as bacteria and yeasts (1,2,4-6). Based on cytology, some studies also reported the presence of leucocytes and erythrocytes in normal anal sacs (2,7-9). The consistency, odor, and colour of the contents of the anal sacs vary greatly between dogs (1,2,4,5,8,9). Their function is not clearly established, but it has been suggested that the volatile compound of anal sacs secretions may have a role for scent communication in dogs (1,5,10).

Dogs can be affected by diseases related to anal sacs, such as impaction, inflammation, infection, or neoplasia. Some of these conditions may require regular anal sac expression, local or systemic antibiotic treatment, dietary modification or, in more severe or refractory cases, surgery (1,3,4,6). Anal saccullectomy can lead to serious complications, such as faecal incontinence, fistulation, and stricture formation (3). Unfortunately, the pathophysiology and risk factors related to anal sac diseases are mostly uncertain, making prevention of these conditions more difficult (6).

During the last decade, the development of new methods for DNA sequencing has allowed a better characterization of bacterial communities, since only a minority of bacteria grows in standard culture media (11,12). The bacterial microbiota is defined as the bacteria living in a specific environment (13). The bacterial microbiota was found to be very important for maintenance of health: it participates in digestion and detoxification, competes with pathogens to prevent their colonization, and interacts with the immune system. The interactions between the bacterial microbiota and the immune system are essential in order to have adequate innate and adaptive immune responses. Moreover, the microbiota attracts inflammatory cells to the surface of the skin, digestive, respiratory and genitourinary epithelia and mucosa to help protecting these areas against pathogens (14). Thus, imbalances in bacterial microbiota have been associated with the pathogenesis of certain diseases (15-17).

In order to determine the role of the bacterial microorganisms in the healthy and diseased anal sacs, we must better define first the bacterial microbiota present in the anal sacs of healthy dogs. Previous studies using culture-based approaches identified staphylococci, streptococci, micrococci, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., and *Pseudomonas* spp. as normal commensal bacteria of the anal sacs, but to the best of the authors' knowledge, no studies were performed on the content of anal sacs in dogs using the new methods of DNA sequencing (2,3,18).

The objectives of this study were to characterize the anal sac microbiota of healthy dogs using next generation DNA sequencing (NGS), and to investigate the influence of rectal bacteria in the composition of the anal sac microbiota.

Materials and methods

Animal selection

The study was approved by the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal's Animal Care Committee (Comité d'éthique de l'utilisation des animaux). The MIRA Foundation had signed a written consent form for participation in this study.

Fifteen healthy dogs from the MIRA Foundation were enrolled in this study. All the dogs had a related genetic background (MIRA Foundation breeds and manages their own dog colony). The MIRA Foundation is a non-profit organization that offers free guide dogs and service dogs. The breeding dogs live in foster families. Several days before giving birth, the pregnant bitches are transferred to the MIRA Foundation's facility (MIRA Campus) where they give birth. The puppies stay in this facility for 9 weeks. At 9 weeks of age, the puppies are kept in a foster family until they reach 12 to 18 months old. Then, the dogs come back to MIRA Campus to be trained for assistance (visual and mobility impairment, and autism spectrum). The dogs enrolled in this study were 13 and 2 Labernese and Labrador Retriever, respectively, aged from 1 to 11.8 year (median 1.3 years), and fed with similar diets (Table I). The dogs 2-6, 8, and 14 were all in contact, living together at MIRA Campus. The dogs 10, 12, and 13 were in lactation, and lived in the same facility, but in different pens at MIRA Campus. The remaining dogs (1, 7, 9, 11, and 15) were living in separate houses.

Table I: Signalement, diet, and housing of dogs included in the study.

Dogs	Breed	Sex	Age (y)	Diets	Dog housing
Dog 1	Labernese	MN	2.5	Hill's ^{MD} Prescription Diet ^{MD} t/d ^{MD} Canine ^a	Single-family house
Dog 2	Labernese	MN	1.2	vetdiet [®] chicken adult large	MFo – training pen breed ^b

Dog 3	Labernese	MN	1.0	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – training pen breed ^b
Dog 4	Labernese	MN	1.0	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – training pen breed ^b
Dog 5	Labernese	FS	1.2	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – training pen breed ^b
Dog 6	Labernese	FS	1.2	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – training pen breed ^b
Dog 7	Labrador Retriever	FS	11.8	vetdiet®	chicken	adult	large	Single-family house breed ^b vetdiet® adult-skin & stomach health ^b vetdiet® senior all breeds ^b
Dog 8	Labernese	MN	1.0	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – training pen breed ^b
Dog 9	Labernese	IM	1.3	Unknown				Single-family house
Dog 10	Labernese	IF	3.7	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – individual pen breed ^b vetdiet® puppy large breed ^b
Dog 11	Labrador Retriever	MN	4.6	Purina®	Pro Plan®	Focus®		Single-family house Sensitive Skin and Stomach Formula Dog Food ^a
Dog 12	Labernese	IF	4.3	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – individual pen breed ^b
Dog 13	Labernese	IF	3.5	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – individual pen breed ^b vetdiet® puppy large breed ^b
Dog 14	Labernese	MN	1.0	vetdiet®	chicken	adult	large	MFo – training pen breed ^b

Dog 15 Labernese FS 3.0 vetdiet® chicken adult large Single-family house
breed^b

MN – male neutered; FS – female spayed; IM – intact male; IF – intact female; MFO – MIRA Foundation

^aMississauga, Ontario, Canada

^bMondou, Anjou, Quebec, Canada

To be included in the study, the dogs should not have been bathed and should not have received systemic or topical drugs (antibiotics, anti-inflammatories, essential fatty acids), 1 and 3 months prior to the study, respectively. The dogs had to be healthy based on physical examination (no clinical signs or physical examination findings consistent with cutaneous or systemic disease, nor with neoplasm).

Sample collection

Three swabs were collected on the same day on each dog: one from the rectum and one from each anal sac (left and right). All the samples were collected from November 2018 to March 2019.

The perianal area was cleaned with sterile gauzes and 4% chlorhexidine (DermChlor 4, Dechra, Pointe-Claire, Quebec, Canada). Two minutes after cleaning the area, a sample from the rectum was obtained by inserting a sterile flocked swab (FLOQSwabs, Murrieta, California, USA) 2 cm into the rectum.

After putting on sterile gloves, sterile lubricant was applied to the index finger, which was gently inserted into the anus. With the thumb outside of dog's anus, the left anal sac was expressed by bringing the index and thumb together, so that the content of the anal sac got through the duct opening on the left side of the anus. The first drops were not collected to decrease the risk of contamination and to be more representative of the content of the anal sac. The secretions were

collected with a sterile flocked swab. The secretions of the right anal sac were collected in the same fashion. Before to collect the secretions from the right anal sac, the perianal area was cleaned again with 4% chlorexidine, and sterile gloves changed. All the samples were transported refrigerated and subsequently frozen at -80 °C until DNA extraction.

DNA extraction and sequencing

The DNA extraction was performed on all samples with a commercial kit *DNeasy® PowerSoil®* (Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer (19). Previously reported primers (515 forward paired to 806 reverse) were used to amplify the V4 hypervariable region of the bacterial 16S ribosomal RNA gene by PCR (20). Sequencing was performed at the Genome Quebec Innovation Centre. The version 4 of an Illumina MiSeq IEMFile platform was used for sequencing using the V2 reagent kit (2 x 250 cycles). Sequences will be made available at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) upon acceptance of the manuscript.

The software mothur was used to perform the bioinformatic analysis following recommendations of Kozich et al (21). It clustered the good quality reads in operation taxonomic units (OTUs) at the genus level (> 94% similarity). The classification of the OTUs was performed using the Ribosomal Database Project (RDP) databank.

Statistical analysis

The alpha diversity was evaluated with the Chao index (estimator of richness), Shannon index, and inverse Simpson index (diversity indices). The Anderson-Darling test was performed to assess the normality of data distribution and results from the inverse Simpson index were transformed into log to obtain a normal distribution. Two-way Analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Tukey test to identify significant differences in the alpha diversity indices, with a $P < 0.05$ considered significant.

Beta diversity was assessed by the Jaccard index that evaluates community membership, representing which bacteria are present in a community, and by the Yue and Clayton index that

evaluates community structure, representing which bacteria are present in respect with their abundance in a community. The analysis of molecular variance (AMOVA) was used to compare the community membership and community structure between groups. A $P < 0.05$ was considered significant. Principal coordinate analysis (PCoA) plots were obtained to visualize the similarities between groups (rectum and left and right anal sacs).

Results

Ten and nine bacterial phyla were identified in the left and right anal sacs, respectively, while 12 bacterial phyla were identified in the rectum. The predominant phyla in the left and right anal sacs and rectum were Firmicutes (60.4%, 60.1%, and 26.2%, respectively), Bacteroidetes (20.2%, 26.0%, and 21.3%, respectively), Proteobacteria (17.4%, 10.2%, and 20.5% respectively), Fusobacteria (1.1%, 3.3%, and 4.1%, respectively), and Actinobacteria (0.9%, 0.4%, and 27.7%, respectively) (Figure 1). The predominant genera found in the left and right anal sacs were *Enterococcus* (34.3% and 31.5%, respectively), *Bacteroides* (16.5% and 20.6%, respectively), and *Proteus* (10.9% and 8.5%, respectively), while in the rectum the predominant genera identified were *Corynebacterium* (21.5%), *Prevotella* (13.8%), and *Lactinobacillus* (8.5%) (Figure 2).

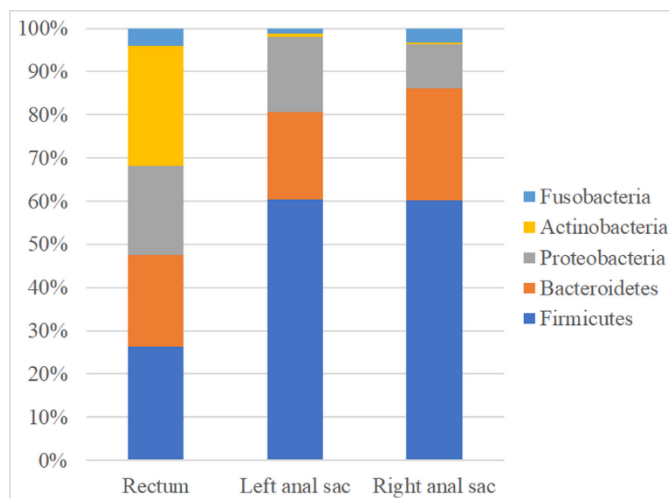


Figure 1: Relative abundance of the main bacterial communities inhabiting the left and right anal sacs and rectum of dogs to the phylum level.

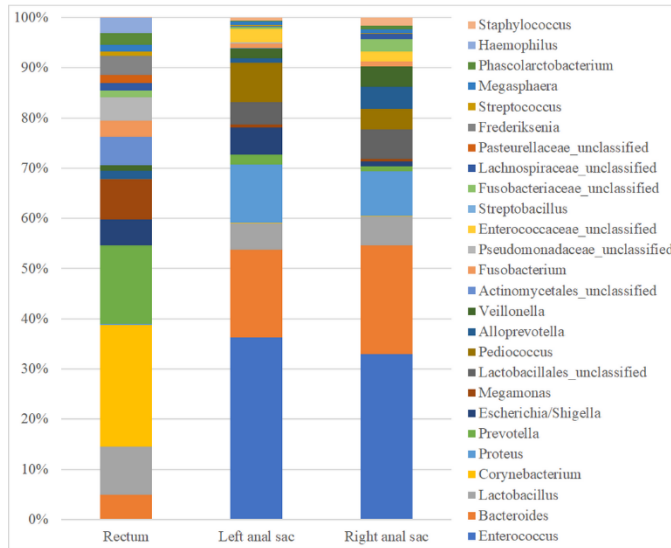


Figure 2: Relative abundance of the main bacterial communities inhabiting the left and right anal sacs and rectum of dogs to the genus level.

The richness (number of bacteria genera observed) was significantly lower in the left and right anal sacs compared to the rectum ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively), but there was no statistical difference between the right and left anal sacs ($P = 0.161$) (Figure 3). The Chao index, which is an estimator of true richness, was significantly lower in the left and right anal sacs compared to the rectum ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively), but there was no significant difference between both anal sacs ($P = 0.337$). The diversity was significantly lower in the left and right anal sacs compared to the rectum according to Shannon index ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) and inverse Simpson index ($P = 0.002$ and $P = 0.001$, respectively). There was no statistical difference in the diversity between the right and left anal sacs according to Shannon index ($P = 0.950$) and inverse Simpson index ($P = 0.981$).

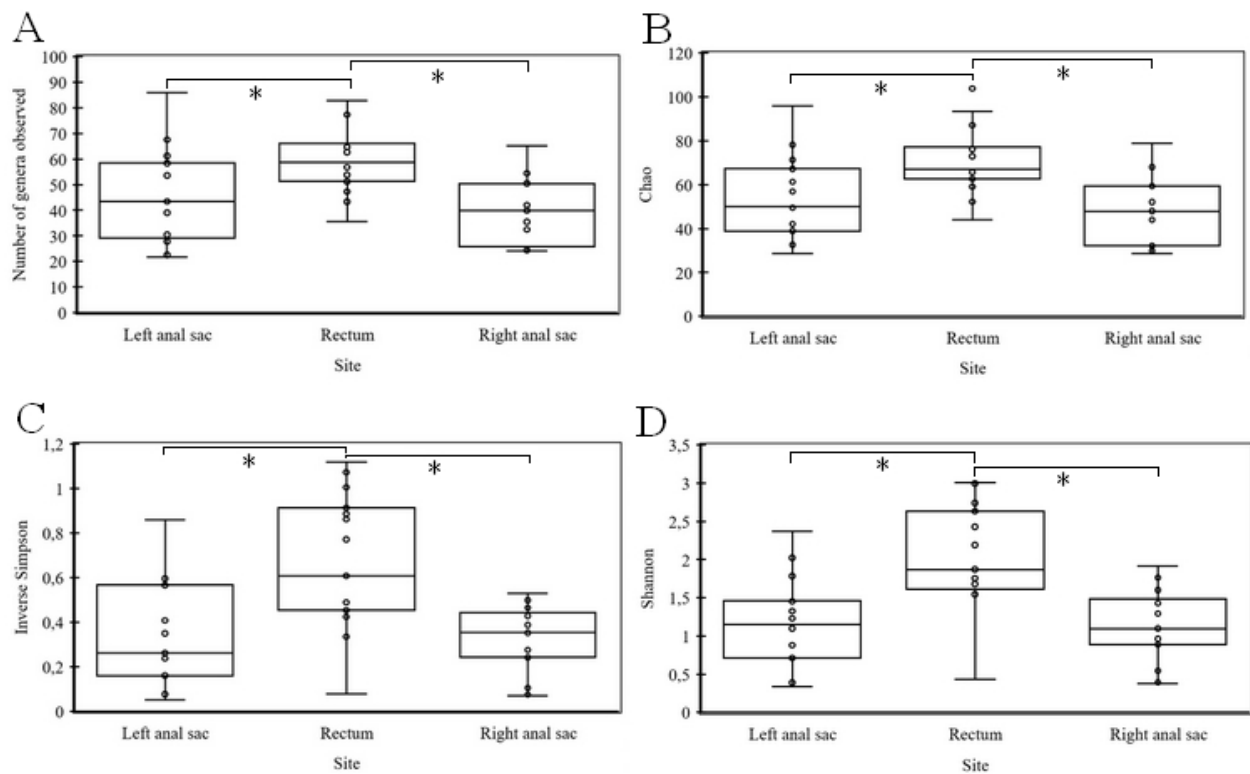


Figure 3: Alpha diversity measurements in different sites (left and right anal sacs and rectum) in healthy dogs. A - Number of genera observed; B - Chao (estimator of richness); C - inverse Simpson index (estimator of diversity); D - Shannon index (estimator of diversity) (D). Error bars represent the standard deviations. The asterisk (*) represents significant difference ($P < 0.05$).

PCoA plots revealed clear differences between anal sacs and rectum community structure and, to a lesser extent, between anal sacs and rectum community membership (Figure 4a). When considering individual factors, such as diet, place of housing, and lactation, no clustering was observed. Interestingly, community structure of the left and right anal sacs clustered according to the dog most of times, indicating individual variability between dogs (Figure 4b). The statistical comparison of community beta diversity showed a significant difference in community membership of the rectum compared to left and right anal sacs ($P = 0.032$ and $P < 0.001$, respectively), but not between both anal sacs ($P = 0.972$). There was also a statistical difference

in community structure of the rectum compared to left and right anal sacs ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively), but there was no statistical difference between both anal sacs ($P = 0.660$).

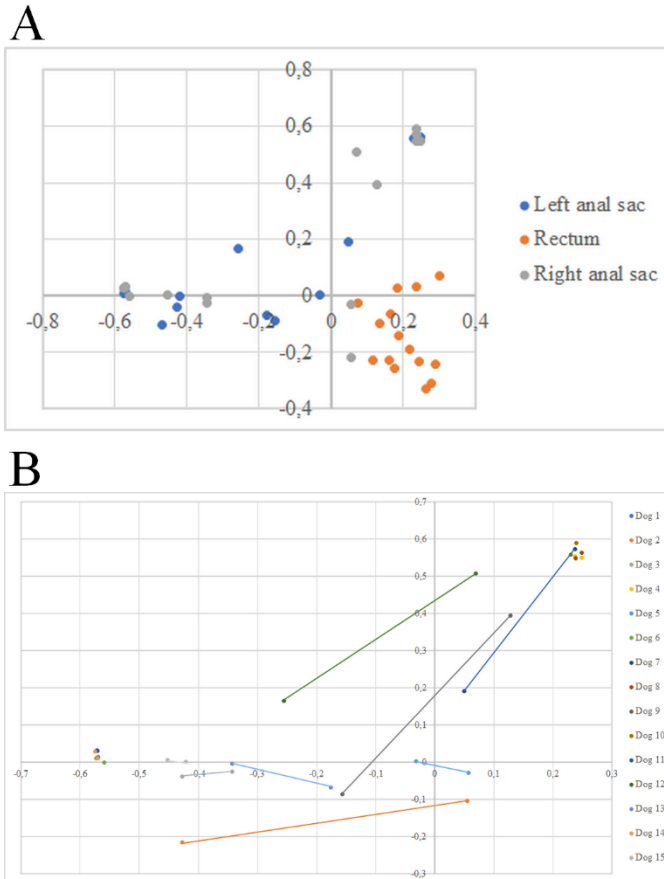


Figure 4: Principal Coordinate Analysis (PCoA) plots of the community structure between sampling sites and dogs. A – There is a clustering of the community structure of rectum. B – The community structure of both anal sacs clusters mainly according to the dog.

Discussion

To the best of authors' knowledge, this is the first study investigating the bacterial microbiota of anal sacs assessed by NGS in dogs. This study shows that the bacterial microbiota of anal sacs is much more diverse and richer than previously reported in studies using culture-based methods (2,5,18,22). The bacteria mainly identified in the healthy anal sacs with standard culture media were Micrococci, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus faecalis*, and *Escherichia coli* (2,3,5,18,22).

Pappalardo et al. also reported *Proteus mirabilis*, *Streptococcus* spp. beta-haemolytic, and *Pseudomonas aeruginosa* (2). Although a major limitation of NGS is the low resolution at lower taxonomic levels, bacterial DNA consistent with all those organisms (all but *Micrococcus* spp.) could be detected in the anal sacs of the dogs in the present study (23). In addition, many other bacteria were detected by NGS, likely because these bacteria do not grow or poorly grow on standard culture media.

Considering that anal sacs in dogs are skin invaginations, it could have been hypothesized that similarities in bacterial communities would be found between anal sacs and skin microbiota (1-5). The current data from studies reporting the skin microbiota in healthy dogs suggest that the skin microbiota varies depending on the sites sampled (24-26). In those studies, samples were taken from several cutaneous regions, including the perianal area, which is the closest region to the anal sacs. The predominant bacterial phyla reported in the perineal region and the ones found in the anal sacs of dogs from the present study were similar (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, and Fusobacteria). However, there is a difference in their relative abundances. Indeed, the average relative abundance of Firmicutes was 60.4 % and 60.1% in the left and right anal sacs, respectively, in the present study while it varied between 22.5% and 28.6% in the perianal region in previous studies (24-26). The difference observed between the results of previous studies and the present study might be associated to different environmental conditions. However, a great variability in the perianal microbiota was noted among individuals, indicating that a comparison of the perianal region and the anal sacs in the same dog would be more appropriate (24-26).

Previous studies have investigated the microbiota of the rectum or feces in dogs (27-33). The main bacterial phyla identified from feces samples taken from the rectum at necropsy or following dog defecation were overall the same as the ones found in this study, namely Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, and Fusobacteria (28-30,32,33). However, the relative abundance of phyla varied according to studies. Actinobacteria was the only phylum that strongly contrasted with the present study. Indeed, in previous studies, the mean or median

relative abundance of Actinobacteria was less than 5%, while it was 27.7% in dogs in the present study, which may be related to the methodology used in each study (27-30,32,33).

The present study also aimed to determine whether the microbiota of the rectum would influence the microbiota of the anal sacs, since these structures are very close to each other. Indeed, anal sacs in dogs are located laterally to the anus and communicate with the mucocutaneous junction of the anus via a duct (1-6). However, the present study showed that the microbiota of healthy anal sacs and rectum are different. A study by Hoffmann et al. showed that there was a significant difference in the bacterial composition between the mucous membranes and the haired skin regions (26). Since the rectum is a mucous membrane and the anal sacs are an invagination of the skin, this could be a factor explaining the difference between the bacterial microbiota of the rectum and the anal sacs (3).

The selection of dogs genetically related living in similar environments could minimize the impact of other variables, making it possible to investigate the influence of certain factors on anal sacs and rectal microbiota of dogs. However, the PCoA plots suggest that the bacterial composition of these animals was not influenced by location, diet nor lactation. Although, some studies have shown that the diet can influence fecal microbiota of dogs, the animals used in this study were fed similar diets, and the small number of dogs used precludes further extrapolations of results (27,32,33).

Conclusions

Compared to previous studies using culture-based methods, a larger number of bacterial genera and a more diverse bacterial microbiota were present in the anal sacs of healthy dogs using NGS. The bacterial communities were similar between the left and right anal sacs, but significantly different between the anal sacs and rectum. In order to better understand the role of the bacteria in anal sac diseases, future studies comparing the microbiota of healthy and diseased anal sacs are required.

References

1. Glaze MB. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: Miller Jr WH, Griffin CE, Campbell KL, eds. *Small Animal Dermatology* 7th ed. St-Louis, Missouri: Elsevier Mosby, 2013:724-773.
2. Pappalardo E, Martino PA, Noli C. Macroscopic, cytological and bacteriological evaluation of anal sac content in normal dogs and in dogs with selected dermatological diseases. *Vet Dermatol* 2002;13(6):315-322.
3. Radlinsky M, Fossum TW. Surgery of the digestive system. In: Fossum TW, Cho J, Dewey CW, et al, eds. *Small Animal Surgery Fifth Edition*. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2019:331-511.
4. Toma S, Scarff DH. An approach to anal sac disease. In: Jackson H, Marsella R, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology* 3rd ed. Quedgeley, England: British Small Animal Veterinary Association 2012:126-129.
5. van Duijkeren E. Diseases condition of canine anal sacs. *J Small Anim Pract* 1995;36(1):12-16.
6. Thompson MS. Diseases of the Anal Sacs. In: Bonagura JD, ed. *Kirk's Current Veterinary Therapy* 13th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders, 2000:591-593.
7. James DJ, Griffin CE, Polissar NL, Neradilek MB. Comparison of anal sac cytological findings and behaviour in clinically normal dogs and those affected with anal sac disease. *Vet Dermatol* 2011;22(1):80-87.
8. Lake AM, Scott DW, Miller WH Jr, Erb HN. Gross and cytological characteristics of normal canine anal-sac secretions. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2004;51(5):249-253.
9. Robson DC, Burton GG, Lorimer MF. Cytological examination and physical characteristics of the anal sacs in 17 clinically normal dogs. *Aust Vet J* 2003;81(1-2):36-41.
10. Miyazaki T, Nishimura T, Yamashita T, Miyazaki M. Olfactory discrimination of anal sac secretions in the domestic cat and the chemical profiles of the volatile compounds. *J Ethol* 2018;36(1):99-105.
11. Cummings LA, Kurosawa K, Hoogestraat DR, SenGupta DJA, Doyle M, et al. Clinical Next Generation Sequencing Outperforms Standard Microbiological Culture for Characterizing Polymicrobial Samples. *Clin Chem* 2016;62(11):1465-1473.

12. Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol* 1996;14(6):190-197.
13. Hoffmann RA. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. *Vet Dermatol* 2017;28(1):60-e15.
14. Tizard I. The Microbiota and the Immune System. In: Tizard I, ed. *Veterinary Immunology*. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018:221-233.
15. Hoffmann AR, Proctor LM, Surette MG, Suchodolski JS. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet Pathol* 2016;53(1):10-21.
16. Redfern A, Suchodolski J, Jergens A. Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *Vet Rec* 2017;181(14):370-377.
17. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 2017;3:71-82
18. Halnan CR. The diagnosis of anal sacculitis in the dog. *J Small Anim Pract* 1976;17(8):527-535.
19. QIAGEN. 2019. DNeasy PowerSoil Kit Handbook. Spotted at:
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5a0517a7-711d-4085-8a28-2bb25fab828a&lang=en>
20. Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG, Fuhrman JA, Apprill A, Knight R. 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):e00009-15.
21. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(17):5112-5120.
22. Harvey RG, Lloyd DH. The distribution of *Staphylococcus intermedius* and coagulase-negative *Staphylococci* on the hair, skin surface, within the hair follicles and on the mucous membranes of dogs. *Vet Dermatol* 1994;5(2):75-81.

23. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 2019;38(6):1059-1070.
24. Cuscó A, Belanger JM, Gershony L, Islas-Trejo A, Levy K, Medrano JF, Sánchez A, Oberbauer AM, Francino O. Individual signatures and environmental factors shape skin microbiota in healthy dogs. *Microbiome* 2017;5(1):139.
25. Cuscó A, Sánchez A, Altet L, Ferrer L, Francino O. Individual signatures define canine skin microbiota composition and variability. *Front Vet Sci* 2017;4:6.
26. Hoffmann AR, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Stephenson CE, Mansell J, Steiner JM, Dowd SE, Olivry T, Suchodolski JS. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One* 2014;9(1):e83197.
27. Deng P, Swanson KS. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br J Nutr* 2015;113:S6-S17.
28. Garcia-Mazcorro JF, Dowd SE, Poulsen J, Steiner JM, Suchodolski JS. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *Microbiologyopen* 2012;1(3):340-347.
29. Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. 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):301-310.
30. Honneffer JB, Steiner JM, Lidbury JA, Suchodolski JS. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics* 2017;13(26). doi:10.1007/s11306-017-1165-3
31. Hooda S, Minamoto Y, Suchodolski JS, Swanson KS. Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Anim Health Res Rev* 2012;13(1):78-88.
32. Middelbos IS, Vester Boler BM, Qu A, White BA, Swanson KS, Fahey Jr GC. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing. *PLoS One* 2010;5(3):e9768.
33. Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, Middelbos IS, Vester BM, Barry KA, Nelson KE, Torralba M, Henrissat B, Coutinho PM, Cann IK, White BA, Fahey Jr GC. Phylogenetic and

gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J* 2011;5(4):639-649.

Annexe B – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés au niveau de l’aspect concave du pavillon auriculaire des chiens sains et atopiques

Études	Principaux phyla chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux phyla chez les chiens atopiques (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens atopiques (abondance relative %)
Hoffmann <i>et al</i> , 2014 ^a	Protéobactérie (45,0) Firmicutes (15,6) Actinobactérie (18,1) Bactéroïdètes (4,1) Cyanobactérie (3,0)	N/A	<i>Ralstonia</i> spp. (9,1) <i>Propionibacterium</i> spp. (3,3) <i>Corynebacterium</i> spp. (1,8) <i>Bacillus</i> spp. (1,7) <i>Staphylococcus</i> spp. (1,6)	N/A
Cuscó <i>et al</i> , 2017 ^{[87]b}	Protéobactérie (42,20) Firmicutes (22,40) Actinobactérie (15,90) Bactéroïdètes (7,60) Fusobactérie (7,30)	N/A	N/A	N/A
Cuscó <i>et al</i> , 2017 ^{[91]b}	Protéobactérie (34,94) Firmicutes (19,95) Bactéroïdètes (19,75) Actinobactérie (8,43) Fusobactérie (8,35)	N/A	<i>Fusobacterium</i> spp. (7,89) <i>Sphingomonas</i> spp. (4,65) <i>Lactobacillus</i> spp. (4,45) <i>Capnocytophaga</i> spp. (3,84) <i>Porphyromonas</i> spp. (3,79)	N/A

^a Les données en pourcentage représentent une médiane

^b Les données en pourcentage représentent une moyenne

Annexe C – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés à la région axillaire des chiens sains et atopiques

Études	Principaux phyla chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux phyla chez les chiens atopiques (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens atopiques (abondance relative %)
Hoffmann <i>et al</i> , 2014 ^a	Protéobactérie (37,90) Firmicutes (16,30) Actinobactérie (20,95) Bactéroïdètes (37,50) Cyanobactérie (2,35)	Protéobactérie (50,0) Firmicutes (18,0) Actinobactérie (6,2) Bactéroïdètes (3,1) Tenericutes (2,4)	<i>Ralstonia</i> spp. (4,25) <i>Bacillus</i> spp. (3,40) <i>Porphyromonas</i> spp. (1,45) <i>Mycobacterium</i> spp. (1,00) <i>Staphylococcus</i> spp. (0,85)	<i>Bacillus</i> spp. (3,80) <i>Sphingomonas</i> spp. (3,10) <i>Mycoplasma</i> spp. (2,40) <i>Rubellimicrobium</i> spp. (1,40) <i>Propionibacterium</i> spp. (1,30)
Cuscó <i>et al</i> , 2017 ^{[87]b}	Protéobactérie (27,40) Firmicutes (30,30) Actinobactérie (12,70) Bactéroïdètes (14,70) Fusobactérie (12,60)	N/A	N/A	N/A
Cuscó <i>et al</i> , 2017 ^{[91]b}	Protéobactérie (40,74) Firmicutes (20,28) Bactéroïdètes (4,96) Actinobactérie (4,69) Cyanobactérie (19,08)	N/A	<i>Psychrobacter</i> spp. (6,59) <i>Lactobacillus</i> spp. (5,46) <i>Fusobacterium</i> spp. (5,05) <i>Staphylococcus</i> spp. (4,14) <i>Erwinia</i> spp. (4,10)	N/A
Apostolopoulos <i>et al</i> , 2021 ^b	Protéobactérie (25,47) Firmicutes (27,75) Bactéroïdètes (9,71) Actinobactérie (27,04) Deinococcus-Thermus (1,73)	Protéobactérie (35,07) Firmicutes (19,50) Bactéroïdètes (14,77) Actinobactérie (20,98) Cyanobactérie (2,12)	<i>Macrococcus</i> spp. (13,80) <i>Brevibacterium</i> spp. (3,20) <i>Staphylococcus</i> spp. (3,10) <i>Clostridium sensu stricto</i> 7 spp. (2,70) <i>Nocardioïdes</i> spp. (2,60)	<i>Clostridium sensu stricto</i> 7 spp. (6,20) <i>Staphylococcus</i> spp. (5,70) <i>Vibrionimonas</i> spp. (5,10) <i>Sphingomonas</i> spp. (4,70) <i>Pelomonas</i> spp. (4,50)
Thomsen <i>et al</i> , 2022 ^b	Protéobactérie (42,94) Firmicutes (19,72) Bactéroïdètes (12,29) Actinobactérie (19,06)	Protéobactérie (44,42) Firmicutes (31,85) Bactéroïdètes (5,32)	<i>Staphylococcus</i> spp. (6,24) <i>Cutibacterium</i> spp. (5,09)	<i>Staphylococcus</i> spp. (24,55) <i>Acetobacter</i> spp. (11,36)

	Fusobactérie (2,91)	Actinobactérie (13,32) Deinococcus- Thermus (1,92)	<i>Moraxellaceae</i> <i>unclassified</i> spp. (4,84) <i>Undibacterium</i> spp. (4,46) <i>Streptococcus</i> spp. (4,12)	<i>Moraxellaceae</i> <i>unclassified</i> spp. (6,36) <i>Undibacterium</i> spp. (6,01) <i>Cutibacterium</i> spp. (4,70)
--	---------------------	---	--	--

^a Les données en pourcentage représentent une médiane

^b Les données en pourcentage représentent une moyenne

Annexe D – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés à la région inguinale des chiens sains et atopiques

Études	Principaux phyla chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux phyla chez les chiens atopiques (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens atopiques (abondance relative %)
Hoffmann <i>et al</i> , 2014 ^a	Protéobactérie (54,5) Firmicutes (15,1) Actinobactérie (8,1) Bactéroïdètes (4,2) Cyanobactérie (1,5)	Protéobactérie (42,6) Firmicutes (16,4) Actinobactérie (17,9) Cyanobactérie (6) Chloroflexi (2,9)	<i>Ralstonia</i> spp. (2,0) <i>Porphyromonas</i> spp. (1,1) <i>Streptococcus</i> spp. (1,1) <i>Bacillus</i> spp. (1,0) <i>Corynebacterium</i> spp. (0,9)	<i>Staphylococcus</i> spp. (2,6) <i>Sphingomonas</i> spp. (2,4) <i>Bacillus</i> spp. (1,8) <i>Roseomonas</i> spp. (1,4) <i>Methylobacterium</i> spp. (1,3)
Apostopoulos <i>et al</i> , 2021 ^b	Protéobactérie (23,79) Firmicutes (22,57) Bactéroïdètes (9,92) Actinobactérie (32,53) Acidobactérie (2,04)	Protéobactérie (37,73) Firmicutes (14,56) Bactéroïdètes (15,92) Actinobactérie (20,92) Cyanobactérie (2,66)	<i>Staphylococcus</i> spp. (10,80) <i>Corynebacterium</i> 1 spp. (8,20) <i>Conchiformibius</i> spp. (2,60) <i>Nocardioides</i> spp. (2,50) <i>Brevibacterium</i> spp. (2,30)	<i>Sphingomonas</i> spp. (4,90) <i>Clostridium sensu stricto</i> 7 spp. (4,30) <i>Nocardioides</i> spp. (4,10) <i>Porphyromonas</i> spp. (3,20) <i>Conchiformibius</i> spp. (3,20)
Thomsen <i>et al</i> , 2022 ^b	Protéobactérie (31,87) Firmicutes (29,71) Bactéroïdètes (14,02) Actinobactérie (17,75) Fusobactérie (2,27)	Protéobactérie (31,61) Firmicutes (34,42) Bactéroïdètes (15,23) Actinobactérie (15,10) Acidobactérie (1,10)	<i>Neisseriaceae unclassified</i> spp. (10,25) <i>Streptococcus</i> spp. (7,97) <i>Staphylococcus</i> spp. (7,71) <i>Porphyromonas</i> spp. (3,79) <i>Acetobacter</i> spp. (3,32)	<i>Staphylococcus</i> spp. (25,63) <i>Acetobacter</i> spp. (7,96) <i>Neisseriaceae unclassified</i> spp. (3,78) <i>Porphyromonas</i> spp. (3,66) <i>Bergeyella</i> spp. (3,49)

^a Les données en pourcentage représentent une médiane

^b Les données en pourcentage représentent une moyenne

Annexe E – Principaux phyla et genres bactériens retrouvés aux espaces interdigués des chiens sains et atopiques

Études	Principaux phyla chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux phyla chez les chiens atopiques (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens sains (abondance relative %)	Principaux genres chez les chiens atopiques (abondance relative %)
Hoffmann <i>et al</i> , 2014 ^a	Protéobactérie (41,35) Firmicutes (9,55) Actinobactérie (21,25) Bactéroïdètes (1,6) Cyanobactérie (3,95)	Protéobactérie (33,7) Firmicutes (8,2) Actinobactérie (24) Bactéroïdètes (2,8) Cyanobactérie (0,2)	<i>Ralstonia</i> spp. (7) <i>Bacillus</i> spp. (1,35) <i>Staphylococcus</i> spp. (0,95) <i>Micrococcus</i> spp. (0,45) <i>Skermanella</i> spp. (0,45)	<i>Alicyclobacillus</i> spp. (1,6) <i>Staphylococcus</i> spp. (1,0) <i>Pseudomonas</i> spp. (1,0) <i>Corynebacterium</i> spp. (0,7) <i>Erwinia</i> spp. (0,5)
Cuscó <i>et al</i> , 2017 ^{[87]b}	Protéobactérie (35,10) Firmicutes (31,50) Actinobactérie (12,10) Bactéroïdètes (14,20) Fusobactérie (3,60)	N/A	N/A	N/A
Cuscó <i>et al</i> , 2017 ^{[91]b}	Protéobactérie (40,84) Firmicutes (18,51) Bactéroïdètes (7,87) Actinobactérie (7,85) Cyanobactérie (18,45)	N/A	<i>Pseumonas</i> spp. (9,23) <i>Chroococcidiopsis</i> spp. (6,88) <i>Lactobacillus</i> spp. (5,54) <i>Fusobacterium</i> spp. (4,49) <i>Erwinia</i> spp. (4,51)	N/A
Apostolopoulos <i>et al</i> , 2021 ^b	Protéobactérie (30,56) Firmicutes (15,65) Bactéroïdètes (11,39) Actinobactérie (29,16) Acidobactérie (2,58)	Protéobactérie (34,47) Firmicutes (14,43) Bactéroïdètes (13,28) Actinobactérie (25,62) Acidobactérie (2,15)	<i>Clostridium sensu stricto</i> 7 spp. (3,50) <i>Nocardioïdes</i> spp. (3,20) <i>Pelomonas</i> spp. (2,90) <i>Sphingomonas</i> spp. (2,80) <i>Vibrionimonas</i> spp. (2,70)	<i>Nocardioïdes</i> spp. (5,30) <i>Sphingomonas</i> spp. (4,90) <i>Pelomonas</i> spp. (4,70) <i>Clostridium sensu stricto</i> 7 spp. (3,50) <i>Vibrionimonas</i> spp. (2,30)

^a Les données en pourcentage représentent une médiane

^b Les données en pourcentage représentent une moyenne