

## **CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 030

*IDENTIFICATION DE MARQUEURS CYTOKINIQUES D'INTERÊT par RT-  
qPCR CHEZ LE CHIEN ATTEINT DE DERMATITE ATOPIQUE*

## **THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 8 septembre 2022  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

*THENARD Quentin*



## **CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 030

*IDENTIFICATION DE MARQUEURS CYTOKINIQUES D'INTERÊT par RT-  
qPCR CHEZ LE CHIEN ATTEINT DE DERMATITE ATOPIQUE*

## **THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 8 septembre 2022  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

*THENARD Quentin*



## Liste des enseignants du Campus vétérinaire de Lyon (26-01-2022)

Mme	ABITBOL	Marie	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Mme	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Mme	BECKER	Claire	Maître de conférences
Mme	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
M.	BRUTO	Maxime	Maître de conférences Stagiaire
M.	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
M.	BUFF	Samuel	Professeur
M.	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
M.	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
M.	CHABANNE	Luc	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
M.	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
M.	CHETOT	Thomas	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Mme	DELIIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Mme	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
M.	GALIA	Wessam	Maître de conférences
M.	GILLET	Benoit	AERC
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Mme	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
M.	JUNOT	Stéphane	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Professeur
Mme	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Mme	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Professeur
Mme	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences
M.	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
M.	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Professeur
M.	LURIER	Thibaut	Maître de conférences Stagiaire
M.	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences Stagiaire
M.	MARCHAL	Thierry	Professeur
Mme	MOSCA	Marion	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Professeur
Mme	PEROZ	Carole	Maître de conférences
M.	PIN	Didier	Professeur
Mme	PONCE	Frédérique	Professeur
Mme	PORTIER	Karine	Professeur
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Mme	REMY	Denise	Professeur
Mme	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
M.	ROGER	Thierry	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
M.	SCHRAMME	Michael	Professeur
Mme	SERGENTET	Delphine	Professeur
M.	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Mme	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur



## Remerciements

### **A Monsieur le Professeur Didier PIN,**

*du campus vétérinaire de VetAgro Sup de Lyon*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommages respectueux

### **A Madame le Professeur Caroline PROUILLAC,**

*du campus vétérinaire de VetAgro Sup de Lyon,*

*Qui m'a fait l'honneur d'encadrer et corriger ce travail,*

*Pour sa bienveillance, sa confiance et ses conseils avisés,*

*Toute ma reconnaissance*

### **A Madame le Docteur Marion MOSCA,**

*du campus vétérinaire de VetAgro Sup de Lyon,*

*Qui a accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury de thèse,*

*Sincères remerciements*

### **A Monsieur le Docteur Antoine Rostang,**

*du campus d'Oniris de Nantes,*

*Pour m'avoir inclus dans ce projet*

*Sincères remerciements*

### **A Monsieur le Docteur Adrien Idée,**

*Pour ton regard avisé et ta spontanéité sur la relecture*

*d'une partie de ma thèse*

*Un grand merci*









# Table des matières

<b>Table des figures</b> .....	13
<b>Tableau des tableaux</b> .....	15
<b>Liste des abréviations</b> .....	17
<b>Introduction</b> .....	19
I. La dermatite atopique canine .....	21
A. Quelques rappels d'anatomie et de physiologie de la peau .....	21
1. Les différentes couches de la peau .....	21
a) L'épiderme.....	22
(1) Stratum corneum .....	22
(2) Stratum lucidum .....	23
(3) Stratum granulosum.....	23
(4) Stratum spinosum .....	24
(5) Stratum basale.....	24
b) Le derme.....	24
c) L'hypoderme.....	26
2. Quelques rôles de barrière de l'épiderme (5).....	26
a) La peau, une barrière hydrique .....	26
(1) Lipides intercornéocytaires .....	26
(2) Les jonctions serrées .....	26
(3) Le FNH .....	27
b) La peau, une barrière chimique et biochimique .....	27
(1) Le pH cutané.....	27
(2) Les peptides anti-microbiens (PAM) .....	27
(3) Flore commensale cutanée .....	27
c) La peau, une barrière immunologique.....	28
(1) Les cellules de Langerhans, un exemple de cellule présentatrice d'antigène .....	28
(2) Les chimiokines.....	28
(3) Les lymphocytes et granulocytes .....	28
B. Clinique et physiopathologie de la dermatite atopique.....	30
1. Définition .....	30
2. Epidémiologie.....	30
a) Fréquence.....	30
b) Population concernée .....	30
c) Facteurs de risques.....	31
3. Les signes cliniques et localisations des lésions .....	33
a) Lésions principales (14,18,19,20) .....	33

b)	Les localisations préférentielles (11) .....	34
4.	Physiopathologie .....	37
a)	Altération de la barrière cutanée .....	37
b)	Atteinte de la PIE .....	38
c)	Déséquilibres lipidiques .....	39
d)	Déséquilibres protéiques.....	40
e)	Microbiote cutané .....	41
5.	Immunopathologie (30).....	43
a)	Sensibilisation à l'allergène .....	43
b)	Mise en place de la réponse immunitaire .....	43
c)	Nouvelle présentation allergénique.....	44
d)	Les cytokines principales mises en jeu dans la maladie .....	45
C.	Diagnostic de la dermatite atopique.....	50
1.	Anamnèse.....	50
2.	L'examen clinique.....	50
a)	Les critères de Prélaud et Willemse .....	50
b)	Les critères de Favrot .....	51
c)	Fiabilité des tests diagnostiques .....	52
3.	Diagnostic différentiel de la dermatite atopique canine. ....	53
4.	Classification de la sévérité des lésions et du prurit .....	55
a)	Scores lésionnel .....	55
(1)	CADESI-4 .....	55
(2)	CADLI .....	56
b)	Score de prurit.....	57
(1)	pruritus Visual Analog Scale (pVAS) .....	57
(2)	Verbal Numeric Score (VNS).....	58
5.	Diagnostic immunologique.....	58
a)	Dosage des IgE.....	58
b)	Intradermoréaction .....	59
c)	Patchs-tests (67).....	59
D.	Traitement de la dermatite atopique.....	60
1.	Prise en charge des complications et hygiène de la peau.....	60
a)	Les shampoings antiseptiques.....	60
b)	Les réhydratants cutanés .....	61
2.	Réduction du prurit et des lésions cutanées.....	61
a)	Les traitements topiques.....	61
(1)	Les dermocorticoïdes .....	61
(2)	Inhibiteurs de la calcineurine topique.....	61

b)	Les immunomodulateurs.....	62
(1)	La corticothérapie per os.....	62
(2)	La ciclosporine .....	62
(3)	L'occlacitinib.....	64
(4)	Le lokivetmab .....	66
(5)	Les immunosuppresseurs cytotoxiques .....	66
c)	Autres traitements .....	67
(1)	Supplémentation en acides gras et lipides topiques.....	67
(2)	La désensibilisation .....	68
(3)	Régime d'éviction alimentaire.....	70
II.	Comparaison des profils cytokiniques entre chiens sains et chiens atopiques .....	71
A.	Contexte et objectif de l'étude .....	71
B.	Matériels et méthodes .....	71
1.	Animaux.....	71
a)	Critères d'inclusion et exclusion des chiens atteints de DA.....	71
b)	Critères d'inclusion lot témoin .....	72
2.	Protocole .....	74
a)	Constitution des groupes .....	74
b)	Prélèvement et extraction d'ARN.....	76
c)	Rétrotranscription .....	76
d)	qPCR .....	76
(1)	Principe.....	76
(2)	PCR « One-Step ».....	77
(3)	Choix des amorces.....	77
(4)	Confirmation de la spécificité des amorces .....	78
(5)	Efficacité et linéarité des amplications qRT-PCR.....	79
(6)	Les cycles seuils .....	80
(7)	Le modèle mathématique de calcul des expressions relatives .....	81
C.	Résultats.....	82
1.	Cohorte de chiens sains.....	82
a)	Expression du gène de ménage.....	82
b)	Expressions relatives des gènes d'intérêt .....	82
(1)	TNF- $\alpha$ .....	82
(2)	IL-4 .....	84
(3)	IL-13.....	85
(4)	IL-31 .....	87
2.	Cohorte de chiens atteints de DA.....	88
a)	Expression du gène de ménage.....	88

b) Expression des gènes d'intérêt.....	88
(1) TNF- $\alpha$ .....	88
(2) IL-4 .....	89
(3) IL-13 .....	89
(4) IL-31 .....	90
3. Comparaison des cohortes.....	90
(1) TNF- $\alpha$ .....	90
(2) IL-4 .....	91
(3) IL-13.....	92
D. Discussion.....	93
1. Rappel de l'objectif de l'étude .....	93
2. Questionnements sur le prélèvement .....	93
a) Conservation du matériel génétique dans le temps et maintien de son intégrité .....	93
b) ARNm ou protéines .....	95
c) Choix du prélèvement .....	97
3. Questionnements sur le protocole.....	98
a) Utilisation des gammes, choix des gènes d'intérêt et du gène de ménage.....	98
b) Utilisation du protocole de PCR « One-Step » .....	101
4. Questionnements sur les résultats.....	101
a) Validité des résultats .....	101
b) Nos résultats et comparaison avec la littérature .....	102
<b>Conclusion</b> .....	105
<b>Bibliographie</b> .....	107

## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie de la peau _____	21
<b>Figure 2</b> : La barrière épidermique _____	22
<b>Figure 3</b> : Coupe histologique de la peau ; derme et annexes _____	25
<b>Figure 4</b> : Prédisposition raciale à la dermatite atopique en fonction des localisations géographiques _____	32
<b>Figure 5</b> : Erythème du chanfrein, des grands plis, lésions secondaires _____	34
<b>Figure 6</b> : Localisations préférentielles des lésions de dermatite atopique _____	34
<b>Figure 7</b> : Silhouette lésionnelle en fonction de la race _____	36
<b>Figure 8</b> : Interrelations entre le dysfonctionnement de la barrière, les facteurs environnements et immunologiques dans la physiopathologie de la DA _____	42
<b>Figure 9</b> : Physio/immunopathologie de la dermatite atopique _____	44
<b>Figure 10</b> : Concentration plasmatique des cytokines chez des chiens atteints de dermatite atopique (noir) et des chiens sains (blanc) _____	46
<b>Figure 11</b> : Expression relative de l'ARNm codant pour l'IL-4 par rapport au GAPDH dans la peau lésée de chiens atteints de DA (noir), dans la peau non lésée de chiens atteints de DA (gris) et dans la peau de chiens sains (blanc) _____	46
<b>Figure 12</b> : Comparaison du niveau d'IL-31 dans le sérum d'individus atteints de DA et d'individu sains (1 <sup>er</sup> tableau) et entre des DA légères et sévères (2 <sup>nd</sup> tableau) _____	47
<b>Figure 13</b> : Expression relative des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$ par rapport au GAPDH dans la peau lésée de chiens atteints de DA (noir), dans la peau non lésée de chiens atteints de DA (gris) et dans la peau de chiens sains (blanc) _____	48
<b>Figure 14</b> : Profils cytokiniques produits par des lymphocytes des ganglions lymphatiques en réponse à une stimulation Th22 chez des modèles de dermatite atopique _____	49
<b>Figure 15</b> : Mesures statistiques et valeurs prédictives des tests diagnostiques de la DA dans des populations de chiens sains et des populations de chiens présentant des dermatoses mimant une DA _____	52
<b>Figure 16</b> : Localisations préférentielles des lésions de gale sarcoptique _____	54
<b>Figure 17</b> : Localisations préférentielles des lésions de gale sarcoptique _____	54
<b>Figure 18</b> : pruritus Visual Analog Score (pVAS) _____	57
<b>Figure 19</b> : Pharmacodynamie des inhibiteurs de la calcineurine _____	63
<b>Figure 20</b> : Mécanisme physiologique d'activation du système JAK-STAT _____	65
<b>Figure 21</b> : Etapes de la qPCR utilisée dans le cadre de notre étude _____	77
<b>Figure 22</b> : Gel d'agarose à 2 % sur les échantillons amplifiés par RT-qPCR _____	78
<b>Figure 23</b> : Linéarité des 3 gammes réalisées pour le gène GAPDH _____	79
<b>Figure 24</b> : Courbe d'amplification de qPCR pour le gène TNF- $\alpha$ chez les chiens 14, 20, 26 et 28. _____	82
<b>Figure 25</b> : Courbe de fusion du gène TNF- $\alpha$ pour les chiens 14, 20, 26 et 28. _____	83
<b>Figure 26</b> : Quantité relative de TNF- $\alpha$ par rapport à GAPDH chez les 29 chiens de la cohorte saine _____	83

<b>Figure 27</b> : Courbe d'amplification de qPCR pour le gène IL-4 chien le chien 23	84
<b>Figure 28</b> : Courbe de fusion du gène IL-4 pour le chien 23	84
<b>Figure 29</b> : Quantité relative de TNF- $\alpha$ par rapport à GAPDH chez les 3 chiens de la cohorte saine	85
<b>Figure 30</b> : Courbe d'amplification de qPCR pour le gène IL-13 chez les chiens 10, 13, 19, 21	86
<b>Figure 31</b> : Courbe de fusion pour le gène IL-13 chez les chiens 10, 13, 19, 21	86
<b>Figure 32</b> : Quantité relative d'IL-13 par rapport à GAPDH chez les 13 chiens de l'étude ayant exprimé l'IL-13	87
<b>Figure 33</b> : Courbe de fusion pour le gène IL-31 obtenue systématiquement pour les chiens sains de DA	87
<b>Figure 34</b> : Quantité relative d'ARNm de TNF- $\alpha$ par rapport à GAPDH chez les 4 chiens l'exprimant au cours de la visite n°2	88
<b>Figure 35</b> : Quantité relative d'ARNm d'IL-4 par rapport à GAPDH chez les 9 chiens l'exprimant au cours de la visite n°2	89
<b>Figure 36</b> : Quantité relative d'ARNm d'IL-13 par rapport à GAPDH chez les 6 chiens l'exprimant au cours de la visite n°2	90
<b>Figure 37</b> : Quantités relatives d'ARNm de TNF- $\alpha$ des chiens atteints de DA (malade) et des chiens sains (témoin)	91
<b>Figure 38</b> : Quantités relatives d'ARNm d'IL-4 des chiens atteints de DA (malade) et des chiens sains (témoin)	91
<b>Figure 39</b> : Quantités relatives d'ARNm d'IL-13 des chiens atteints de DA (malade) et des chiens sains (témoin)	92



## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Récapitulatif des facteurs de risques au développement d'une DA chez le chien _____	33
<b>Tableau 2</b> : Les critères de Willemse _____	50
<b>Tableau 3</b> : Sensibilité et spécificité des jeux de critères de Favrot _____	52
<b>Tableau 4</b> : Diagnostic différentiel du prurit chronique et similitudes avec la DA _____	55
<b>Tableau 5</b> : Score CADESI-04 _____	56
<b>Tableau 6</b> : Score CADLI _____	57
<b>Tableau 7</b> : Âge et race des chiens sains de dermatite atopique inclus dans l'étude _____	73
<b>Tableau 8</b> : Visites, prélèvements et modifications de posologie _____	75
<b>Tableau 9</b> : Séquences et taille des amorces sens et anti-sens utilisées dans le cadre de l'étude _____	78
<b>Tableau 10</b> : Calculs des efficacités de la PCR pour chacun des gènes choisis _____	80



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**Ag** : Antigène

**ALAT** : Alanine aminotransférase

**ARN** : Acide ribonucléique

**CADESI** : Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index

**CADLI** : Canine Atopic Dermatitis Lesion Index

**CCL** : Chemokine ligand

**CCR** : Chemokine receptor

**CD** : Cluster of differentiation

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA** : Cellule présentatrice d'antigène

**CT** : Seuil de cycle

**Da** : Dalton

**DA** : Dermatite atopique

**DAMPs** : Damage Associated Molecular Pattern

**Df** : *Dermatophagoides farinae*

**FcR** : Récepteur à la fraction constante

**FNH** : Facteur naturel d'hydratation

**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**HDM** : House dust mite (*Dermatophagoides*)

**HS** : Hypersensibilité

**IDR** : Intradermoréaction

**IFN $\gamma$**  : Interféron gamma

**IgE** : Immunoglobuline E

**IL** : Interleukine

**JAK** : Janus kinase

**LB** : Lymphocyte B

**LT** : Lymphocyte T

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**MTX** : Méthotrexate

**NFAT** : Nuclear factor of activated T-cells

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor-  $\kappa$ B

**ng** : nanogramme

**PAL** : Phosphatases alcalines

**PAM** : Peptides anti-microbien

**PAMPs** : Pathogen-associated molecular pattern

**Pb** : Paire de bases

**PBMC** : Peripheric blood mononuclear cell

**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PIE** : Perte insensible en eau

**PRR** : Pattern recognition receptor

**pVAS** : pruritus Visual Analog Score

**RT- qPCR** : reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction

**RIN** : RNA integrity number

**TARC** : Thymus and activation regulated chemokine

**Teff** : Lymphocyte T effecteur

**Th** : Lymphocyte T helper

**TLR** : Toll-like receptor

**Tm** : Lymphocyte T mémoire

**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor

**TSLP** : Thymic stromal lymphopoietin

**VNS** : Visual Numeric Score

**ng** : nanogramme

**ng/ $\mu$ L** : nanogramme par microlite



## Introduction

La dermatite atopique canine est une maladie inflammatoire chronique de la peau, à caractère allergique, se manifestant souvent dès l'âge de 6 mois à 3 ans, jusqu'à la fin de la vie de l'animal. Elle est proche de l'eczéma atopique que l'on observe en médecine humaine, qui constitue un guide pour le développement du diagnostic et de la thérapeutique. Elle représente une part importante de la dermatologie vétérinaire même si elle demeure un diagnostic d'exclusion, une maladie difficile à mettre en évidence, parfois dissimulée par d'autres atteintes de la peau. Que ce soit chez l'Homme ou chez le chien, la gestion rigoureuse de la dermatite atopique représente un véritable enjeu de bien-être tant certains individus et propriétaires se retrouvent dans des impasses thérapeutiques et financières notamment.

La bibliographie de l'eczéma atopique humain a permis de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la maladie, notamment concernant les modifications de la barrière cutanée et la théorie du « outside-inside-outside ». Des anomalies structurales de la peau, mises indirectement en évidence par une perte insensible en eau, sont responsables d'une pénétration anormale d'allergènes au travers de la barrière cutanée. L'inflammation qui en résulte, est à l'origine, secondairement, d'une aggravation du défaut de barrière.

L'inflammation est dépendante de lymphocytes et notamment de lymphocytes T intervenant aux côtés de messagers protéiques appelés cytokines. Ces dernières, que l'on identifie, localement, dans la peau ou moins spécifiquement dans le sang de l'individu, peuvent être une piste dans la recherche et le développement de biomarqueurs de sévérité dans le diagnostic et le suivi de l'efficacité de traitements immunomodulateurs.

C'est dans cette perspective et dans le cadre d'une étude cherchant à évaluer la non-infériorité du méthotrexate au traitement de référence, la ciclosporine, que nous avons mené ces manipulations de biologie moléculaire, afin d'identifier, au sein d'un ensemble de cytokines pré-choisies, des différences au seins des transcriptomes cytokiniques entre individus atteints de dermatite atopique et individus sains.

Ce manuscrit s'articulera en trois parties distinctes. La première est une étude bibliographique, centrée sur la dermatite atopique, sa physiopathologie, son diagnostic et ses options de traitement.

La seconde est consacrée à notre étude de biologie moléculaire.

Enfin, nous discuterons dans la dernière des résultats obtenus, des biais de notre étude ainsi que des possibilités d'amélioration.



# I. La dermatite atopique canine

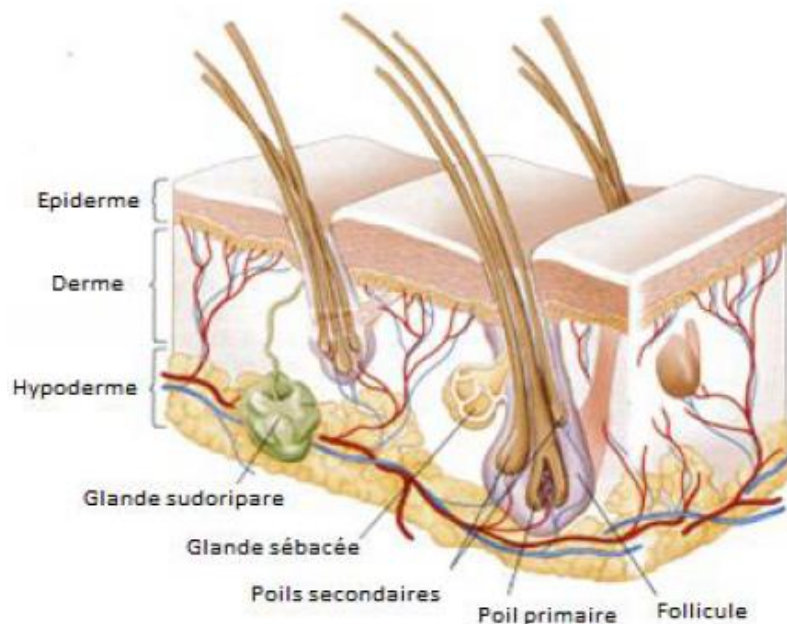
## A. Quelques rappels d'anatomie et de physiologie de la peau du chien

La peau est un organe complexe remplissant de nombreuses fonctions de barrière, régulation thermique, synthèse protéique, et immune. Elle représente, chez le chien adulte, près de 10% du poids corporel. L'épiderme est renouvelé tous les 21 à 28 jours par division cellulaire et desquamation. Cela lui permet de maintenir sa cohésion.

L'épaisseur de la peau varie, en fonction de la localisation, entre 0,5 et 5 mm. Elle est la plus épaisse notamment au niveau de l'encolure, de la partie dorsale du thorax et de la base de la queue et est la plus fine au niveau des pavillons auriculaires et des grands plis (axillaires et inguinaux) (1).

### 1. Les différentes couches de la peau

La peau est constituée de trois couches intimement reliées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Chez l'animal, la peau est presque intégralement velue à l'exception des jonctions cutané-muqueuses, de la truffe et des coussinets (1,2) (Figure 1).

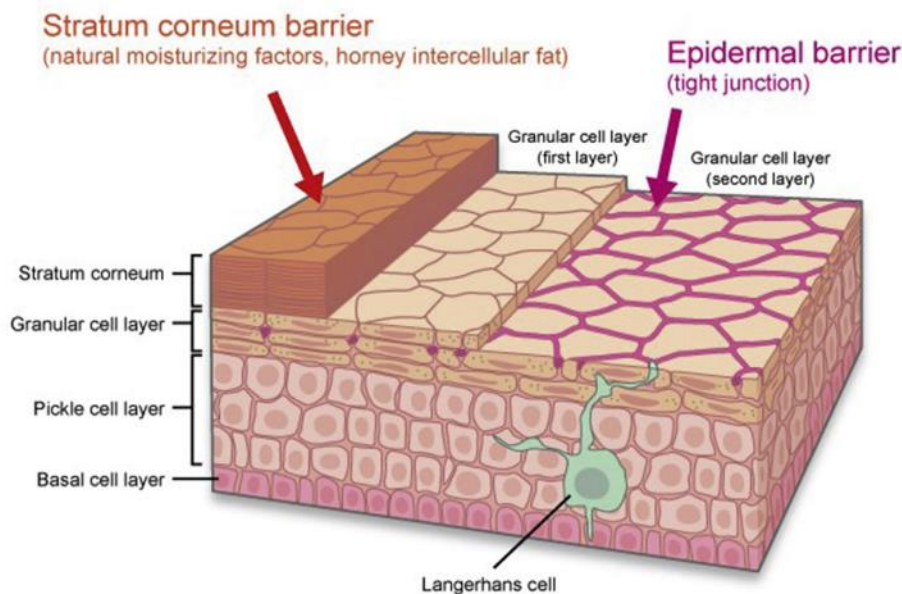


**Figure 1** : Anatomie de la peau (3)

## a) L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Il est constitué d'un épithélium malpighien kératinisé. Il est formé de 4 couches cellulaires, qui sont, de la plus superficielle à la plus profonde, la couche cornée (*stratum corneum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche épineuse (*stratum spinosum*) et la couche basale (*stratum basale*), cette dernière étant au contact du derme. Il existe également une couche dite claire (*stratum lucidum*), située entre la couche cornée et granuleuse dans les zones où la peau est épaisse comme les coussinets ou le planum nasal. Ces couches se distinguent l'une de l'autre par un arrangement, une morphologie et des stades de différenciation cellulaire différents (Figure 2). Les cellules principales de l'épiderme sont les kératinocytes (85 %), mélanocytes (5 %), cellules de Langerhans (8 %) et cellules de Merkel (2 %).

La solidité des couches et l'ancrage de l'épiderme sont permis par des molécules d'adhésion comme les hémidesmosomes, desmosomes, jonctions serrées ainsi que par les filaments intermédiaires de kératine.



**Figure 2** : La barrière épidermique (4) ; Granular cell layer = couche granuleuse, Pickle cell layer = couche épineuse, Basal cell layer = couche basale

### (1) *Stratum corneum*

La couche cornée est la couche la plus superficielle de l'épiderme, parmi laquelle on retrouve des kératinocytes dans leur dernier stade de différenciation. Son épaisseur varie entre 5 et 1500  $\mu\text{m}$  chez le chien, selon la localisation. Elle est perpétuellement renouvelée grâce au



phénomène de desquamation ; processus en équilibre avec le renouvellement cellulaire provenant de la couche basale. Cela permet de maintenir une épaisseur constante.

Elle est composée de plusieurs épaisseurs de cellules appelées cornéocytes reliées par une matrice extracellulaire lipidique, prévenant des pertes en eau, à l'image de briques associées avec du mortier. Les cornéocytes sont également reliés par des cornéodesmosomes.

Les cornéocytes ne possèdent pas de véritable membrane cellulaire contenant des phospholipides. Ils possèdent une membrane plasmique propre, appelée enveloppe cornée, riche en protéines telles que la filaggrine, la loricrine ou l'involucrine. Cette enveloppe est imperméable et permet à la peau de maintenir son rôle de barrière contre les micro-organismes, les agents physiques chimiques et environnementaux.

On retrouve à la surface de la couche cornée, des peptides anti-microbiens appelés PAM (cathelicidines, B-défensines notamment). Ces derniers constituent une défense contre les micro-organismes potentiellement pathogènes.

### (2) *Stratum lucidum*

La couche claire est une strate compacte, entièrement kératinisée composée d'une fine couche de kératinocytes anucléés. Ces derniers contiennent, chez le chien, des gouttelettes transparentes d'éléidine. Elle se distingue histologiquement de la couche cornée par sa richesse en lipides liés aux protéines. Elle est surtout présente au niveau des coussinets.

### (3) *Stratum granulosum*

L'épaisseur de la couche granuleuse est variable selon la localisation. En effet, dans les zones velues, elle n'est composée que d'une ou deux assises cellulaires, pour quatre à huit dans les zones non velues ou au niveau des infundibulum des follicules pileux.

Les cellules de cette couche sont aplaties, leurs noyaux de taille réduite et leur cytoplasme contient de volumineux agrégats basophiles de kératohyaline. Ces agrégats sont composés de profilaggrine, précurseur de la filaggrine, permettant l'agrégation de la kératine et donc le passage de cellules nucléées avec kératine dispersée à des cellules mortes, anucléées avec kératines agrégées. Ils jouent un rôle dans le processus de cornification et dans la fonction de barrière imperméable de l'épiderme. Le *stratum granulosum* est également le lieu de production de la loricrine.

L'ensemble de ces protéines est à l'origine de la formation d'une matrice autour des filaments de kératine au sein des cornéocytes. Ils sont aussi une source d'acides aminés libres, important dans le maintien d'une bonne hydratation de la couche cornée.

#### *(4) Stratum spinosum*

La couche épineuse est composée de kératinocytes polygonaux avec un petit noyau rond central. Ils contiennent des corps lamellaires, constitués des précurseurs de la matrice lipidique de la couche cornée. C'est au sein de la couche épineuse, que les kératinocytes issus de la couche basale cessent de proliférer et démarrent leur différenciation. L'épaisseur de cette couche varie également en fonction de la localisation et de la pilosité. Elle n'est constituée que d'une ou deux assises cellulaires dans les zones velues et peut atteindre une vingtaine d'assises au niveau des coussinets, du planum nasal ou encore des jonctions cutanéomuqueuses.

#### *(5) Stratum basale*

La couche basale est composée d'une unique rangée de cellules cylindriques à cuboïdes, à l'interface entre l'épiderme et le derme. Cette couche est à l'origine des autres couches plus superficielles de l'épiderme. En effet, elle est constituée majoritairement de kératinocytes qui se divisent constamment et poussent les cellules filles précédemment formées vers les couches superficielles. En remontant vers la surface, elles vont être impliquées dans le processus de cornification.

Au sein de la couche basale, il existe deux populations de kératinocytes qu'il est possible de distinguer : les kératinocytes responsables de l'ancrage de l'épiderme et ceux à fonction de « cellules souches », qui prolifèrent et réparent l'épiderme.

Ce sont des molécules d'adhésion comme les desmosomes (adhérence entre kératinocytes) et hémidesmosomes (adhérence entre les kératinocytes et la lame basale) qui permettent l'ancrage de l'épiderme à la lame basale.

La couche basale contient également des mélanocytes. Ces cellules produisent des pigments de mélanine qui se propagent au sein du mélanocyte et dans ses dendrites. Ils sont alors transmis au kératinocytes environnants et se placent au-dessus de leur noyau, protégeant ainsi le matériel génétique des rayons lumineux.

On y trouve également des cellules de Merkel au niveau des renflements appelés tubercules tylotriches.

#### b) Le derme

Le derme est un tissu conjonctif situé sous l'épiderme. Il est issu du mésoderme. Cette structure, composée de nombreuses fibres de collagènes, d'élastine organisées ainsi qu'une matrice de protéoglycanes, assure un rôle de soutien. Il contient également les follicules pileux, les fibres nerveuses et les vaisseaux pour lesquels il joue notamment un rôle de protection.

Les cellules majoritaires, à l'origine de la production des fibres de collagène, d'élastine et de la matrice extracellulaire, sont les fibroblastes. Ces fibroblastes répondent à des stimuli,

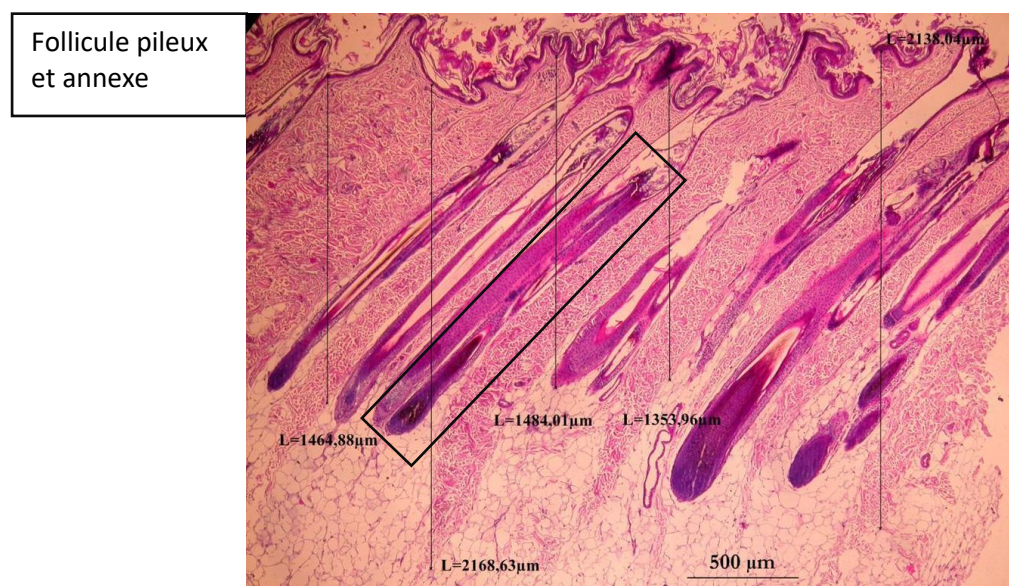
notamment de facteurs de croissance produits par les kératinocytes, les cellules inflammatoires et les fibroblastes eux-mêmes.

L'intégralité des fibres composant le derme sont produits par les fibroblastes. Il s'agit du collagène, de l'élastine et de la réticuline. Ils sont aussi à l'origine de la production de la matrice épidermique. Les fibres de collagène, composant principal de la trame dermique, sont des fibres de protéines polymériques qui, assemblées, sont très résistantes à la traction. La trame collagénique n'a pas la même morphologie dans les différentes couches du derme. En effet, dans le derme superficiel, les fibres sont agencées en trames assez lâches alors qu'elles forment un réseau dense et épais dans le derme profond. L'essentiel des fibres de collagènes, c'est-à-dire environ 90 %, sont du collagène de type I ou III. On y retrouve également du collagène de type IV en regard de la lame basale et de la jonction dermo-épidermique. Les fibres d'élastine forment un fin réseau au sein du derme superficiel, qui se densifie et s'épaissit en profondeur. Elle confère son élasticité au derme.

La matrice extracellulaire, composante du tissu interstitiel, est produite par les fibroblastes. Elle contient des glycosaminoglycanes parmi lesquels on retrouve l'acide hyaluronique, la chondroïtine-sulfate et dermatane sulfate. Ces macromolécules s'associent à des protéoglycanes (notamment fibronectines) et jouent un rôle dans l'homéostasie et la rétention hydrique, dans la résistance à la compression du derme, la fibrillogenèse du collagène et dans son orientation, organisation et sa différenciation.

Au niveau du derme, on met aussi en évidence par histologie et marquage immunohistochimique des cellules du système immunitaire comme les mastocytes, cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup>, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.

L'aspect du derme et de ses annexes en coupe histologique est représenté ci-dessous (Figure 3).



**Figure 3 :** Coupe histologique de la peau ; derme et annexes (1)

### c) L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est majoritairement composé d'adipocytes. Il joue un rôle d'amortisseur, de réserve pour les structures supérieures ainsi que dans la thermorégulation.

## 2. Quelques rôles de barrière de l'épiderme (5)

### a) La peau, une barrière hydrique

L'épiderme est une barrière hydrique qui permet de maintenir le gradient de teneur en eau entre les couches profondes et la couche cornée. En effet dans des conditions physiologiques, les couches profondes de l'épiderme sont composées d'environ 70 % d'eau contre 20 % environ en surface. L'équilibre physiologique de la peau est dépendant de cette homéostasie hydrique. En effet, elle intervient dans la résistance et l'élasticité cutanée, dans les activités enzymatiques et la signalisation cellulaire.

Le maintien de ce gradient hydrique est dépendant d'éléments comme les lipides intercornéocytaires, les jonctions serrées ou encore le facteur naturel d'hydratation (FNH), composés d'acides aminés libres et de composants extracellulaires. Le gradient hydrique se manifeste notamment par une perte insensible en eau (PIE) mesurable pour l'exploration de l'intégrité de la barrière.

#### (1) Lipides intercornéocytaires

Les lipides intercornéocytaires sont synthétisés par les kératinocytes et issus de la sécrétion des corps lamellaires. Ils sont composés de céramides, acides gras et cholestérol. La composition et arrangement en lamelles superposées de cette matrice lipidique limite la pénétration des liquides non liposolubles. En effet, la majorité de ces lipides sont organisés de manière très compacte (état cristallin ou orthorhombique) ce qui favorise l'imperméabilité de la couche cornée. La barrière hydrique repose sur la synergie entre ces différents lipides. Nous précisons davantage leur rôle et leur implication dans l'homéostasie hydrique dans la partie sur la physiopathologie de la DA.

#### (2) Les jonctions serrées

Des jonctions intercellulaires spécifiques des épithéliums sont appelées jonctions serrées. Dans le cas de l'épiderme, on retrouve ces jonctions serrées au niveau du *stratum granulosum*, à la jonction apico-latérale des kératinocytes. Elles sont constituées d'une structure protéique transmembranaire complexe ancrée au cytosquelette cellulaire avec notamment les claudines et occludines. Ces jonctions confèrent une étanchéité quasi-totale de l'épiderme, propriété

démontrée grâce à un modèle murin en 2002 (6). En effet, seules les molécules de très bas poids moléculaires et les ions peuvent passer par voie paracellulaire.

### *(3) Le FNH*

Le FNH est un facteur que l'on retrouve exclusivement dans la couche cornée. Il y représente une part importante, 30 % du poids sec total. Il est composé d'acides aminés libres issus de la lyse de la filaggrine et de composants extracellulaires comme l'acide lactique, l'urée et les sucres. Le FNH capte et retient des molécules d'eau au sein de la matrice protéique.

## b) La peau, une barrière chimique et biochimique

### *(1) Le pH cutané*

Le pH cutané du chien varie en fonction de la race, du stade sexuel, de l'emplacement anatomique mais serait en majorité acide.

Il a un rôle important dans l'activité des enzymes épidermiques. Une variation de ce pH peut entraîner des répercussions sur leur fonctionnement. Il influe notamment dans le processus de desquamation en permettant la libération des kallikréines, enzymes protéolytiques. De plus, ce pH permet favorise le développement de la flore commensal tout en inhibant la croissance et prolifération de la flore pathogène.

### *(2) Les peptides anti-microbiens (PAM)*

Les PAM sont produits notamment par les kératinocytes et se concentrent dans la couche cornée. On trouve parmi eux les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines. Ils jouent un rôle dans l'immunité innée de l'organisme. En effet, ils possèdent une action antimicrobienne à spectre large contre les bactéries, virus et champignons. Ils interagissent avec les lipides des membranes des organismes cibles pour les détruire.

### *(3) Flore commensale cutanée*

On retrouve à la surface de la peau une flore microbiologique commensale, parmi laquelle des bactéries et des levures. Des phénomènes de compétition interviennent entre certains agents pathogènes et cette flore commensale.

### c) La peau, une barrière immunologique

#### *(1) Les cellules de Langerhans, un exemple de cellule présentatrice d'antigène*

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques résidentes de la peau, présentatrices d'antigènes au moyen du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II). Elles jouent un rôle majeur dans les réponses immunitaires primaires et secondaires. On les retrouve dans les couches basales et supra basales de l'épiderme, entre les kératinocytes (7). Elles sont notamment caractérisées par des extensions cytoplasmiques fines qui émergent du corps de la cellule. Elles se caractérisent en immunohistochimie par des marqueurs du type CD45, CD33 et CD13 (7).

Les cellules de Langerhans sont capables de phagocytose. Elles reconnaissent notamment des antigènes glycoprotéiques au moyen de récepteurs aux lectines, aux protéines d'enveloppe et également des récepteurs spécifiques des parties constantes des immunoglobulines comme FcRI ou FcRIII. Elles peuvent donc également phagocyter des antigènes après opsonisation par des anticorps. Les cellules de Langerhans vont ensuite migrer dans le nœud lymphatique drainant afin de présenter le complexe CMH II-antigène aux LT. Cette migration est notamment dépendante de facteurs appelés chimiokines, comme le CCR7 dont l'absence, chez des souris dont le gène a été muté, empêche toute migration vers le ganglion (8).

La physiopathologie de la réponse immunitaire à la suite de la pénétration anormale d'un allergène sera décrite ultérieurement.

#### *(2) Les chimiokines*

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques produites à la suite de stimulation par des signaux de dangers. Elles régulent notamment la différenciation, l'activation et la migration des cellules présentatrices d'antigène (cellules de Langerhans, LT, granulocytes). Les kératinocytes peuvent produire certaines chimiokines et entraîner l'afflux de cellules immunitaires sur le site. Certaines chimiokines comme le CCL20 possèdent une action antimicrobienne.

#### *(3) Les lymphocytes et granulocytes*

Il est possible de retrouver, dans l'épiderme et dans le derme, des populations de lymphocytes différentes. On distingue notamment les LT des lymphocytes B (LB). Les LT CD8+ sont davantage retrouvés au sein de l'épiderme alors que les LT CD4+ davantage au sein du derme. En cas de précédente sensibilisation à un antigène, il est possible de retrouver des LT mémoires, résidents de la peau, qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire secondaire en cas de nouvelle présentation antigénique (9).

On retrouve également des granulocytes ou polynucléaires neutrophiles et éosinophiles au sein du derme.

Il est important de rappeler que la peau est une barrière physique, mécanique et qu'elle a des rôles dans la thermorégulation, la sensibilité et la photoprotection. Ces rôles ne seront pas précisés davantage.

## B. Clinique et physiopathologie de la dermatite atopique

### 1. Définition

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire cutanée dont l'inflammation est essentiellement due à une hypersensibilité à médiation cellulaire retardée. Elle est donc répertoriée dans la classe IV de la classification des hypersensibilités de Gell et Coombs. Elle implique, comme nous le détaillerons ensuite, une barrière cutanée altérée et une pénétration allergénique accrue.

### 2. Epidémiologie

#### a) Fréquence

Selon différentes études, la DA concernerait entre 3 et 15 % de la population canine avec une moyenne de 10 % dans une étude de Majewska et al. en 2016 (10,11). Ces chiffres peuvent cependant être questionnés car les études font peu état des critères d'inclusion et des méthodes diagnostiques par exemple. Cette maladie est complexe, l'exclusion d'autres hypothèses rentrant dans le diagnostic différentiel du prurit chronique est indispensable. Elle peut donc être le plus souvent sur-diagnostiquée ou éventuellement sous-diagnostiquée.

#### b) Population concernée

L'âge est un critère important à prendre en compte lors du diagnostic de DA. Il est retrouvé dans de nombreux critères diagnostiques de DA. Quelle que soit la publication, les animaux recevant un diagnostic de DA ont en grande majorité un âge compris entre 6 mois et 3 ans (11,12). En effet la moyenne d'âge au diagnostic/déclenchement des symptômes, d'après Favrot et al., est de 2,2 ans (12). En effet 68 % des chiens ont leurs premiers signes cliniques de DA avant l'âge de leurs 2 ans. Une étude rétrospective à l'université de California Davis montre elle, sur 266 cas, que 95 % des individus présentent leurs premiers signes avant 5 ans (13).

Le collège américain de dermatologie vétérinaire stipule que les cas présentant leurs premiers signes cliniques en dessous de 6 mois et au-delà de 3 ans sont possibles mais que la mise en place précoce des signes cliniques est un critère que l'on retrouve significativement plus dans la dermatite atopique que dans les autres dermatoses prurigineuse (14).



### c) Facteurs de risques

De nombreux facteurs de risque ont été mis en évidence dans la dermatite atopique du chien. Ces facteurs de risque sont inclus dans les critères diagnostics établis, que ce soit par Willemse, Prelaud ou encore Favrot.

Le premier facteur de prédisposition que nous pouvons évoquer est la race. En effet, toutes les études s'accordent à dire que certaines races présentent une incidence plus importante de DA.

Cependant, il est possible d'observer quelques différences entre les études. En effet, selon le lieu et l'époque, certaines races semblent prédisposées ou non au développement de la maladie. En effet, certaines publications incluent le Berger allemand alors que d'autres le présentent comme une des races les moins touchées. Il est évident que ces estimations dépendent aussi de la population témoin/contrôle de l'étude : est-ce ramené à une population locale ou générale ? C'est ce qui est présenté dans la publication de Jaeger (11). Dans cette étude, l'auteur fait l'hypothèse que des variations allergéniques entre les pays et avec le temps peuvent expliquer ces différences. Cette hypothèse est à remettre en question, les erreurs diagnostiques seraient davantage à privilégier pour expliquer cette différence au cours du temps. En effet, un chien atteint de DA a toutes les chances de développer des symptômes quel que soit l'environnement. D'autres races sont généralement retrouvées dans l'ensemble des publications sur la DA. Il s'agit des Labrador et Golden Retriever, Boxer, Bull Terrier, Cairn Terrier, Bulldog français, Cocker Spaniel, West Highland White terrier, Shar Pei (11,12,14).

La figure suivante présente les prédispositions selon la localisation géographique en utilisant des *Odd Ratio*. On observe que les mêmes races ne sont pas décrites comme prédisposées sur tous les continents, à part pour le Golden Retriever, qu'on retrouve sur trois continents (Figure 4).

	Hamburg, Germany	Munich, Germany	Melbourne, Australia	Campbell, CA, USA	Fort Collins, CO, USA
Bichon frise	0/112*	0/80*	3/145*	<b>5/120 (P = 0.003, OR 4.5, CI 1.7–11.6)</b>	2/95*
Boxer	5/112 (P = 0.1251, OR 2.3, CI 0.9–5.7)	1/80*	<b>5/145 (P = 0.0069, OR 3.9, CI 1.6–9.6)</b>	2/120*	0/95*
Bullterrier	1/112*	0/80*	<b>4/145 (P = 0.0011, OR 7.6, CI 2.3–25.6)</b>	1/120*	1/95*
Cavalier King Charles Spaniel	0/112*	0/80*	<b>8/145 (P &lt; 0.0001, OR 6.9, CI 3.0–16.2)</b>	0/120*	0/95*
French bulldog	<b>5/112 (P &lt; 0.0001, OR 46.9, CI 16.7–131.3)</b>	0/80*	0/145*	1/120*	1/95*
German shepherd dog	<b>17/112 (P &lt; 0.0001, OR 6.6, CI 3.9–11.2)</b>	<b>16/80 (P &lt; 0.0001, OR 5.0, CI 2.9–8.6)</b>	<b>19/145 (P = 0.0019, OR 2.4, CI 1.4–4.1)</b>	9/120 (P = 0.154, OR 1.8, CI 0.9–3.6)	4/95 (P = 0.968, OR 1.177, CI 0.4–3.2)
Golden retriever	7/112 (P = 0.641, OR 1.3, CI 0.6–2.8)	<b>13/80 (P &lt; 0.0001, OR 8.6, CI 4.7–15.6)</b>	<b>6/145 (P = 0.006, OR 0.3, CI 0.1–0.6)</b>	<b>20/120 (P &lt; 0.0001, OR 5.1, CI 3.1–8.4)</b>	10/95 (P = 0.082, OR 3.017, CI 1.0–3.7)
Great Dane	0/112*	0/80*	<b>4/145 (P &lt; 0.0001, OR 20.3, CI 4.5–91.4)</b>	1/120*	0/95*
Jack Russell terrier	7/112 (P = 0.087, OR 2.1, CI 1.0–4.6)	<b>5/80 (P = 0.0003, OR 5.5, CI 2.2–13.7)</b>	3/145*	2/120*	0/95*
Labrador retriever	7/112 (P = 0.063, OR 2.3, CI 1.0–4.9)	<b>6/80 (P = 0.004, OR 3.7, CI 1.6–8.5)</b>	<b>9/145 (P = 0.0007, OR 0.3, CI 0.2–0.6)</b>	19/120 (P = 0.264, OR 1.377, CI 0.8–2.3)	10/95 (P = 0.562, OR 0.8, CI 0.4–1.5)
Silky terrier	0/112*	0/80*	<b>4/145 (P = 0.0022, OR 6.8, CI 2.1–22.2)</b>	0/120*	0/95*
West Highland white terrier	9/112 (P = 0.1507, OR 1.8, CI 0.9–3.5)	4/80 (P = 0.39, OR 1.8, CI 0.7–5.0)	<b>6/145 (P &lt; 0.0001, OR 10.3, CI 3.6–29.3)</b>	2/120*	1/95*

OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval.

**Figure 4 : Prédilection raciale à la dermatite atopique en fonction des localisations géographiques (11)**

L'environnement est également un facteur de risque au développement de la maladie. En effet les animaux vivant en intérieur sont plus susceptibles d'en développer les signes que les animaux vivant en extérieur. On peut observer jusqu'à 35 % d'amélioration à la suite d'un changement d'environnement et 25 % présentent une aggravation saisonnière dans l'étude de Favrot et al. (12). Cela peut être lié aux différents allergènes impliqués dans la maladie ou au fait d'une prolifération de *Malassezia* plus favorable en milieu chaud et humide.

Dans son étude, datant de 2011, Meury fait l'hypothèse qu'un animal sédentaire et urbain présente plus de risque de développer des signes de dermatite atopique qu'un animal vivant en zone rurale. On peut souligner un biais dans cette étude : les chiens de ville sont peut-être davantage médicalisés et on y trouve davantage de vétérinaires pour animaux de compagnie (15).

Une étude a d'ailleurs mis en évidence des preuves d'un risque plus élevé de développement d'eczéma atopique chez l'enfant en milieu urbain qu'en milieu rural (16).

Le collègue américain de dermatologie vétérinaire indique la présence de signes primitifs saisonniers dans 42 à 75 % des cas avec 80 % de ces derniers entre le printemps et l'automne (14).

Le sexe de l'animal, lui, n'aurait aucune importance. En effet le *sex ratio* est de 50 % quelle que soit l'étude (13).

Le tableau suivant résume les principaux facteurs, évoqués précédemment, intervenant ou non dans la survenue de la DA (Tableau 1).

**Tableau 1** : Récapitulatif des facteurs de risques au développement d'une DA chez le chien (17)

Risque augmenté	Risque réduit	Aucune corrélation
-Race prédisposée	-Vie en milieu rural	-Sexe
-Vie en milieu urbain	-Présence de congénères	-Saison à la naissance
-Bains réguliers au jeune âge		-Vaccination et vermifugation

### 3. Les signes cliniques et localisations des lésions

Le signe clinique principal de la DA est un prurit, fréquemment antérieur aux lésions, ce qui s'oppose notamment aux prurits que l'on retrouve dans certaines ectoparasitoses (gale sarcoptique) ou pyodermite superficielle. Il se manifeste chez l'animal par des mordillements, du léchage ou du grattage. Il serait généralisé chez 40 % des chiens (14). Les lésions peuvent être classées en lésions primaires, c'est-à-dire associée à la réaction inflammatoire cutanée lors de la pénétration allergénique et lésions secondaires au prurit ; ce qui sera détaillé par la suite (14,18).

La topographie lésionnelle classique est une atteinte des petits plis (coude, grasset) et des grands plis (axillaires, inguinaux), associée à une atteinte de la face (lèvres, paupières), des espaces interdigités, des faces médiales des membres, et de la face dorsale des doigts, ainsi que des pavillons auriculaires.

#### a) Lésions principales (14,18,19,20)

Les lésions dites primaires comprennent l'érythème et parfois des papules. D'après Olivry, l'érythème et le prurit coexistent presque systématiquement mais leurs sévérités ne sont pas toujours corrélées (20). Les lésions primaires s'accompagnent de lésions secondaires avec la chronicité et les traumatismes induits par le prurit. On peut alors observer des excoriations, écorchures superficielles de la peau, des croûtes, une alopecie auto-induite (dépilation), une lichénification c'est-à-dire un épaissement de l'épiderme, une hyperpigmentation cutanée, associée à une production augmentée de mélanine (Figure 5).

On observe aussi fréquemment une xérose cutanée, c'est-à-dire une sécheresse de la peau. Comme nous le verrons par la suite, la barrière cutanée altérée permet une perte d'eau par voie transcutanée plus importante. La xérose apparaît sous la forme d'un pelage terne, la présence de squames pityriasiforme (squames fines, sèches, assimilables à de la farine), des coussinets secs.

Une coloration modifiée du pelage est souvent observée et notamment dans les zones de plis, les lèvres et les doigts. Cette modification est secondaire à l'inflammation, à la présence d'une dysbiose à coques, de *Malassezia* ou d'une oxydation du poil par marquage salivaire.

Des surinfections, avec des pyodermites de surface, superficielles (pustules) et des proliférations de *Malassezia* sont possibles.

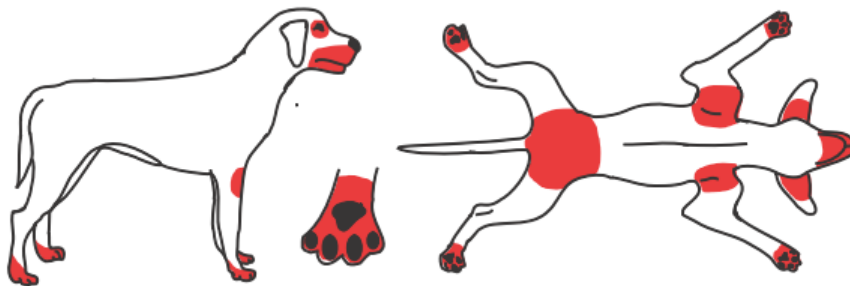
La diversité des lésions peut dépendre de la chronicité de la maladie, du prurit, des surinfections et de la génétique, dernier point qui reste à prouver (14).



**Figure 5 :** Erythème du chanfrein, des grands plis, lésions secondaires (lichénification et hyperpigmentation) (18,19)

#### b) Les localisations préférentielles (11)

Les zones les plus touchées lors de DA sont l'extrémité distale des pattes, le ventre avec les grands plis axillaires et inguinaux, le pavillon interne des oreilles et la face (21). (Figure 6)



**Figure 6 :** Localisations préférentielles des lésions de dermatite atopique (21)

Les extrémités distales des pattes sont les zones les plus touchées lors de DA avec 62 % des chiens de l'étude. C'est proche de ce qui a été montré sur des études rétrospectives comme celle menée à l'université de California Davis (13).

Les zones impliquées dans la DA seraient des zones favorables aux frottements, traumatismes.

Les atteintes podales concernent majoritairement les espaces interdigités et la face dorsale des membres. Elles se caractérisent par les lésions typiques primaires et secondaires détaillées précédemment. On peut observer en cas d'évolution non contrôlée de la maladie, une

atteinte de la face ventrale du carpe et du tarse. Une atteinte des bourrelets unguéaux serait également fréquente mais moins recherchée en pratique. Celle-ci serait fréquemment liée à des proliférations bactériennes de surface ou des proliférations de *Malassezia*.

On observe un prurit facial avec des lésions érythémateuses péri-oculaires, une chéilite et une blépharite chez près d'un chien sur trois (11). La chéilite, c'est-à-dire l'inflammation des lèvres, touche en général le pli de la lèvre inférieure. Des lésions secondaires de lichénification, d'excoriations associées à des croûtes peuvent être observées.

L'atteinte des paupières, ou blépharite, peut être très discrète avec un simple érythème ou sévère avec des lésions secondaires au prurit.

D'après Willemse et al., 60 à 70 % des chiens atteints de dermatite atopique ont des lésions visibles sur la face ou les doigts (12).

On décrit très fréquemment des otites externes chez les chiens atteints de DA. Elle est d'ailleurs une des causes primaires d'otite externe chez le chien. La fréquence dépend des études mais est évaluée à environ 50 % des cas (17 à 80 %) (11,12).

Elles peuvent se présenter sous différentes formes, avec des stades différents allant d'un érythème léger jusqu'à une sténose complète du conduit dans certains cas sévères.

Il faut rappeler que l'atteinte dorso-lombaire, elle, est presque toujours absente. Elle constitue un critère d'exclusion sauf en cas de surinfection généralisée.

Certaines atteintes seraient davantage retrouvées dans certaines races. Il semble cependant que dans ces articles, des pododermatites et otites soient confondues avec des DA (13,21). (Figure 7)

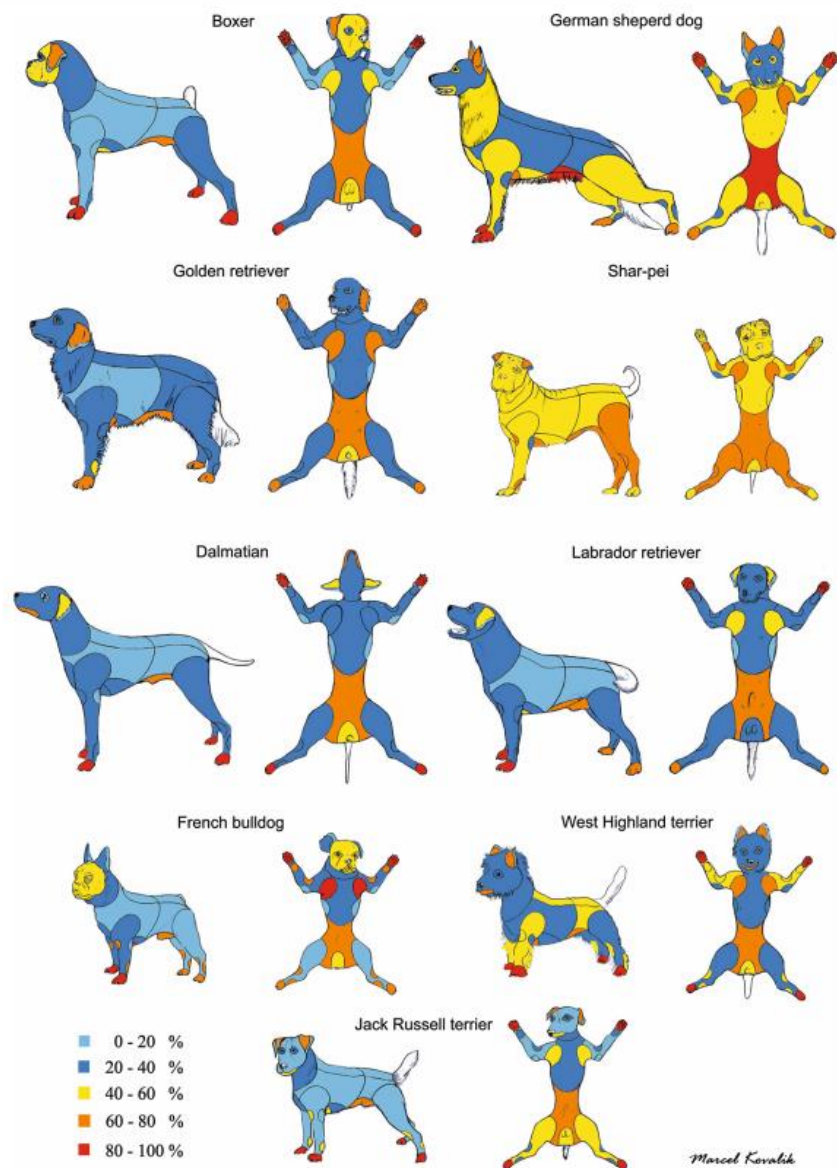


Figure 7 : Silhouette lésionnelle en fonction de la race (21)

#### 4. Physiopathologie

##### a) Altération de la barrière cutanée

L'altération intrinsèque de la peau d'un chien atteint de DA permet à des agents de tailles importantes (< 500 Da) de pénétrer, ce qui est impossible dans le cas d'une barrière cutanée saine. Ce sont, par exemple, des aéroallergènes protéiques. Ces derniers peuvent être/avoir une activité de protéases qui favorisent leur entrée dans l'épiderme en détruisant les jonctions entre kératinocytes. Les allergènes les plus souvent mis en cause proviennent des acariens et notamment de *Dermatophagoides farinae* et *D.pteronyssinus*. Chez l'Homme, des protéines dérivées de *Staphylococcus aureus* pourraient être mises en cause également en tant qu'allergènes, mais cela reste à prouver (22).

La communauté scientifique a premièrement pensé que des modifications génétiques du système immunitaire à l'origine, secondairement, d'un comportement anormal des cellules immunitaires lors d'intrusion per-cutanée, étaient à l'origine de la dermatite atopique. Il s'agit de la théorie du inside-outside. Puis de nouvelles informations ont permis d'appréhender le rôle fondamental de la barrière cutanée dans la physiopathologie de la dermatite atopique. En effet, une barrière altérée laisse pénétrer davantage les allergènes, ce qui favorise secondairement la présentation des allergènes aux cellules immunitaires et présentatrices d'antigènes (CPA). C'est la théorie du outside-inside (23).

Le consensus scientifique est désormais que la physiopathologie de la DA fait intervenir une combinaison de ces deux mécanismes. Un défaut primaire de la barrière épidermique est à l'origine d'une pénétration de protéines allergéniques et l'adhérence de microbes entraînant une stimulation exacerbée du système immunitaire cutané (inné et adaptatif). Cet excès de stimulation est associé à une libération de cytokines en grand nombre (dont les interleukines, le TSLP, le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )). Cette inflammation locale est à l'origine d'un dérèglement de la prolifération des kératinocytes, entraînant un dysfonctionnement encore plus important de cette dernière. Il y a donc une perte de fonction à la suite de modifications initialement primaires de l'épiderme puis secondaires à l'inflammation. C'est la théorie du outside-inside-outside (24).

Le défaut de barrière cutanée a bien été prouvé chez l'Homme avant d'être montré chez le chien. Cette barrière altérée est associée à une xérose cutanée, un dysfonctionnement de la barrière avec notamment une augmentation de la perte d'eau trans-épidermique ou perte insensible en eau (PIE) ou TEWL. Des modifications qualitatives et quantitatives des couches lipidiques (notamment céramides), des protéines constitutives de l'épiderme (notamment filaggrine) ont été mises en évidence chez l'Homme et chez le chien.

Des études ont montré, chez des chiens atteints de DA, une couche cornée avec des lamelles lipidiques désorganisées, plus courtes et plus fines que chez des individus sains (25). Elles

montrent également que des altérations in vitro de la barrière cutanée entraînent des sensibilisations plus importantes des chiens aux allergènes (2).

Plusieurs méthodes peuvent être mises en place pour évaluer la perte de fonction de la barrière épidermique dont la mesure de la PIE réalisée chez puis chez le chien.

Une deuxième méthode, beaucoup moins utilisée est la mesure de la capacitance cutanée.

#### b) Atteinte de la PIE

La définition de la PIE est le volume d'eau sortant du corps à travers les couches épidermiques supérieures. Une barrière cutanée intacte est indispensable afin de prévenir de la dessiccation par perte d'eau et la pénétration allergénique (2,26).

De nombreuses études en médecine humaine ont montré l'intérêt de cette mesure dans l'évaluation du bon fonctionnement de la barrière cutanée et elle est utilisée chez le chien comme critère d'évaluation de la sévérité de la maladie, ou critère de suivi de traitement entre autres. Une relation entre la PIE et l'intégrité de la barrière cutanée a d'ailleurs été mise en évidence dans l'étude de Shimada et al., plusieurs appareils sont décrits pour la mesure de la PIE (27). Une étude montre d'ailleurs, une bonne répétabilité et peu de variation intra et inter-observateur pour les appareils Corneometer, Skin-pH-Meter et Colorimeter mais une grande variabilité pour le Vapometer. Ces premiers appareils sont donc validés et conseillés pour l'évaluation de la PIE chez le chien (28).

De nombreuses difficultés se présentent lorsqu'il s'agit d'évaluer une perte d'eau trans-épidermique chez un animal. Ils doivent tous être dans des conditions absolument similaires car de nombreux paramètres peuvent influencer la mesure. Ils doivent impérativement être acclimatés au même environnement et ses paramètres physiques (humidité, température) avant et pendant la mesure (27). Le choix du site de mesure a également une importance. On observe moins de variabilité lorsque les mouvements sont réduits et lorsque la quantité de poils est aussi moins importante. Le pavillon auriculaire interne est donc régulièrement choisi car il remplit ces deux conditions et est fréquemment associé à des lésions de DA. Il peut être également être choisi de raser l'animal.

Les études comparant la PIE entre des chiens atteints de DA et des chiens sains montrent des différences significatives dans les mesures. En effet, la PIE est supérieure chez les chiens atteints de DA. Il a été montré que des chiens en rémission de leur maladie, avec des signes cliniques contrôlés, présentent une PIE plus faible que les chiens en phase clinique. Aussi, il a été montré une corrélation entre le score clinique (CADESI)-03 et la PIE, sur certains sites de mesure, chez des chiens atteints de DA dans l'étude de Zajac et al. (29). C'est repris dans l'étude de Shimada et al. (27). Cela peut en faire un outil de mesure intéressant dans l'évaluation et le suivi de la maladie à condition d'utiliser un appareil présentant peu de variabilité.



Une étude longitudinale similaire à ce qui est réalisé chez l'Homme serait nécessaire avant de le démontrer rigoureusement (24).

### c) Déséquilibres lipidiques

La couche cornée (*stratum corneum*) est composée en partie de lipides, parmi lesquels on retrouve les céramides, le cholestérol ainsi que des acides gras libres. Les céramides sont les composants principaux puisqu'ils représentent près de 50 % des lipides de la couche cornée chez les humains (24).

Les céramides sont localisés dans la bicouche lipidique cellulaire et sont constitués de diverses combinaisons de sphingosines et d'acide gras. Le nom qui leur est attribué dépend de cette combinaison. Les céramides ont une fonction structurale en intervenant notamment dans l'imperméabilité de la barrière cutanée, et jouent aussi un rôle dans les communications inter-cellulaires, la signalisation lipidique, la différenciation et la mort cellulaire programmée.

Il a été montré en médecine humaine et vétérinaire que l'épiderme des individus atteints de DA présente des modifications structurales, qualitatives et quantitatives.

En effet, on retrouve dans la grande majorité des cas une quantité de céramide moindre que ce soit au niveau des lésions de DA qu'au niveau de la peau non lésionnelle. Chez le chien, l'épaisseur de la matrice lipidique de la couche cornée a été montrée significativement diminuée chez les individus malades. Les céramides présents seraient aussi désorganisés avec notamment passage d'une conformation orthorhombique à hexagonale (2,23,24,31).

Une étude a montré chez l'Homme qu'il y a moins de céramide de type 1/CER[EOS] et 9/CER[EOP] dans la peau lésionnelle et non lésionnelle d'un individu atteint de DA. De plus cette peau présente significativement plus de cholestérol que chez individus sains (32).

Chez le chien, une étude de Chermprapai et al. met en évidence une quantité diminuée d'acide gras au sein de la couche cornée ainsi qu'une réduction du ratio des céramides C44/C34 (chiffre correspondant au nombre de carbones). Ce ratio diminue lui-même de manière non linéaire avec l'augmentation de la sévérité des signes cliniques (CADESI) (31).

On observe aussi des glucosylcéramides chez les chiens malades alors qu'ils sont quasiment absents chez les chiens sains (33).

D'autres modifications sont observables avec notamment une diminution de l'activité de certaines enzymes indispensables à la synthèse des lipides comme la sphingomyelinase épidermique. De récentes études font l'hypothèse qu'une enzyme (sphingomyéline glucosylceramide deacylase) dont l'activité est spécifiquement augmentée chez les individus atteints de DA, serait au moins en partie responsable des modifications quantitatives observées (24).

Chez l'Homme cette perte quantitative et qualitative de céramides de la couche lipidique est à la fois primaire, c'est-à-dire préexistante, et secondaire à l'inflammation cutanée chronique. En effet, ces altérations sont en partie liées aux poussées inflammatoires déclenchées par

l'exposition allergénique chez des individus sensibilisés (34). Cependant, même avant stimulation antigénique, on observe par microscopie électronique de sévères atteintes de la lamelle lipidique et des élargissements des espaces intercellulaires contenant un matériel lipidique altéré chez les individus malades (33).

D'autres études ont cherché à montrer que ces anomalies structurales de la couche cornée sont à l'origine d'une perte de la fonction de barrière de la peau. L'augmentation de la PIE a été associée chez les chiens à une diminution des céramides de la peau (32). Par ailleurs, la supplémentation topique en acides gras essentiels a, dans certaines études, permis d'améliorer la fonction de barrière de la peau altérée et s'est montrée bénéfique au sein de polythérapie. Les études s'avèrent plutôt contradictoires dans le cas des suppléments oraux (24,35).

Les chiens atteints de DA, comme les humains, présentent une anomalie primaire structurale de l'épiderme à l'origine de la pénétration exacerbée d'allergènes. L'inflammation secondaire détériore davantage l'équilibre structural de la barrière épidermique. En effet, chez les chiens atteints de DA, les variations lipidiques en strates suggèrent l'implication de phases inflammatoires dans le remaniement secondaire de la strate cornée (23).

#### d) Déséquilibres protéiques

Les protéines épidermiques sont importantes dans la différenciation épidermique et le processus de cornification. La filaggrine est une protéine permettant l'agrégation des filaments intermédiaires de kératine afin de créer une matrice protéique (23).

Des études chez l'Homme ont montré que la présence de mutations perte de fonction du gène codant pour la protéine filaggrine est un facteur de risque majeur dans le développement de l'eczéma atopique chez l'enfant. Cela ne concerne qu'une partie de la population, majoritaire de peu.

Ces mutations permettent de réaliser qu'une modification de fonction au sein de la barrière épidermique peut engendrer une DA, d'où l'importance de ces anomalies structurales dans la physiopathologie de la maladie. En effet, on observe une prédisposition au développement de la DA chez des individus possédant cette perte de fonction dans la partie C terminale de la protéine (2,36).

Ces mutations n'ont pas systématiquement été mises en évidence chez le chien. D'ailleurs, des mutations perte de fonction ont aussi été retrouvées chez des chiens sains de DA. Cependant, dans l'étude de Chervet et al., des profils d'expression anormaux ont été retrouvés chez 15/18 chiens dont 4 avec une perte de la partie C-terminale, probablement associée à une mutation perte de fonction (37).

D'autres études menées chez le West Highland White Terrier ont montré qu'une diminution de l'expression de l'ARN messager de la filaggrine dans la peau de ces chiens atteints de DA

peut être retrouvée. Cependant le faible nombre d'individus ne permet pas de généraliser (38).

Aussi, une étude menée sur un lot de chiens atteints de DA a montré à l'aide de microscopie par immunofluorescence une diminution voire une absence de filaggrine dans la peau d'un nombre significatif de ces chiens. Ces modifications peuvent être génétiques ou fonctionnelles c'est-à-dire associées à une inflammation cutanée. En effet, comme dans le cas de la couche lipidique, l'inflammation cutanée lors de DA est également à l'origine d'une modification secondaire de l'expression de la filaggrine et des protéines constitutives des enveloppes cornifiées (involucrines et loricrines) (39,40).

#### e) Microbiote cutané

Le microbiote cutané est l'ensemble des micro-organismes et du matériel génétique présent sur la peau. Cette diversité d'organismes implique des interactions entre eux et avec l'hôte. Cette flore cutanée est indispensable car elle prévient de l'invasion de pathogènes par phénomènes de compétition (23).

Chez l'Homme, il a été montré à de nombreuses reprises que la dermatite atopique est associée à des changements importants au sein du microbiote cutané. En effet, pendant les phases aiguës de poussées inflammatoires, la diversité microbienne cutanée est fortement réduite et l'on retrouve alors une dominance de *Staphylococcus aureus*. D'ailleurs, cette modification du microbiote cutané et son importance sont corrélées à la sévérité de la maladie (41,42).

Les études en médecine vétérinaire sont moins nombreuses. Cependant, une étude récente menée dans des populations de chiens atteints de DA a montré par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S une plus faible diversité de la flore cutanée chez les chiens atteints de DA (43).

Malgré le faible échantillon, l'étude de Pierozan et al. (2016) montre le développement d'une dysbiose cutanée parallèlement au développement des lésions cutanées chez des chiens stimulés *in vivo* avec des protéines de *Dermatophagoides farinae* (41).

La peau de ces chiens est colonisée par des bactéries de type *Staphylococcus*. En effet 90% de ces chiens atteints de DA présentent une grande majorité de staphylocoques à coagulase positive, avec en première place *Staphylococcus pseudintermedius* devant *S.aureus*. Ce genre de colonisation n'a, dans cette étude, été rapporté que dans 40% des cas de chiens sains (23,41,43).

D'ailleurs cette différence du microbiote cutané disparaîtrait lorsque les chiens sont en rémission clinique de la maladie (43).

Les *Staphylococcus pseudintermedius* auraient une meilleure adhérence sur les peaux des individus atteints de DA, qu'elles soient lésionnelles ou non. En outre, cette adhérence est significativement plus importante lorsque le prurit est sévère (44). Cette adhérence ne serait

cependant pas un facteur prédisposant au développement de pyodermite superficielle, comme l'indique l'étude de Simou et al. (44).

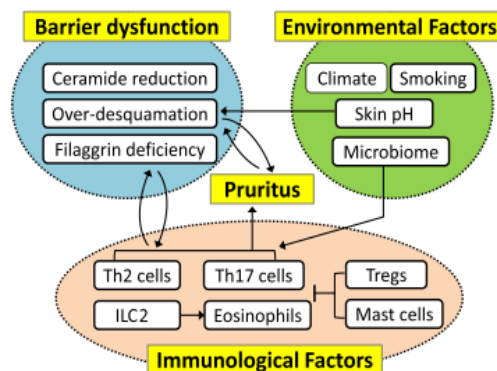
Cette colonisation bactérienne serait facilitée par la polarisation Th2 de la réponse immunitaire. Les interleukines 4 et 13 sont inhibitrices des peptides anti-microbiens cutanés (45).

De plus, les protéines de *Staphylococcus pseudintermedius* peuvent pénétrer la couche cornée altérée lors de DA, et entraîner une stimulation exacerbée de la réponse immunitaire, et sont alors appelés « superantigènes ». En effet, certaines protéines bactériennes sont considérées comme des super-antigènes. Elles sont capables d'entraîner une réponse massive de l'immunité avec une prolifération en grand nombre de cellules clonales T et un relargage secondaire de cytokines. 25 % des *Staphylococcus pseudintermedius* seraient producteur de super-antigènes chez le chien.

Chez l'Homme, il a été montré qu'une exposition aux protéines de staphylocoques chez des individus atteints de DA est à l'origine de réponses cutanées immédiates et tardives et d'une exacerbation des lésions inflammatoires associée à une prolifération lymphocytaire.

Les chiens atteints de DA sont prédisposés aux affections cutanées : les proliférations bactériennes de surface (notamment à *Staphylococcus pseudintermedius*) et les proliférations de *Malassezia pachydermatis*. La présence de ces pathogènes opportunistes stimule la libération de cytokines pro-inflammatoires et pro-prurigineuses (18).

Pour conclure, la DA repose sur un défaut de barrière, caractérisé par des modifications qualitatives et quantitatives structurales. Ces modifications favorisent une dysbiose cutanée et une interaction exacerbée avec l'environnement. (Figure 8)



**Figure 8 :** Interrelations entre le dysfonctionnement de la barrière, les facteurs environnementaux et immunologiques dans la physiopathologie de la DA (30)

## 5. Immunopathologie (30)

Dans la classification des hypersensibilités de Gell et Coombs, la dermatite atopique est une réaction d'hypersensibilité de type IV, c'est-à-dire à médiation cellulaire retardée (46).

### a) Sensibilisation à l'allergène

La sensibilisation est la première rencontre avec l'antigène qui pénètre l'organisme à travers la barrière cutanée. Il se lie à une protéine épidermique, et active l'immunité innée. En effet, des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) de la famille des Toll-like Receptor (TLR) reconnaissent des signaux anormaux (PAMPs) de l'antigène (Ag). S'en suit alors un relargage de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-25) dans le cas de dermatite atopique (9).

### b) Mise en place de la réponse immunitaire

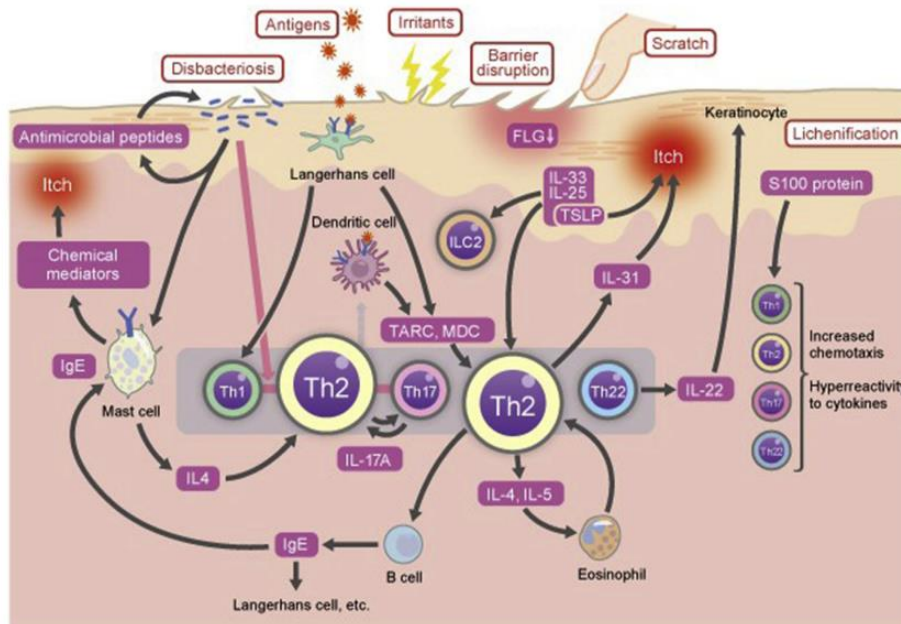
Des cellules dendritiques pro-inflammatoires, soit recrutées lors de cette phase initiale, ou résidentes (cellules de Langerhans), phagocytent la protéine. Ils migrent alors dans la paracorticale du ganglion drainant (47). Une fois dans le ganglion, il y a présentation du complexe cellule présentatrice-antigène à des lymphocytes T naïfs via le CMH I ou II. Il y a ensuite prolifération et différenciation des clones lymphocytaires spécifiques. Ces effecteurs spécifiques migrent au niveau du premier lieu de contact grâce à des signaux d'adressage appelés signaux de « homing ». Alors que des lymphocytes T effecteurs (Teff) spécifiques de l'allergène se mettent en place sur le site inflammatoire, des lymphocytes T mémoires (Tm) également spécifiques de l'allergène se différencient, prolifèrent et permettront en cas de récurrence du contact avec l'allergène, l'apparition d'une réponse inflammatoire plus précoce et plus rapidement efficace. Certains de ces Tm proviennent de la différenciation de Teff après la résolution de cette première phase (48).

Des études ont montré par immunofluorescence l'augmentation des LT notamment CD4<sup>+</sup> dans le derme des individus humains et canins atteints de DA et cela que ce soit dans les parties lésionnelles et non lésionnelles (49). On retrouve également plus de CD8<sup>+</sup> dans l'épiderme. Les LT représentent le composant majeur de l'infiltrat inflammatoire cutané. Cette augmentation de la quantité de lymphocytes est expliquée par l'augmentation d'expression (« upregulation ») du CCR4 (récepteur du TARC ou thymus and activation regulated chemokine). Cette chimiokine est surexprimée par les kératinocytes dans les lésions de DA.

### c) Nouvelle présentation allergénique

Lors d'une nouvelle présentation de l'allergène, on observe une inflammation et la formation des lésions eczémateuses. En effet, lorsque l'individu sensibilisé subit une nouvelle exposition au même antigène allergénique, ce dernier est pris en charge par des cellules présentatrices d'antigène. Cependant, il est, cette fois, présenté par des Tm spécifiques de l'allergène, générés lors de la première rencontre et provenant en grande partie de Teff (9,48). Ces lymphocytes T spécifiques orientent la réaction vers une voie Th2 avec les cytokines IL-4, IL-5, IL-13 notamment (9). La production de ces cytokines pro-inflammatoires intervient dans le recrutement de cellules effectrices comme les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les lymphocytes T effecteurs mémoires (Tem) producteurs de granzyme B, perforine et d'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). De plus des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires de l'hôte (DAMPs) activent l'immunité innée et entraînent le recrutement de polynucléaires neutrophiles localement. L'action combinée de ces différents effecteurs est à l'origine des lésions observées, que ce soit macroscopiquement ou en coupe histologique. Les acteurs majoritaires de ces réactions épidermiques sont donc les lymphocytes T, surtout CD4<sup>+</sup> Th2 et plus minoritairement CD8<sup>+</sup>, d'où la catégorisation IV dans la classification de Gell et Coombs.

Le schéma physiopathologique de la DA est résumé ci-dessous. (Figure 9)



**Figure 9** : Physio/immunopathologie de la dermatite atopique. FLG : filaggrine ; IgE : immunoglobuline E ; IL : interleukine, ILC : innated lymphoid cell ; MDC : macrophage-derived chimiokine ; TARC : thymus and activation-regulated chemokine ; Th : T helper ; TSLP : thymic stromal lymphopoietin (4)

#### d) Les cytokines principales mises en jeu dans la maladie

Afin de comprendre le projet de l'étude suivante et la physiopathologie complexe de la DA, il est important de s'attarder sur les voies immunitaires principales impliquées, ainsi que les cytokines les plus retrouvées. Les cytokines sont des protéines produites par les cellules immunitaires jouant le rôle de signaux intercellulaires par activité autocrine, paracrine et exocrine. Elles agissent sur toutes les cellules possédant un récepteur membranaire capable de reconnaître cette cytokine.

Les cytokines sont classifiées en pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, chimiokines, régulatrices de croissance entre autres. Elles sont associées à des voies inflammatoires particulières comme Th1, Th2, Th9, Th17, Th22. Elles sont médiatrices des maladies inflammatoires et leur implication est indéniable dans la physiopathologie de la DA (50).

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer quelles cytokines étaient responsables de l'inflammation cutanée, du prurit et de la chronicité de la dermatite atopique. Que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire ainsi que dans les modèles murins, il est évident que la voie de « type 2 » impliquant les LTh2 et cellules lymphoïdes innées de type 2 notamment est la voie dominante dans le mécanisme immunologique de la maladie.

En effet, l'analyse des ARN messagers (ARNm) cutanés a montré que l'IL-4 et l'IL-5 sont davantage présents dans les échantillons issus de chiens atteints de DA que dans les échantillons de chiens sains et également davantage présents dans les échantillons de peaux lésées (Figure 11). Cela indique une polarisation de l'inflammation locale cutanée vers une voie Th2. En effet l'IL-4 est la cytokine principale de cette voie (49,51). Elle est produite par les LT CD4<sup>+</sup>, les mastocytes et polynucléaires basophiles. Dans une étude menée par Majewska et al. en 2016, les concentrations de cytokines produites par les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMC) ont été évaluées par ELISA. Cela confirme que cette maladie est associée à un profil Th2 avec des cytokines comme l'IL-4, 5, 13 et 31 (10) (Figure 10). Ces cytokines sont à l'origine du recrutement de polynucléaires, notamment éosinophiles, sur le site de l'inflammation (50).

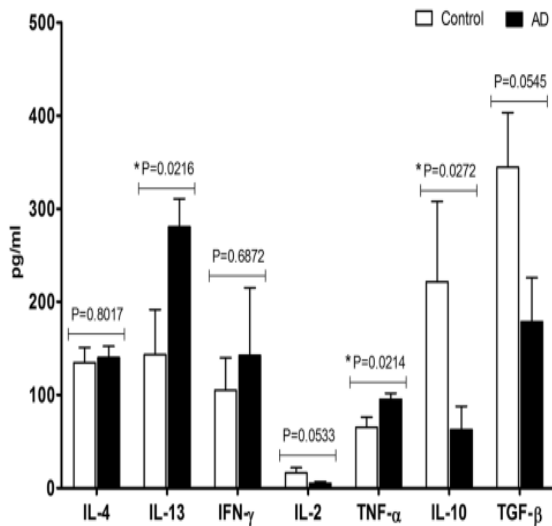
Chez l'Homme, il a été montré que l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 dans les PBMC est discriminante de la maladie car totalement absente des individus sains (52).

Dans une étude, l'IL-13, autre cytokine de la voie Th2, est également davantage retrouvée chez les individus atteints de DA. Cette cytokine a été identifiée dans de nombreuses autres études et joue sans doute un rôle très important dans la DA. En effet, dans l'étude de Schlotter et al. en 2011, on retrouve une augmentation de l'IL-13 chez les individus malades plus significative que l'augmentation de l'IL-4 (53). Dans l'étude de Majewska et al. en 2016, l'ARNm d'IL-13 s'est retrouvé davantage dans le sang des chiens atteints de DA (10).

L'expression de l'ARNm codant pour l'IL-13 a aussi été remarquée à la suite de la stimulation cutanée de chiens à des protéines allergéniques de *Dermatophagoides* (HDM) alors que d'autres interleukines Th2 n'étaient pas surexprimées comme l'IL-5 ou même l'IL-4. Il est dit

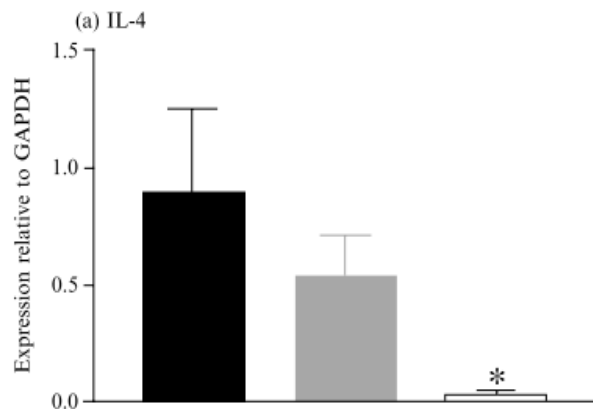
dans l'article que pour l'IL-4, il manque certaines données pour permettre une interprétation statistique. L'IL-13 est aussi retrouvée dans le sang périphérique (54).

La DA semble être polarisée vers une réponse Th2, médiée par l'IL-4 et l'IL-13 que ce soit au niveau cutané ou sanguin. Notons cependant que certaines études évoquent la présence simultanée d'autres voies comme Th1 en phase chronique de la maladie, ce dont nous parlerons ultérieurement.



**Figure 10 :** Concentration plasmatique des cytokines chez des chiens atteints de dermatite atopique (noir) et des chiens sains (blanc) d'après (10) ; \*  $p < 0,05$

**Figure 11 :** Expression relative de l'ARNm codant pour l'IL-4 par rapport au GAPDH dans la peau lésée de chiens atteints de DA (noir), dans la peau non lésée de chiens atteints de DA (gris) et dans la peau de chiens sains (blanc) (51) ; \*  $p < 0,05$



L'IL-31 est une cytokine affiliée à la voie Th2. Elle semble fortement associée au prurit dans la DA. Cette cytokine se lie à un récepteur hétérodimérique composé du récepteur à l'IL-31A et le récepteur  $\beta$  à l'oncostatine. La transduction du signal passe par la voie des JAK1 (Janus Kinase) et par activation des facteurs de transcription mitogen-activated protein kinase (MAPK) et phosphoinositide-3-kinase PI3K (55).



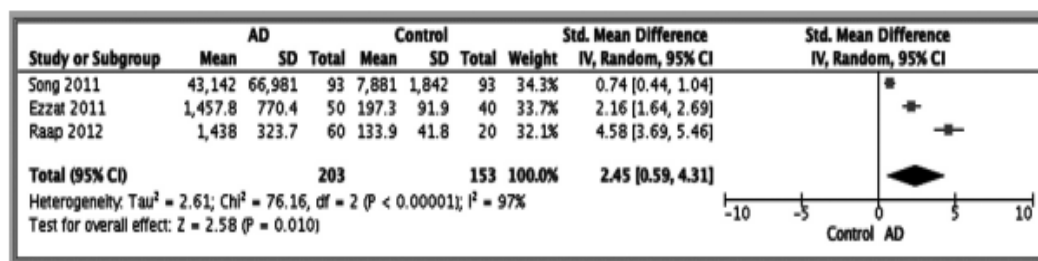
L'injection d'IL-31 chez des patients sains induit un prurit. De plus l'injection d'une dose d'anticorps monoclonal anti-IL-31 induit une réduction significative du prurit pendant 4 à 8 semaines selon la dose chez des chiens atteints de DA. Cela montre l'implication de l'IL-31 dans la physiopathologie du prurit (56).

Chez l'Homme, il a été montré que les quantités sériques d'IL-31 sont corrélées positivement à la sévérité de la maladie (55). Cette corrélation est de nouveau mise en évidence par une méta-analyse de Lu et al. en 2018 (57) (Figure 12).

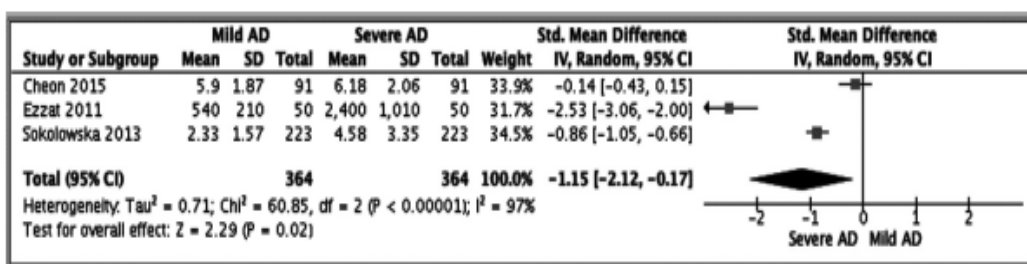
Chez le chien, de l'IL-31 sérique fut détectée chez plus de 50 % des individus atteints de DA. Les techniques utilisées (ELISA) ont montré un seuil indétectable d'IL-31 circulant chez les chiens sains, atteints de pulicose ou sensibilisés *in vitro*. La concentration minimale détectée par leurs manipulations est de 13 pg/mL (55).

40 % des chiens atteints de DA n'ont pas présenté d'IL-31 détectable, ce qui laisse penser que :

- Certains cas inclus ne sont en réalité pas des DA
- L'IL-31 est présente mais sous le seuil de détection de l'ELISA
- L'action de cette interleukine est locale mais il n'y a pas ou peu de diffusion sanguine
- La dermatite atopique étant très multifactorielle et polymorphe, certains cas et prurits associés ne sont peut-être pas liés à une dérégulation de l'IL-31



Comparison of IL-31 levels between the AD patients and the healthy controls



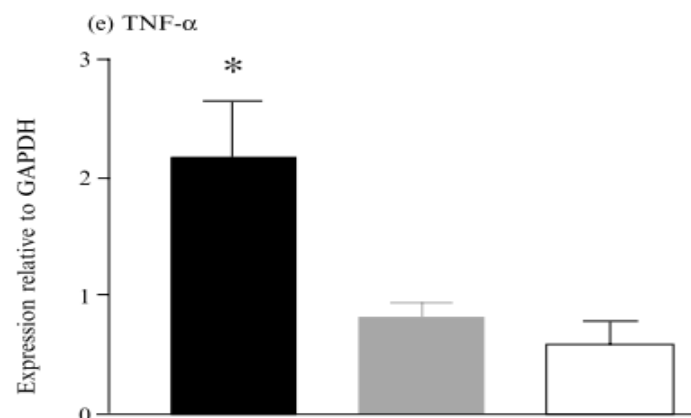
Comparison of IL-31 levels between patients with severe and mild AD

**Figure 12** : Comparaison du niveau d'IL-31 (défini par le rapport de la moyenne avec l'écart type de la différence entre les deux groupes) dans le sérum d'individus atteints de DA et d'individu sains (1<sup>er</sup> tableau) et entre des DA légères et sévères (2<sup>nd</sup> tableau) (57)

Cependant, la dermatite atopique n'est pas uniquement une maladie impliquant la voie Th2. En effet, il a été montré chez l'Homme qu'en phase chronique, de nombreuses cytokines de la voie Th1 sont retrouvées. On a fait l'hypothèse que les lésions chroniques et colonisations microbiennes entraînent une réponse à médiation cellulaire Th1. La dichotomie est moins claire chez le chien où l'on retrouve parfois une association des deux profils. Il n'y a donc pas d'incompatibilité même si l'on parle de balance Th1/Th2 et que l'expression des cytokines de la voie Th1 inhibe l'expression de la voie Th2. D'ailleurs, comme nous l'évoquerons par la suite, d'autres voies sont aussi mises en jeu comme Th17, Th22 ou Th33, même si sans doute moins impliquées que Th2 (10,51).

Dans une étude de Nuttall et al., on observe une augmentation significative des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  dans le plasma des chiens atteints de DA. Rappelons que le TNF- $\alpha$  est une cytokine pléiotropique, jouant un rôle dans le passage de l'immunité innée à adaptative dans les maladies inflammatoires chroniques. C'est une cytokine produite par les LT, macrophages, mastocytes et polynucléaires. Elle est souvent associée au profil Th1. Dans la DA, le TNF- $\alpha$  induirait une prolifération lymphocytaire, une apoptose des kératinocytes et un recrutement de polynucléaires et macrophages sur le site de pénétration de l'allergène (51).

On retrouve une augmentation du TNF- $\alpha$  dans les échantillons cutanés dans l'étude (Figure 13).

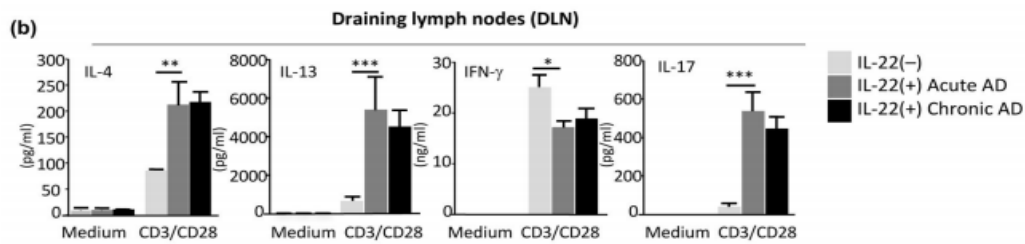


**Figure 13** : Expression relative des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  par rapport au GAPDH dans la peau lésée de chiens atteints de DA (noir), dans la peau non lésée de chiens atteints de DA (gris) et dans la peau de chiens sains (blanc) ; \*  $p < 0,05$  (51)

Plus récemment, de nouvelles voies immunitaires et donc de nouvelles interleukines ont été mises en évidence dans la DA. Il s'agit de l'IL-22 dans la voie Th22, de la chimiokine CCL17 ou TARC (Thymus and activation-regulated chemokine), du TSLP (Thymic Stromal Lymphopietin), de la voie Th17 avec l'IL-17 et de l'IL-33, cytokines de la voie Th2.

Dans une étude 2017 menée par Lou et al., l'expression du Th22 dans la peau des individus atteints de DA est significativement plus importante que dans la peau des individus sains. Son

taux sérique est augmenté dans certaines publications. L'IL-22 est aussi à l'origine de l'upregulation de la voie Th2 et des cytokines IL-4 et IL-13 (58) (Figure 14).



**Figure 14** : Profils cytokiniques produits par des lymphocytes des ganglions lymphatiques en réponse à une stimulation Th22 chez des modèles de dermatite atopique (58)

Le TARC ou CCL17 est une chimiokine à l'origine de la migration lymphocytaire sur le site de l'inflammation. Cette chimiokine est positivement corrélée à la sévérité de la dermatite atopique (59).

Le TSLP permet l'activation des cellules présentatrices d'antigène et notamment des cellules dendritiques immatures via son récepteur. Il est aussi à l'origine du développement d'une réponse Th2 chronique. Il a été montré chez l'Homme que les concentrations sanguines en TSLP sont augmentées chez les individus présentant une DA. Le polymorphisme du gène codant pour le TSLP est un facteur de risque au développement de cette maladie. Il le serait également chez certaines espèces de chien comme le West Highland Terrier (17,60).

L'IL-17 et l'IL-33 jouent également un rôle dans le mécanisme physiopathologique de la DA, mais nous ne nous attarderons pas sur leur importance (9).

## C. Diagnostic de la dermatite atopique

### 1. Anamnèse

Comme nous le verrons dans la liste des critères diagnostiques établis par Willemse, Prélaud ou Favrot, les recueils des anamnèses et commémoratifs sont des étapes importantes à ne pas négliger dans le diagnostic de la DA. Parmi ces données, on s'intéressera notamment à l'âge de l'animal, à la génétique raciale, la présence de congénères canins au lieu de vie, au mode de vie (plutôt à l'extérieur, à l'intérieur), à la saisonnalité des lésions.

### 2. L'examen clinique

Lors de l'examen clinique, on s'attardera notamment sur la localisation et l'aspect des lésions tout en prenant en compte l'utilisation d'autres traitements pour soigner les lésions par le passé.

#### a) Les critères de Prélaud et Willemse

Les critères utilisés en médecine humaine ne sont pas utilisables chez le chien. Ils sont trop imprécis pour la maladie canine car ne prennent pas en compte les diversités cliniques raciales et individuelles et des éléments spécifiques à cette maladie comme l'atteinte des doigts. En 1986, Willemse s'inspire néanmoins des travaux de dermatologie humaine pour établir une grille de critères diagnostiques (Tableau 2). Celle-ci, toujours imprécise, ne prend pas tant en compte la diversité clinique interraciale présente chez les chiens

**Tableau 2** : Les critères de Willemse (61)

<b>Au moins 3 critères majeurs</b>	<b>Au moins 3 critères mineurs</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Prurit</li><li>- Types de lésions et leur localisation<ul style="list-style-type: none"><li>o Atteinte de la face et/ou des membres</li><li>o Lichénification du pli du jarret et/ou de la face crâniale du carpe</li></ul></li><li>- Dermite chronique récidivante</li><li>- Race prédisposée ou antécédents familiaux</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Début entre 1 et 3 ans</li><li>- Erythème facial</li><li>- Conjonctivite bilatérale</li><li>- Pyodermite superficielle</li><li>- Hyperhidrose</li><li>- Intradermoréactions positives, IgE spécifiques ou IgG spécifiques élevées</li></ul>

D'autres études ont suivi en France avec notamment celles menées par Prélaud. Il met également en place des critères diagnostiques proches de ceux établis par Williemse. Ils sont présentés ci-dessous :

- Apparition des symptômes entre 6 mois et 3 ans
- Prurit corticosensible (ce qui ne veut rien dire, même une gale sarcoptique est corticosensible, ça dépend de la dose)
- Erythème de la face interne des conques auriculaires
- Pododermatite bilatérale érythémateuse interdigitée antérieure
- Chéilite

Favrot indique dans son étude que ces deux grilles de critères ont respectivement une sensibilité de 49,3% et 74,3% et une spécificité de 80,2% et 68,4% (12).

Les critères de Prélaud sont plus sensibles mais moins spécifiques. Cela reste des valeurs très basses ne suffisant pas à l'élaboration d'un diagnostic légitime de dermatite atopique.

L'étude de Favrot et al. permet cependant d'instaurer un nouveau lot de 5 critères, ne remplaçant bien évidemment pas l'examen clinique complet et la réalisation d'examens complémentaires (12,17,61).

#### b) Les critères de Favrot

Les critères de Favrot sont constitués de deux jeux de critères (12). Celui présenté ci-dessous est le jeu le jeu n°2 :

- Premiers signes cliniques avant 3 ans
- Animal vivant essentiellement en intérieur
- Prurit initialement alésionnel (prurit qualifié de primaire)
- Lésions des doigts des antérieurs
- Lésion du pavillon auriculaire
- Absence de lésions sur le bord libre des pavillons auriculaires
- Absence de lésions dorsolombaires

Il est plus spécifique que le jeu 1, lui constitué des critères « prurit corticosensible et infection à *Malassezia* chronique ou récidivante » à la place de « prurit initialement alésionnel ».

Le tableau ci-dessous présente les sensibilités et spécificités des jeux 1 et 2 de Favrot en tant que tests diagnostiques de la DA (Tableau 3).

**Tableau 3 : Sensibilité et spécificité des jeux de critères de Favrot (12)**

	5 critères		6 critères	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
Jeu 1	85 %	79 %	58 %	89 %
Jeu 2	77 %	83 %	42 %	94 %

### c) Fiabilité des tests diagnostiques

En 2019, l'équipe de Brément a cherché à évaluer l'efficacité et la fiabilité de ces tests diagnostiques sur une population de 250 chiens atteint d'une unique maladie prurigineuse. Les tests utilisés sont ceux de Willemse, Prélaud, et les jeux 1 et 2 de Favrot (62) (Figure 15).

		Willemse <sup>6</sup>	Prélaud and others <sup>7</sup>	Favrot and others <sup>8</sup> Set 1	Favrot and others <sup>8</sup> Set 2
Study population that was not diagnosed with cAD (i.e. diagnosed with other skin diseases or dermatoses mimicking atopic dermatitis)	Sensitivity (%)	83	79	54	75
	Specificity (%)	68	75	76	70
	Positive likelihood ratio	2.59	3.2	2.23	2.48
	Negative likelihood ratio	0.25	0.28	0.61	0.36
	Diagnostic odds ratio	10.5	11.6	3.7	6.9
Mimicking diagnoses	Sensitivity (%)	83	79	54	75
	Specificity (%)	70	77	75	65

		Willemse <sup>6</sup>	Prélaud and others <sup>7</sup>	Favrot and others <sup>8</sup> Set 1	Favrot and others <sup>8</sup> Set 1
Study population that was not diagnosed with AD (i.e. diagnosed with other skin diseases or dermatoses mimicking atopic dermatitis)	PPV (%)	38	43	35	37
	NPV (%)	94	94	87	92
Mimicking dermatoses	PPV (%)	66	70	60	60
	NPV (%)	86	84	70	79

**Figure 15 : Mesures statistiques et valeurs prédictives des tests diagnostiques de la DA dans des populations de chiens sains et des populations de chiens présentant des dermatoses mimant une DA (62)**

Cette étude montre que les quatre outils diagnostiques présentés ne peuvent être des Gold standard. En pratique, un chien présentant un nombre suffisant de critères n'a pas nécessairement une DA (spécificité et VPP) et un chien ne remplissant pas assez de critères peut lui avoir une DA (sensibilité et VPN). Ces tests semblent tout de même plus fiables dans l'exclusion des cas en cas de test négatif, avec une VPN proche des 90 % (62).

### 3. Diagnostic différentiel de la dermatite atopique canine.

La dermatite atopique étant une dermatose complexe aux signes cliniques assez peu spécifiques, d'autres hypothèses doivent être évoquées. Il s'agit du diagnostic différentiel du prurit chronique (18) :

- Les autres phénomènes allergiques, dermatite allergique aux piqûres de puce (DAPP) et dermatite de contact (DC), bien qu'ayant une répartition des lésions fréquemment différente.
- Ectoparasitoses avec notamment la gale sarcoptique (*Sarcoptes scabiei*) mais aussi la thrombiculose (*Trombicula autumnalis*), la démodécie (*Demodex canis*) et la cheyletiellose (*Cheyletiella yasguri*). Rappelons cependant que la démodécie n'est pas toujours associée à un prurit et que la cheyletiellose se présente essentiellement par un prurit du dos.
- Proliférations bactériennes de surface (souvent *Staphylococcus pseudintermedius*)
- Prolifération de *Malassezia*

Il est nécessaire d'exclure ou de contrôler toutes ces causes afin d'arriver à un diagnostic de DA. Nous pouvons donner l'exemple des ectoparasitoses, des proliférations bactériennes de surface et les proliférations de *Malassezia*, qui sont des atteintes fréquentes, parfois superposées à la DA. Le diagnostic des ectoparasitoses repose sur le type de lésions cliniques et la localisation du prurit. Des examens complémentaires par brossage, raclages et observation microscopique peuvent par exemple être mis en place. Le traitement repose sur l'utilisation d'antiparasitaires externes.

Par ailleurs, la bonne utilisation des antiparasitaires associé à un traitement de l'environnement et des congénères peut aussi permettre le traitement de la DAPP.

Les pyodermites (prolifération de surface ou folliculite) et les proliférations de *Malassezia* peuvent être primaires et faire partie du diagnostic différentiel de la DA ou être secondaires à la DA. Dans ce second cas, elles devront être traitées avant de pouvoir confirmer la dermatose allergique, à l'aide de traitements topiques et de shampoings ou d'antibiotiques par voie générale en cas de pyodermite superficielle étendue ou profonde. En effet, il est indispensable de s'assurer qu'aucun agent infectieux n'est présent car ils rendent le diagnostic de DA impossible. Il est donc nécessaire de réaliser des examens cytologiques à l'aide de calques cutanés pour s'assurer de l'absence de ces micro-organismes.

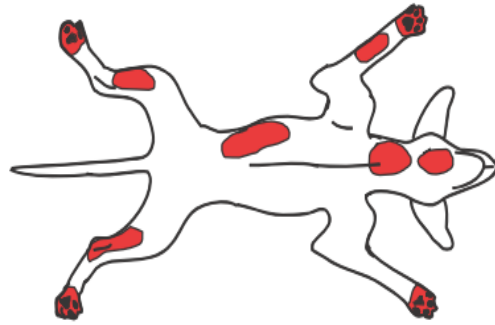
De plus, l'administration de corticoïdes dans le cadre du traitement de la DA peut aggraver le phénomène infectieux.

Lorsque ces quatre hypothèses majeures ont été exclues, d'autres peuvent éventuellement être explorées, si les signes cliniques les évoquent :

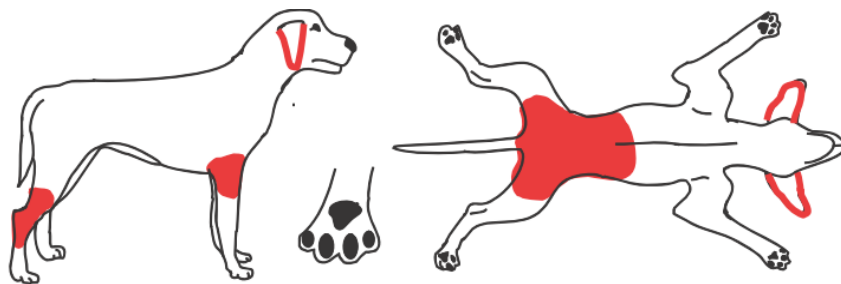
- Lymphome cutanéomuqueux
- Pemphigus foliacé

Il peut alors être nécessaire de réaliser des biopsies cutanées et des examens histologiques.

L'association de lésions primaires ou secondaires compatibles avec une DA, d'une localisation des lésions caractéristiques et l'exclusion d'autres atteintes prurigineuses permet le diagnostic de DA (21). Les localisations des lésions dermatologiques, souvent préférentielles, peuvent permettre de hiérarchiser les hypothèses (Figure 16, Figure 17).



**Figure 17** : Localisations préférentielles des lésions de gale sarcoptique (21)



**Figure 16** : Localisations préférentielles des lésions de gale sarcoptique (21)

Le tableau ci-dessous énumère certaines maladies entrant dans le diagnostic du prurit chronique, les signes cliniques comparables à ceux de la DA et enfin les méthodes diagnostiques pour chacune d'entre elles (Tableau 4).



**Tableau 4 : Diagnostic différentiel du prurit chronique et similitudes avec la DA (12)**

<b>Dermatose</b>	<b>Signes cliniques comparables à ceux de la DAC</b>	<b>Diagnostic</b>
Gale sarcoptique ( <i>Sarcoptes scabiei</i> )	Prurit, localisation (face, extrémité des membres), corticosensible	Raclages cutanés, réponse au traitement antiparasitaire
Démodécie ( <i>Demodex canis</i> )	Prurit et séborrhée	Raclages cutanés
Trombiculose ( <i>Trombicula autumnalis</i> )	Prurit, localisation aux pattes et à la face	Raclages cutanés
Prolifération bactérienne de surface	Prurit, localisations aux grand plis	Cytologie, réponse au traitement
Folliculite bactérienne	Prurit, localisations aux grands plis	Cytologie, réponse au traitement
Prolifération de <i>Malassezia</i>	Prurit et localisations identiques	Cytologie, réponse au traitement
Dermatite de contact	Prurit, localisation (lèvres, oreilles)	Eviction de l'allergène
DAPP	Prurit, corticosensible	Traitement anti-parasitaire externe
Lymphome cutanéomuqueux	Prurit, localisations (lèvres, grands plis)	Histopathologie
Troubles du comportement	Prurit (ex : succion des flancs, de l'anus)	Anamnèse, évaluation comportementale

#### 4. Classification de la sévérité des lésions et du prurit

La création d'une échelle d'évaluation de la sévérité d'une maladie, fiable et précise, est un aspect important dans le processus de recherche de preuves médicales.

##### a) Scores lésionnel

###### (1) CADESI-4

Chez l'Homme il existe un grand nombre de grille de scores lésionnels réservés à la dermatite atopique. Chez le chien, un seul type de grille de score a été instauré au nom de CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extension and Severity Index). Ce sont des scores qui sont exploités lors d'essais cliniques. L'évaluation se base sur l'observation et l'évaluation des lésions d'érythème, d'alopécie, d'excoriation et de lichénification (20).

Plusieurs versions du CADESI sont parus mais la quatrième fut réalisée car le grand nombre de lésions concernées par la DA rendait l'utilisation de la troisième version peu pratique. Le tableau ci-dessous est une version du CADESI-04 (Tableau 5).

**Tableau 5 : Score CADESI-04 (20)**

		Erythème	Lichénification	Excoriations/alopecie auto-induite	Total
Péribial					
Abdomen ventral					
Aire génitale/base de la queue ventrale					
Conque auriculaire (face interne)	D				
	G				
Doigts antérieurs	D				
	G				
Doigts postérieurs	D				
	G				
Pli axillaire	D				
	G				
Pli du coude	D				
	G				
Pli du carpe	D				
	G				
Pli du jarret	D				
	G				
Pli du tarse	D				
	G				

La grille CADESI-04 est plus simple d'utilisation et prend en compte les 20 sites avec les plus grandes sensibilités et spécificités pour le diagnostic de la DA ainsi que la meilleure répartition sur le corps.

*(2) CADLI*

Mis en place avant la création du CADESI-04 car la grille CADESI-03 était trop complexe, le CADLI (CANINE ATOPIC LESION INDEX) repose sur l'évaluation de l'ensemble des zones prédisposées par une note allant de 0 à 5 : 0 correspond à l'absence de lésion, 1 à des lésions légères, 2 et 3 à des lésions modérées et 4 et 5 à des lésions sévères et étendues (63) (Tableau 6).

**Tableau 6** : Score CADLI (63)

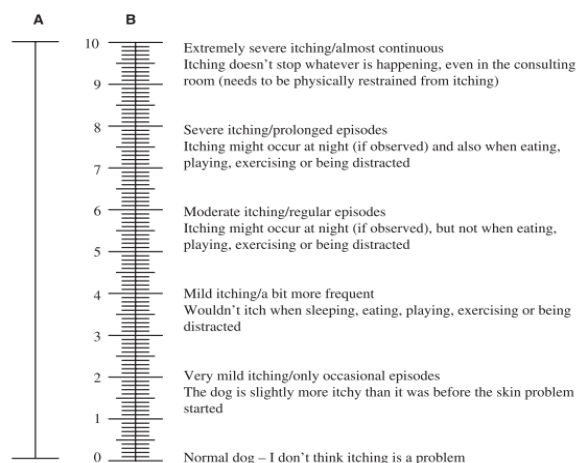
	Erythème, excoriations, érosions de 0 à 5	Alopécie, lichénification, hyperpigmentation de 0 à 5
Face et oreilles		
Pieds antérieurs		
Pieds postérieurs		
Ars et sternum		
Abdomen et région inguinale		
Sous-totaux (0-25)		
Totaux (0-50)		

b) Score de prurit

(1) pruritus Visual Analog Scale (pVAS)

L'évaluation de la sévérité du prurit par le propriétaire est également un outil intéressant à la fois dans le diagnostic et dans le suivi de la réponse au traitement.

L'utilisation d'une échelle de prurit (pVAS) a été validée dans une étude incluant 713 chiens (64). En effet, il a été montré une différence significative de score de prurit entre des chiens atteints d'une dermatose prurigineuse et des chiens sains. Cette étude montre aussi qu'une telle échelle est un outil utilisable pour évaluer la réponse au traitement. En effet, à la suite du traitement d'une population de chiens présentant un prurit, ils observent une diminution moyenne de 4,4 sur cette échelle. Seulement, l'étude n'est pas menée en aveugle et les propriétaires ont conscience qu'ils administrent un traitement anti-prurigineux à leur animal (64). Cette échelle est présentée dans la figure ci-dessous (Figure 18).



**Figure 18** : pruritus Visual Analog Score (pVAS) (64)

Une étude menée par Young et al. en 2019 a cherché à évaluer la meilleure façon d'utiliser le pVAS pour que l'évolution des scores de prurit au cours du suivi correspondent réellement à

la perception d'amélioration ou d'aggravation par le propriétaire. La meilleure correspondance est retrouvée lorsque les propriétaires sont informés du score précédent avant de remplir le score du jour (65).

## *(2) Verbal Numeric Score (VNS)*

Une seconde échelle associant une note de prurit de 0 à 10 à un qualificatif (léger, modéré, sévère) a été créée pour des personnes n'ayant pas la possibilité d'être présent le jour de la consultation ou de remplir le pVAS. Elle montre une bonne corrélation avec le score pVAS mais les deux tests ne sont pas interchangeables. Il reste préférable d'utiliser le score pVAS (65,66).

## 5. Diagnostic immunologique

Il a été choisi par certains vétérinaires, à l'image des diagnostics d'atopie (dermatite atopique, asthme, allergie alimentaire) en médecine humaine, d'identifier les allergènes pour lesquels l'individu est sensibilisé afin d'initier des manœuvres de désensibilisation par immunothérapie. Plusieurs techniques, dont les mécanismes sont différents, ont été décrites afin d'identifier ces allergènes en cause. Parmi elles, nous retrouvons le dosage des IgE, les intradermoréactions ou encore les patchs-tests.

### a) Dosage des IgE

Les dosages d'immunoglobulines E ont pour but de cibler les protéines pour lesquelles une désensibilisation amènerait à une amélioration clinique.

Le dosage des IgE est parfois utilisé chez l'homme, dans le cadre de l'atopie, pour l'exploration des allergies alimentaires, asthme et rhinite allergique mais il s'avère moins intéressant dans le diagnostic de la dermatite atopique. En effet, la DA se présente chez l'Homme à terrain atopique mais ne fait pas intervenir les IgE contrairement aux autres affections évoquées précédemment. En effet, la DA est une affection à médiation cellulaire dépendante des LT (4,67). D'ailleurs, une méta-analyse publiée en 2020 sur les nouvelles perspectives de traitement systémique dans la gestion de l'eczéma atopique montre que l'utilisation de l'omalizumab, anticorps monoclonal anti-IgE, n'apporte dans la plus grande majorité des études pas une meilleure amélioration clinique que le placebo (68).

Chez le chien, le taux d'IgE n'est d'ailleurs pas corrélé à la sévérité de la maladie, et pas non plus à la quantité d'IL-4 circulante. Il a aussi été montré que les taux d'IgE chez les chiens sains sont similaires aux chiens atteints (17,52).

Le dosage des IgE dans la dermatite atopique canine semble donc peu judicieux car ne ciblant pas le bon mécanisme physiopathologique.

## b) Intradermoréaction

L'intradermoréaction (IDR) est un test dont la positivité est un critère diagnostique de Willemsse et fait toujours partie, dans certaines pratiques de dermatologie canine, des tests d'identification des allergènes.

L'IDR consiste en l'injection d'une quantité définie d'antigène dans le derme du sujet et qui permet, par l'évaluation de la réponse inflammatoire immédiate (dans les 30 mins-1 heure), de déterminer si le sujet possède ou non des IgE fixés sur les mastocytes dermiques. Il est donc un test de mesure indirect de la réactivité des mastocytes, c'est-à-dire de la présence d'IgE spécifiques de l'allergène présents à leur surface ; la liaison de l'épitope antigénique à deux paratopes d'IgE adjacents entraînant la dégranulation mastocytaire (21).

Ces tests ont été décrits comme méthode de référence pour déterminer les allergènes en cause de la réaction inflammatoire du patient dans les maladies médicamenteuses par les IgE. Cependant, il a aussi été montré que ces tests étaient associés à de nombreux faux positifs et faux négatifs, ce qui peut rendre leur utilisation délicate.

Une étude menée en 2021 sur 48 chiens atteints de DA n'a montré aucune corrélation entre la saisonnalité des signes cliniques et les allergènes identifiés par IDR. Ils ne constituent sans doute pas un test optimal d'identification des allergènes cliniquement pertinents (69).

De plus, comme dans le cas du dosage des IgE, le schéma physiopathologique testé par l'IDR ne correspond pas à celui de la DA.

## c) Patchs-tests (67)

Les patch tests ou Atopy Patch-Tests sont utilisés de façon générale pour diagnostiquer des réactions d'hypersensibilités de type IV de la classification de Gell et Coombs à un allergène. Il s'agit donc d'un test intéressant dans le cadre de DA. En effet, l'exposition des patients atteints de DA à des aéroallergènes et allergènes alimentaires peut entraîner des répercussions cliniques, une rechute, entretenir ou même aggraver la maladie.

Le patch test consiste à appliquer un allergène défini sur la peau, de le laisser sous occlusion pendant 48 heures, puis de regarder si l'on a obtenu une reproduction clinique de l'eczéma. Il s'agit d'une batterie d'allergènes protéiques de l'environnement disposés dans de la vaseline, tel que les acariens entre autres.

Les allergènes testés doivent toujours être accompagnés d'un ou deux témoins négatifs. L'interprétation sera impossible si les témoins négatifs sont positifs.

Peu d'études ont été réalisées en médecine vétérinaire pour déterminer l'efficacité des patch-tests dans la recherche d'allergènes chez le chien. En outre, il s'avère qu'il n'y a pour le moment aucune standardisation dans le choix des allergènes et de la méthode. Il paraît également plus délicat de laisser en place chez un chien qui a tendance à se le retirer.

Quels que soient les allergènes mis en évidence par ces tests diagnostiques, la désensibilisation n'ayant pas fait ses preuves d'efficacité chez le chien et l'éviction des allergènes étant souvent difficiles, la recherche des allergènes impliqués dans les manifestations eczéma-teuses ne paraît pas pertinente.

#### D. Traitement de la dermatite atopique

Le traitement des phases aiguës (*flare-ups*) de dermatite atopique devrait inclure la recherche et l'élimination de la cause, le contrôle du prurit et des lésions cutanées ainsi que des shampoings réguliers (19,70).

##### 1. Prise en charge des complications et hygiène de la peau

Si une surinfection bactérienne (*Staphylococcus pseudintermedius*) ou fongique (*Malassezia*) de surface, sources fréquentes de rechutes, est présente, il s'agit de les mettre en évidence (calques cutanés et coloration) puis de les traiter (shampoings antiseptiques). L'utilisation des shampoings peut être suivie de l'utilisation d'un réhydratant cutané (71).

De nombreuses études montrent que près de deux tiers des chiens atteints de DA présentent une infection cutanée lors de leur présentation initiale. Les traitements topiques suffisent dans la grande majorité des cas, mis à part dans des cas de pyodermites superficielles ou profondes, étendues, qui nécessiteraient alors la mise en place d'une antibiothérapie par voie générale. Il s'agit alors de se référer aux dernières recommandations concernant l'utilisation des antibiotiques (12).

##### a) Les shampoings antiseptiques

L'utilisation d'un shampoing antiseptique est indispensable lors de la prise en charge de prolifération de bactéries de surface ou prolifération de *Malassezia*. Une étude récente a montré l'efficacité similaire de deux produits dans la réduction du prurit et des lésions cutanées chez les chiens allergiques. L'effet anti-prurigineux est modeste et à court terme.

Il a d'ailleurs été montré que 3 % de chlorhexidine était nécessaire au traitement des proliférations de *Malassezia* (72). Autrement, certains shampoings sont pourvus d'un antifongique.

C'est l'intensité et la fréquence du lavage qui serait associé à la meilleure amélioration (73).

On rappelle que le protocole du shampoing est le suivant :

- Appliquer
- Rincer
- Appliquer et laisser poser 5 mins
- Rincer, sécher
- Utiliser un réhydratant cutané

## b) Les réhydratants cutanés

L'ajout de réhydratant post lavage est une étape envisageable pour diminuer la xérose et l'irritation. Elle permet de maintenir l'hydratation de la couche cornée, aide au rétablissement de la fonction de barrière de l'épiderme et à prévenir la pénétration d'allergènes. Leur application est recommandée après lavages, que ce soit chez l'homme ou chez le chien (4,74). Des études réalisées sur des modèles canin de DA ont d'ailleurs montré un potentiel intérêt de l'utilisation de réhydratant à base de glycerol et propylène glycol (Ermidra) dans l'amélioration de la fonction de barrière de la peau (74).

## 2. Réduction du prurit et des lésions cutanées

### a) Les traitements topiques

#### *(1) Les dermocorticoïdes*

Plusieurs études ont montré l'efficacité de l'utilisation de sprays à base de glucocorticoïdes (0,015% triamcinolone et 0,0584 % acéponate d'hydrocortisone c'est-à-dire respectivement Genesis spray et Cortavance) dans le contrôle du prurit et la réduction des lésions cutanées chez les chiens présentant une dermatite atopique (75). L'utilisation d'autres spécialités contenant des corticoïdes différents de ceux cités précédemment devrait théoriquement avoir un effet mais cela dépendra de la nature et la concentration de la molécule en question. Des DA dont les manifestations cliniques sont modérées peuvent être contrôlées uniquement par dermocorticoïdes. Leur utilisation est aussi envisageable en prévention, avec des traitements de « week-end therapy » par exemple. Ces thérapies pro-actives sont décrites chez l'homme, par exemple deux fois par semaine, pour éviter les poussées eczémateuses (4). L'utilisation de ces dermocorticoïdes est adaptée à des lésions circonscrites, peu étendues. Il existe un risque de surinfection par prolifération de bactéries de surface ou prolifération de *Malassezia* important à surveiller. Il existe également un risque d'atrophie cutanée réversible après traitement ainsi que la possible apparition de comédons ou de kystes folliculaires en cas de traitement prolongé. Le temps de traitement est cependant spécifique à chaque individu et devrait normalement être perpétué jusqu'à l'arrêt des lésions.

#### *(2) Inhibiteurs de la calcineurine topique*

Des études prospectives à effectifs réduits, respectivement 12 et 15 chiens, ont montré que l'utilisation de tacrolimus pouvait être intéressante pour réduire la sévérité de lésions eczémateuses légères à modérées. L'utilisation de cette molécule n'est pas systématisée en médecine vétérinaire et davantage de preuves devraient être avancées (76,77).

## b) Les immunomodulateurs

### (1) La corticothérapie per os

L'utilisation de dermocorticoïdes étant souvent réservée à des lésions restreintes ou sur de courtes périodes, la prise en charge de lésions importantes, sévères et étendues peut nécessiter l'utilisation de corticoïdes par voie orale. Les glucocorticoïdes se lient à des récepteurs cytoplasmiques spécifiques qui vont intervenir sur la transcription génétique. Ils permettent une diminution du nombre de cellules inflammatoires et une production réduite de médiateurs inflammatoires (19,70,71,78).

Des méta-analyses ont montré que l'utilisation de prednisone, prednisolone ou méthylprednisolone à un dosage de 0,5 mg/kg à 1mg/kg une à deux fois par jour permettait un bon contrôle du prurit et des lésions. L'effet anti-allergique est atteint très rapidement à l'aide de ces molécules. Il est souvent nécessaire de trouver par réduction progressive des doses, la dose minimale permettant le contrôle de la maladie. La réponse fréquente des chiens atteints de DA aux glucocorticoïdes par voie orale devrait indiquer d'autres pistes en cas d'échec du traitement comme les surinfections bactériennes, prolifération de *Malassezia*, ectoparasitisme entre autres.

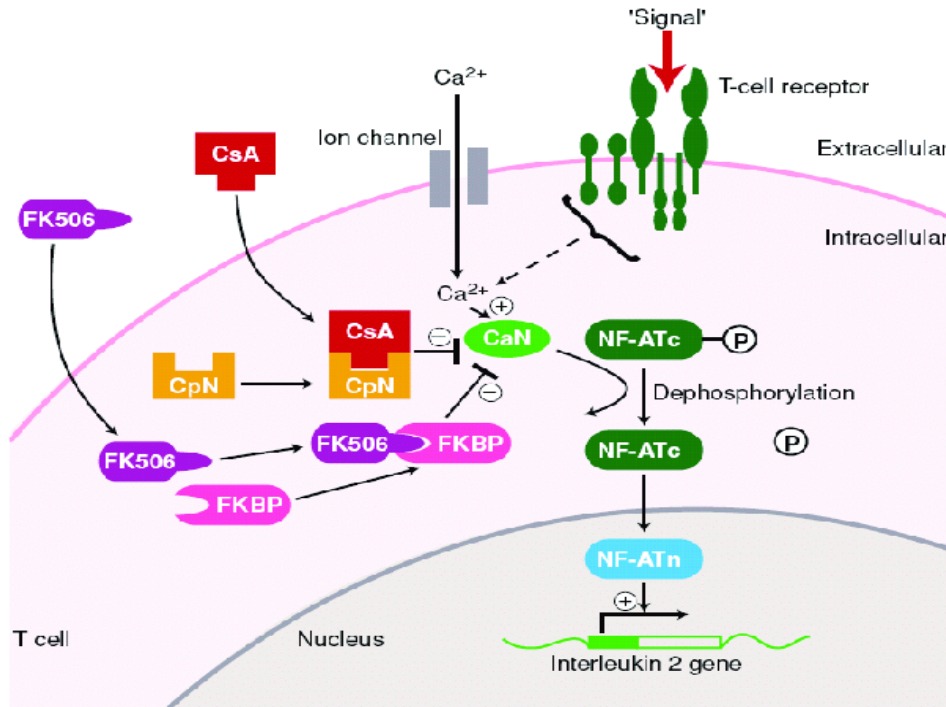
Les vétérinaires doivent se souvenir que l'utilisation à long terme de glucocorticoïdes par voie générale (orale ou injectable) peut entraîner des hypercorticismes iatrogènes, des surinfections, des calcinoses cutanées (dépôts de sels de calcium dans la peau et les tissus sous cutanée) et prédisposent notamment aux démodécies. Les effets secondaires les plus présents lors de l'utilisation de glucocorticoïdes par voie orale sont la polyuro-polydipsie, la polyphagie, les vomissements, la prise de poids. Les inflammations associées peuvent méconduire la propriétaire à réutiliser des traitements topiques et systémiques, pensant avoir à faire des poussées allergiques et pas à des effets secondaires du traitement aux corticoïdes (19,70).

### (2) La ciclosporine

La ciclosporine est un peptide cyclique lipophile de 11 acides aminés aux propriétés immunomodulatrices. Elle se fixe sur des protéines cytoplasmiques des lymphocytes T appelées cyclophilines. Ces complexes ciclosporine-cyclophiline inhibent la calcineurine, une protéine cytoplasmique activatrice de facteurs de transcriptions comme NFAT, NF-κB. Ces dernières sont à l'origine de la production d'IL-2, cytokine permettant l'activation des lymphocytes T. La ciclosporine inhibe donc l'activation des lymphocytes T (79) (Figure 19).



La ciclosporine a été montrée efficace dans le traitement à long terme des lésions de la dermatite atopique. La ciclosporine ayant un long délai d'action (4 à 6 semaines), il est possible d'induire une rémission des signes cliniques plus précoce à l'aide d'un traitement à effet plus rapide comme les glucocorticoïdes par voie systémique (19,70,71,78).



**Figure 19** : Pharmacodynamie des inhibiteurs de la calcineurine (CsA : cyclosporine A, FK506 : tacrolimus, CpN : cyclophiline, CaN : calcineurine) (80)

La ciclosporine doit être initiée à une dose de 5 mg/kg une fois par jour et ce dosage doit être maintenu jusqu'à ce qu'on observe une amélioration satisfaisante des signes cliniques. La dose peut ensuite être diminuée selon deux possibilités :

- On diminue la fréquence d'administration (une fois tous les 2 jours)
- Diminution de la dose journalière par deux (non conseillé)

Lorsque les signes sont encore davantage réduits (75 % d'amélioration d'après le guide, l'estimation devant rester clinique), deux doses par semaine ou une réduction de 75 % de la dose initiale est recommandée.

Comme dit précédemment, le délai d'action de la ciclosporine est de 4 à 6 semaines, ce qui explique pourquoi son utilisation n'est pas judicieuse dans les cas de poussées inflammatoires. Cela implique que les modifications de dosage ne peuvent être mises en œuvre qu'à partir d'un mois de traitement.

Les effets secondaires de la ciclosporine sont moins fréquents que ceux des glucocorticoïdes. Ils comprennent des événements digestifs comme des vomissements ou de la diarrhée ainsi qu'une hyperplasie gingivale et une éventuelle hypertrichose, réversibles. Aucune atteinte rénale ou hypertension artérielle n'est observée, contrairement aux traitements chez l'homme.

Plusieurs études (ciclosporine vs placebo / ciclosporine vs glucocorticoïdes) ont été menées et ont montré l'efficacité au long terme de la ciclosporine. L'utilisation à long terme (plus de 3 mois) montre une conservation de l'efficacité de la ciclosporine et ce malgré la diminution progressive des doses (78,81).

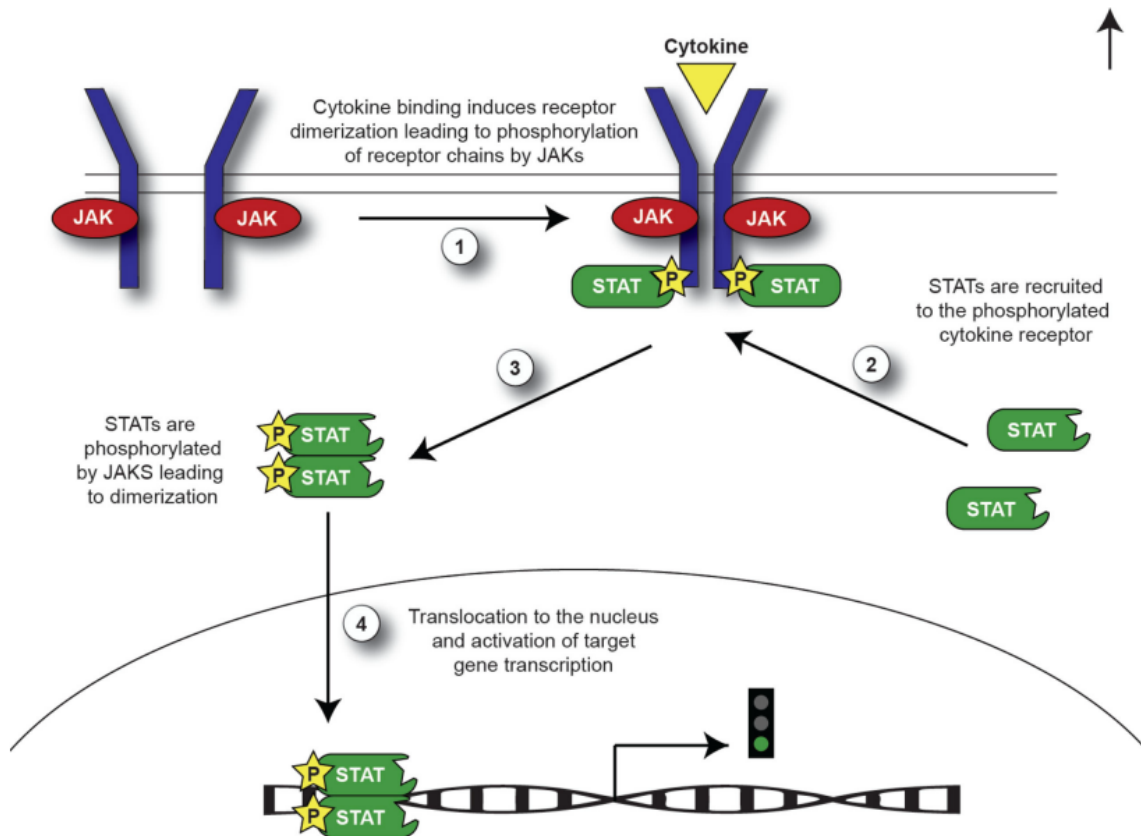
Dans la plupart des études une réduction de la dose a pu être réalisée et a suffi à maintenir l'état clinique de l'animal (82) :

- 50 % de réduction chez 40 à 50 % des chiens au bout de 4 semaines
- 75 % de réduction chez 20 à 26 % des chiens au bout de 12 à 16 semaines

La sévérité de la maladie et l'âge n'influencerait pas la réussite du traitement.

### *(3) L'ocloclacitinib*

L'ocloclacitinib est un inhibiteur de la protéine Janus Kinase 1. Ces tyrosine kinases ont un rôle dans la transduction du signal intracellulaire lors de la liaison d'interleukines à leur récepteur membranaire. La fixation de l'interleukine sur son récepteur entraîne par la protéine JAK, une phosphorylation du facteur de transcription STAT (Figure 20). La protéine JAK-1 est associée à la transduction du signal de l'IL-31, cytokine jouant un rôle primordial dans le prurit chez les chiens atteints de DA (83).



**Figure 20** : Mécanisme physiologique d'activation du système JAK-STAT (83)

L'oclocitinib (Apoquel, Zoetis) peut être prescrit à une dose de 0,4 à 0,6 mg/kg deux fois par jour pendant 14 jours. Une disparition rapide (<24h) du prurit est attendue. La RCP indique d'éventuels effets secondaires digestifs et contre-indique son utilisation dans le cas de tumeurs en cours d'évolution.

L'utilisation combinée de glucocorticoïdes et d'oclocitinib est envisageable. Aucune étude n'a montré un risque de surinfection significativement plus important dans ces cas de polythérapie.

L'étude randomisée de Gadeyne et al. en 2014, réalisée sur 123 chiens, a montré une efficacité de l'oclocitinib similaire à celle de la prednisolone sur la réduction du prurit lié aux dermatites allergiques au sens large chez le chien (84).

L'effet de l'oclocitinib à un dosage de 0,4 à 0,6 mg/kg a été évalué similaire à celui de la prednisolone à un dosage de 0,5 à 1 mg/kg pendant 6 jours puis un jour sur deux. La tolérance des deux produits était bonne dans les 28 jours de l'étude.

Dans cette étude randomisée, multicentrique, en double aveugle de Cosgrove et al., menée sur 299 chiens atteints de DA, l'efficacité de l'ocloclacitinib dans le traitement du prurit et des lésions chez les chiens atteints de DA est objectivée (85). L'effet de l'ocloclacitinib serait rapide avec d'après les propriétaires une réduction du prurit chez 30% des chiens dans les 24 premières heures de mise en place du traitement, ce qui est significativement supérieur à ce qui est observé chez les chiens prenant le placebo (6,5 %). 14 jours de traitement ont suffi pour observer une réduction importante des lésions cutanées chez 1 chien sur 2. L'ocloclacitinib semble également très bien toléré avec très peu de différence significative en termes de fréquence des effets secondaires dans les 14 premiers jours de traitement vis-à-vis du placebo (85). Les effets secondaires, rarement rencontrés, sont l'anorexie, des vomissements et des diarrhées (19,70).

L'efficacité de l'ocloclacitinib a été montrée au moins aussi bonne que celle de la ciclosporine dans cet essai clinique randomisé en aveugle. Le délai d'action de l'ocloclacitinib est cependant beaucoup plus court que celui de la ciclosporine. Les effets secondaires sont également moins fréquents chez les chiens prenant de l'ocloclacitinib (86).

#### *(4) Le lokivetmab*

Le lokivetmab est un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement l'IL-31.

Une étude randomisée, multicentrique, en aveugle sur 274 chiens a montré une efficacité similaire du lokivetmab 1 mg/kg SID à la ciclosporine après 28 jours de traitement (56). Le délai d'action est cependant plus court avec des améliorations cliniques dès 24h post injection. Les effets secondaires associés à cette molécule sont rares. Il est important de mentionner un risque d'immunisation au traitement, mentionné dans le RCP du produit. Le lokivetmab peut induire des anticorps anti-médicament transitoires ou permanents. L'induction de tels anticorps est peu fréquente et peut n'avoir aucun effet (anticorps anti-médicament transitoires) ou il peut en résulter une diminution notable de l'efficacité (anticorps anti-médicament permanents) chez des animaux qui répondaient préalablement au traitement. L'efficacité doit dépendre de l'implication de l'IL-31 dans le prurit de chaque individu car, rappelons-le, la dermatite atopique implique un grand nombre de cellules inflammatoires et de cytokines.

Le contrôle du prurit est de 3 à 8 semaines. L'AMM, elle, est pour 4 semaines d'efficacité.

#### *(5) Les immunosuppresseurs cytotoxiques*

Le méthotrexate (acide 4-amino-10-méthylfolique) (MTX) est inhibiteur de la dihydrofolate réductase, enzyme permettant la production de la forme active de l'acide folique, indispensable au cycle cellulaire. Son action est dirigée contre la phase S du cycle mitotique cellulaire. Cette molécule est cytostatique et son action est persistante à faible dose ce qui

explique son effet anti-inflammatoire en empêchant notamment la prolifération des LT. Son délai d'action est de 4 semaines en moyenne, proche de celui de la ciclosporine.

Certaines données suggèrent que le MTX puisse être une alternative aux traitements « conventionnels » lors de dermatite atopique réfractaire à l'ocloctinib et à la ciclosporine. En effet, une étude a été menée chez l'enfant et a montré une efficacité et une tolérance comparable à la ciclosporine dans des cas sévères d'eczéma atopique (87).

Des études similaires sont menées chez les chiens et ce projet s'inscrit dans une de ces dernières.

L'étude de Rostang et al. en 2018 a évalué l'innocuité au traitement MTX sur une population de 6 chiens sains. Le traitement a globalement bien été toléré par les chiens. Seuls des effets secondaires mineurs (dysorexie, érythème cutané) ont été mis en évidence et n'ont pas motivé l'arrêt du traitement. Une perte de poids significative a cependant été remarquée chez 3 des 6 chiens ainsi qu'une diminution du nombre de leucocytes n'ayant mené à une leucopénie légère chez un chien, à la dose de 0,5 mg/kg. Une faible biodisponibilité du MTX par voie orale, malgré l'administration d'une dose importante comparée à celle utilisée chez l'Homme, est mise en évidence. Elle pourrait être reliée à une saturation des processus d'absorption. A l'image de ce qui est observé en médecine humaine, il existerait une grande variabilité dans cette biodisponibilité chez le chien. Cette variabilité pourrait être expliquée par la pharmacogénétique, l'affinité du transporteur pour le MTX pouvant être modifiée par les variations génétiques individuelles (88).

### c) Autres traitements

#### *(1) Supplémentation en acides gras et lipides topiques*

Etant donné les modifications qualitatives et quantitatives des lipides cutanés dans la DA et l'efficacité avérée de ces suppléments lipidiques dans le remodelage de la barrière et de la couche cornée en médecine humaine, on pourrait s'interroger sur son efficacité en médecine vétérinaire (24).

Il a été montré, dans certaines études, que la prise d'acides gras essentiels par voie orale, et plus particulièrement ceux riches en oméga 6, influence la quantité et la nature des lipides de la couche cornée. Ils ont longtemps été utilisés dans l'objectif d'également réduire la production d'eicosanoïdes pro-inflammatoires, d'inhiber la production de cellules inflammatoires et donc réduire la production de cytokines (19,70).

Il n'y a encore pas de preuve du bénéfice de ces compléments pour la clinique de l'animal atteint de DA, mais il a été montré, dans une étude, que ces régimes adaptés permettent des modifications biochimiques et structurales de la couche cornée de l'épiderme, qui se

rapproche alors de ce qu'on peut observer chez des individus sains. La composition et le dosage de ces compléments n'a pas été déterminée (25).

Cependant, les dernières études sont plutôt en défaveur d'un réel bénéfice de ces suppléments. De plus, si bénéfique, plusieurs semaines seraient généralement nécessaires avant de pouvoir observer une quelconque amélioration (71).

Des formulations lipidiques topiques peuvent aussi être utilisées. Ces dernières contiennent généralement des acides gras essentiels, du cholestérol et des céramides. La proportion des lipides au sein de ces produits mime la composition de la couche cornée d'animaux sains (19,70).

Une étude menée par Bensignor et al. en 2022 montre un bénéfice de l'utilisation combinée de traitements topiques à base d'acides gras, de céramides et du lokivetmab à l'utilisation du lokivetmab seul. En effet, on observe amélioration plus précoce et plus importante des lésions et du prurit notamment (35).

Une étude de Marsella et al. en 2018 témoigne de résultats bénéfiques également.

Cependant, les formulations topiques ne permettent pas, seules, un contrôle du prurit (89).

## *(2) La désensibilisation*

La désensibilisation est une méthode utilisée en médecine humaine dans les cas d'hypersensibilités de type I (rhinite allergique, asthme notamment). C'est une immunothérapie qui consiste en l'exposition répétée de l'individu à des concentrations croissantes de l'allergène cible, identifié par dosage des IgE, IDR, patch-tests. Cette exposition répétée cherche à induire une tolérance du système immunitaire par des mécanismes qui restent encore inconnus chez le chien (90). L'hypothèse serait d'un passage d'une voie majoritairement Th2 à une voie Th1 et de la commutation isotypique au sein des LB des IgE en IgG. Chez le chien, une première phase d'induction consiste en des injections sous-cutanées d'allergènes à concentrations progressivement augmentées, et ce sur des semaines ou des mois selon le protocole utilisé. Ensuite, une concentration fixe en allergène est administrée à intervalles réguliers (comme une fois par mois), et ce pendant plusieurs années : c'est la phase de maintenance. Les doses et fréquences doivent être adaptées en fonction de la réponse de l'individu (91).

Des protocoles d'administration du produit en sous-lingual (immunothérapie oro-mucosale) serait également en développement chez le chien.

Il est possible de remettre en question l'utilisation de ces protocoles de désensibilisation dans le traitement de la DA.

En effet, en médecine humaine, les recommandations ne font pas mention de désensibilisation dans le traitement de la DA (4).

Les sociétés allemande, autrichienne et suisse d'allergologie indiquent qu'il n'y a pas d'étude mettant en évidence un effet bénéfique reproductible lors d'utilisation de la désensibilisation dans le cadre de DA (92).

Chez le chien, les études montrent que des temps de traitements long, souvent supérieurs à 12 mois, sont nécessaires pour observer des résultats. Une étude rétrospective de Ramio—Lluch et al. sur 145 chiens montre que seulement 22% des chiens ayant reçu un traitement de moins de 12 mois ont présenté une amélioration du score clinique contre 65% pour les chiens ayant reçu un traitement pendant plus de 12 mois. Cette étude indique aussi que l'observance du traitement par le propriétaire est un des facteurs majeurs de réussite mais que cette observance est nettement altérée pour un traitement prolongé au-delà de 12 mois, notamment à cause du manque de résultat pendant cette première période (93).

Une étude préliminaire menée par Marsella et al. en 2010 sur 13 beagles sensibilisés *in vitro* à un allergène de *Dermatophagoides farinae* n'a montré aucun bénéfice de la désensibilisation par rapport au placebo, et ce après 7 mois de traitement (94).

Une étude randomisée en double aveugle menée par Willemse et al. en 2009 sur 25 chiens ne montrent aucune différence d'amélioration du score lésionnel ou du prurit entre le traitement de désensibilisation et le placebo, au bout du 9 mois de traitement. Cependant, les chiens inclus dits atteints de dermatite atopique d'après l'étude sont des chiens de 1 à 5 ans présentant des lésions « compatibles », et un IDR ou dosage d'IgE positif à *Df*. On peut donc émettre un doute sur la réelle présence d'une DA chez les 25 chiens inclus (95).

L'étude de Timm et al. en 2018 évaluant l'efficacité de l'immunothérapie intra lymphatique chez 51 chiens semble montrer une légère amélioration des scores de prurit chez certains chiens. Les chiens sont inclus sur la base de l'anamnèse, l'exclusion d'autres causes de prurit, des critères de Favrot et d'un dosage IgE ou IDR positif. On peut cependant relever que les traitements concomitants anti-prurigineux, immunomodulateurs sont acceptés, non standardisés sur l'ensemble des chiens. De plus 56% des chiens de l'étude n'ont pas fini l'étude et ont été exclus dont 25% par manque d'amélioration clinique (96).

Une étude Colombo et al. en 2005 comparant l'efficacité de l'immunothérapie à faible dose par rapport à l'immunothérapie à forte dose montre une amélioration significative de score lésionnel dans chacun des groupes mais ne montre pas d'amélioration du score de prurit. Il précise également que des shampoings antiseptiques pour le traitement de prolifération bactérienne de surface et de prolifération de *Malassezia* ainsi que des glucocorticoïdes ont été mis en place au cours de l'étude dans le cas de certains chiens présentant un prurit important. Les chiens sont de nouveau décrits comme atteints de DA sur la base d'une clinique et de tests de laboratoire « favorables » (97).

On voit bien au travers de ces études que les preuves d'une réelle efficacité des immunothérapies dans le traitement de la DA sont imparfaites. Certaines études présentent des résultats proches de ce qui est obtenu avec le traitement placebo. Les critères d'inclusion des chiens atteints de DA ne sont pas toujours bien précisés ou ne sont pas conformes à la démarche standard. De plus les polythérapies sont mises en place au cours des études et ne concernent pas toujours l'ensemble des chiens. Enfin les études ne comportent pas un nombre de chiens suffisant pour valider les résultats.

### (3) Régime d'éviction alimentaire

En médecine humaine, les protéines alimentaires peuvent être à l'origine de réaction inflammatoire chez les individus atopiques. Ces réactions se manifestent sous la forme d'un urticaire.

Cependant, dans le cas de la DA, les recommandations japonaises de 2020 chez l'Homme indiquent qu'il n'y a aucune preuve de l'intérêt de régimes d'évictions alimentaires sans mise en évidence d'une allergie alimentaire vraie (4).

Les réactions cutanées en lien avec un aliment pourraient, chez le chien, être liées au léchage post-repas mais aucune étude n'a été réalisée pour le prouver. D'un point de vue physiopathologique, ce ne serait pas les protéines ingérées qui causerait la réaction inflammatoire cutanée mais bien celles qui pénètrent au travers de la barrière épidermique cutanée.

Dans de nombreuses pratiques de dermatologie canine dans le monde, des régimes d'éviction alimentaire sont tout de même mis en place dans le traitement de la dermatite atopique. Pour commencer il s'agit de recenser l'ensemble des aliments ingérés par le chien (y compris les à-côtés). On recherche ensuite un aliment pour le nouveau régime. Il s'agit d'introduire une protéine non connue par le système immunitaire de l'animal. Cela peut passer par de la nourriture industrielle de gamme an-ou-hypoallergénique ou de préparation monoprotéique ménagère.

Olivry a rédigé un consensus en place vis-à-vis des régimes d'éviction et préconise une durée de minimum 8 semaines pour induire une rémission clinique chez 90% des chiens qui présenteraient des réactions cutanées cliniquement proche d'une DA à la suite de l'ingestion d'une nourriture (70). Il est important de préciser que dans ces mêmes recommandations, il est dit qu'aucune preuve n'a été avancée pour prouver que l'interruption d'un régime à base croquettes commerciales est bénéfique aux chiens sensibilisés aux allergènes de *Df*.

Olivry précise également qu'un changement alimentaire pendant 8 semaine suivi d'une réintroduction de l'allergène soupçonné devrait suffire pour le diagnostic de la majorité des « allergies alimentaires ». Cependant, les tests de réintroduction de l'allergène sont réalisés en double aveugle avec un contrôle placebo chez l'Homme et très peu chez le chien. D'ailleurs, 30% des individus disent avoir une réaction à la suite de l'ingestion du placebo et 10% s'avère avoir réellement une réaction : c'est l'effet « nocebo ».



## II. Comparaison des profils cytokiniques entre chiens sains et chiens atopiques

### A. Contexte et objectif de l'étude

L'étude que j'ai menée fait partie d'un essai clinique cherchant notamment à évaluer l'efficacité du méthotrexate chez le chien atteint de dermatite atopique, d'un point de vue pharmacologique et clinique et comparativement au traitement de référence à base de ciclosporine ; l'utilisation du méthotrexate étant une option thérapeutique dans les cas d'eczéma atopique réfractaire chez l'enfant.

Cette partie de biologie moléculaire avait pour but de comparer les profils d'expression des ARNm des cytokines (IL-4, IL-13, IL-31, TNF- $\alpha$ ) d'un groupe d'individus témoins, sains de DA, à celui d'un groupe de chiens atteints de DA, diagnostiqués au sein d'unités de dermatologie vétérinaire françaises et traités avec du MTX ou de la ciclosporine. Les profils des ARNm cytokiniques mensuels des chiens atteints de DA au cours de leur traitement ont également été évalués. Il s'agissait, dans le cadre de cette étude, d'explorer la possibilité d'identifier des biomarqueurs de suivi de la maladie, qui pourraient être utilisés notamment dans l'évaluation précoce de l'efficacité du traitement et ainsi adapter la posologie employée.

### B. Matériels et méthodes

#### 1. Animaux

Le projet a été soumis au comité d'éthique et toute personne ayant pris part à l'étude a signé un papier de consentement éclairé.

##### a) Critères d'inclusion et exclusion des chiens atteints de DA

Des cliniciens spécialisés en dermatologie de diverses universités et cliniques de France ont diagnostiqué 53 chiens atteints de dermatite atopique modérée à sévère entre 2017 et 2022. Les échantillons sanguins de 12 chiens ont pu être analysés lors de notre étude pour la recherche des cytokines sanguines. C'est à cette population que nous nous intéressons. Les chiens étaient de race American Staffordshire Terrier (3/12), Labrador (2/12), Bull Terrier (2/12), Bouledogue français (2/12), Berger allemand (1/12), American Bully (1/12), croisé berger (1/12). Ils avaient, lors de l'inclusion, entre 2 ans et 9 ans, avec une moyenne d'âge de 51 mois.

Les diagnostics ont systématiquement été réalisés par association de critères anamnestiques, cliniques, par exclusion des autres causes de prurit et par l'utilisation d'une grille CADESI-04 ainsi que d'un score de prurit évalué par le propriétaire.

Des analyses sanguines lors des consultations de pré-inclusion ont été réalisées. Il s'agissait d'une numération formule sanguine, d'une biochimie de base (PAL, ALAT, Urée, Créatinine), d'une analyse urinaire (bandelette, réfractomètre) ainsi que d'un premier prélèvement pour l'analyse des interleukines du sang (IL-4, IL-13, IL-31 et TNF- $\alpha$ ).

A été exclu de l'étude, tout animal :

- Présentant une DA saisonnière
- Présentant une maladie systémique (néoplasie, maladie métabolique comme le diabète, maladie auto-immune)
- Ayant reçu un anti-inflammatoire stéroïdien par voie topique depuis 10 jours, par voie orale depuis 15 jours, par voie générale depuis 1 mois pour les formes non-retard, depuis 3 mois pour les formes retard
- Ayant reçu un traitement antihistaminique depuis 15 jours
- Ayant reçu un traitement immunomodulateur (notamment ciclosporine) depuis 1 mois
- Ayant reçu dans les 3 à 6 derniers mois (selon la durée de traitement) de la ciclosporine ou du MTX.
- Chiens sous immunothérapie
- Ayant reçu dans les 15 à 30 jours précédents l'un des traitements suivants : probénécide, AINS, acide folique ou acide folinique, insuline, sulfamides +/- triméthoprimine, cytostatiques, pénicillines, céphalosporines, théophylline, dypiridamole, rétinoïdes, léflunomide, pyriméthamine, cholestiramine, aminoglycosides, amphotéricine B, hydroxychloroquine, imidazolés, macrolides, lactones macrocycliques, spinosad, émodepside, loperamide, et toute molécules connue comme substrat de la P-GP, anti convulsivants barbituriques ou non, benzodiazépines.
- Gestant/allaitant, ainsi que tout animal destiné à la reproduction
- Dont l'examen clinique général révèle une anomalie
- Dont les examens complémentaires de pré-inclusion révèlent une numération formule sanguine, une biochimie (PAL, ALAT, UREE, CREATININE) ou une analyse d'urine (bandelette, réfractomètre) anormale.
- Ayant reçu un vaccin vivant dans les 15 derniers jours

#### b) Critères d'inclusion lot témoin

Vingt-neuf animaux issus majoritairement de chiens d'étudiants de l'école ont pris part à l'étude. Ces chiens avaient, lors des prélèvements, entre 5 mois et 6 ans, la moyenne d'âge étant de 33 mois. Des animaux de races prédisposées à la dermatite atopique ont été choisis dans la mesure du possible, avec en majorité des Labradors et affiliés (24 %, 7/29), Golden Retriever et affiliés (14 %, 4/29) et Dalmatien (7 %, 2/29) (Tableau 7) (11).

Les critères d'exclusion du groupe témoins étaient presque identiques à ceux du groupes des chiens atteints de dermatite atopique. Seulement, les chiens destinés à la reproduction n'ont pas été exclus de l'étude. De même, aucune analyse sanguine ou urinaire préalable n'a été réalisée sur ces chiens.

**Tableau 7** : Âge et race des chiens sains de dermatite atopique inclus dans l'étude

	Age en mois	Race
1	38	Berger Hollandais
2	40	Berger Australien
3	40	Épagneul breton
4	38	Berger Allemand
5	24	Beauceron
6	18	Staffordshire Terrier
7	26	Labrador
8	33	Beagle
9	53	Croisé berger
10	32	Croisé labrador
11	56	Border Collie
12	29	Croisé épagneul
13	40	Dalmatien
14	43	Labrador
15	36	Croisé épagneul
16	40	Croisé beauceron
17	20	Golden Retriever
18	24	Golden Retriever
19	17	Golden Retriever
20	72	Croisé labrador
21	44	Croisé épagneul
22	20	Croisé berger
23	20	Labrador
24	16	Labrador
25	33	Croisé golden retriever
26	12	Labrador
27	52	Croisé berger
28	5	Croisé labrador
29	34	Dalmatien

## 2. Protocole

### a) Constitution des groupes

Les animaux atteints de dermatite atopique et inclus dans l'étude ont été attribués de manière aléatoire dans deux groupes. Le premier groupe, composé de 5 des 12 chiens, fut traité avec de la ciclosporine (SPORIMUNE<sup>®</sup> 50 mg/mL) à la dose de 5 mg/kg, à raison d'une administration *per os* par jour pendant 2 mois, puis tous les deux jours ensuite. La ciclosporine a été administrée à distance des repas, ce qui était défini comme 2 heures avant ou après le repas.

Le second groupe, composé de 7 des 12 chiens, recevait du MTX (LEDERTREXATE<sup>®</sup>) à la dose initiale de 0,15 mg/kg à raison d'une injection par semaine.

Afin d'obtenir une étude en double aveugle, il a été choisi d'administrer un placebo (SYRSPEND<sup>®</sup>) disponible en solution injectable et en solution buvable. Ces derniers n'étaient pas identifiables des produits médicamenteux. Le groupe ciclosporine recevait des injections de placebo une fois par semaine alors que le groupe MTX recevait le placebo par voie orale tous les jours. Ainsi, pour chaque animal, ont été administrés un produit *per os* quotidiennement et une solution injectable de manière hebdomadaire. Il était ainsi impossible, que ce soit pour le propriétaire ou le clinicien, de distinguer un individu recevant le MTX d'un individu recevant la ciclosporine.

Après 15 jours de traitement, une visite était réalisée afin d'évaluer la tolérance de l'animal aux traitements. Au cours de cette consultation, le clinicien réalisait un examen clinique, des prises de sang pour biochimie et hématologie ainsi qu'une vérification du protocole utilisé par les propriétaires et le recueil des éventuels effets secondaires.

La période d'inclusion de l'étude était de 6 mois. Comme précisé précédemment, une première prise de sang a été réalisée en pré-inclusion. De nouvelles prises de sang ont été réalisées à 15 jours puis tous les mois ensuite, jusqu'à la sortie de l'animal de l'étude au 7<sup>ème</sup> mois. 8 échantillons destinés à l'évaluation du profil cytokinique furent donc collectés pour chaque animal finissant l'étude. Un suivi clinique était également réalisé à chacune des visites. Le tableau ci-dessous résume chaque visites, le délai entre inclusion et visite, les examens réalisés lors ces visites et les éventuels réajustements de posologie (Tableau 8).

**Tableau 8 : Visites, prélèvements et modifications de posologie**

Visite n°1	Visite n°2	Visite n°3	Visite n°4	Visite n°5	Visite n°6	Visite n°7	Visite n°8
Pré-inclusion	à 15 jours	à 1 mois	à 2 mois	à 3 mois	à 4 mois	à 5 mois	à 6 mois
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• Hématologie</li> <li>• Biochimie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• Hématologie</li> <li>• Biochimie</li> <li>• MTX-PG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• MTX-PG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• MTX-PG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• Hématologie</li> <li>• Biochimie</li> <li>• MTX-PG + OG-MTX</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• MTX-PG + OG-MTX</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• MTX-PG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukines</li> <li>• Hématologie</li> <li>• Biochimie</li> <li>• MTX-PG + OG-MTX</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration : Buvable 1j/2</li> <li>• Posologie +/- adaptée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration : Buvable 1j/2 (si non réalisé à la visite n°4)</li> <li>• Posologie +/- adaptée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration : Buvable 1j/2 (si non réalisé à la visite n°5)</li> <li>• Posologie +/- adaptée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration : Buvable 1j/2 (si non réalisé à la visite n°6)</li> <li>• Posologie +/- adaptée</li> </ul>	Levée de l'aveugle pour le propriétaire

Au cours de l'étude, ont été autorisés les traitements concomitants suivant :

- Antiparasitaires externes à l'exception du spinosad et des lactones macrocycliques
- Antiparasitaires internes à l'exception des lactones macrocycliques
- Shampoings antiseptiques, réhydratants cutanés et nettoyants auriculaires sans corticoïdes
- Traitements antibiotiques autorisés, après appréciation du dermatologue
- Traitements antifongiques à l'exception des imidazolés, après appréciation du dermatologue
- Dermocorticoïdes pour la gestion des crises

Les dermatologues pouvaient choisir d'exclure les animaux précédemment inclus dans l'étude pour les raisons suivantes :

- Echec du traitement défini par une aggravation des lésions cutanées ou intensification du prurit après 3 mois de traitement
- Effets secondaires délétères associés au traitement
- Nécessité d'employer des traitements invalidant le protocole
- Non présentation lors des suivis
- Non-respect du protocole par le propriétaire
- Mort de l'animal

Notre étude consistait en l'extraction des ARNm contenus dans cet échantillon sanguin, l'estimation de la quantité d'ARN après extraction, par spectrophotométrie, ainsi que la réalisation d'une rétrotranscription et d'une qPCR sur les ADN obtenus.

## b) Prélèvement et extraction d'ARN

Les ARN totaux étaient issus de prélèvements sanguins de 0,5 mL réalisés aux veines céphaliques, saphènes ou jugulaires. Ces échantillons étaient alors mélangés à 0,5 mL de solution de tampon de lyse (NucleoSpin RNA blood kits) et instantanément mis au congélateur à une température constante de -20°C. Le tampon de lyse était utilisé afin d'obtenir une lyse des cellules du sang dont des leucocytes ainsi qu'une inhibition des RNases, permettant d'obtenir un échantillon propre à l'isolement et l'extraction des ARN recherchés.

L'extraction était basée sur l'utilisation de colonnes retenant les acides nucléiques et l'élimination des ADN. Le choix d'utilisation du kit d'extraction fut orienté par la nature de nos organes d'intérêt. Il a été choisi de travailler avec NucleoSpin RNA blood kit (Macherey Nagel). Le kit inclue dans son protocole une élimination de l'ADN génomique via l'utilisation d'une RDNase. Le rendement de l'extraction en ng/ $\mu$ L était mesuré par spectrophotométrie avec une machine (BioDrop  $\mu$ Lite, Biochrom). Cette dernière permettait également d'évaluer la pureté du prélèvement par le rapport des absorbances  $A_{260}/A_{280}$ . Le protocole utilisé fut celui fourni par le fournisseur du kit.

## c) Rétrotranscription

Nous avons ensuite procédé, pour chaque échantillon, à une étape de rétrotranscription afin d'obtenir de l'ADN à partir de nos solutions d'ARNm. Le protocole suivi était celui donné par le kit du producteur (PrimeScript RT Reagent Kit, Takara). La quantité d'ARNm rétro transcrite était de 250 ou 125 ng en fonction de la quantité obtenue après extraction.

## d) qPCR

### (1) Principe

La qPCR consiste en l'amplification exponentielle d'ADN complémentaire (ADNc) précédemment obtenu par rétrotranscription. Cette technique est couramment utilisée pour quantifier l'expression de gènes cibles (98). Il existe deux méthodes de quantification : la quantification absolue et la quantification relative. La quantification absolue permet de mesurer le niveau exact d'expression du gène d'intérêt dans un échantillon donné. La deuxième méthode de quantification permet de comparer les niveaux d'expression de nos gènes cibles dans le groupe d'essai par rapport à ceux du groupe témoin au moyen de ratios. Afin de minimiser les variations intra et inter PCR, l'expression est normalisée par rapport à celle d'un gène de ménage ou de référence qui est dans le cas de notre étude le glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase (*GAPDH*).

Un gène de ménage est un gène non régulé, qui s'exprime dans toutes les cellules nucléées car il est indispensable à leur survie. L'expression d'un gène de ménage est considérée comme

stable et ne doit pas varier en fonction des différentes conditions expérimentales (98). Il constitue une méthode acceptable pour corriger les variations mineures liées par exemple au rendement de la rétrotranscription.

Les différentes étapes de la qPCR sont présentées dans la figure ci-contre (Figure 21).

4 steps	scan	°C	m:s	goto	loops	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\Delta t(s)$	$\lambda(^{\circ}C/s)$
40x	1	95,0	02:00	--	---	--,-	---	8,0
	2	95,0	00:05	--	---	--,-	---	6,0
	3	60,0	00:30	--	---	--,-	---	6,0
	4	72,0	00:20	2	39	--,-	---	6,0
	5	Melt	00:30					
6								
7								
8								
9								
10								

95°C : dénaturation de l'ADN  
60°C : hybridation des amorces  
72°C : élongation

**Figure 21** : Etapes de la qPCR utilisée dans le cadre de notre étude

### (2) PCR « One-Step »

Le protocole « One-Step » permet de réaliser les réactions de rétrotranscription de l'ARNm en ADNc puis l'amplification de ce dernier dans le même tube, et permet ainsi d'éviter toute contamination liée à la manipulation de l'ADNc produit. De plus elle évite d'introduire un biais supplémentaire dû à la mesure de la concentration de l'ADNc produit. Cependant elle ne permet pas une optimisation parfaite de chacune des deux étapes de la réaction et il est impossible de calculer le rendement de la rétrotranscription. Il a été choisi dans le cadre des échantillons de chiens atteints de DA, car les concentrations en ARN après extraction étaient faibles pour la plupart. Il nous était impossible de réaliser les PCR car le volume d'ADN à introduire, étant donné la concentration faible, était trop élevé. Par ailleurs, la sensibilité de l'enzyme responsable de l'amplification des ADN est plus importante dans le protocole One-Step que dans un protocole de PCR standard.

### (3) Choix des amorces

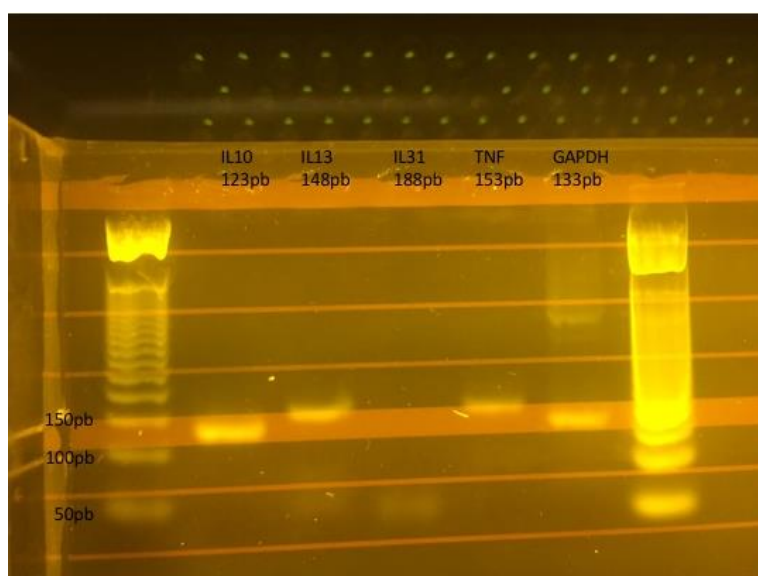
Des amorces spécifiques des interleukines canines choisies (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13 et IL-31) ont été choisies et utilisées pour permettre l'amplification des ADNc. Le gène de ménage utilisé est le GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase). Les amorces, données dans le tableau ci-dessous proviennent de la littérature (Tableau 8). Cependant, il a été vérifié au cours de l'étude que chaque amorce est bien présente dans la séquence du gène isolé par PCR par analyse de la séquence du gène et positionnement de l'amorce. Cette vérification permet également de mesurer la taille de l'amplicon produit qui a pu être vérifiée par migration des produits de PCR sur un gel d'agarose.

**Tableau 9** : Séquences et taille des amorces sens et anti-sens utilisées dans le cadre de l'étude

Oligo name	Sequence	Taille amplicon	Gene ID
IL4_CN_s	CAC-CTC-CCA-ACT-GAT-TCC-AA	123	NM_001003159.1
IL4_CN_as	CTC-GCT-GTG-AGG-ATG-TTC-AA		
TNFa_CN_s	TCT-CGA-ACC-CCA-AGT-GAC-AAG	153	DQ923808.1
TNFa_CN_as	CAA-CCC-ATC-TGA-CGG-CAC-TA		
IL13_CN_s	CCT-CCT-CAG-AGC-AAA-GTG	148	AF244915.1
IL13_CN_as	CCC-AGC-ACA-AAC-AAA-GAC		
IL31_CN_s	CCT-GTT-CCT-GCT-CTG-CTC-TA	188	NM_001165914.1
IL31_CN_as	TGA-GAC-ACA-GCA-GCA-AGG-TA		
GAPDH_CN_s	ATC-ACT-GCC-ACC-CAG-AAG-AC	133	NM_001003142.2
GAPDH_CN_as	TCA-GCT-CAG-GGA-TGA-CCT-TG		

#### (4) Confirmation de la spécificité des amorces

L'analyse des courbes de fusions permet de vérifier qu'un seul produit d'amplification est généré. L'analyse des courbes de fusion des différents gènes de cette étude montre que pour l'IL-4, IL-13, le TNF- $\alpha$  et le GAPDH, un seul produit se forme au cours des 40 cycles d'amplification. Cependant dans le cas de l'IL-31, on observe des dimères d'amorce formés autour de 75°C. Les températures de fusion spécifiques suivantes ont été retrouvées : *GAPDH* : 88°C ; *IL-4* : 78,5°C ; *IL-13* : 81,5°C ; *IL-31* : 84°C ; *TNF- $\alpha$*  : 85,7°C. La spécificité de ces produits a ensuite été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, avec le Syber Green et un marqueur de taille de 50-1000 pb (Lonza, USA) (Figure 22). Dans le cas de l'IL-13, le TNF- $\alpha$  et le GAPDH, une seule bande correspondant à la taille attendue est retrouvée. Des séquençages d'ADN ont également été réalisés.



**Figure 22** : Gel d'agarose à 2 % sur les échantillons amplifiés par RT-qPCR (Crédit : C.Prouillac)



### (5) Efficacité et linéarité des amplifications qRT-PCR

Pour chaque gène, une courbe standard établie à partir de concentrations croissantes d'ADNc (1, 10, 20, 25, 50 ng) et des Ct (déterminés pour chaque concentration à l'issue des qRT-PCR par le logiciel qPCRsoft d'Analytik Jena) a été réalisée (Figure 23). L'objectif de ces gammes est de vérifier la linéarité de l'amplification dans la gamme de concentrations choisies, et de déterminer l'efficacité de la réaction. Toutes les droites obtenues ont un coefficient de corrélation supérieur à 0,93. La droite de régression linéaire est sous la forme de  $CT = f(X)$  avec  $X = \log_{10}(\text{concentration du gène})$  et  $f$  une fonction affine de  $X$  définie par  $f(X) = aX + b$ . Les pentes (a) des droites de régression linéaire permettent de calculer les efficacités des PCR selon la formule :  $\text{Efficacité} = 10^{(-1/\text{pente})}$ . Ces efficacités sont utilisées dans le calcul des expressions relatives (Tableau 10).

Nous n'avons dans le cas de l'IL-4 et l'IL-13 pu réaliser qu'une seule gamme. Dans le cas de l'IL-31, aucune gamme n'a été réalisée par défaut d'amplification.

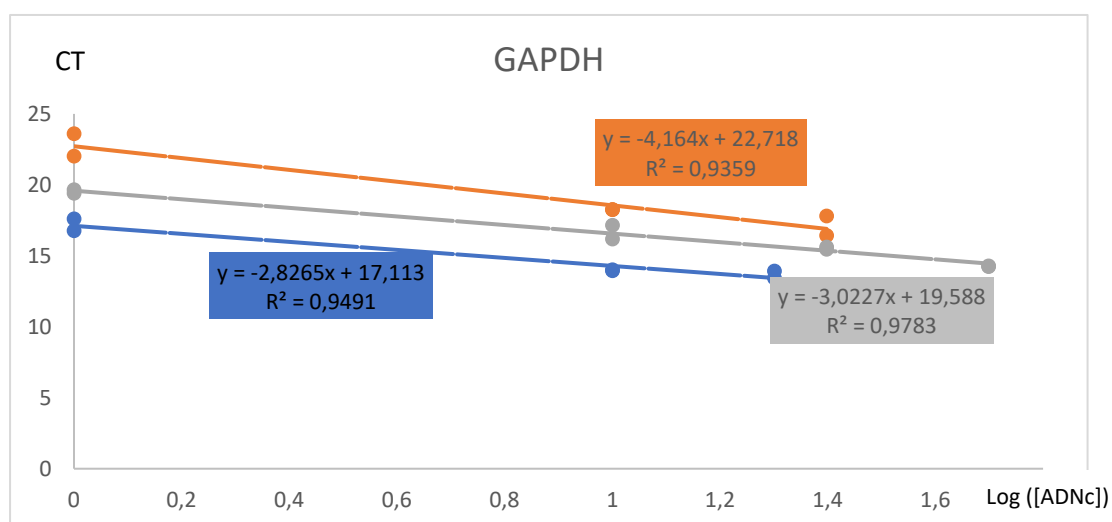


Figure 23 : Linéarité des 3 gammes réalisées pour le gène GAPDH

**Tableau 10** : Calculs des efficacités de la PCR pour chacun des gènes choisis (X : concentration en ng/ $\mu$ L)

	<b>Coeff corrélation</b>	<b>Equation de la droite</b>	<b>Efficacité</b>	<b>Moyenne</b>
GAPDH	0.9359	$Y = -4.164 * \text{LOG}(X) + 22.718$	73.8%	104.6%
	0.9783	$Y = -3.0227 * \text{LOG}(X) + 19.588$	114.2%	
	0.9491	$Y = -2.8265 * \text{LOG}(X) + 17.113$	125.8%	
IL4	0.9834	$Y = -3.0044 * \text{LOG}(X) + 26.131$	115.2%	
IL13	0.961	$Y = -3.0728 * \text{LOG}(X) + 28.827$	111.6%	
TNF	0.9891	$Y = -3.5352 * \text{LOG}(X) + 25.407$	91.8%	105.4%
	0.9397	$Y = -3.1279 * \text{LOG}(X) + 25.287$	108.8%	
	0.9758	$Y = -2.9976 * \text{LOG}(X) + 22.473$	115.6%	

*(6) Les cycles seuils*

Pour le calcul des expressions des gènes d'intérêt, les cycles seuils (Thresold Cycle=Ct) sont déterminés à partir des courbes d'amplification par le logiciel qPCRsoft.

Un cycle seuil est le cycle d'amplification à partir duquel la fluorescence mesurée est considérée comme significativement supérieure au bruit de fond. Il est donc déterminé à partir de la courbe d'amplification.

Il permet de calculer les quantités d'ADNc ; à chaque cycle la quantité d'ADNc double. Plus les valeurs de Ct sont faibles plus la concentration en ADNc est importante.

(7) Le modèle mathématique de calcul des expressions relatives

Pour l'évaluation des profils d'expression des messagers de nos gènes d'intérêt, les quantités relatives par rapport à GAPDH (Q relative/ GAPDH) des cultures *in vitro* sont calculées à partir des efficacités (Eff) et des CT du gène de ménage et de chacun de nos gènes selon la formule suivante :

$$Q_{\text{relative/GAPDH}} = \frac{(Eff_{\text{gène cible}})^{-CT_{\text{gène cible}}}}{(Eff_{\text{GAPDH}})^{-CT_{\text{GAPDH}}}}$$

Des PCR « One-Step » ont été utilisés dans le cadre des chiens atteints de DA. Cette méthode de PCR n'a pas bénéficié de la réalisation de gamme. L'efficacité pour chaque gène, calculé à l'aide des coefficients directeurs des courbes standard de gamme n'a donc pas pu être calculée. L'utilisation de la formule pour le calcul des quantités relatives n'est alors pas utilisable telle qu'elle. Il a été décidé d'utiliser la méthode « Delta-delta » consistant en l'approximation de l'efficacité du gène cible et du gène de ménage à 2 de telle sorte que : (98)

$$Q_{\text{relative/GAPDH}} = \frac{2^{-CT_{\text{gène cible}}}}{2^{-CT_{\text{GAPDH}}}} = 2^{CT_{\text{GAPDH}} - CT_{\text{gène cible}}}$$

## C. Résultats

### 1. Cohorte de chiens sains

Les ARNm des sangs de 29 chiens sains de DA ont pu être extraits au cours de cette étude. Chacune des manipulations a été complétée, jusqu'à la réalisation de la RT-qPCR et l'obtention des courbes d'amplification pour chaque gènes.

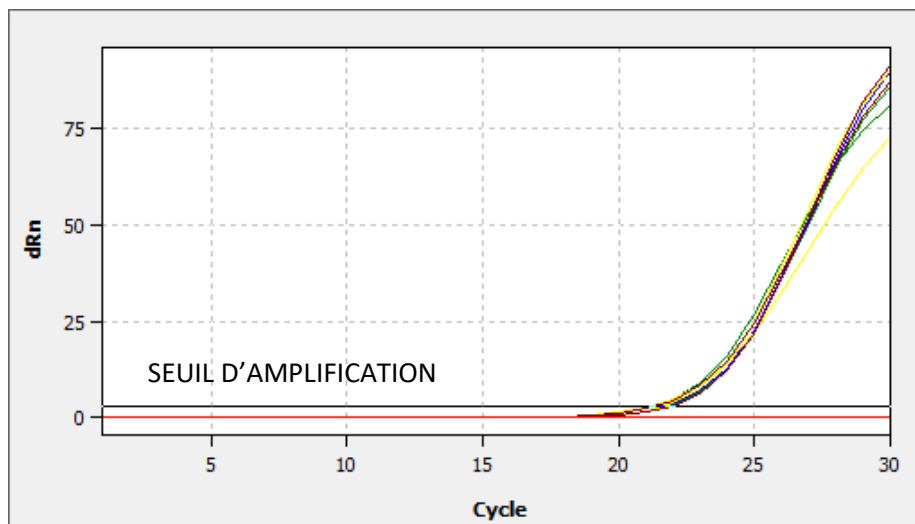
#### a) Expression du gène de ménage

Le gène de ménage (GAPDH) a été exprimé chez les 29 chiens analysés.

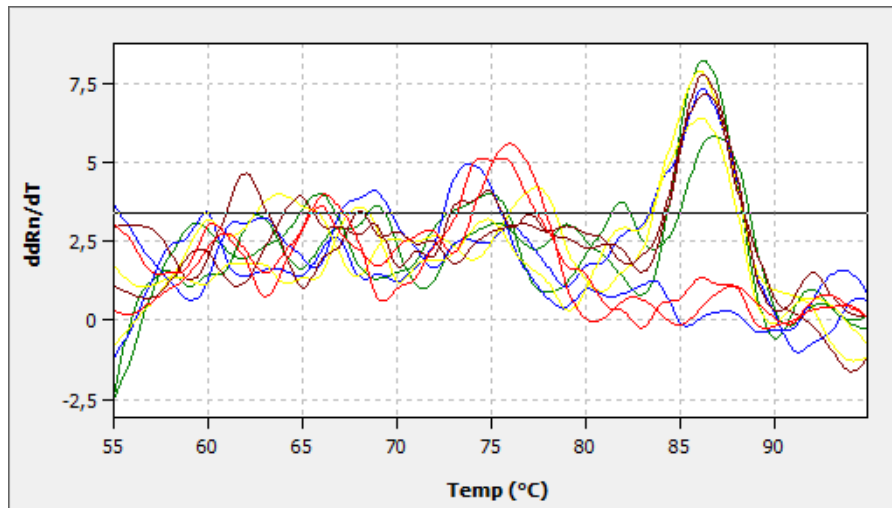
#### b) Expressions relatives des gènes d'intérêt

##### (1) *TNF- $\alpha$*

Le *TNF- $\alpha$*  a été retrouvé chez 100 % des chiens de la cohorte saine (29/29). Un profil d'amplification et une courbe standard de fusion sont présentés dans les figures suivantes (Figure 24 et 25).



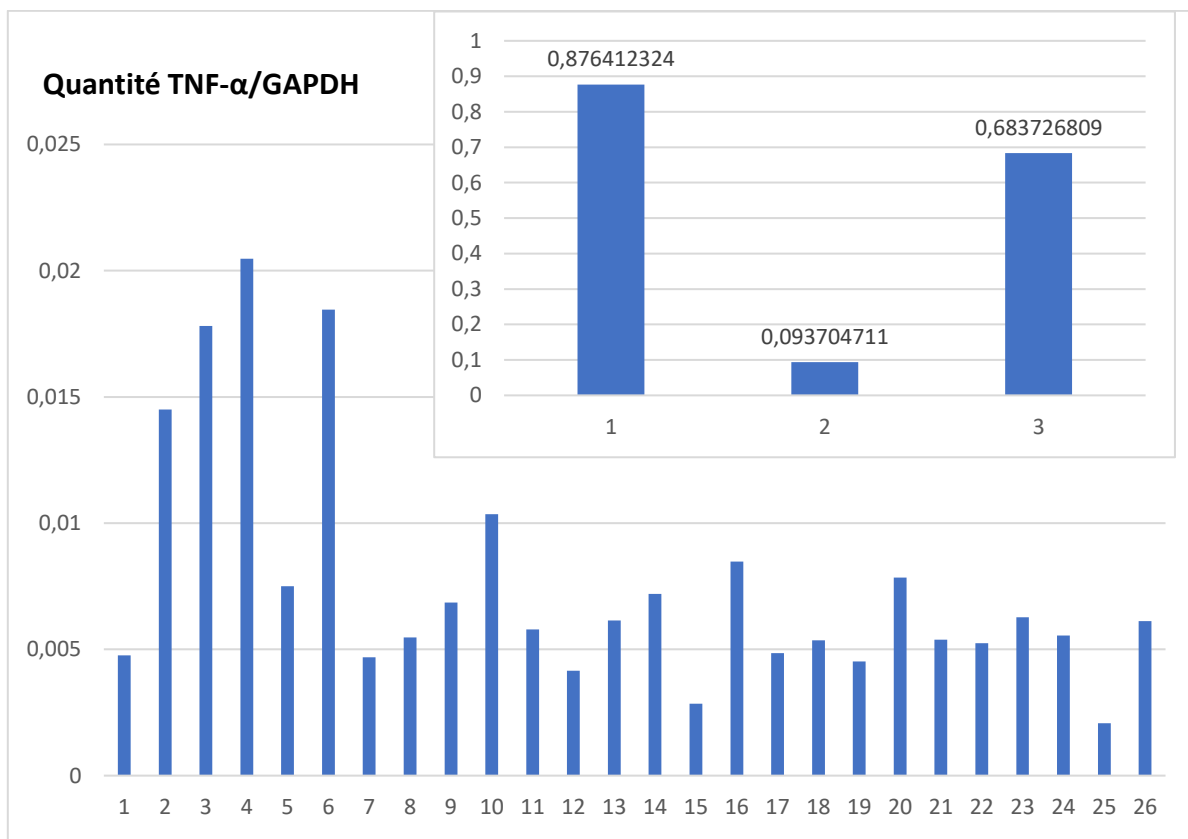
**Figure 24** : Courbe d'amplification de qPCR pour le gène *TNF- $\alpha$*  chez les chiens 14, 20, 26 et 28.



**Figure 25** : Courbe de fusion du gène *TNF-α* pour les chiens 14, 20, 26 et 28.

On retrouve bien dans la Figure 24, le  $T_m$  donné par la littérature du *TNF-α* soit 85,7°C.

Les quantités relatives par rapport au GAPDH, pour chaque chien, sont présentées dans la figure suivante (Figure 26).

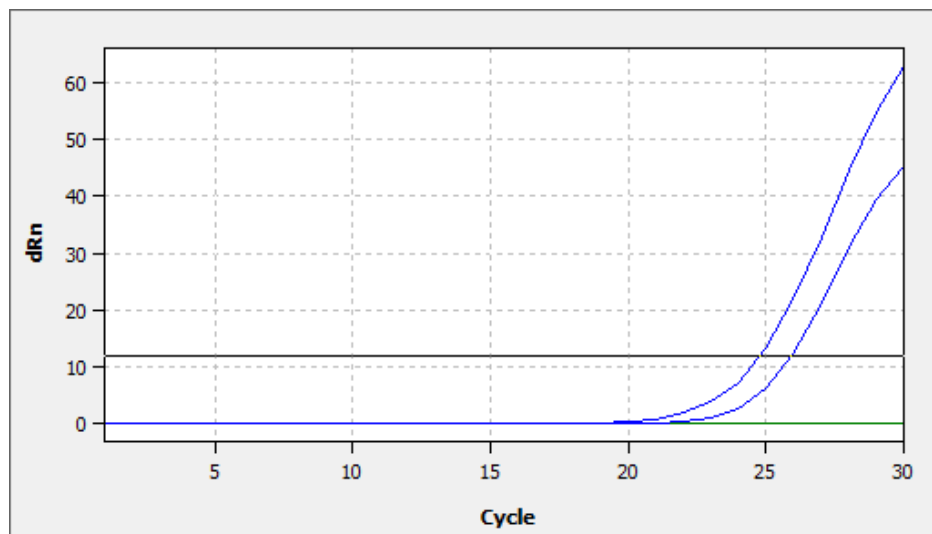


**Figure 26** : quantité relative des ARNm de *TNF-α* par rapport à GAPDH chez les 29 chiens de la cohorte saine l'exprimant. L'histogramme est représenté sur deux graphiques par soucis d'échelle.

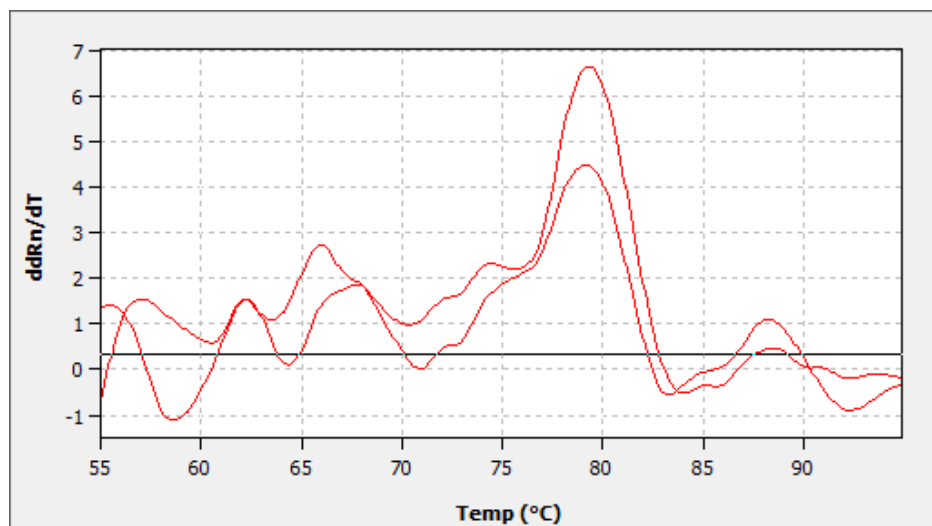
La moyenne des quantités relatives de l'ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  par rapport à GAPDH au sein de la cohorte saine de DA est de  $0,066 \pm 0,076$ . En extrayant les 3 valeurs extrêmes, on obtient une moyenne de  $0,0076 \pm 0,0018$  soit l'intervalle de confiance à 95 % suivant : [0,0058 ; 0,0095]

## (2) IL-4

L'IL-4 a été retrouvée chez 10 % des chiens de la cohorte saine (3/29). Un profil d'amplification et une courbe standard de fusion sont présentés dans les figures suivantes (figure 27 et 28).



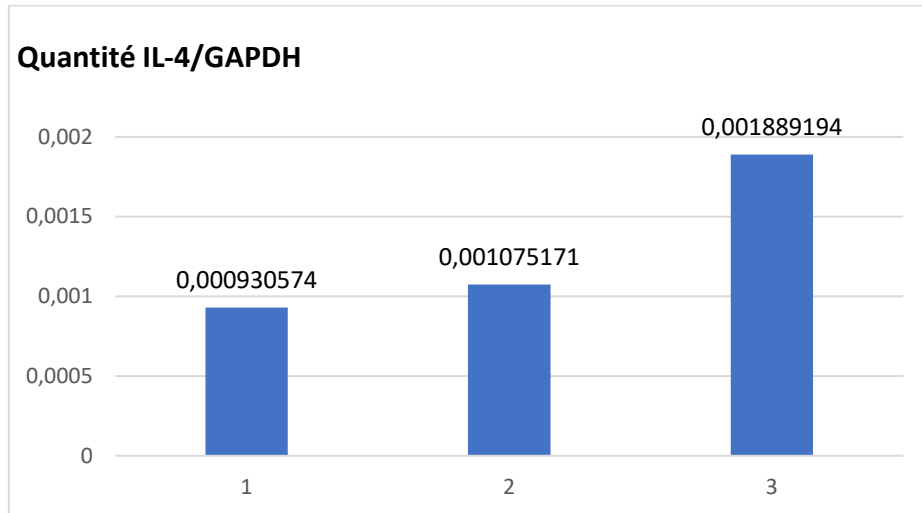
**Figure 27 :** Courbe d'amplification de qPCR pour le gène IL-4 chien le chien 23



**Figure 28 :** Courbe de fusion du gène IL-4 pour le chien 23

On retrouve bien dans la Figure 28, un Tm proche de celui donné par la littérature pour l'IL-4 soit 78,5°C.

Les quantités relatives par rapport au GAPDH, pour chaque chien, sont présentées dans la figure suivante (Figure 29).

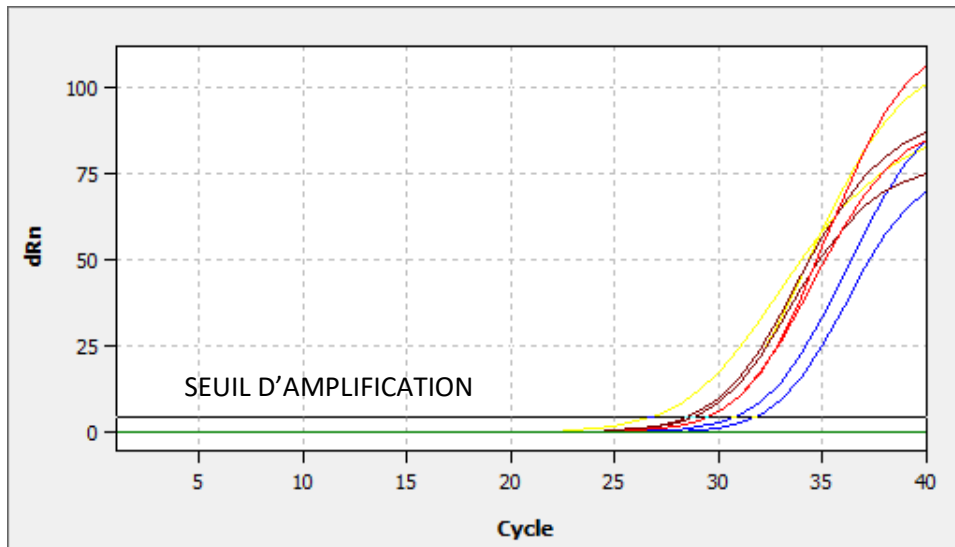


**Figure 29** : quantité relative d'ARNm d'IL-4 par rapport à GAPDH chez les 3 chiens de la cohorte saine l'exprimant

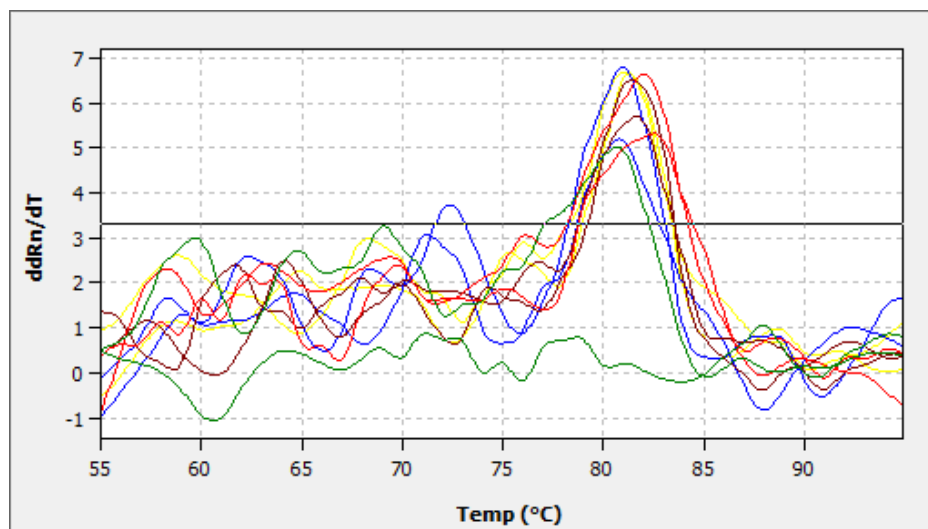
La moyenne des quantités relatives des ARNm d'IL-4 par rapport à GAPDH au sein de la cohorte saine de DA est de  $0,0013 \pm 0,0006$  soit l'intervalle de confiance à 95 % suivant : [0,0007 ; 0,0019].

### (3) IL-13

L'IL-13 a été retrouvée chez 48 % des chiens de la cohorte saine (14/29). Un profil d'amplification et une courbe standard de fusion sont présentés dans les figures suivantes (Figure 30 et 31).



**Figure 30** : Courbe d'amplification de qPCR pour le gène IL-13 chez les chiens 10, 13, 19, 21

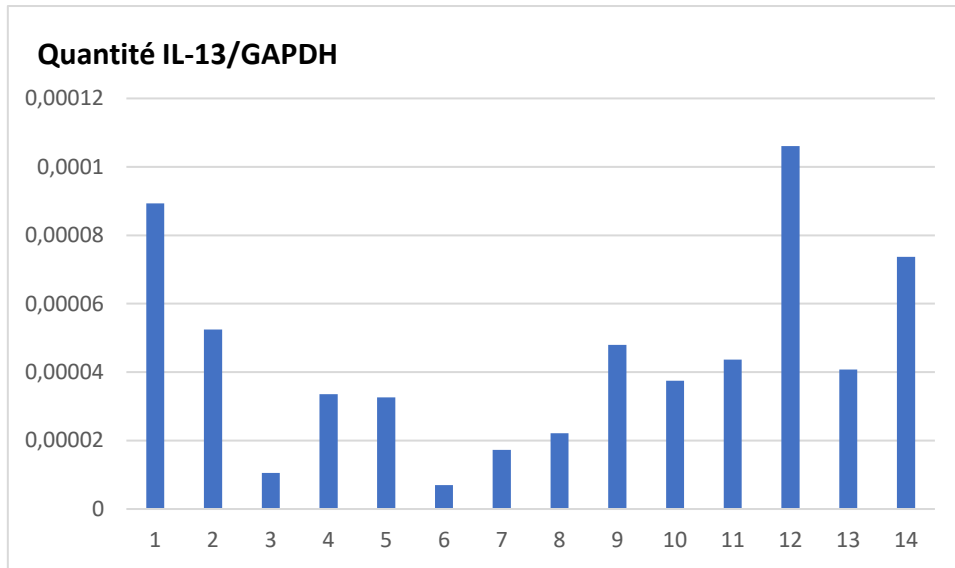


**Figure 31** : Courbe de fusion pour le gène IL-13 chez les chiens 10, 13, 19, 21

On retrouve bien dans la Figure 27, le  $T_m$  donné par la littérature de l'IL-13 soit 81,5°C.

Les quantités relatives de chaque animal par rapport à GAPDH sont présentés dans la figure suivante (Figure 32).



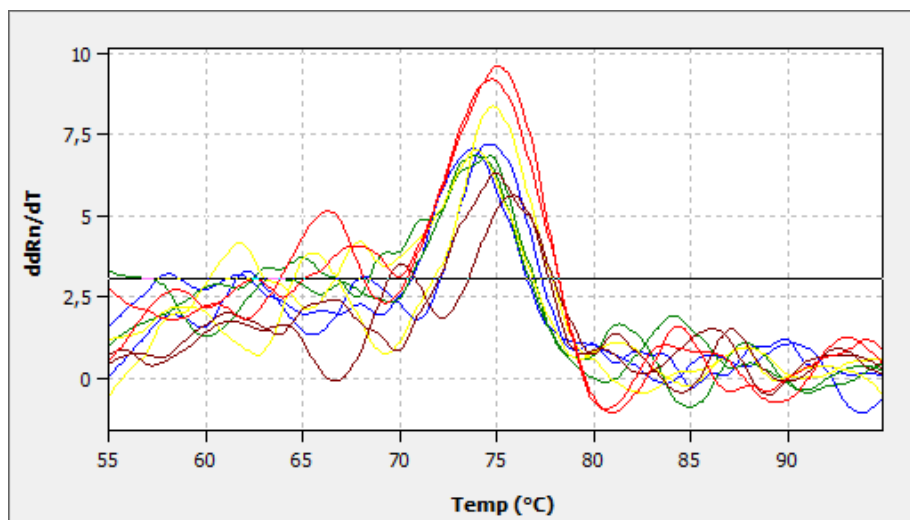


**Figure 32** : Quantité relative d'ARNm d'IL-13 par rapport à GAPDH chez les 13 chiens de l'étude ayant exprimé l'IL-13

La moyenne des quantités relatives d'ARNm d'IL-13 par rapport à GAPDH au sein de la cohorte saine de DA est de  $4,4 \cdot 10^{-5} \pm 1,5 \cdot 10^{-5}$  soit l'intervalle de confiance à 95 % suivant :  $[2,9 \cdot 10^{-5}; 5,9 \cdot 10^{-5}]$ .

#### (4) IL-31

L'ARNm codant pour l'IL-31 n'a pas été détecté dans le sang des chiens sains de DA au cours de l'étude. Seuls ont été retrouvés des dimères d'amorces caractérisés par un  $T_m$  de 75°C plus bas que celui attendu (84°C) (Figure 33).



**Figure 33** : Courbe de fusion pour le gène IL-31 obtenue systématiquement pour les chiens sains de DA

## 2. Cohorte de chiens atteints de DA

Au sein de la cohorte des chiens atteints de DA, des extractions et quantifications d'ARNm ont pu être réalisées chez 12 chiens. Parmi ces 12 chiens, 7 sont dans le groupe MTX et 5 dans le groupe ciclosporine.

### a) Expression du gène de ménage

Le gène de ménage (GAPDH) a été exprimé chez les 12 chiens analysés, à partir de la visite n°2.

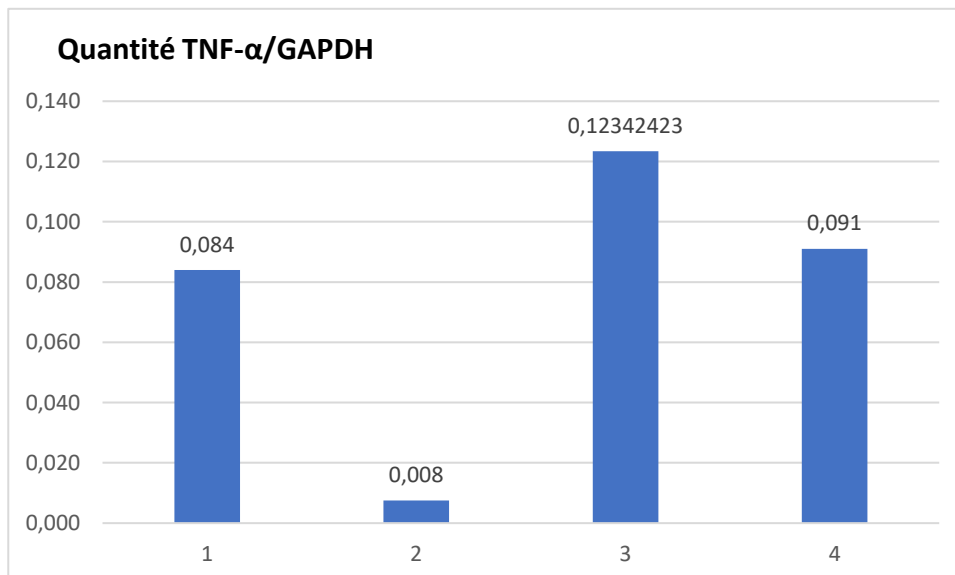
### b) Expression des gènes d'intérêt

Aucun ARNm (même GAPDH) n'a été retrouvé dans les échantillons de visite n°1, visite de pré-inclusion. Il est choisi ici de ne parler que des échantillons des visites n°2, c'est-à-dire 15 jours après initiation du traitement.

#### (1) *TNF- $\alpha$*

Le TNF- $\alpha$  a été retrouvé chez 33 % (4/12) des chiens atteints de DA. Trois sont dans le groupe MTX (43 %) et un dans le groupe ciclosporine (20 %).

Les quantités relatives des ARNm codant pour le TNF- $\alpha$  par rapport à GAPDH pour chaque chien l'exprimant sont présentés dans la figure suivante (Figure 34).



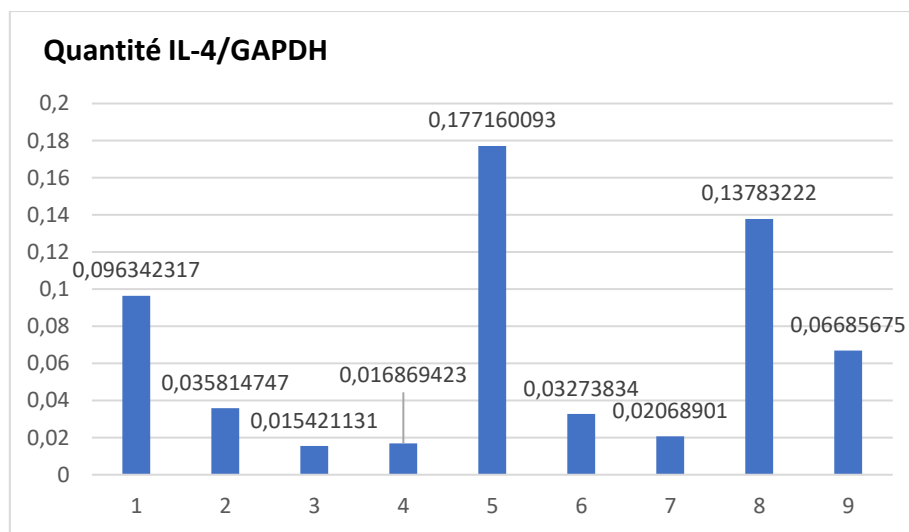
**Figure 34** : Quantité relative d'ARNm de TNF- $\alpha$  par rapport à GAPDH chez les 4 chiens l'exprimant au cours de la visite n°2. Les chiens 1,2 et 3 sont dans le groupe MTX et le chien 4 dans le groupe ciclosporine.

La moyenne des quantités relatives d'ARNm de TNF- $\alpha$  par rapport à GAPDH au sein de la cohorte de chiens atteints de DA, lors de la visite n°2, est de  $0,076 \pm 0,048$  soit l'intervalle de confiance à 95 % suivant : [0,028 ; 0,125].

### (2) IL-4

L'IL-4 a été retrouvé chez 75 % (9/12) des chiens atteints de DA lors de la visite n°2. Cinq sont dans le groupe MTX (71 %) et quatre dans le groupe ciclosporine (80 %).

Les quantités relatives par rapport à GAPDH pour chaque chien l'exprimant sont présentés dans la figure suivante (Figure 35).



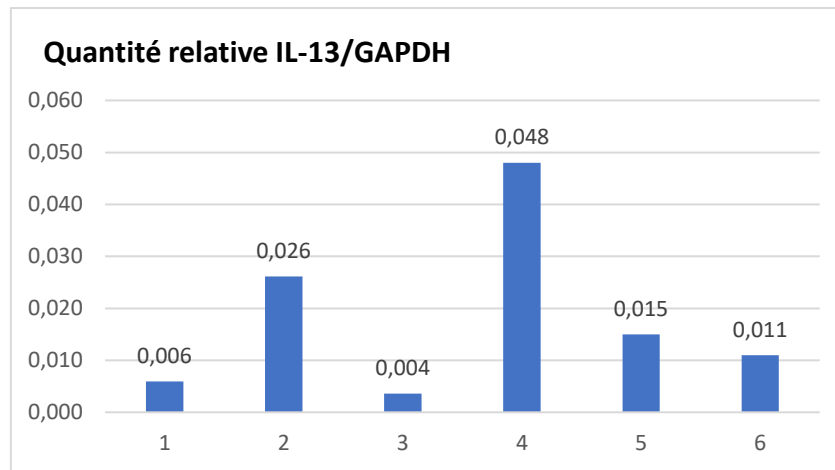
**Figure 35 :** Quantité relative d'ARNm d'IL-4 par rapport à GAPDH chez les 9 chiens l'exprimant au cours de la visite n°2. Les chiens 1,2,3,4 et 5 sont dans le groupe MTX et les chiens 6,7,8 et 9 dans le groupe ciclosporine.

La moyenne des quantités relatives d'ARNm d'IL-4 par rapport à GAPDH au sein de la cohorte de chiens atteints de DA, lors de la visite n°2, est de  $0,067 \pm 0,038$  soit l'intervalle de confiance à 95 % suivant : [0,029 ; 0,105].

### (3) IL-13

L'IL-13 a été retrouvé chez 50 % (6/12) des chiens atteints de DA. Trois sont dans le groupe MTX (43 %) et trois dans le groupe ciclosporine (60 %).

Les quantités relatives par rapport à GAPDH pour chaque chien l'exprimant sont présentés dans la figure suivante (Figure 36).



**Figure 36** : Quantité relative d'ARNm d'IL-13 par rapport à GAPDH chez les 6 chiens l'exprimant au cours de la visite n°2. Les chiens 1,2 et 3 sont dans le groupe MTX et les chiens 4,5 et 6 dans le groupe ciclosporine.

La moyenne des quantités relatives d'ARNm d'IL-13 par rapport à GAPDH au sein de la cohorte de chiens atteints de DA, lors de la visite n°2, est de  $0,018 \pm 0,013$  soit l'intervalle de confiance à 95 % suivant : [0,005 ; 0,031].

#### (4) IL-31

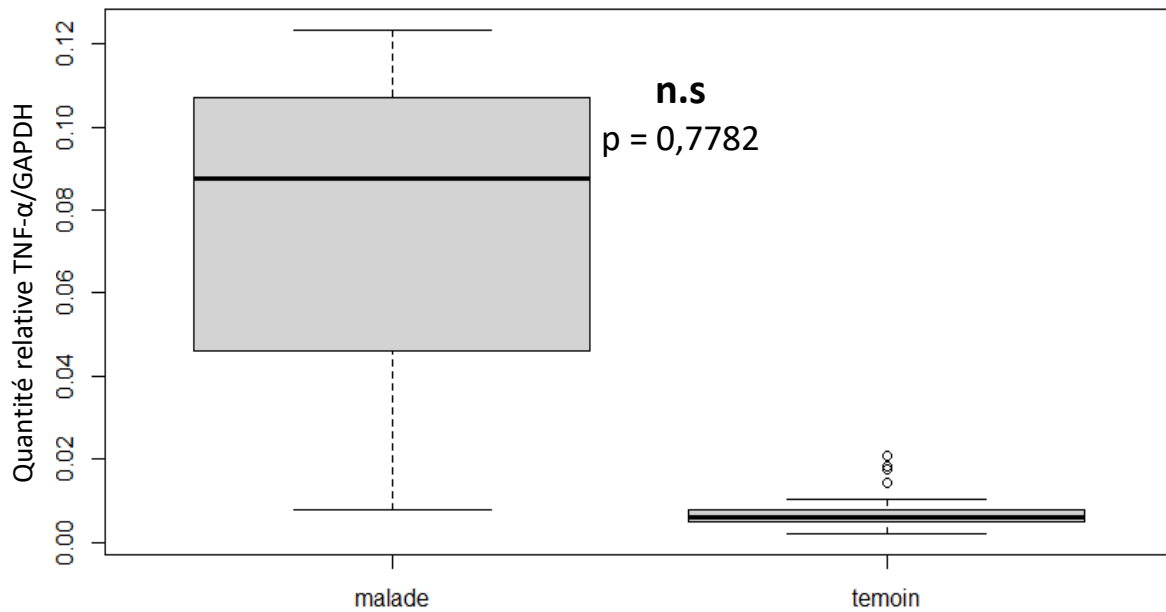
L'IL-31 n'a pas été retrouvé au cours de nos analyses chez les chiens atteints de DA.

### 3. Comparaison des cohortes

Pour chaque gène, il est décidé de comparer les moyennes des quantités relatives des ARNm par rapport à GAPDH à l'aide du logiciel R et du test de Welch ou test de Student pour séries indépendantes avec variances inégales défini par la fonction `t.test(paired = FALSE, var.equal = FALSE)` (120).

#### (1) TNF- $\alpha$

La moyenne des quantités relatives de la cohorte saine est non significativement différente de la moyenne de la cohorte malade, que ce soit en conservant les 3 valeurs extrêmes ou en les retirant ( $p > 0,05$ ) (Figure 37).

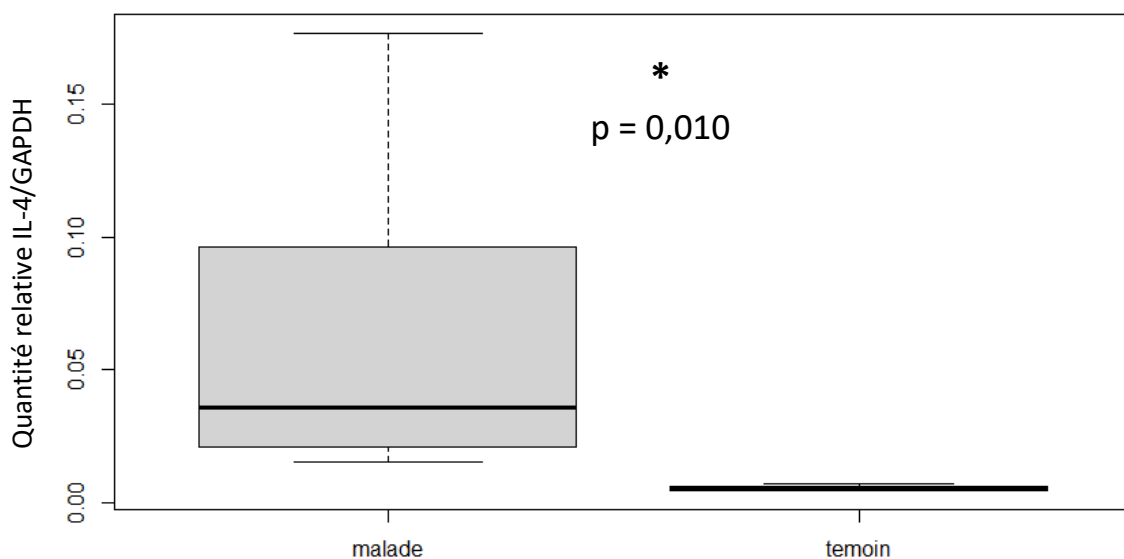


**Figure 37 :** Quantités relatives d'ARNm de TNF- $\alpha$  des chiens atteints de DA (malade) et des chiens sains (témoin). n = 3, 26. Les 3 chiens de la cohorte saine présentant une quantité relative extrême ont été retiré du graphique par souci d'échelle n.s : résultat non significatif entre les deux groupes ( $p > 0,05$ )

## (2) IL-4

La moyenne des quantités relatives de la cohorte saine est significativement différente de la moyenne de la cohorte malade ( $p < 0,05$ ), et ce en utilisant, pour la cohorte malade, les efficacités calculées ou l'efficacité approchée de la méthode « Delta-delta » (Figure 38).

En effet, l'ARNm d'IL-4 est significativement plus abondant au sein de la cohorte de chiens atteints de DA, lors de leur visite n°2, que dans la cohorte de chiens sains.

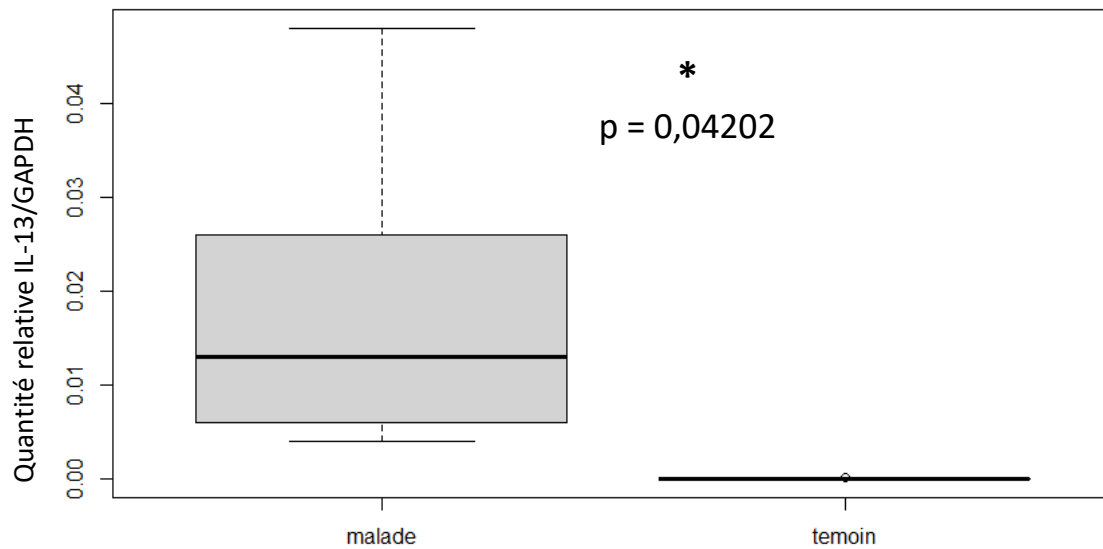


**Figure 38 :** Quantités relatives d'ARNm d'IL-4 des chiens atteints de DA (malade) et des chiens sains (témoin). n = 9, 3 et \* résultat significatif entre les deux groupes ( $p < 0,05$ )

### (3) IL-13

La moyenne des quantités relatives de la cohorte saine est significativement différente de la moyenne de la cohorte malade ( $p < 0,05$ ), et ce en utilisant, pour la cohorte malade, les efficacités calculées ou l'efficacité approchée de la méthode « Delta-delta » (Figure 39).

L'ARNm d'IL-13 est significativement plus abondant au sein de la cohorte de chiens atteints de DA, lors de leur visite n°2, que dans la cohorte de chiens sains.



**Figure 39** : Quantités relatives d'ARNm d'IL-13 des chiens atteints de DA (malade) et des chiens sains (témoin). n = 6, 14 et \* résultat significatif entre les deux groupes ( $p < 0,05$ )

## D. Discussion

### 1. Rappel de l'objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de déterminer s'il existe des biomarqueurs cytokiniques d'intérêt, dans le diagnostic, le suivi de la clinique et du traitement de la DA. Ces biomarqueurs ont été caractérisés à l'échelle transcriptomique par la quantification des ARN messagers correspondants.

Pour cela, des prélèvements sanguins sont réalisés avant la mise en place du traitement et au cours du traitement. Ces prélèvements ont été conservés à -20°C, dans un tampon de lyse, jusqu'à leur analyse. Le traitement de ces échantillons a ensuite consisté en l'extraction des ARN totaux, suivie de la rétrotranscription de ces ARN en ADNc qui a été quantifié par PCR quantitative en temps réel (qPCR). En raison de nombreuses difficultés expérimentales, nous allons discuter de la méthode choisie et de ses limites rendant l'interprétation des résultats complexe.

### 2. Questionnements sur le prélèvement

#### a) Conservation du matériel génétique dans le temps et maintien de son intégrité

Les acides nucléiques (ADN, ARNm) et protéines circulantes sont, dans le cas de pathologies inflammatoires, des cibles intéressantes pour des études biomédicales non invasives. Cependant, il a été montré par de nombreuses études que la dégradation des acides nucléiques est dépendante des facteurs temps et température de conservation. Les ARNm perdent leur intégrité généralement plus rapidement que les ADNc même à des températures voisines des -20°C (99). En outre, il est évident que la qualité du prélèvement, représenté notamment par sa concentration en acides nucléiques influence les résultats. La qualité de l'échantillonnage ne peut être modifiée par le praticien réalisant le prélèvement. Cependant, le temps avant congélation, dépendant du praticien, peut par exemple être réduit afin de limiter les pertes de matière. En effet, une mauvaise conservation peut conduire à des résultats incohérents, plus difficiles à interpréter. La question d'une bonne conservation des échantillons biologiques, et dans notre cas du sang total, est donc essentielle dans la réalisation d'une telle étude, l'extraction des ARNm ne pouvant pas toujours être réalisée à la suite de l'échantillonnage. La qualité de la conservation est notamment déterminée dans plusieurs des références bibliographiques citées par la concentration en ARN totaux (Biodrop®) et par le RNA integrity number (RIN > 7) (Bioanalyser®). Le RIN est une méthode algorithmique d'évaluation de l'intégrité de l'ARNm, plus standardisée et puissante que les ratios ribosomiques, utilisés par le passé. Le RIN permettrait de s'affranchir des variations de concentration notamment.

La cryopréservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  est une bonne solution dans certaines études. Dans l'étude de Camacho-Sanchez et al. en 2013, la méthode de cryopréservation est comparée à la conservation avec solution de conservation à température ambiante (100). Les concentrations issues des échantillons congelés y sont meilleures que les concentrations des échantillons avec solution de conservation. Cependant, dans le cas de notre étude multicentrique, un stockage puis un transport à  $-80^{\circ}\text{C}$  est difficile à mettre en place. Les praticiens ont plus facilement accès à un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ . De plus, dans le cadre de notre étude, une solution de conservation (tampon de lyse) et la congélation sont utilisés ensemble afin de favoriser une meilleure conservation des acides nucléiques.

En 2016, Bulla et al. indique qu'une congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$  permet une stabilisation du matériel génétique sur la durée, avec un rendement d'extraction à 1 an entre 50 et 60 % alors que l'on obtient un rendement de 40% avec un stockage à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 6 mois. On observe cependant une perte d'efficacité et de rendement sur l'extraction d'environ 30 % après seulement 7 jours de congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$  (101).

L'étude de Huang et al. en 2017 cherche à évaluer l'évolution de la concentration en acide nucléique en fonction du temps et de la température de conservation (102). Cette étude précise que la qualité de l'ARN (évaluée par le RIN) diminue significativement lors de la congélation ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). De plus, lors de l'analyse des Ct sur des gènes de référence (ARN18S et GAPDH), des basses températures de stockage semblent être associées à des Ct plus élevés, donc une concentration plus basse en acide nucléique cible. La conservation à basse température ne semble, d'après cette étude, pas optimale, si ce n'est préjudiciable pour la qualité des prélèvements. De plus, dans le cas du gène IP-10, on observe une expression du gène plus importante lors de stockage plus long, et ce quelle que soit la température. L'expression du gène est induite par des conditions de stress cellulaire comme la privation en oxygène dans le tube de prélèvement. La mesure à un instant  $t$  n'est pas l'image de la concentration à l'instant  $t_0$  de prélèvement.

D'après l'étude de Baoutina et al. en 2019, la concentration en acide nucléique après congélation diminue d'autant plus que cette concentration de départ est faible (103). Or, les concentrations estimées dans nos prélèvements frais, ne dépassent pas  $150\text{ ng}/\mu\text{L}$ . Chaque échantillon de leur étude présente une concentration en ADN diminuée après congélation. Cette diminution est liée à une dégradation de l'ADN. De plus, une congélation lente ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) serait plus préjudiciable pour la qualité de l'échantillon qu'une congélation rapide ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). En effet, cette température de congélation influence la durée de la phase intermédiaire solide/liquide au cours de laquelle la cohabitation de cristaux de glace et d'une solution aqueuse endommage les acides nucléiques. L'étude n'a cependant pas été faite pour les ARNm.

Les résultats concernant les meilleures stratégies de conservation des échantillons biologiques pour l'évaluation des acides nucléiques dépendent des études, de leurs méthodes de mesure, de la qualité et de l'intégrité du prélèvement. Ils semblent cependant indiquer une diminution



significative de la qualité du prélèvement lors d'un stockage dans la durée même sous congélation. Cette dernière ne prévient pas de l'altération de notre prélèvement, de la diminution du rendement de l'extraction, de la concentration et de la qualité des acides nucléiques. Cependant, elle permet de préserver un rendement modeste dans le temps. La solution serait d'analyser un échantillon fraîchement prélevé mais une étude à cette échelle, d'autant plus multicentrique, ne le permet pas. L'utilisation d'une solution de conservation comme le tampon de lyse, semble être une solution intéressante, associée à la congélation, pour maintenir un bon rendement d'extraction. En effet, il semblerait que l'ajout de telles solutions avant congélation permette d'améliorer le rendement d'extraction d'acides nucléiques (102).

Nous pouvons à la lumière de ces études, comprendre pourquoi les échantillons de chiens atteints de DA, parfois analysés six mois après leur prélèvement, présentent une qualité très diminuée, et sont parfois inexploitable. Les autres échantillons, plus récents, peuvent présenter un faible rendement d'extraction et peuvent nécessiter, après quelques mois de stockage, la réalisation du protocole de PCR « One-Step » pour optimiser les chances de pouvoir réaliser une PCR au regard d'une quantité très faible d'acide nucléique. En vue d'améliorer le protocole, il pourrait être intéressant d'étudier l'évolution de nos échantillons de sang total avec nos conditions de conservation, en évaluant le rendement de l'extraction et le RIN en fonction du temps de stockage et de congélation. De plus, étant donné l'existence d'une cinétique de dégradation des acides nucléiques lors de leur conservation, même après congélation, il serait raisonnable d'analyser nos échantillons après un intervalle de temps fixe de congélation, afin d'éviter de sous-estimer les quantités initiales de certains échantillons plus que d'autres. Cela nécessiterait une adaptation de l'essai multicentrique afin de centraliser l'envoi des échantillons.

#### b) ARNm ou protéines

L'effet pharmacologique des cytokines, biomarqueurs protéiques recherchés dans notre étude, provient de leur liaison à un récepteur membranaire. La quantification de ces cytokines à l'échelle protéique pourrait donc être pertinente dans le cadre de notre étude. Cependant, celles-ci ont un temps de demi-vie de quelques heures limitant la faisabilité d'une telle analyse (104). Elles sont produites par phase, en très faibles quantités et leur lieu de production s'avère également important dans leur détection. Un prélèvement sanguin représente une capture d'un instant  $t$ , entre la traduction de l'ARNm et la dégradation protéique, potentiellement différent de la production moyenne (105). Une étude menée chez des patients asthmatiques montre d'ailleurs une grande variabilité (facteur 3 à 10) de la quantité sérique en IL-13 protéique inter et intra-individuelle au sein de la cohorte saine (104). Dans la plupart des études comme la nôtre, il est choisi d'évaluer les ARNm codant pour ces protéines.

Pal et al., en 2020, a voulu corréler la quantité d'ARNm et de protéines cytokines après stimulation de PBMC ou de sang total congelé. La corrélation était inférieure à 41%, dans le meilleur des cas, pour l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  (106). L'étude d'Israelsson et al. en 2020 semble également montrer que la traduction de l'ARNm n'est pas corrélée à la quantité d'ARNm et qu'il est donc insuffisant de considérer le niveau d'ARNm pour déterminer la quantité de protéines produites mais que ce niveau d'ARNm peut être utilisé à la place des quantités de protéines dans le cas de comparaison de cohortes par exemple (105). Une différence significative entre quantité d'ARNm et protéines (CD4 et IFN- $\gamma$ ) a également été mise en évidence dans l'étude de Van Hoof et al. (107).

Il semblerait que cette corrélation dépende également des cytokines recherchées (108).

Les études de Liu et al. en 2016 et celle de Maier et al. en 2009 mettent en avant plusieurs hypothèses expliquant la différence entre quantités d'ARNm et production protéique (109,110). Lors de la transcription d'un ADN en ARNm, plusieurs isoformes sont possiblement produits. Les isoformes ne possèdent pas tous la séquence codant pour la protéine. Ainsi, comparer la quantité de protéines au niveau d'ARNm général dans ces conditions peut modifier les corrélations. Seule une partie de la variance de la quantité de protéine semble être expliquée par les variations quantitatives de l'ARNm. De plus, les variations des quantités d'ARNm et de la quantité de protéines sont décalées dans le temps car dépendantes des étapes post-transcriptionnelles, de la présence de facteurs *cis* et *trans*, de la traduction elle-même dépendante des ribosomes, de l'ATP et de leur disponibilités dans la cellule, des étapes post-traductionnelles et de la demi-vie protéique. Lors de la stimulation de cellules dendritiques avec du LPS, on obtient la meilleure corrélation ARNm/protéines 12 heures après stimulation (111).

Les corrélations n'étant pas toujours possibles, il s'agit d'être prudent lors de l'interprétation d'une quantité d'ARNm présent dans un échantillon biologique. Il n'est pas possible d'associer directement l'évolution de la quantité d'ARNm de cytokines inflammatoires Th1 (TNF- $\alpha$ ) ou Th2 (IL-4, IL-13 ou IL-31) à une évolution de la clinique de l'animal, les quantités d'ARNm n'étant pas corrélées aux quantités de protéines et la corrélation entre la quantité de protéines et la clinique restant hypothétique. Cependant, il est important de préciser que l'objectif n'est pas de mettre en évidence les cytokines impliquées directement dans le mécanisme physiopathologique de la DA mais bien d'identifier des cytokines, qui se retrouveraient davantage chez des individus atteints que des individus sains et qui constitueraient ainsi des biomarqueurs de la maladie.

La RT-qPCR a donc été choisie au profit d'autres méthodes également décrites dans les quantifications de cytokines, comme l'ELISA (quantification de la protéine) ou de l'ELISPOT (quantification de la protéine liée à son récepteur). La RT-PCR a l'avantage d'être une technique rapide, sensible qui ne nécessite qu'une infime quantité d'ARNm. De plus l'identification des cytokines par des méthodes ELISA nécessitent des échantillons de taille plus importante et ne permettent l'identification que d'un faible nombre de protéines via cet

échantillon (112). Par ailleurs, la disponibilité des anticorps nécessaires à la réalisation d'ELISA est limitée. Leur coûts sont également élevés et les données concernant leurs spécificités ne sont pas claires.

### c) Choix du prélèvement

Il a été choisi dans le cadre de l'étude d'utiliser comme échantillon le sang afin d'extraire les ARNm des cytokines recherchées pour des raisons de praticité. En effet, ce type de prélèvement peut représenter un biais dans la mesure où le site prélevé ne correspond pas réellement ou directement au site de l'inflammation.

Dans une étude évaluant le profil cytokinique systémique (sérum) et local (lavage nasal) d'individus sensibilisés aux HDM en comparaison avec celui d'individus non sensibilisés, une corrélation négative entre l'IL-22 sérique et nasal ainsi qu'une corrélation positive entre l'IFN- $\gamma$  systémique et nasal ont été trouvées (114). Aucune corrélation n'a été mise en évidence pour les autres cytokines (IL-10, IL-13, IL-17, IL-33). Cela suggère que l'évaluation des cytokines sériques ne reflète pas toujours le profil cytokinique local (114). L'étude de Fedenko et al. en 2011, réalisée sur 48 patients atteints de DA, suggère que l'utilisation de biopsies cutanées est plus appropriée que le sang total dans la recherche de ces profils cytokiniques (115). En effet, aucune corrélation entre profil de la peau et profil du sang n'a été mise en évidence. Par ailleurs, aucune différence d'expression des cytokines sanguines n'a été mise en évidence entre patient sain et patient atteint de DA (115).

Cependant, des quantifications des ARNm de cytokines sériques ont été corrélées au score clinique de la DA chez l'Homme, et corrélées aux quantifications de ces mêmes ARNm au sein de biopsies cutanées de peaux lésionnelles et non lésionnelles chez des individus atteints de DA dans une étude de Brunner en 2017 (116).

La mesure des cytokines ou ARNm codants pour ces cytokines dans le sang peut être un bon compromis. En effet, les corrélations entre les ARNm systémiques et locaux ne sont pas systématiques mais ont été mises en évidence dans certaines études. De plus, nous recherchons des biomarqueurs, qui même s'ils ne peuvent être acteurs directs dans la formation des lésions de DA, peuvent s'avérer significativement différents entre des individus sains et des individus atteints de DA et dont la présence peut être corrélée notamment à la sévérité des lésions. Les résultats des études peuvent paraître contradictoires, sont souvent obtenus sur de petites cohortes, mais certains avancent des résultats intéressants, comme celle de Koury et al. en 2019, Majewska et al. en 2016, Nuttall et al. en 2002 et Esnault et al. en 1996 (10, 51, 52, 117). Koury présente une différence des quantités d'interleukines (IL-13, IL-31, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10) entre les neuf chiens atteints de DA et les huit chiens sains recrutés, via une technique ELISA (117). Cette différence est cependant non significative pour l'IL-13 et le TNF- $\alpha$ , mais l'échantillon est de petite taille. Esnault présente lui une différence significative pour les ARNm codant pour l'IL-4 et le l'IL-13 (52). De plus, il ne paraît pas envisageable d'un point de vue éthique et pratique de réaliser des biopsies cutanées sous sédation/anesthésie

générale, chez des chiens sains et à 8 reprises sur des chiens atteints de DA comme il serait nécessaire de le faire dans notre étude. Par ailleurs, si l'on devait réaliser des biopsies cutanées, la question de quelle lésion à privilégier devrait se poser. L'utilisation du sang comme échantillon biologique reflète le profil systémique global et pourrait être plus fiable que les biopsies cutanées, car exempt de la variabilité inter-lésionnelle (117).

### 3. Questionnements sur le protocole

#### a) Utilisation des gammes, choix des gènes d'intérêt et du gène de ménage

Un biomarqueur est une caractéristique biologique (moléculaire, cellulaire par exemple) qui peut être mesurée de manière objective dans un milieu biologique (sang, tissu) et servir d'indicateur d'un processus biologique normal, pathologique ou encore d'une réponse à un traitement pharmacologique. Pour nous, un bon biomarqueur doit se retrouver dans le sang de l'individu, doit pouvoir discriminer un individu sain de DA et un individu atteint de DA et doit pouvoir donner des résultats reproductibles (118).

Les ARNm codant pour les cytokines peuvent constituer des biomarqueurs d'effet, modifier dans le cadre d'une maladie comme la DA.

Nous avons choisi pour notre étude d'étudier le profil d'expression des ARNm de quatre cytokines : (IL-4, IL-13, IL-31 et TNF- $\alpha$ ). Le choix repose sur une analyse bibliographique de plusieurs études montrant des différences des niveaux d'expression de ces cytokines circulantes ou dans la peau, à l'échelle transcriptomique et/ou protéique, entre des chiens atteints de DA et des chiens sains (10,18,55,57). Par ailleurs, ces cytokines constituent un choix pertinent au regard de la physiopathologie de la maladie, impliquant la voie Th2 (IL-4, IL-13 et IL-31), parfois associée à une voie TH1 (TNF- $\alpha$  notamment).

Afin de discriminer les individus sains des individus malades, les cytokines choisies doivent être au maximum spécifiques de la DA. Il paraît difficile d'isoler des médiateurs inflammatoires n'intervenant que dans une maladie. Les cytokines choisies interviennent dans d'autres maladies allergiques, auto-immunes, prurigineuses (IL-31), néoplasiques mais certaines cytokines s'avèrent surexprimées davantage dans des conditions d'allergie. La quantité de TARC (protéine) a été montrée, au sein d'une cohorte de 455 individus, significativement plus augmentée dans le sang périphérique des individus atteints de DA que des individus sains ou atteints d'asthme allergique. De plus l'évolution de la concentration du TARC était corrélée à l'évolution de la DA sous traitement ciclosporine (119). Le TSLP (protéine) serait également impliqué dans la physiopathologie de la DA, et significativement augmenté chez des individus atteints. Cependant cette cytokine est aussi impliquée dans d'autres maladies allergiques, néoplasiques par exemple (120). Cependant, ces différences n'ont été montrées qu'à l'échelle protéique. Or, nous avons précédemment qu'il n'existait pas de corrélation entre ARNm et protéines.

L'autre difficulté dans notre étude relève du peu de données bibliographiques quant à la séquence des gènes chez le chien. La conception des amorces se trouvent limitées par cet aspect.

D'autre part, pour valider la méthode de quantification il est important de pouvoir établir des gammes standards pour chaque gène afin de déterminer une efficacité de la réaction de PCR et de quantifier correctement l'expression des gènes selon la méthode de Pfaffl (98). Or ces gammes standards ne peuvent être établies que sur des échantillons qui expriment la cytokine donc potentiellement des animaux atteints de DA. L'expression de ces cytokines n'étant pas continue ni simultanée il devient délicat de choisir le bon prélèvement à partir duquel établir ces gammes. A cette difficulté s'ajoute celle de la quantité très faible en acide nucléique discutée plus haut limitant les réactions de PCR par échantillon.

C'est la raison pour laquelle, nous avons voulu développer un modèle in vitro de stimulation des PBMC par du LPS pour simuler une réaction inflammatoire et mieux contrôler la production de cytokines et établir ces gammes. Malheureusement, cela n'a pas pu être fait pour l'IL31 que nous n'avons pas pu détecter dans ces conditions.

L'idéal est de réaliser plusieurs gammes pour chaque gène afin de calculer une efficacité de la qPCR plus précise, moyenne des efficacités de chaque gamme. Cependant, il n'a été possible de réaliser trois gammes que pour le TNF- $\alpha$  et le GAPDH, une gamme pour l'IL-4 et une gamme pour l'IL-13. Des différences mineures d'efficacité se répercutent mathématiquement de manière significative sur le calcul des quantités et quantités relatives. En effet, chez un même chien et pour un CT identique de 22, la quantité relative de TNF- $\alpha$  par rapport à GAPDH est d'environ  $5,2 \cdot 10^{-3}$  (Efficacité = 2,05) et celle d'IL-4 de  $1,9 \cdot 10^{-3}$  (Efficacité = 2,15). L'objectif de l'étude n'est pas de comparer les expressions de deux gènes entre eux mais de comparer les expressions d'un même gène au sein de deux populations différentes. Pour un même protocole et un même gène, l'efficacité devrait être la même. Cependant, on observe pour le TNF- $\alpha$  et le GAPDH une variabilité au sein des 3 efficacités calculées via les 3 courbes standards réalisées. En effet, on obtient une moyenne de 2,05 et l'intervalle de confiance à 95 % suivant [1,74 ; 2,35] pour le GAPDH et une moyenne de 2,05 avec l'intervalle de confiance à 95 % suivant [1,92 ; 2,19] pour le TNF- $\alpha$ . Or, l'on estime l'efficacité idéale d'une qPCR à une valeur de 2, valeur d'ailleurs utilisée dans les méthodes simplifiées de calcul. Il serait donc intéressant d'obtenir deux autres courbes standards pour les gènes IL-4 et IL-13, afin de se rapprocher d'une efficacité moyenne acceptable comprise entre 1,9 et 2,1. Ainsi, on retrouverait des résultats proches des résultats que l'on obtiendrait avec la méthode « Delta-delta » (efficacité de 2) et la comparaison des quantifications relatives entre la cohorte saine et la cohorte atteinte de DA serait plus aisée.

Des amorces IL-22 et TSLP ont aussi été testées sans succès. Cet échec peut s'expliquer par le fait que ces cytokines ne sont pas présentes ou parce que les amorces utilisées ne sont pas adaptées. De plus, selon les études, les expressions de certaines cytokines, à l'échelle transcriptomique ou protéique, s'avèrent être parfois significativement augmentées, d'autre

fois diminuées, ou non significativement différentes entre une cohorte d'individus sains et une cohorte d'individus atteints de DA. C'est le cas notamment de l'IL-10 et de l'IFN- $\gamma$  (10, 18, 116, 121).

Les cytokines utilisées pour l'étude restent donc pertinentes d'un point de vue théorique, bibliographique et pratique. En effet, elles sont impliquées dans le mécanisme physiopathologique de la DA et leur présence dans le sang circulant et/ou localement dans la peau a été montrée significativement différente entre des individus sains et des individus atteints de DA, dans des cohortes de petites tailles. Enfin, nous avons pu valider notre méthode avec uniquement ces cytokines compte tenu des difficultés explicitées plus haut. Cependant, il serait opportun de rechercher un ensemble de cytokines des différentes voies :

- Th2 : IL-4, IL-13, IL-22
- Th1 : TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$
- Treg : IL-10
- IL-31, IL-33, IL-17, TSLP, TARC

La réalisation d'une étude reposant sur la quantification par RT-PCR nécessite également l'utilisation de gènes de ménage, gènes dont l'expression doit être identique dans tous les échantillons analysés et non modifiée par les conditions de l'expérience ou de l'étude. Leur utilisation minimise les variations intra et inter-PCR comme celles liées à la rétrotranscription. De nombreuses critiques ont été faites sur leur utilisation au début des années 2000 et notamment sur le GAPDH (112). Dans l'étude de Chimura et al. en 2011 cherchant à identifier les meilleurs gènes de ménage pour les RT-qPCR sur sang total de chien, le GAPDH n'est pas présenté comme le gène de référence le plus stable que ce soit avec les techniques statistiques GeNorm<sup>®</sup>, Normfinder<sup>®</sup> ou BestKeeper<sup>®</sup> (113). Ces dernières permettent de calculer la variabilité transcriptionnelle du gène entre plusieurs échantillons et la corrélation des niveaux de transcription par paires de gènes de référence. Ils justifient aussi statistiquement l'intérêt d'utiliser deux à trois gènes de ménage (113). Cependant, nous étions, au cours de l'étude, restreint en nombre de gènes d'intérêt car la quantité de matériel génétique était limitée après extraction. Il a donc été choisi de se limiter à un seul gène de ménage. De plus, de tous les gènes de ménage testés, seul le GAPDH a pu être expérimentalement validé. Il s'avère qu'au cours de nos manipulations, au sein de la cohorte des 29 chiens sains de dermatite atopique, l'expression du GAPDH s'est avéré assez stable, avec une quantité moyenne définie par :

*Efficacité*<sub>GAPDH</sub><sup>-CT (GAPDH)</sup> de  $2,5 \cdot 10^{-5} \pm 5,8 \cdot 10^{-6}$  c'est-à-dire l'intervalle de confiance à 95 % suivant :  $[1,89 \cdot 10^{-5} ; 3,05 \cdot 10^{-5}]$ .

#### b) Utilisation du protocole de PCR « One-Step »

Les échantillons sanguins prélevés sur les chiens atteints de DA sont réalisés sur sept mois. Les huit échantillons sanguins prélevés sur un même chien au cours de l'étude sont analysés pour l'évaluation de l'expression des ARNm cytokiniques à la suite les uns des autres. Les échantillons ont donc, lors de l'extraction, parfois été prélevés plusieurs mois auparavant. Le matériel génétique, malgré la congélation, est, comme vu précédemment, altéré et donc en plus faible quantité que dans un échantillon de sang récemment prélevé. L'extraction de l'ARNm ne permettait pas d'obtenir une quantité suffisante de matériel génétique pour initier une qPCR standard. Il a donc été décidé, dans l'optique d'utiliser ces échantillons de chiens atteints de DA, d'utiliser un protocole de PCR dit « One-Step ». Son utilisation est nécessaire dans notre cas mais apporte un biais dans l'analyse des données. En effet les quantités relatives dépendent de l'efficacité de la qPCR pour un gène donné. Or, toutes les efficacités de la qPCR « One-Step » sont conventionnellement approximés à 2 par la méthode « Delta-delta ». Des gammes standards pourraient être envisager en utilisant cette méthode sur des échantillons cellulaires de PBMC stimulés.

#### 4. Questionnements sur les résultats

##### a) Validité des résultats

Il a été décidé, lors de la comparaison des cohortes de chiens sains et de chiens atteints de DA, de prendre en compte uniquement les échantillons des visites n°2 des chiens atteints, 15 jours après initiation du traitement. Il aurait été plus pertinent d'utiliser les visites n°1, de pré-inclusion, mais les manipulations de ces visites pourtant faites de manière systématique n'ont pas pu être menées jusqu'à la qPCR, en raison d'un manque de matériel génétique dans l'échantillon ou de l'absence de prélèvement sanguin pour cette visite. Ainsi, il nous a paru raisonnable de considérer que les quantités relatives des ARNm des cytokines inflammatoires dans du sang de chien sous traitement immunomodulateur sont plus faibles que celles avant traitement. Ainsi dans notre cas où l'on observe une quantité d'ARNm codant pour l'IL-4 et IL-13 significativement plus importante dans la cohorte de chiens atteints de DA (visite n°2) que dans la cohorte saine, on suppose qu'il aurait été de même pour les échantillons de la visite n°1.

Il a été nécessaire d'utiliser la méthode « Delta-delta » pour le calcul des quantités relatives des échantillons issus des chiens atteints de DA. Nous avons donc comparé des quantités relatives calculées avec les efficacités issues des gammes pour la cohorte saine avec les quantités relatives calculées à partir de l'efficacité idéale de la méthode « Delta-delta » pour la cohorte des chiens atteints. Cependant, les tests statistiques ont également été réalisés sur les quantités relatives, majorées, que l'on aurait obtenues pour la cohorte saine avec la

méthode « Delta-delta » et on observe alors toujours une différence significative entre les deux cohortes pour les quantités d'ARNm codant pour l'IL-4 et IL-13.

Il aurait été idéal d'avoir deux cohortes de taille et caractéristiques proches pour comparer les quantités relatives d'ARNm. Au vu des intervalles de confiance calculés, la dispersion des résultats pour un gène au sein d'une cohorte est importante. Pour cela, augmenter le nombre d'échantillons en augmentant le nombre d'individus dans chaque cohorte s'avèrerait nécessaire afin d'obtenir une étude plus puissante et significative. En effet, la moyenne issue de 29 valeurs est comparée statistiquement à la moyenne issue de 3 valeurs pour le TNF- $\alpha$ . Le résultat aurait peut-être été davantage significatif si la taille de l'échantillon était plus importante.

#### b) Nos résultats et comparaison avec la littérature

On retrouve une expression hétérogène de l'IL-13 au sein de notre cohorte de chiens sains et de notre cohorte de chiens atteints de DA. Cependant et malgré la dispersion des valeurs, il semblerait que, la quantité relative d'ARNm codant pour l'IL-13 soit significativement plus importante chez les chiens atteints de DA que chez les chiens sains. Ce résultat est cohérent avec l'étude d'Esnault et al. (1996), dans laquelle les ARNm cytokiniques retrouvés dans les PBMC y sont mesurés par RT-qPCR chez 12 chiens diagnostiqués d'une DA et 12 chiens sains (52). Dans cette étude, l'expression de l'IL-4 est aussi significativement plus importante chez les chiens atteints de DA que chez les chiens sains, ce que l'on retrouve dans le cadre de notre étude. Par ailleurs, il ne retrouve pas de différence significative pour les cytokines de la voie Th1 (IFN- $\gamma$  et IL-2) comme nous ne retrouvons pas de différence significative pour le TNF- $\alpha$ . Dans l'étude de Majewska et al. (2016), des différences significatives des transcriptomes sanguins, évalués par l'utilisation de micropuces à ARN, entre des animaux sains (n=8) et atteints de DA (n=20) sont retrouvés pour le TNF- $\alpha$  et pour l'IL-13 mais pas pour l'IL-4 (10). Dans l'étude de Nuttall et al. (2002), les niveaux d'expression cutanée des ARNm de TNF- $\alpha$  et IL-4 sont significativement plus importants chez le chien atteint de DA que le chien sain (51). Les résultats retrouvés au cours de notre étude semblent en adéquation avec ce qui est retrouvé dans d'autres études et également avec la physiopathologie de la maladie. Les cytokines de la voie Th2 semblent plus exprimées chez les chiens atteints de DA.

Il est difficile d'expliquer pourquoi nous avons retrouvé du TNF- $\alpha$  chez l'intégralité des chiens de la cohorte saine et chez seulement 33 % des chiens de la cohorte de chiens de DA analysés. Comme nous l'avons indiqué dans la première partie de ce manuscrit, il s'agit d'une balance entre plusieurs voies immunologiques, plusieurs LTh. Il n'y a pas d'incompatibilité entre ces voies, mais la voie Th2 inhiberait théoriquement la voie Th1. Il est possible qu'au sein de notre cohorte de chiens atteints de DA, la surexpression de cette voie Th2, observée au travers des quantités relatives d'ARNm codant pour IL-4 et IL-13 significativement augmentées, soit à l'origine de l'absence d'expression de cette voie Th1 chez une majorité des chiens analysés.



Nous n'avons pas mis en évidence l'expression d'IL-31 que ce soit chez nos chiens sains ou nos chiens atteints de DA. La première explication serait un défaut d'amorce. Cependant, lors de la réalisation de nos gammes, de l'ARNm codant pour l'IL-31 a pu être isolé et confirmé notamment par l'examen de la courbe de fusion et séquençage, ce qui remet en question cette première hypothèse.

Il est également possible que les concentrations en ARNm codant pour l'IL-31 soient minimales dans nos échantillons et que celles-ci passent sous les seuils de détection de la RT-qPCR suite à la congélation et la conservation sur plusieurs mois.

Enfin il est aussi possible que l'IL-31 soit essentiellement produite localement dans la peau avec peu de diffusion sanguine et que les ARNm ne soient alors pas détectables dans cet échantillon biologique. Cependant l'étude de Koury et al. (2019) met en évidence une différence significative du niveau d'IL-31 (protéique) sérique entre les chiens atteints de DA et les chiens sains (117). La méta-analyse de Lu et al. (2018) met en évidence des résultats similaires (57). De l'IL-31 serait donc bien présent dans le sang, ce qui laisse penser que les ARNm codant pour l'IL-31 aussi.

Il serait nécessaire de renouveler les cultures de PBMC in vitro pour de nouveau réaliser une gamme pour l'IL-31. Il s'agira en suite d'analyser des échantillons récents de chiens atteints de DA, en visite n°1 avant toute initiation du traitement.



## CONCLUSION

La dermatite atopique canine est proche, d'un point de vue physiopathologique et clinique, de l'eczéma atopique chez l'Homme. Elle repose, en premier lieu, sur une anomalie de la barrière cutanée, mise en évidence par une perte insensible en eau, et, secondairement, sur une exposition anormale aux allergènes de l'environnement. Les voies immunologiques mises en jeu sont nombreuses avec divers effecteurs cellulaires dont les LTh2, majoritaires, LTh1, LTh17, LTh22, LT CD8<sup>+</sup> et granulocytes.

Le diagnostic de la dermatite atopique demeure un diagnostic d'exclusion. Il est nécessaire pour le clinicien de mener une démarche rigoureuse, reposant sur l'anamnèse et l'observation des lésions, ainsi que sur l'exclusion d'autres causes de prurit chronique primaires ou secondaires à la dermatose allergique au moyen d'examens complémentaires ciblés. A la suite du diagnostic, des traitements divers dont des immunomodulateurs peuvent être mis en place selon la sévérité des lésions. Il est important d'impliquer le propriétaire qui doit comprendre qu'il s'agit d'un traitement contraignant durant toute la vie de l'animal. L'observance et l'adhésion au traitement sont essentielles.

Le suivi clinique de l'animal s'avère être important et repose sur la détermination par le clinicien de scores lésionnels (CADESI-04, CADLI) et par le propriétaire des scores de prurit (pVAS, VNS). Dans le cadre d'un essai clinique en cours visant à comparer deux thérapeutiques, nous avons souhaité identifier des biomarqueurs sanguins de l'efficacité des traitements. A ce titre, nous avons identifié quatre cytokines (IL-4, IL-13, IL-31, TNF- $\alpha$ ) et développé une méthode de quantification des ARN messagers par PCR quantitative. Afin d'exploiter les animaux atteints de dermatite atopique recrutés, nous avons recruté une cohorte de 29 chiens sains en vue de caractériser un profil d'expression des cytokines. Ce travail décrit la mise en place de la méthode, les difficultés rencontrées et les principaux résultats. L'étude nécessite d'être poursuivie afin d'atteindre un nombre suffisant d'individus et de comparer une cohorte saine avec une cohorte atteinte de dermatite atopique.



## BIBLIOGRAPHIE

1. SCOTT, Danny, 2001. Structure and Function of the Skin. In : . pp. 1-70. ISBN 978-0-7216-7618-0.
2. OLIVRY, Thierry, WOFFORD, Jessica, PAPS, Judy S. et DUNSTON, Stanley M., 2011. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*. avril 2011. Vol. 22, n° 2, pp. 188-196. DOI [10.1111/j.1365-3164.2010.00938.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00938.x).
3. MILLER, William H., Craig E. GRIFFIN, Karen L. CAMPBELL, George H. MULLER, et Danny W. SCOTT. 2013. *Muller & Kirk's small animal dermatology. 7th ed. St. Louis, Mo: Elsevier*.
4. KATOH, Norito, OHYA, Yukihiro, IKEDA, Masanori, EBIHARA, Tamotsu, KATAYAMA, Ichiro, SAEKI, Hidehisa, SHIMOJO, Naoki, TANAKA, Akio, NAKAHARA, Takeshi, NAGAO, Mizuho, HIDE, Michihiro, FUJITA, Yuji, FUJISAWA, Takao, FUTAMURA, Masaki, MASUDA, Koji, MUROTA, Hiroyuki, YAMAMOTO-HANADA, Kiwako, et COMMITTEE FOR CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS 2018, THE JAPANESE SOCIETY OF ALLERGOLOGY, THE JAPANESE DERMATOLOGY ASSOCIATION, 2020. Japanese guidelines for atopic dermatitis 2020. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*. juillet 2020. Vol. 69, n° 3, pp. 356-369. DOI [10.1016/j.alit.2020.02.006](https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.02.006).
5. SIMON, Michel et REYNIER, Marie, 2016. L'ÉPIDERME, UNE BARRIÈRE SUR TOUS LES FRONTS. <https://biologiedelapeau.fr>. [en ligne]. 9 avril 2016. [Consulté le 29 avril 2022]. Disponible à l'adresse: <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article84>
6. FURUSE, Mikio, HATA, Masaki, FURUSE, Kyoko, YOSHIDA, Yoko, HARATAKE, Akinori, SUGITANI, Yoshinobu, NODA, Tetsuo, KUBO, Akiharu et TSUKITA, Shoichiro, 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier. *The Journal of Cell Biology*. 18 mars 2002. Vol. 156, n° 6, pp. 1099-1111. DOI [10.1083/jcb.200110122](https://doi.org/10.1083/jcb.200110122).
7. VALLADEAU, Jenny, 2006. Les cellules de Langerhans. *médecine/sciences*. 1 février 2006. Vol. 22, n° 2, pp. 144-148. DOI [10.1051/medsci/2006222144](https://doi.org/10.1051/medsci/2006222144).
8. OHL, Lars, 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 1 mai 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15308107/>
9. GAMRADT, Pia, 2017. *Tissue-resident memory T cells in eczema : contribution and protective regulatory mechanisms*. [en ligne]. phdthesis. Université de Lyon. [Consulté le 1 mai 2022]. Disponible à l'adresse: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01962943>

10. MAJEWSKA, Alicja, GAJEWSKA, Małgorzata, DEMBELE, Kourou, MACIEJEWSKI, Henryk, PROSTEK, Adam et JANK, Michał, 2016. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*. 23 août 2016. Vol. 12, n° 1, pp. 174. DOI [10.1186/s12917-016-0805-6](https://doi.org/10.1186/s12917-016-0805-6).
11. JAEGER, K., LINEK, M., POWER, H. T., BETTENAY, S. V., ZABEL, S., ROSYCHUK, R. a. W. et MUELLER, Ralf S., 2010. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*. février 2010. Vol. 21, n° 1, pp. 118-122. DOI [10.1111/j.1365-3164.2009.00845.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00845.x).
12. FAVROT, Claude, STEFFAN, Jean, SEEWALD, Wolfgang et PICCO, Federicca, 2010a. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*. février 2010. Vol. 21, n° 1, pp. 23-31. DOI [10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x).
13. ZUR, Gila, IHRKE, Peter J., WHITE, Stephen D. et KASS, Philip H., 2002. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology*. avril 2002. Vol. 13, n° 2, pp. 89-102. DOI [10.1046/j.1365-3164.2002.00285.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2002.00285.x).
14. GRIFFIN, C. E. et DEBOER, D. J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 20 septembre 2001. Vol. 81, n° 3-4, pp. 255-269. DOI [10.1016/s0165-2427\(01\)00346-4](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(01)00346-4).
15. MEURY, S., MOLITOR, V., DOHERR, M. G., ROOSJE, P., LEEB, T., HOBI, S., WILHELM, S. et FAVROT, C., 2011. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Veterinary Dermatology*. août 2011. Vol. 22, n° 4, pp. 327-334. DOI [10.1111/j.1365-3164.2010.00950.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00950.x).
16. SCHRAM, M. E., TEDJA, A. M., SPIJKER, R., BOS, J. D., WILLIAMS, H. C. et SPULS, Ph I., 2010. Is there a rural/urban gradient in the prevalence of eczema? A systematic review. *The British Journal of Dermatology*. mai 2010. Vol. 162, n° 5, pp. 964-973. DOI [10.1111/j.1365-2133.2010.09689.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09689.x).
17. PRELAUD, P., GUAGUERRE, E., ALHAIDARI, Z., FAIVRE, N., HERIPRET, D. et GAYERIE, A., 1998. Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. *Revue de Médecine Veterinaire (France)*. [en ligne]. 1998. [Consulté le 4 mai 2022]. Disponible à l'adresse: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Reevaluation+of+diagnostic+criteria+of+canine+atopic+dermatitis.&author=Prelaud%2C+P.&publication\\_year=1998](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Reevaluation+of+diagnostic+criteria+of+canine+atopic+dermatitis.&author=Prelaud%2C+P.&publication_year=1998)

18. NUTTALL, Timothy J., MARSELLA, Rosanna, ROSENBAUM, Michele R., GONZALES, Andrea J. et FADOK, Valerie A., 2019. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 juin 2019. Vol. 254, n° 11, pp. 1291-1300. DOI [10.2460/javma.254.11.1291](https://doi.org/10.2460/javma.254.11.1291).
19. OLIVRY, Thierry, DEBOER, Douglas J., FAVROT, Claude, JACKSON, Hilary A., MUELLER, Ralf S., NUTTALL, Tim, PRÉLAUD, Pascal, et INTERNATIONAL TASK FORCE ON CANINE ATOPIC DERMATITIS, 2010. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*. juin 2010. Vol. 21, n° 3, pp. 233-248. DOI [10.1111/j.1365-3164.2010.00889.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00889.x).
20. OLIVRY, Thierry, SARIDOMICHELAKIS, Manolis, NUTTALL, Tim, BENSIGNOR, Emmanuel, GRIFFIN, Craig E., HILL, Peter B., et INTERNATIONAL COMMITTEE ON ALLERGIC DISEASES OF ANIMALS (ICADA), 2014. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*. avril 2014. Vol. 25, n° 2, pp. 77-85, e25. DOI [10.1111/vde.12107](https://doi.org/10.1111/vde.12107).
21. HENSEL, Patrick, SANTORO, Domenico, FAVROT, Claude, HILL, Peter et GRIFFIN, Craig, 2015. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*. 11 août 2015. Vol. 11, n° 1, pp. 196. DOI [10.1186/s12917-015-0515-5](https://doi.org/10.1186/s12917-015-0515-5).
22. YAMAZAKI, Yuriko, NAKAMURA, Yuumi et NÚÑEZ, Gabriel, 2017. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergology International*. 1 octobre 2017. Vol. 66, n° 4, pp. 539-544. DOI [10.1016/j.alit.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.08.004).
23. SANTORO, Domenico, MARSELLA, Rosanna, PUCHEU-HASTON, Cherie M., EISENSCHENK, Melissa N. C., NUTTALL, Tim et BIZIKOVA, Petra, 2015. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Veterinary Dermatology*. avril 2015. Vol. 26, n° 2, pp. 84-e25. DOI [10.1111/vde.12197](https://doi.org/10.1111/vde.12197).
24. MARSELLA, Rosanna, OLIVRY, Thierry, CARLOTTI, Didier-Noel, et INTERNATIONAL TASK FORCE ON CANINE ATOPIC DERMATITIS, 2011. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. juin 2011. Vol. 22, n° 3, pp. 239-248. DOI [10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x).
25. POPA, Iuliana, PIN, Didier, REMOUÉ, Noëlle, REMOUÉ, Nathalie, OSTA, Bilal, CALLEJON, Sylvie, VIDEMONT, Emilie, GATTO, Hugues, PORTOUKALIAN, Jacques et HAFTEK, Marek, 2011. Analysis of epidermal lipids in normal and atopic dogs, before and after administration of an oral omega-6/omega-3 fatty acid feed supplement. A pilot study. *Veterinary Research Communications*. décembre 2011. Vol. 35, n° 8, pp. 501-509. DOI [10.1007/s11259-011-9493-7](https://doi.org/10.1007/s11259-011-9493-7).

26. CORNEGLIANI, Luisa, VERCELLI, Antonella, SALA, Elisabetta et MARSELLA, Rosanna, 2012. Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative preliminary study. *Veterinary Dermatology*. février 2012. Vol. 23, n° 1, pp. 41-44, e9-10. DOI [10.1111/j.1365-3164.2011.01003.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.01003.x).
27. SHIMADA, Kenichiro, YOSHIHARA, Toru, YAMAMOTO, Masahiko, KONNO, Katsuhiko, MOMOI, Yasuyuki, NISHIFUJI, Koji et IWASAKI, Toshiroh, 2008. Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. *The Journal of Veterinary Medical Science*. août 2008. Vol. 70, n° 8, pp. 841-843. DOI [10.1292/jvms.70.841](https://doi.org/10.1292/jvms.70.841).
28. COBIELLA, Danielle, ARCHER, Linda, BOHANNON, Mary et SANTORO, Domenico, 2019. Pilot study using five methods to evaluate skin barrier function in healthy dogs and in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 15 janvier 2019. DOI [10.1111/vde.12723](https://doi.org/10.1111/vde.12723).
29. ZAJĄC, Marcin, SZCZEPANIK, Marcin P., WILKOŁEK, Piotr M., ADAMEK, Lukasz R., POMORSKI, Zbigniew J. H., SITKOWSKI, Wiesław et GOŁYŃSKI, Marcin G., 2014. Assessment of the relationship between transepidermal water loss (TEWL) and severity of clinical signs (CADESI-03) in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*. décembre 2014. Vol. 25, n° 6, pp. 503-506, e83. DOI [10.1111/vde.12150](https://doi.org/10.1111/vde.12150).
30. EGAWA, Gyohei et WENINGER, Wolfgang, 2015. Pathogenesis of atopic dermatitis: A short review. GINHOUX, Florent (éd.), *Cogent Biology*. 31 décembre 2015. Vol. 1, n° 1, pp. 1103459. DOI [10.1080/23312025.2015.1103459](https://doi.org/10.1080/23312025.2015.1103459).
31. CHERMPRAPAI, Suttiwee, BROERE, Femke, GOORIS, Gert, SCHLOTTER, Yvette M., RUTTEN, Victor P. M. G. et BOUWSTRA, Joke A., 2018. Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1 février 2018. Vol. 1860, n° 2, pp. 526-533. DOI [10.1016/j.bbamem.2017.11.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.11.013).
32. SHIMADA, Kenichiro, [sans date]. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 4 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178492/>
33. POPA, Iuliana, REMOUE, Noelle, HOANG, Linh Thuy, PIN, Didier, GATTO, Hugues, HAFTEK, Marek et PORTOUKALIAN, Jacques, 2011. Atopic dermatitis in dogs is associated with a high heterogeneity in the distribution of protein-bound lipids within the stratum corneum. *Archives of Dermatological Research*. août 2011. Vol. 303, n° 6, pp. 433-440. DOI [10.1007/s00403-011-1120-5](https://doi.org/10.1007/s00403-011-1120-5).
34. BERDYSHEV, Evgeny, GOLEVA, Elena, BRONOVA, Irina, DYJACK, Nathan, RIOS, Cydney, JUNG, John, TAYLOR, Patricia, JEONG, Mingum, HALL, Clifton F., RICHERS,



- Brittany N., NORQUEST, Kathryn A., ZHENG, Tao, SEIBOLD, Max A. et LEUNG, Donald Ym, 2018. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI insight*. 22 février 2018. Vol. 3, n° 4, pp. 98006. DOI [10.1172/jci.insight.98006](https://doi.org/10.1172/jci.insight.98006).
35. BENSIGNOR, Emmanuel et VIDEMONT, Emilie, 2022. Weekly topical therapy based on plant extracts combined with lokivetmab in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. février 2022. Vol. 33, n° 1, pp. 68-e22. DOI [10.1111/vde.13004](https://doi.org/10.1111/vde.13004).
36. O'REGAN, G. M. et IRVINE, A. D., 2010. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2010. Vol. 40, n° 7, pp. 965-972. DOI [10.1111/j.1365-2222.2010.03522.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03522.x).
37. CHERVET, Ludovic, GALICHET, Arnaud, MCLEAN, W. H. Irwin, CHEN, Huijia, SUTER, Maja M., ROOSJE, Petra J. et MÜLLER, Eliane J., 2010. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*. août 2010. Vol. 19, n° 8, pp. e343-346. DOI [10.1111/j.1600-0625.2010.01109.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01109.x).
38. ROQUE, Joana Barros, O'LEARY, Caroline A., KYAW-TANNER, Myat, DUFFY, David L. et SHIPSTONE, Michael, 2011. Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. *BMC Research Notes*. 21 décembre 2011. Vol. 4, n° 1, pp. 554. DOI [10.1186/1756-0500-4-554](https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-554).
39. HOWELL, Michael D., KIM, Byung Eui, GAO, Peisong, GRANT, Audrey V., BOGUNIEWICZ, Mark, DEBENEDETTO, Anna, SCHNEIDER, Lynda, BECK, Lisa A., BARNES, Kathleen C. et LEUNG, Donald Y. M., 2009. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. septembre 2009. Vol. 124, n° 3 Suppl 2, pp. R7-R12. DOI [10.1016/j.jaci.2009.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.012).
40. LE LAMER, Marina et PELLERIN, Laurence, 2015. Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 4 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26020560/>
41. PIEREZAN, Felipe, OLIVRY, Thierry, PAPS, Judith S., LAWHON, Sara D., WU, Jing, STEINER, Jörg M., SUCHODOLSKI, Jan S. et RODRIGUES HOFFMANN, Aline, 2016. The skin microbiome in allergen-induced canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. octobre 2016. Vol. 27, n° 5, pp. 332-e82. DOI [10.1111/vde.12366](https://doi.org/10.1111/vde.12366).
42. YAMAZAKI, Yuriko, NAKAMURA, Yuumi et NÚÑEZ, Gabriel, 2017. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergology International*. 1 octobre 2017. Vol. 66, n° 4, pp. 539-544. DOI [10.1016/j.alit.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.08.004).
43. RODRIGUES HOFFMANN, Aline, PATTERSON, Adam P., DIESEL, Alison, LAWHON, Sara D., LY, Hoai Jaclyn, ELKINS STEPHENSON, Christine, MANSELL, Joanne, STEINER, Jörg M., DOWD, Scot E., OLIVRY, Thierry et SUCHODOLSKI, Jan S., 2014. The skin

- microbiome in healthy and allergic dogs. *PloS One*. 2014. Vol. 9, n° 1, pp. e83197. DOI [10.1371/journal.pone.0083197](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083197).
44. SIMOU, Chrisi, THODAY, Keith L., FORSYTHE, Peter J. et HILL, Peter B., 2005. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Veterinary Dermatology*. décembre 2005. Vol. 16, n° 6, pp. 385-391. DOI [10.1111/j.1365-3164.2005.00484.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00484.x).
  45. BRUNNER, Patrick M., GUTTMAN-YASSKY, Emma et LEUNG, Donald Y. M., 2017. The Immunology of AD and its Reversibility with Broad Spectrum and Targeted Therapies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. avril 2017. Vol. 139, n° 4 Suppl, pp. S65-S76. DOI [10.1016/j.jaci.2017.01.011](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.011).
  46. DISPENZA, Melanie C, 2019. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2019. Vol. 40, n° 6, pp. 6.
  47. SAINT-MEZARD, Pierre, BERARD, Frédéric, DUBOIS, Bertrand, KAISERLIAN, Dominique et NICOLAS, Jean-François, 2004. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *European journal of dermatology: EJD*. juin 2004. Vol. 14, n° 3, pp. 131-138.
  48. PARK, Chang Ook et KUPPER, Thomas S., 2015. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nature Medicine*. juillet 2015. Vol. 21, n° 7, pp. 688-697. DOI [10.1038/nm.3883](https://doi.org/10.1038/nm.3883).
  49. PUCHEU-HASTON, Cherie M., BIZIKOVA, Petra, MARSELLA, Rosanna, SANTORO, Domenico, NUTTALL, Tim et EISENSCHENK, Melissa N. C., 2015. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. avril 2015. Vol. 26, n° 2, pp. 124-e32. DOI [10.1111/vde.12205](https://doi.org/10.1111/vde.12205).
  50. RICHTER, Kristen R., NASR, Amirah N. et MEXAS, Angela M., 2018. Cytokine Concentrations Measured by Multiplex Assays in Canine Peripheral Blood Samples. *Veterinary Pathology*. janvier 2018. Vol. 55, n° 1, pp. 53-67. DOI [10.1177/0300985817725388](https://doi.org/10.1177/0300985817725388).
  51. NUTTALL, T. J., KNIGHT, P. A., MCALEESE, S. M., LAMB, J. R. et HILL, P. B., 2002. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. mai 2002. Vol. 32, n° 5, pp. 789-795. DOI [10.1046/j.1365-2222.2002.01356.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2002.01356.x).
  52. ESNAULT, S., BENBERNOU, N., LAVAUD, F., SHIN, H. C., POTRON, G. et GUENOUNOU, M., 1996. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from

- atopic patients. *Clinical and Experimental Immunology*. janvier 1996. Vol. 103, n° 1, pp. 111-118. DOI [10.1046/j.1365-2249.1996.00911.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.00911.x).
53. SCHLOTTER, Yvette M., RUTTEN, Victor P. M. G., RIEMERS, Frank M., KNOL, Edward F. et WILLEMSE, Ton, 2011. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 septembre 2011. Vol. 143, n° 1-2, pp. 20-26. DOI [10.1016/j.vetimm.2011.05.025](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.025).
  54. MARSELLA, Rosanna, OLIVRY, Thierry et MAEDA, Sadatoshi, 2006. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Veterinary Dermatology*. avril 2006. Vol. 17, n° 2, pp. 111-120. DOI [10.1111/j.1365-3164.2006.00508.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2006.00508.x).
  55. GONZALES, Andrea J., HUMPHREY, William R., MESSAMORE, James E., FLECK, Timothy J., FICI, Gregory J., SHELLY, John A., TEEL, Janet F., BMMERT, Gary F., DUNHAM, Steven A., FULLER, Troy E. et MCCALL, Robert B., 2013. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. février 2013. Vol. 24, n° 1, pp. 48- 53.e11-12. DOI [10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x).
  56. MOYAERT, Hilde, VAN BRUSSEL, Leen, BOROWSKI, Stasia, ESCALADA, Monica, MAHABIR, Sean P., WALTERS, Rodney R. et STEGEMANN, Michael R., 2017. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. décembre 2017. Vol. 28, n° 6, pp. 593-e145. DOI [10.1111/vde.12478](https://doi.org/10.1111/vde.12478).
  57. LU, Jianyun, WU, Kathy, ZENG, Qinghai, XIANG, Yaping, GAO, Lihua et HUANG, Jinhua, 2018. Serum interleukin-31 level and pruritus in atopic dermatitis: A Meta-analysis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences*. 28 février 2018. Vol. 43, n° 2, pp. 124-130. DOI [10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.003](https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.003).
  58. LOU, Hongfei, LU, Jingning, CHOI, Eun Byul, OH, Min Hee, JEONG, Mingeum, BARMETTLER, Sara, ZHU, Zhou et ZHENG, Tao, 2017. Expression of IL-22 in the Skin Causes Th2-Biased Immunity, Epidermal Barrier Dysfunction, and Pruritus via Stimulating Epithelial Th2 Cytokines and the GRP Pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1 avril 2017. Vol. 198, n° 7, pp. 2543-2555. DOI [10.4049/jimmunol.1600126](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600126).
  59. JAHNZ-ROZYK, K., TARGOWSKI, T., PALUCHOWSKA, E., OWCZAREK, W. et KUCHARCZYK, A., 2005. Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy*. mai 2005. Vol. 60, n° 5, pp. 685-688. DOI [10.1111/j.1398-9995.2005.00774.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00774.x).
  60. KLONOWSKA, Jolanta, GLEŃ, Jolanta, NOWICKI, Roman J. et TRZECIAK, Magdalena, 2018a. New Cytokines in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis-New Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 9 octobre 2018. Vol. 19, n° 10, pp. E3086. DOI [10.3390/ijms19103086](https://doi.org/10.3390/ijms19103086).

61. WILLEMSE, Ton, 1986. Atopic skin disease: a review and reconsideration of diagnostic criteria. *Journal of Small Animal Practice*. 1 janvier 2010. Vol. 51, pp. 66-73.
62. BRÉMENT, Thomas, LALY, Marie J., COMBARROS, Daniel, GUILLEMAILLE, Dorian, BOURDEAU, Patrick J. et BRUET, Vincent, 2019. Reliability of different sets of criteria in diagnosing canine atopic dermatitis applied to a population of 250 dogs seen in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Dermatology*. juin 2019. Vol. 30, n° 3, pp. 188-e59. DOI [10.1111/vde.12729](https://doi.org/10.1111/vde.12729).
63. PLANT, Jon D., GORTEL, Kinga, KOVALIK, Marcel, POLISSAR, Nayak L. et NERADILEK, Moni B., 2012. Development and validation of the Canine Atopic Dermatitis Lesion Index, a scale for the rapid scoring of lesion severity in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. décembre 2012. Vol. 23, n° 6, pp. 515-e103. DOI [10.1111/j.1365-3164.2012.01113.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01113.x).
64. RYBNÍČEK, J., LAU-GILLARD, P. J., HARVEY, R. et HILL, P. B., 2009. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary Dermatology*. avril 2009. Vol. 20, n° 2, pp. 115-122. DOI [10.1111/j.1365-3164.2008.00728.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00728.x).
65. YOUNG, Amanda J., TORRES, Sheila M. F., KOCH, Sandra N., EISENSCHENK, Melissa N. C. et RENDAHL, Aaron K., 2019. Canine Pruritus Visual Analog Scale: how does it capture owners' perception of their pet's itching level? *Veterinary Dermatology*. octobre 2019. Vol. 30, n° 5, pp. 377-e111. DOI [10.1111/vde.12761](https://doi.org/10.1111/vde.12761).
66. STRZOK, Emily, TORRES, Sheila M. F., KOCH, Sandra N. et RENDAHL, Aaron K., 2022. Validation of the 0-10 verbal numeric scale for assessment of pruritus severity in dogs. *Veterinary Dermatology*. 22 février 2022. DOI [10.1111/vde.13062](https://doi.org/10.1111/vde.13062).
67. NOSBAUM, A., HENNINO, A., ROZIÈRES, A., VOCANSON, M. et NICOLAS, J.-F., 2009. [Epicutaneous testing of patients presenting atopic dermatitis: atopy patch tests]. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*. septembre 2009. Vol. 136, n° 8-9, pp. 630-634. DOI [10.1016/j.annder.2009.06.019](https://doi.org/10.1016/j.annder.2009.06.019).
68. SIEGELS, Doreen, HERATIZADEH, Annice, ABRAHAM, Susanne, BINNMYR, Jonas, BROCKOW, Knut, IRVINE, Alan D., HALKEN, Susanne, MORTZ, Charlotte G, FLOHR, Carsten, SCHMID-GRENDELMEIER, Peter, VAN DER POEL, Lauri-Ann, MURARO, Antonella, WEIDINGER, Stephan, WERFEL, Thomas, SCHMITT, Jochen et THE EUROPEAN ACADEMY OF ALLERGY, Clinical Immunology Atopic Dermatitis Guideline group, 2021. Systemic treatments in the management of atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2021. Vol. 76, n° 4, pp. 1053-1076. DOI [10.1111/all.14631](https://doi.org/10.1111/all.14631).
69. MALLMANN, Stefanie, KLINGER, Christoph J., CLASSEN, Janine, WAGNER, Iris, KLIMA, Andre, CASTELLETTI, Noemi et MÜLLER, Ralf S., 2021. Clinical relevance of intradermal test results in atopic dogs. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K*,

*Kleintiere/Heimtiere*. octobre 2021. Vol. 49, n° 5, pp. 349-356. DOI [10.1055/a-1584-4965](https://doi.org/10.1055/a-1584-4965).

70. OLIVRY, Thierry, DEBOER, Douglas J., FAVROT, Claude, JACKSON, Hilary A., MUELLER, Ralf S., NUTTALL, Tim, PRÉLAUD, Pascal, et FOR THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON ALLERGIC DISEASES OF ANIMALS, 2015. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*. 16 août 2015. Vol. 11, n° 1, pp. 210. DOI [10.1186/s12917-015-0514-6](https://doi.org/10.1186/s12917-015-0514-6).
71. SARIDOMICHELAKIS, Manolis N. et OLIVRY, Thierry, 2016. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. janvier 2016. Vol. 207, pp. 29-37. DOI [10.1016/j.tvjl.2015.09.016](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.016).
72. MAYNARD, L., RÈME, C. A. et VIAUD, S., 2011. Comparison of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled trial. *The Journal of Small Animal Practice*. novembre 2011. Vol. 52, n° 11, pp. 566-572. DOI [10.1111/j.1748-5827.2011.01124.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01124.x).
73. LÖFLATH, A., 2007. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus - a double-blinded, randomized, placebo-controlled study - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 4 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17991160/>
74. PANZUTI, Pauline, 2020. A moisturizer formulated with glycerol and propylene glycol accelerates the recovery of skin barrier function after experimental disruption in dogs - Panzuti - 2020 - Veterinary Dermatology - Wiley Online Library. [en ligne]. [Consulté le 27 avril 2022]. Disponible à l'adresse: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vde.12859>
75. NUTTALL, Tim, MUELLER, Ralf, BENSIGNOR, Emmanuel, VERDE, Maite, NOLI, Chiara, SCHMIDT, Vanessa et RÈME, Christophe, 2009. Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray in the management of canine atopic dermatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Veterinary Dermatology*. juin 2009. Vol. 20, n° 3, pp. 191-198. DOI [10.1111/j.1365-3164.2009.00756.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00756.x).
76. MARSELLA, R., NICKLIN, C. F., SAGLIO, S. et LOPEZ, J., 2004. Investigation on the clinical efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment (Protopic) in canine atopic dermatitis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, cross-over study. *Veterinary Dermatology*. octobre 2004. Vol. 15, n° 5, pp. 294-303. DOI [10.1111/j.1365-3164.2004.00397.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2004.00397.x).
77. BENSIGNOR, Emmanuel et OLIVRY, Thierry, 2005. Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded randomized controlled trial. *Veterinary Dermatology*. février 2005. Vol. 16, n° 1, pp. 52-60. DOI [10.1111/j.1365-3164.2005.00419.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00419.x).

78. OLIVRY, Thierry, FOSTER, Aiden P., MUELLER, Ralf S., MCEWAN, Neil A., CHESNEY, Christopher et WILLIAMS, Hywel C., 2010. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Veterinary Dermatology*. février 2010. Vol. 21, n° 1, pp. 4-22. DOI [10.1111/j.1365-3164.2009.00784.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00784.x).
79. AMBER, Tazein et TABASSUM, Saadia, 2020. Cyclosporin in dermatology: A practical compendium. *Dermatologic Therapy*. novembre 2020. Vol. 33, n° 6, pp. e13934. DOI [10.1111/dth.13934](https://doi.org/10.1111/dth.13934).
80. BERTOK, Jp, 2015. Mineralocorticoid Receptor activation and cyclosporine A-induced nephrotoxicity. . 16 février 2015.
81. STEFFAN, Jean, PARKS, Craig, SEEWALD, Wolfgang, et NORTH AMERICAN VETERINARY DERMATOLOGY CYCLOSPORINE STUDY GROUP, 2005. Clinical trial evaluating the efficacy and safety of cyclosporine in dogs with atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 juin 2005. Vol. 226, n° 11, pp. 1855-1863. DOI [10.2460/javma.2005.226.1855](https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1855).
82. STEFFAN, Jean, FAVROT, Claude et MUELLER, Ralf, 2006. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*. février 2006. Vol. 17, n° 1, pp. 3-16. DOI [10.1111/j.1365-3164.2005.00491.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00491.x).
83. DAMSKY, William et KING, Brett A., 2017. JAK inhibitors in dermatology: The promise of a new drug class. *Journal of the American Academy of Dermatology*. avril 2017. Vol. 76, n° 4, pp. 736-744. DOI [10.1016/j.jaad.2016.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.12.005).
84. GADEYNE, Caroline et LITTLE, Peter, 2014. Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 4 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25109820/>
85. COSGROVE, Sallie B., WREN, Jody A., CLEAVER, Dawn M., WALSH, Kelly F., FOLLIS, Stacey I., KING, Vickie L., TENA, Jezaniah-Kira S. et STEGEMANN, Michael R., 2013. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. décembre 2013. Vol. 24, n° 6, pp. 587-597, e141-142. DOI [10.1111/vde.12088](https://doi.org/10.1111/vde.12088).
86. LITTLE, Peter R. et KING, Vickie L., 2015. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 4 mars 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25496303/>

87. GOUJON, Catherine, VIGUIER, Manuelle, STAUMONT-SALLÉ, Delphine, BERNIER, Claire, GUILLET, Gérard, LAHFA, Morad, FERRIER LE BOUEDEC, Marie-Christine, CAMBAZARD, Frédéric, BOTTIGIOLI, David, GRANDE, Sophie, DAHEL, Karima, BÉRARD, Frédéric, RABILLOUD, Muriel, MERCIER, Catherine et NICOLAS, Jean-François, 2018. Methotrexate Versus Cyclosporine in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Phase III Randomized Noninferiority Trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*. avril 2018. Vol. 6, n° 2, pp. 562- 569.e3. DOI [10.1016/j.jaip.2017.07.007](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.07.007).
88. ROSTANG, Antoine, MOSCA, Marion, JEANNIN, Morgan, LUISSIEZ, Coralie, BERNY, Philippe, FOUREL, Isabelle, PIN, Didier et PROUILLAC, Caroline, 2018. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in healthy beagle dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. octobre 2018. Vol. 41, n° 5, pp. 659-669. DOI [10.1111/jvp.12673](https://doi.org/10.1111/jvp.12673).
89. MARSELLA, Rosanna, CORNEGLIANI, Luisa, OZMEN, Ibrahim, BOHANNON, Mary, AHRENS, Kim et SANTORO, Domenico, 2017. Randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study on the effects of topical blackcurrant emulsion enriched in essential fatty acids, ceramides and 18-beta glycyrrhetic acid on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. décembre 2017. Vol. 28, n° 6, pp. 577-e140. DOI [10.1111/vde.12467](https://doi.org/10.1111/vde.12467)
90. DEBOER, Douglas J., 2017. The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Veterinary Dermatology*. février 2017. Vol. 28, n° 1, pp. 25-e6. DOI [10.1111/vde.12416](https://doi.org/10.1111/vde.12416).
91. MUELLER, Ralf S., 2019. Update on Allergen Immunotherapy. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. janvier 2019. Vol. 49, n° 1, pp. 1-7. DOI [10.1016/j.cvsm.2018.08.001](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.08.001).
92. PFAAR, Oliver, BACHERT, Claus, BUFE, Albrecht, BUHL, Roland, EBNER, Christof, ENG, Peter, FRIEDRICHS, Frank, FUCHS, Thomas, HAMELMANN, Eckard, HARTWIG-BADE, Doris, HERING, Thomas, HUTTEGGER, Isidor, JUNG, Kirsten, KLIMEK, Ludger, KOPP, Matthias Volkmar, MERK, Hans, RABE, Uta, SALOGA, Joachim, SCHMID-GRENDELMEIER, Peter, SCHUSTER, Antje, SCHWERK, Nicolaus, SITTER, Helmut, UMPFENBACH, Ulrich, WEDI, Bettina, WÖHRL, Stefan, WORM, Margitta, KLEINE-TEBBE, Jörg, KAUL, Susanne et SCHWALFENBERG, Anja, 2014. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (ÖGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto- Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional

Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo Journal International*. 2014. Vol. 23, n° 8, pp. 282-319. DOI [10.1007/s40629-014-0032-2](https://doi.org/10.1007/s40629-014-0032-2).

93. RAMIO-LLUCH, Laura, 2020. Allergen-specific immunotherapy in dogs with atopic dermatitis: is owner compliance the main success-limiting factor? - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 1 mai 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33082241/>
94. MARSELLA, Rosanna, 2010. Tolerability and clinical efficacy of oral immunotherapy with house dust mites in a model of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Veterinary Dermatology*. décembre 2010. Vol. 21, n° 6, pp. 566-571. DOI [10.1111/j.1365-3164.2010.00890.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00890.x).
95. WILLEMSE, T., BARDAGI, M., CARLOTTI, D. N., FERRER, L., FONDATI, A., FONTAINE, J., LEISTRA, M., NOLI, C., ORDEIX, L., SCARAMPELLA, F., SCHLEIFER, S., SINKE, J. et ROOSJE, P., 2009. Dermatophagoides farinae-specific immunotherapy in atopic dogs with hypersensitivity to multiple allergens: a randomised, double blind, placebo-controlled study. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. juin 2009. Vol. 180, n° 3, pp. 337-342. DOI [10.1016/j.tvjl.2008.01.004](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.004).
96. TIMM, Katrin, MUELLER, Ralf S. et NETT-METTLER, Claudia S., 2018. Long-term effects of intralymphatic immunotherapy (ILIT) on canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. avril 2018. Vol. 29, n° 2, pp. 123-e49. DOI [10.1111/vde.12517](https://doi.org/10.1111/vde.12517).
97. COLOMBO, Silvia, HILL, Peter B., SHAW, Darren J. et THODAY, Keith L., 2005. Effectiveness of low dose immunotherapy in the treatment of canine atopic dermatitis: a prospective, double-blinded, clinical study. *Veterinary Dermatology*. juin 2005. Vol. 16, n° 3, pp. 162-170. DOI [10.1111/j.1365-3164.2005.00453.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00453.x).
98. PFAFFL, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 1 mai 2001. Vol. 29, n° 9, pp. e45. DOI [10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45).
99. MASSIE, H. R., SAMIS, H. V. et BAIRD, M. B., 1972. The kinetics of degradation of DNA and RNA by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 31 juillet 1972. Vol. 272, n° 4, pp. 539-548. DOI [10.1016/0005-2787\(72\)90509-6](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90509-6).
100. CAMACHO-SANCHEZ, Miguel, BURRACO, Pablo, GOMEZ-MESTRE, Ivan et LEONARD, Jennifer A., 2013. Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*. juillet 2013. Vol. 13, n° 4, pp. 663-673. DOI [10.1111/1755-0998.12108](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12108).
101. BULLA, Alexandre, DE WITT, Brian, AMMERLAAN, Wim, BETSOU, Fay et LESCUYER, Pierre, 2016. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After



- Long-Term Storage. *Biopreservation and Biobanking*. février 2016. Vol. 14, n° 1, pp. 29-38. DOI [10.1089/bio.2015.0045](https://doi.org/10.1089/bio.2015.0045).
102. HUANG, Lien-Hung, LIN, Pei-Hsien, TSAI, Kuo-Wang, WANG, Liang-Jen, HUANG, Ying-Hsien, KUO, Ho-Chang et LI, Sung-Chou, 2017. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PloS One*. 2017. Vol. 12, n° 9, pp. e0184692. DOI [10.1371/journal.pone.0184692](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184692).
103. BAOUTINA, Anna, BHAT, Somanath, PARTIS, Lina et EMSLIE, Kerry R., 2019. Storage Stability of Solutions of DNA Standards. *Analytical Chemistry*. 1 octobre 2019. Vol. 91, n° 19, pp. 12268-12274. DOI [10.1021/acs.analchem.9b02334](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02334).
104. ST LEDGER, Katie, AGEE, Sara J., KASAIAN, Marion T., FORLOW, Stephen B., DURR, Billie L., MINYARD, Jennifer, LU, Quynh Anh, TODD, John, VESTERQVIST, Ole et BURCZYNSKI, Michael E., 2009. Analytical validation of a highly sensitive microparticle-based immunoassay for the quantitation of IL-13 in human serum using the Erenna immunoassay system. *Journal of Immunological Methods*. 31 octobre 2009. Vol. 350, n° 1-2, pp. 161-170. DOI [10.1016/j.jim.2009.08.012](https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.08.012).
105. ISRAELSSON, Pernilla, DEHLIN, Eva, NAGAEV, Ivan, LUNDIN, Eva, OTTANDER, Ulrika et MINCHEVA-NILSSON, Lucia, 2020. Cytokine mRNA and protein expression by cell cultures of epithelial ovarian cancer-Methodological considerations on the choice of analytical method for cytokine analyses. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*. juillet 2020. Vol. 84, n° 1, pp. e13249. DOI [10.1111/aji.13249](https://doi.org/10.1111/aji.13249).
106. R, PAL, J, SCHAUBHUT, D, CLARK, L, BROWN et JJ, STEWART, 2020. Single-Cell Analysis of Cytokine mRNA and Protein Expression by Flow Cytometry. *Current protocols in cytometry*. [en ligne]. mars 2020. Vol. 92, n° 1. [Consulté le 8 mai 2022]. DOI [10.1002/cpcy.69](https://doi.org/10.1002/cpcy.69).
107. VAN HOOFF, Dennis, LOMAS, Woodrow, HANLEY, Mary Beth et PARK, Emily, 2014. Simultaneous flow cytometric analysis of IFN- $\gamma$  and CD4 mRNA and protein expression kinetics in human peripheral blood mononuclear cells during activation. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. octobre 2014. Vol. 85, n° 10, pp. 894-900. DOI [10.1002/cyto.a.22521](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22521).
108. SHEBL, Fatma M., PINTO, Ligia A., GARCÍA-PIÑERES, Alfonso, LEMPICKI, Richard, WILLIAMS, Marcus, HARRO, Clayton et HILDESHEIM, Allan, 2010. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. avril 2010. Vol. 19, n° 4, pp. 978-981. DOI [10.1158/1055-9965.EPI-10-0064](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0064).

109. LIU, Yansheng, BEYER, Andreas et AEBERSOLD, Ruedi, 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 21 avril 2016. Vol. 165, n° 3, pp. 535-550. DOI [10.1016/j.cell.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014).
110. MAIER, Tobias, GÜELL, Marc et SERRANO, Luis, 2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters*. 17 décembre 2009. Vol. 583, n° 24, pp. 3966-3973. DOI [10.1016/j.febslet.2009.10.036](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036).
111. JOVANOVIC, Marko, ROONEY, Michael S., MERTINS, Philipp, PRZYBYLSKI, Dariusz, CHEVRIER, Nicolas, SATIJA, Rahul, RODRIGUEZ, Edwin H., FIELDS, Alexander P., SCHWARTZ, Schraga, RAYCHOWDHURY, Raktima, MUMBACH, Maxwell R., EISENHAURE, Thomas, RABANI, Michal, GENNERT, Dave, LU, Diana, DELOREY, Toni, WEISSMAN, Jonathan S., CARR, Steven A., HACOEN, Nir et REGEV, Aviv, 2015. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science (New York, N.Y.)*. 6 mars 2015. Vol. 347, n° 6226, pp. 1259038. DOI [10.1126/science.1259038](https://doi.org/10.1126/science.1259038).
112. GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R. et MATHIEU, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods (San Diego, Calif.)*. décembre 2001. Vol. 25, n° 4, pp. 386-401. DOI [10.1006/meth.2001.1261](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261).
113. CHIMURA, Naoki, SHIBATA, Sanae, KIMURA, Tsuyoshi, KONDO, Naho, MORI, Takashi, HOSHINO, Yuki, KAMISHINA, Hiroaki et MAEDA, Sadatoshi, 2011. Suitable reference genes for quantitative real-time rt-pcr in total RNA extracted from canine whole blood using the PAXgene™ system. *The Journal of Veterinary Medical Science*. août 2011. Vol. 73, n° 8, pp. 1101-1104. DOI [10.1292/jvms.11-0050](https://doi.org/10.1292/jvms.11-0050).
114. TAMASAUSKIENE, Laura et SITKAUSKIENE, Brigita, 2021. Systemic and local cytokine profile and risk factors for persistent allergic airway inflammation in patients sensitised to house dust mite allergens. *BMC Pulmonary Medicine*. 21 décembre 2021. Vol. 21, n° 1, pp. 424. DOI [10.1186/s12890-021-01798-8](https://doi.org/10.1186/s12890-021-01798-8).
115. FEDENKO, Elena S, ELISYUTINA, Olga G, FILIMONOVA, Tatyana M, BOLDYREVA, Margarita N, BURMENSKAYA, Olga V, REBROVA, Olga Yu, YARILIN, Alexander A et KHAITOV, Rakhim M, 2011. Cytokine gene expression in the skin and peripheral blood of atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Self Nonself*. 2011. Vol. 2, n° 2, pp. 120-124. DOI [10.4161/self.2.2.16939](https://doi.org/10.4161/self.2.2.16939).
116. BRUNNER, Patrick, SUAREZ-FARINAS, Mayte, HE, Helen, MALIK, Kunal, WEN, Huei-Chi, GONZALEZ BASETA, Juana, TOM, Chih-Chieh, CHAN, ESTRADA, Yeriel, ZHENG, Xiuzhong, KHATTRI, Saakshi, DATTOLA, Nancy, KRUEGER, James et GUTTMAN-YASSKY, Emma, 2017. The atopic dermatitis blood signature is characterized by increases in inflammatory and cardiovascular risk proteins. *Scientific Reports*. 18 août 2017. Vol. 7. DOI [10.1038/s41598-017-09207-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09207-z).

117. KOURY, Jeffrey, RAMIREZ, Ana, XIE, Chen, HARB, Jerry, DONG, Charli. 2019. Phosphodiesterase 4D, miR-203 and selected cytokines in the peripheral blood are associated with canine atopic dermatitis - PubMed. [en ligne]. [Consulté le 12 mai 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226136/>
118. HULKA, B. S. et WILCOSKY, T., 1988. Biological markers in epidemiologic research. *Archives of Environmental Health*. avril 1988. Vol. 43, n° 2, pp. 83-89. DOI [10.1080/00039896.1988.9935831](https://doi.org/10.1080/00039896.1988.9935831).
119. HIJNEN, DirkJan, DE BRUIN-WELLER, Marjolein, OOSTING, Bert, LEBRE, Cristina, DE JONG ESTHER, BRUIJNZEEJ-KOOMEN, Carla, KNOL, Edward, 2004. Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis - PubMed, [en ligne]. [Consulté le 13 mai 2022]. Disponible à l'adresse: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14767451/>
120. ZIEGLER, Steven F., ROAN, Florence, BELL, Bryan D., STOKLASEK, Thomas A., KITAJIMA, Masayuki et HAN, Hongwei, 2013. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*. 2013. Vol. 66, pp. 129-155. DOI [10.1016/B978-0-12-404717-4.00004-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404717-4.00004-4).
121. NIWA, Y., 2000. Elevated RANTES levels in plasma or skin and decreased plasma IL-10 levels in subsets of patients with severe atopic dermatitis. *Archives of Dermatology*. janvier 2000. Vol. 136, n° 1, pp. 125-126. DOI [10.1001/archderm.136.1.125](https://doi.org/10.1001/archderm.136.1.125).
122. R CORE TEAM, 2022. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. [en ligne]. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing. Disponible à l'adresse: <https://www.R-project.org/>

## **IDENTIFICATION DE MARQUEURS CYTOKINIQUES D'INTERET PAR RT-QPCR CHEZ LE CHIEN ATTEINT DE DERMATITE ATOPIQUE**

---

Auteur

---

**THENARD Quentin**

Résumé

---

La dermatite atopique canine est une maladie inflammatoire cutanée à la physiopathologie complexe, au diagnostic et à la prise en charge difficile. En effet, la fréquence des suivis, l'apparition de complications, la nécessité d'une observance rigoureuse avec des soins contraignants parfois quotidiens en font une maladie complexe à contrôler. Les méthodes de suivi reposent en pratique sur l'amélioration des signes cliniques c'est-à-dire des lésions cutanées et du prurit, principal symptôme altérant le bien-être de l'animal. Peu d'études cherchent à évaluer l'existence de biomarqueurs de la sévérité de la maladie dont l'évaluation pourrait aider au suivi.

Nous nous sommes intéressés à la recherche de biomarqueurs sanguins au sein d'un groupe de cytokines préchoisies au regard de la physiopathologie de la maladie : TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13, IL-31. Cette recherche repose sur l'extraction d'ARNm au sein d'échantillons sanguins, de leur rétrotranscription suivie d'une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), et ce dans une cohorte de chiens atteints de dermatite atopique et dans une cohorte de chiens sains.

L'étude prospective multicentrique a permis de comparer les profils de 12 chiens atteints de dermatite atopique aux profils de 29 chiens sains. Les ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-13 sont significativement plus présents dans le sang des chiens atteints de dermatite atopique que dans le sang des chiens sains. Aucune différence significative n'est retrouvée dans le cas du TNF- $\alpha$ . L'IL-31 n'a pas pu être isolé au cours de l'étude.

Mots-clés

---

DERMATITE ATOPIQUE, CYTOKINES, BIOMARQUEURS, RT-qPCR, METHOTREXATE

Jury

---

Président du jury	:	<b>Pr</b>	<b>PIN Didier</b>
Directeur de thèse	:	<b>Pr</b>	<b>PROUILLAC Caroline</b>
1er assesseur	:	<b>Pr</b>	<b>PROUILLAC Caroline</b>
2ème assesseur	:	<b>Dr</b>	<b>MOSCA Marion</b>
Membre invité	:	<b>Dr</b>	<b>ROSTANG Antoine</b>