RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

VetAgro Sup

CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2022 - Thèse n° 047

EFFICACITÉ DE L'APPLICATION TOPIQUE D'OZONE DANS LE CADRE DE PYODERMITES CHEZ LE CHIEN : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE, IN VITRO ET CLINIQUE

THESE

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

Et soutenue publiquement le 06 octobre 2022
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

MAHÉAS November

UNIVERSITÉ DE LYON

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

VetAgro Sup

CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2022 - Thèse n° 047

EFFICACITÉ DE L'APPLICATION TOPIQUE D'OZONE DANS LE CADRE DE PYODERMITES CHEZ LE CHIEN : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE, IN VITRO ET CLINIQUE

THESE

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

Et soutenue publiquement le 06 octobre 2022
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

MAHÉAS November

UNIVERSITÉ DE LYON

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France.

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	DELIGNETTE-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	Dorothée	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	Dorothée	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur

REMERCIEMENTS DU JURY

A Monsieur le Professeur Jean-François NICOLAS
De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon Sud,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon Jury de thèse,
Pour votre disponibilité et votre bienveillance,
Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Marion MOSCA
De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,

Pour avoir accepté d'encadrer la réalisation de ce manuscrit,
Pour votre grande disponibilité, votre accessibilité, votre gentillesse, vos corrections rigoureuses, votre enthousiasme ainsi que vos conseils toujours avisés.
Mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Didier PIN,
De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon,

Pour avoir accepté d'être mon second assesseur de thèse,
Pour votre bienveillance et votre rigueur,
Remerciements chaleureux.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ANNEXES 13

TABLE DES FIGURES 15

TABLE DES TABLEAUX 17

LISTE DES ABBREVIATIONS 19

INTRODUCTION 21

PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 23

I.1 L'OZONE 23

I.1.1 L'ozone et son histoire 23

I.1.2 Mode d'action et effets thérapeutiques 24

I.1.2.1 Effet antiseptique 24

I.1.2.2 Effet anti-inflammatoire 25

I.1.2.3 Pouvoir stimulant de la cicatrisation 25

I.1.3 Les indications 25

I.1.4 Les formes d'administration de l'ozone 26

I.1.5 L'huile ozonée 26

I.1.6 Toxicité/ Innocuité 27

I.1.7 Utilisation en dermatologie humaine et animale 28

I.2 LES PYODERMITES CHEZ LE CHIEN 30

I.2.1 Définition et épidémiologie 30

I.2.2 Étiologie 31

I.2.3 Diagnostic 31

I.2.4 Traitement conventionnel 32

I.2.5 L'antibiorésistance 33

I.2.5.1 Définitions 33

I.2.5.2 Prévalence et conséquences thérapeutiques 36

I.2.5.3 Mécanismes de transmission 36

I.2.5.4 Santé publique 37

I.3 CONCLUSION SUR L'INTÉRÊT DE L'ÉTUDE DE L'OZONE TOPIQUE DANS LE CADRE DES PYODERMITES CHEZ LE CHIEN 38

PARTIE II : ÉTUDE *IN VITRO* DE L'EFFET DE L'HUILE OZONÉE SUR DES BACTÉRIES IMPLIQUÉES DANS LES PYODERMITES CANINES ET DE CYTOTOXICITÉ 39
II.1. IDENTIFICATION DE SOUCHES DE BACTÉRIES IMPLIQUÉES DANS LES PYODERMITES CANINES 39
II.1.1 Introduction 39
II.1.2. Matériels et méthodes 39
II.1.2.1 Critères de sélection 39
II.1.2.2 Méthode d'identification 40
II.1.3. Résultats 41
II.1.4. Discussion 42
II.2. ÉTUDE DE L'EFFET DE L'HUILE OZONÉE SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DE *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* 43
II.2.1. Introduction 43
II.2.2. Matériels et méthodes 43
II.2.2.1 Sélection des souches bactériennes 43
II.2.2.2 Huile ozonée et témoin 44
II.2.2.3 Méthode de l'étude 44
II.2.2.4 Évaluation de la croissance bactérienne 47
II.2.2.5 Tests de contrôle négatif et positif 47
II.2.3. Résultats 48
II.2.4. Discussion 50
II.3. ÉTUDE DE CYTOTOXICITÉ DE L'HUILE OZONÉE SUR UNE LIGNÉE DE KÉRATINOCYTES CANINS.....51
II.3.1. Introduction 51
II.3.2. Matériels et méthodes 51
II.3.2.1 Matériels utilisés 51
II.3.2.2 Méthode de mise en contact des cellules avec les huiles 52
II.3.2.3 Méthode de test colorimétrique de cytotoxicité 53
II.3.3. Résultats 54
II.3.3.1 Observation des cellules après mise en contact avec les huiles 54
II.3.3.2 Résultats de l'étude colorimétrique au CCK-8 55
II.3.4. Discussion 56
II.4. CONCLUSION DE L'ÉTUDE IN VITRO 58

PARTIE III : ÉTUDE CLINIQUE DE L'EFFET THÉRAPEUTIQUE DE L'OZONE TOPIQUE SUR DES PYODERMITES LOCALISÉES CHEZ LE CHIEN 59
III.1. INTRODUCTION 59
III.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 59
III.2.1 Critères de sélection des cas 59
II.2.2 Consultation d'inclusion 60
II.2.3 Protocole thérapeutique et suivi clinique 62
II.2.4 Sortie d'étude 63
III.3. RÉSULTATS 64
III.3.1 Cas inclus dans l'étude 64
III.3.2 Cas ayant suivi toute l'étude 64
III.3.2.1 Livaï 64
III.3.2.2 Samy 66
III.3.2.3 Raymonde 67
III.3.2.4 Spotty 69
III.3.3 Cas retirés de l'étude 71
III.3.3.1 Guismo 71
III.3.3.2 Nao 71
III.3.4 Synthèse des résultats pour l'ensemble des cas 72
III.4. DISCUSSION 73
III.5. CONCLUSION DE L'ÉTUDE CLINIQUE 75
CONCLUSION 77
BIBLIOGRAPHIE 79
ANNEXES 85

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Résultat d'identification VITEK®2 GP de la souche « Pin Up »……85

Annexe 1 : Poster scientifique sur l'étude *in vitro* publié au congrès européen de dermatologie vétérinaire 2021……..86

Annexe 2 : Document d'information sur l'étude clinique……..87

Annexe 3 : Fiche de consentement éclairé avant entrée dans l'étude clinique……90

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Formes mésomères de l'ozone……23
Figure 2 : Pustule folliculaire dans le cadre d'une folliculite bactérienne……30
Figure 3 : Furoncle interdigité……31
Figure 4 : Cytologie de pus avec polynucléaires neutrophiles, coques et image de phagocytose……32
Figure 5 : Schéma explicatif d'antibiogramme par diffusion en gélose……34
Figure 6 : A : Souches préservées à décongeler, B : Culture bactérienne sur gélose au sang….40
Figure 7 : Cartes d'identification VITEK® 2 GP et tubes de suspension bactérienne dans cassette VITEK® 2 ……40
Figure 8 : Nombre de souches de chaque espèce identifiée……41
Figure 9 : Répartition des profils de sensibilité des souches de *Staphylococcus pseudintermedius* ……42
Figure 10 : Huile d'olive ozonée PurO3 Ozonated Olive Oil ®……44
Figure 11 : Fabrication de gélose……45
Figure 12 : 72 boites de pétri annotées selon leur composition……46
Figure 13 : A : Test de contrôle négatif, B : Test de contrôle positif ……47
Figure 14 : Effet de la quantité d'huile dans la gélose sur la croissance bactérienne moyenne……48
Figure 15 : Mélanges d'huile ozonée et d'huile d'olive témoin dans des proportions de 0 à 100% d'huile ozonée……52
Figure 16 : Méthode d'étude de cytotoxicité CCK-8 à la suite d'une mise en contact avec les différents mélanges d'huile……53
Figure 17 : Observation au microscope optique des cellules dans les trois conditions testées au bout de 2, 4 et 6 heures d'incubation……54
Figure 18 : Densités optiques des puits après réaction avec le CCK-8……55
Figure 19 : Échelle d'évaluation de prurit et questionnaire d'évaluation du bien-être à remplir par le propriétaire……61
Figure 20 : Évolution des lésions de Livai au cours de l'étude……65
Figure 21 : Bonne évolution des lésions de Samy en 2 semaines……66

Figure 22 : Cytologie de calque par apposition de pus du furoncle de la tête de Raymonde à J0……67
Figure 23 : Évolution des lésions de la tête de Raymonde au cours de l'étude……68
Figure 24 : Évolution des lésions de Spotty au cours de l'étude……70
Figure 25 : Évolution du score clinique au cours du traitement……72
Figure 26 : Évolution du score de prurit au cours du traitement……73

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Volumes d'huile et d'agar dans chaque mélange afin d'obtenir une solution de 20mL avec un pourcentage défini en huile……46

Tableau II : Méthode d'évaluation semi-quantitative de la croissance bactérienne……47

Tableau III : Score de croissance bactérienne pour chaque souche dans chaque type de gélose……48

Tableau IV : Plan de plaque P96……52

Tableau V : Densités optiques moyennes après réaction avec le CCK-8……56

Tableau VI : Score clinique……60

LISTE DES ABBREVIATIONS

AHT : autohémothérapie

AMM : autorisation de mise sur le marché

BOG : prolifération bactérienne de surface (Bacterial Overgrowth Syndrome)

CCK-8 : Cell Counting Kit-8

CHUVAC : centre hospitalier universitaire vétérinaire pour animaux de compagnie

CMI : concentration minimale inhibitrice

CPEK : Canine Progenitor Epidermal Keratinocytes

GEDAC : Groupe d'étude en dermatologie des animaux de compagnie

LOPs : produits de l'oxydation des lipides (Lipid Oxydation Products)

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)

MRSP : *Staphylococcus pseudintermedius* résistant à la méthicilline (Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*)

ROS : espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)

SCCmec : cassette staphylococcique (Staphylococcal cassette chromosome mec)

TSA : Trypcase Soy Agar

INTRODUCTION

De nos jours, l'antibiorésistance est un problème majeur de santé publique et la recherche de nouvelles thérapies pour limiter l'utilisation d'antibiotiques est en plein essor. En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques est la cause directe de plus d'un million de décès humains en 2019 d'après une étude récente (1). L'utilisation des antibiotiques doit donc être raisonnée et limitée au strict nécessaire, notamment en médecine vétérinaire, afin de permettre de maintenir un arsenal thérapeutique efficace pour les affections bactériennes humaines.

Les pyodermites canines sont une des causes majeures de prescription d'antibiotique en médecine vétérinaire. Les bactéries impliquées dans les pyodermites sont connues pour développer des résistances et ces affections deviennent donc de plus en plus difficiles à traiter. Il est nécessaire de développer et d'étudier des nouvelles perspectives thérapeutiques qui sont soit alternatives aux thérapies conventionnelles, soit complémentaires à celles-ci.

La thérapie à l'ozone est une de ces perspectives. Elle est utilisée depuis le 20ème siècle pour traiter diverses affections mais les études de son efficacité sont peu nombreuses. Il n'existe pas, à ce jour, d'étude sur l'utilisation de la thérapie à l'ozone dans le cadre des pyodermites canines. Cette thèse portera donc sur l'étude de l'efficacité de l'ozone topique dans le traitement des pyodermites chez le chien.

Dans une première partie, nous allons réaliser une étude bibliographique permettant de justifier l'intérêt de cette étude. Nous verrons tout d'abord ce qu'est l'ozone, ses principales propriétés thérapeutiques, ses indications, et nous nous concentrerons tout particulièrement sur une de ses formes d'application topique, l'huile ozonée. Nous verrons ensuite, plus en détail, les pyodermites chez le chien : leur étiologie, leur diagnostic, leur prise en charge et les enjeux actuels d'antibiorésistance.

Dans une deuxième partie, nous détaillerons l'étude *in vitro* que nous avons réalisée sur l'effet antibactérien de l'huile ozonée contre les bactéries impliquées dans les pyodermites canines. Nous verrons également une étude sur la toxicité de cette huile ozonée sur une lignée de kératinocytes canins. Cette deuxième partie a pour objectif de justifier des propriétés antiseptiques et non nocives de l'huile ozonée et donc de démontrer qu'il est intéressant de réaliser une étude clinique.

Dans une troisième partie finale, nous détaillerons l'étude clinique que nous avons réalisée dans le but de tester l'efficacité de l'huile ozonée dans le traitement des pyodermites localisées chez le chien.

PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 L'ozone

I.1.1 L'ozone et son histoire

L'ozone, de formule chimique O_3, est une molécule gazeuse composée de 3 atomes d'oxygène. C'est une molécule instable qui se décompose rapidement en oxygène. Son temps de demi-vie est de 20 minutes dans l'eau et de 3 jours dans l'air à 20°C. L'ozone est un hybride de résonance des quatre formes mésomères de la figure suivante (Figure 1) (2).

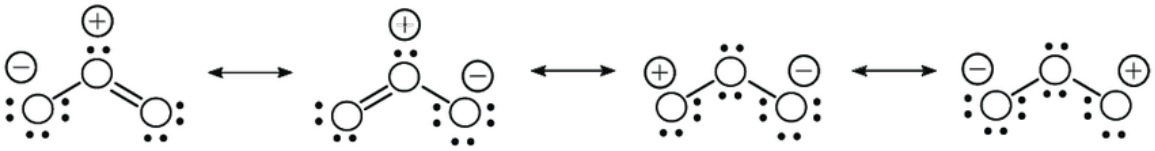

Figure 1 : Formes mésomères de l'ozone (Source : Batakliev *et al.*, 2014)

L'ozone a été découvert dans les années 1840 par le chimiste allemand Christian Friedrich Schönbein qui lui a donné le nom « ozone » qui vient du grec *ozein* et signifie sentir une odeur, en référence à son odeur caractéristique. Son utilisation principale est la désinfection de l'eau mais au cours du siècle dernier, des études ont permis de démontrer ses effets anti-inflammatoires et stimulant de l'immunité (3). Il est utilisé de façon empirique en médecine humaine dans différents pays (Italie, Espagne, Allemagne, Etats-Unis, Chine) depuis une trentaine d'années, mais était peu accepté comme traitement complémentaire en raison d'un manque de connaissance et d'études de son efficacité (4). De nos jours, de nombreuses nouvelles études démontrant son utilité ont été réalisées mais son utilisation reste rare.

L'ozone est un composant atmosphérique naturel présent dans des proportions différentes selon la couche atmosphérique. L'ozone médical est produit à partir d'oxygène pur à l'aide d'un générateur d'ozone, le plus souvent un réacteur à décharge à barrière diélectrique (5). Ce réacteur va générer une décharge électrique qui engendre le clivage des molécules de dioxygène, qui vont alors se recombiner en molécules d'ozone selon la réaction : $3O_2 + 68400$ cal $\rightarrow 2O_3$. Le générateur donne un mélange gazeux composé de minimum 95% d'O_2 et de maximum 5% d'O_3 (4).

I.1.2 Mode d'action et effets thérapeutiques

L'ozone réagit instantanément dès qu'il est dissous dans un liquide biologique (plasma, lymphe, urine) et mis en contact avec des biomolécules, dont les acides gras polyinsaturés et les antioxydants (acide ascorbique, acide urique, albumine, …) naturellement présents dans ces liquides. Ces molécules sont oxydées selon la réaction :

$R\text{-}CH{=}CH\text{-}R' + O_3 + H_2O \rightarrow R\text{-}CH{=}O + R'\text{-}CH{=}O + H_2O_2$

Cette réaction aboutit à la formation d'une mole de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui est une espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS), ainsi que 2 moles de produits de l'oxydation des lipides (Lipid Oxidation Products : LOPs) qui vont agir comme molécules de signalisation d'un stress oxydatif aigu. Ceci va permettre l'activation d'enzymes antioxydantes dont l'hème-oxygénase 1 (HO-1) et la libération de monoxyde d'azote NO, de monoxyde de carbone CO et de nombreux facteurs de croissance endothéliaux. Une activation immunitaire des leucocytes est également provoquée, ce qui mène à la libération de cytokines anti-inflammatoires.

I.1.2.1 Effet antiseptique

L'ozone a un fort pouvoir antiseptique, démontré depuis plusieurs décennies. Il est utilisé depuis le 20ème siècle pour la désinfection de l'eau potable en Europe. Une étude montre qu'il a le même pouvoir antiseptique que la chlorhexidine, sans ses effets néfastes cytotoxiques (6). Pour son mécanisme d'action, lorsque l'ozone rentre en contact avec la paroi bactérienne, les phospholipides et lipoprotéines sont oxydés ce qui engendre une instabilité de cette paroi. L'ozone va ensuite pouvoir pénétrer dans la bactérie et provoquer l'oxydation des glycoprotéines et glycolipides du cytoplasme, ce qui bloque le fonctionnement enzymatique et engendre la mort de la bactérie.

L'ozone est aussi efficace pour tuer les virus, les agents fongiques et les protozoaires. Il agit également indirectement en stimulant une réponse immunitaire : il augmente la quantité de leucocytes, stimule la capacité phagocytaire des granulocytes, facilite la formation de monocytes et active les lymphocytes T. Il engendre la libération de cytokines stimulant un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (7).

I.1.2.2 Effet anti-inflammatoire

L'ozone est utile pour diminuer l'inflammation et la douleur, notamment en cas d'arthrite et de hernie discale (8). Il agit en réduisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires et en activant l'interleukine 10 anti-inflammatoire (9). Il va également agir en oxydant l'acide arachidonique, les prostaglandines et leurs dérivatifs qui contribuent à maintenir l'inflammation (10).

I.1.2.3 Pouvoir stimulant de la cicatrisation

Il a été démontré que l'huile ozonée permet une cicatrisation plus rapide des plaies. En effet, l'ozone stimule l'angiogenèse et active des réactions biologiques et enzymatiques favorisant l'oxygénation des tissus, notamment via la production de facteurs de croissance endothéliaux. L'ozone induit également la migration des fibroblastes, permettant la fermeture plus rapide des plaies (11). Ceci est notamment utile dans les cas d'ulcères infectés liés à un diabète sucré ou à une athérosclérose (12).

I.1.3 Les indications

Nous détaillons ici les indications de la thérapie à l'ozone en général, nous parlerons des indications spécifiques de l'huile ozonée topique dans la partie I.1.5. L'ozone est utilisé pour le traitement de nombreuses affections en médecine humaine et vétérinaire. La plus commune étant le traitement des ulcères des pieds chez les patients diabétiques (13). L'ozone permet une meilleure oxygénation des tissus, une amélioration de la cicatrisation et une éradication des phénomènes infectieux qui viennent empêcher la cicatrisation de ces ulcères.

D'autres affections pour lesquelles son utilité a été démontrée en médecine humaine sont les hernies discales (8), la forme atrophique de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (14), des affections dentaires (15), l'arthrose et des affections virales dont le VIH (16).

En médecine vétérinaire, peu d'études ont été réalisées mais son efficacité a été démontrée pour le traitement des mammites et des affections utérines chez la vache (17), le piétin infectieux du mouton (18), l'ostéoarthrite et les plaies chroniques chez les chevaux (19), les hernies discales et les infections dentaires chez le chien (3).

I.1.4 Les formes d'administration de l'ozone

L'ozone peut être administré sous différentes formes, avec des effets systémiques ou locorégionaux, selon celle employée.

Sous sa forme gazeuse, l'ozone médical est un mélange de 95% de dioxygène avec 5% maximum d'ozone. Il peut être appliqué soit par insufflation directement dans le rectum ou le vagin pour une action systémique par absorption du gaz, soit en contact direct avec des lésions cutanées notamment en utilisant un sac en polyuréthane que l'on ferme hermétiquement autour d'un membre affecté et dans lequel est insufflé de l'ozone médical pendant 30 minutes sur plusieurs séances. Cette méthode permet une action locale sur des lésions superficielles, notamment pour des plaies avec un défaut de cicatrisation chez les chevaux (19).

La méthode la plus fiable d'utilisation de l'ozone pour obtenir un effet systémique est l'autohémothérapie (AHT) majeure, qui est utilisée en médecine humaine (20) et vétérinaire (21). Celle-ci consiste à prélever un volume de sang du patient pour le mettre en contact avec de l'ozone médical gazeux et ensuite le réinjecter au patient par voie intraveineuse. Cela permet une action systémique avec une connaissance précise de la dose d'ozone administrée, contrairement à l'insufflation rectale qui est peu précise (22). Il existe aussi l'autohémothérapie mineure qui consiste à prélever quelques millilitres de sang du patient, que l'on met en contact avec l'ozone avant de les injecter localement dans une zone affectée, par exemple une tumeur cutanée.

Enfin, l'ozone peut être utilisée sous forme topique soit d'eau ozonée, soit d'huile ozonée. Dans les deux cas, la méthode consiste à faire diffuser l'ozone médical dans l'eau ou une huile végétale jusqu'à saturation afin d'obtenir une solution plus stable que l'ozone gazeux. L'eau ozonée garde son efficacité pendant environ 30 minutes. Quant à l'huile, elle peut être stable pendant plusieurs mois voire années lorsqu'elle est conservée au réfrigérateur. Elle conserve les propriétés de l'ozone et peut être utilisée chez l'homme et l'animal (23)(24).

I.1.5 L'huile ozonée

L'huile ozonée est produite en faisant diffuser de l'ozone gazeux en continu dans une huile végétale pendant plusieurs jours, ce qui permet l'obtention d'un produit plus ou moins solide selon l'huile utilisée. L'ozone agit sur les doubles liaisons des acides gras insaturés constituant l'huile, formant des molécules d'ozonides, d'aldéhydes et de peroxydes (molécules les plus actives et intéressantes). L'ozone, en lui-même, ne reste pas dans l'huile mais les molécules

produites par sa réaction avec les acides gras conservent ses propriétés oxydantes et sont stables dans le temps. L'huile ozonée est également bien plus facile à manipuler et ne présente pas les effets dangereux de l'ozone gazeux (25), expliqués dans la partie I.1.6. Son application peut être réalisée à domicile au contraire des autres formes qui nécessitent une thérapie au sein d'une clinique disposant d'une machine fabriquant de l'ozone médical (26).

L'huile ozonée ainsi produite peut être analysée par des dosages volumétriques permettant de la caractériser. La principale caractéristique intéressante est l'indice de peroxyde qui permet d'évaluer la quantité d'oxygène actif dans le produit et donc en fonction de cet indice de déterminer la dose thérapeutique à utiliser. Les autres caractéristiques sont l'indice d'iode qui est un indicateur du nombre d'insaturations d'une huile et le degré d'acidité (27).

L'huile ozonée a des propriétés antimicrobiennes démontrées par plusieurs études dont une étude comparative avec la chlorhexidine et la povidone iodée montrant un effet antiseptique supérieur de l'huile ozonée (28) et une étude de concentration minimale inhibitrice sur de multiples espèces de bactéries (mycobactéries, staphylocoques, streptocoques, *Escherichia coli* et *Pseudomonas*) montrant une activité antibactérienne forte de l'huile ozonée sur toutes les espèces testées (29). Elle possède également d'importantes propriétés stimulantes de la cicatrisation de plaies très intéressantes pour des utilisations cutanées, qui ont été démontrées par des études sur la cicatrisation d'effractions cutanées chez le cochon d'inde (30) ou chez la souris (11) ainsi qu'une étude sur des plaies de brûlure cutanée chez l'homme (31). Ses effets bénéfiques sont liés à la réduction de la surinfection bactérienne, à un effet de débridement, à la modulation de la phase inflammatoire et la stimulation de l'angiogenèse (32).

Les types d'huiles végétales utilisées sont très variés mais les plus communes sont l'huile d'olive et l'huile de tournesol. L'huile ozonée peut être conservée jusqu'à 2 ans au réfrigérateur et 6 mois à température ambiante.

I.1.6 Toxicité/ Innocuité

L'ozone est un oxydant puissant qui a une innocuité variable selon sa concentration, le lieu et la durée d'exposition, comme la plupart des autres composés utilisés en thérapeutique. La peau est assez tolérante à ses effets alors que le tractus respiratoire y est très sensible (33). L'exposition pulmonaire aigue à l'ozone peut provoquer une détresse respiratoire ou des crises d'asthme, et est à l'origine d'une sensibilité accrue aux infections et

à l'inflammation pulmonaire. Cette toxicité est notamment due à l'effet des radicaux libres qui vont venir attaquer et altérer la structure et le fonctionnement des membranes des cellules alvéolaires de type I (34).

Cet effet toxique a entrainé un scepticisme quant à l'utilisation médicale de l'ozone, mais, lorsqu'il est utilisé avec des faibles doses sécuritaires, il permet de stimuler de nombreux mécanismes biologiques bénéfiques, menant à la guérison (35). L'utilisation cutanée sous forme topique a une bien meilleure innocuité car elle ne demande pas de précautions particulières comme la forme gazeuse qu'il ne faut pas inhaler.

Une étude in vitro de 2017 a permis de montrer que des solutions ozonées n'étaient pas cytotoxiques pour des lignées de kératinocytes humains et de fibroblastes de souris, au contraire de le chlorhexidine qui réduit significativement la viabilité des cellules (6).

I.1.7 Utilisation en dermatologie humaine et animale

Les premières applications connues de l'ozone en médecine humaine étaient pour traiter des infections cutanées gangréneuses pendant la première guerre mondiale (23). L'usage principal de l'ozone aujourd'hui est pour le traitement des ulcères de personnes diabétiques, notamment au niveau des pieds. En effet, les propriétés de l'ozone sont idéales pour le traitement de ces affections car elles permettent à la fois l'élimination des pathogènes et l'activation de la prolifération de fibroblastes permettant la guérison de ces ulcères. Il n'y a pas de consensus sur un seul protocole de traitement mais les protocoles étudiés, incluant l'utilisation d'eau et d'huile ozonée topique, d'ozone sous forme gazeuse dans un sac autour du pied et l'insufflation rectale, ont tous conclu à une efficacité de l'ozone dans le traitement des ulcères diabétique (36). Une autre application en dermatologie humaine est le traitement de la dermatite atopique grâce à une douche à l'eau ozonée de 15 minutes quotidienne avec 2 applications par jour d'huile de camélia ozonée pendant 3 jours, qui permet une réduction des lésions, du prurit et de l'inflammation grâce à un rétablissement de l'équilibre de la flore microbienne cutanée (37). D'autres études ont permis de démontrer une efficacité de la thérapie à l'ozone pour le traitement du psoriasis (38), de l'acné et de la sclérose systémique (39).

En dermatologie vétérinaire, de nombreuses études ont démontré l'efficacité de la thérapie à l'ozone pour soigner diverses affections chez différentes espèces. Une étude de 2017 a démontré l'efficacité de l'eau ozonée pour guérir le piétin infectieux du mouton, grâce à l'application de pansement de pied imbibé d'eau ozonée pendant 20 minutes une fois par

semaine pendant quatre semaines. Ils ont obtenu la guérison complète des lésions et de la boiterie en maximum 28 jours chez 60% des moutons étudiés, les 40% restants ont reçu un traitement local au plasma enrichi en plaquettes ayant permis une guérison complète 14 jours plus tard(18). Une autre étude a permis de montrer que l'huile d'olive ozonée avait une efficacité similaire à la perméthrine pour traiter la gale d'oreille à *Otodectes cynotis* chez le chat (40), avec 100% de guérison suite à 10 jours d'application de 5 gouttes de produit (huile d'olive ozonée ou solution Oridermyl contenant de la perméthrine) une fois par jour dans les deux oreilles. Les autres affections étudiées incluent les plaies chronique chez le cheval, la pharmacodermie (réaction cutanée à une substance pharmaceutique comme les bêta-lactamines) chez le chien (41) et la teigne chez le lapin, parmi d'autres (24).

Le nombre d'études est cependant restreint et une affection particulièrement fréquente chez le chien n'a à ce jour pas encore été étudiée, il s'agit de la pyodermite. Étant donné les effets déjà démontrés à la fois antimicrobiens et stimulant de la cicatrisation de l'ozone, l'étude de son effet sur la pyodermite canine est particulièrement intéressante.

I.2 Les pyodermites chez le chien

I.2.1 Définition et épidémiologie

Les pyodermites sont des infections cutanées bactériennes à germes pyogènes, possiblement zoonotiques, caractérisées par des lésions suppurées (42). Elles peuvent être primaires ou secondaires à une maladie sous-jacente (dermatite allergique, maladies endocriniennes notamment). C'est un des motifs de consultations les plus fréquemment rencontrés en pratique vétérinaire généraliste, et le diagnostic le plus commun après les otites en consultation de dermatologie chez le chien (43). Les pyodermites sont également la première cause de prescription d'antibiotiques en pratique canine.

Les pyodermites sont classées selon la profondeur des lésions en trois catégories. Tout d'abord, les pyodermites de surface sont caractérisées par une prolifération des bactéries à la surface de la peau sur la couche cornée, ce qui provoque une inflammation locale (44). Cela inclut le syndrome de prolifération bactérienne, ou Bacterial Overgrowth Syndrome (BOG), et la pyodermite cutanéo-muqueuse. Ensuite, les pyodermites superficielles, qui sont les plus fréquentes, affectent l'épiderme ou les follicules pileux. Parmi elles, les pyodermites folliculaires, aussi appelées folliculites, sont caractérisées par des pustules et des papules folliculaires (Figure 2) (45). Elles diffèrent des pyodermites superficielles non folliculaires (impétigo et pyodermite superficielle extensive), pour lesquelles la lésion caractéristique est une pustule non folliculaire ou son évolution : la collerette épidermique.

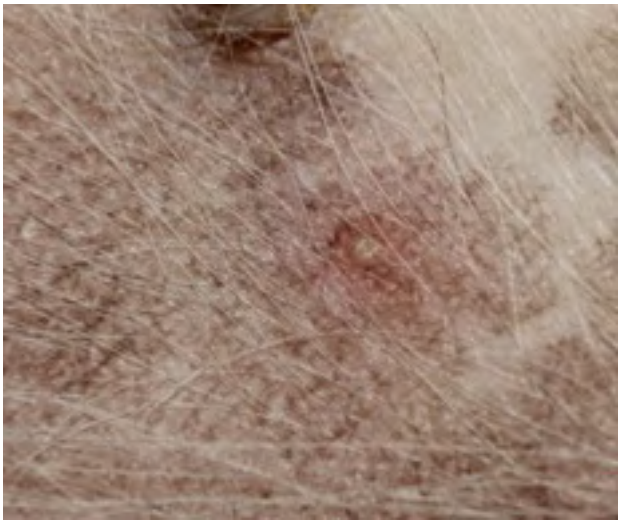

Figure 2 : Pustule folliculaire dans le cadre d'une folliculite bactérienne (Source : unité de dermatologie de VetAgro Sup)

Enfin, les pyodermites profondes ont lieu lorsqu'il y a rupture du follicule pileux et de la gaine folliculaire permettant un envahissement du derme. Les lésions observées sont appelées des furoncles, qui peuvent coalescer en cellulite. Ces pyodermites profondes, aussi appelées furonculose ou cellulite, peuvent être localisées ou généralisées. Les localisations préférentielles sont le menton, les espaces interdigités (notamment chez les chiens à défaut d'aplombs, Figure 3), les membres en cas de dermatite de léchage ou les joues et l'arrière train en cas de furonculose pyotraumatique (46).

Figure 3 : Furoncle interdigité (Source : unité de dermatologie VetAgro Sup)

I.2.2 Étiologie

Dans la grande majorité des cas, les pyodermites sont dues à *Staphylococcus pseudintermedius*, un coque Gram positif à coagulase positive, anaérobie facultatif appartenant au microbiote cutané et muqueux des mammifères et des oiseaux. D'autres bactéries impliquées plus rarement ont été décrites : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus hyicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (47)(48)

I.2.3 Diagnostic

Une pyodermite est d'abord suspectée grâce au tableau clinique de l'animal et à l'observation de ses lésions, qui peuvent être associées ou non à un prurit. Les lésions observées sont non spécifiques et peuvent inclure des pustules folliculaires ou non, des croutes, des collerettes épidermiques, de l'érythème, des ulcères et des furoncles. Le caractère non spécifique de ces lésions est à l'origine d'erreurs diagnostiques, et les

pyodermites peuvent prendre de multiples formes et être confondues avec d'autres affections comme le pemphigus foliacé (49).

Le diagnostic est confirmé grâce à des examens complémentaires simples, notamment le calque cutané qui permet d'observer les cellules et les bactéries présentes à la surface de la peau lésée (méthode du scotch test) ou dans le pus (par apposition). L'observation d'images de phagocytose confirme l'infection et la présence de macrophages traduit une infection profonde. L'absence de bactéries à la cytologie n'exclut pas l'hypothèse de pyodermite bactérienne (42).

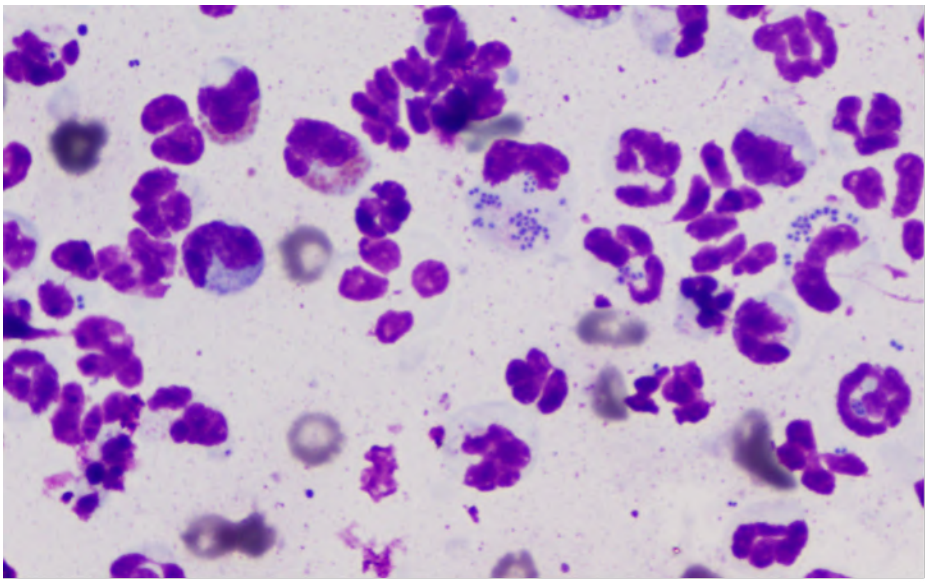

Figure 4 : Cytologie de pus avec polynucléaires neutrophiles, coques et image de phagocytose (Source : unité de dermatologie VetAgro Sup)

En cas de prescription d'antibiotique critique, de présence de bacilles, d'affection généralisée avec atteinte de l'état général, de présence d'un germe résistant précédemment ou d'échec du traitement, il est recommandé d'identifier la bactérie impliquée et de réaliser un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques. Cela permet de cibler le traitement en choisissant l'antibiotique le plus adapté.

I.2.4 Traitement conventionnel

Dans tous les types de pyodermites, il faut utiliser un traitement topique qui peut être un shampooing antiseptique (le plus efficace) ou des solutions antiseptiques. Les shampooings doivent être réalisés fréquemment et il est très important de réaliser chaque shampooing en 2 applications, une première pour retirer les croûtes et les impuretés puis le rinçage suivi d'une deuxième application qu'on laisse poser pendant 10 minutes avant de rincer pour une

efficacité antiseptique maximale. L'avantage du shampooing par rapport aux autres traitements topiques est l'effet mécanique permettant de retirer les croûtes et les débris cellulaires. En cas de pyodermite superficielle, on peut ajouter, au traitement topique antiseptique, une pommade antibiotique à l'acide fusidique sur les lésions. Le traitement topique seul est souvent suffisant pour guérir les pyodermites de surface et superficielles peu étendues(50). Cependant, le traitement topique est trop peu prescrit par les vétérinaires en cas de pyodermite, notamment par peur que les propriétaires n'adhèrent pas à ce traitement (51).

En cas de pyodermite profonde ou de pyodermite superficielle étendue, il est nécessaire d'associer au traitement topique un traitement systémique à base d'antibiotiques, qui doivent être choisis selon les recommandations du Groupe d'étude en dermatologie des animaux de compagnie (GEDAC)(52). En première intention, lorsqu'on ne suspecte pas une pyodermite à germes multirésistants, les antibiotiques conseillés en premier lieu sont l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique ou la céfalexine, et en second lieu la clindamycine ou l'association du triméthoprime avec une sulfamide (42). Les antibiotiques de seconde ligne, dits critiques, ne doivent être prescrits qu'en cas de suspicion de résistance bactérienne et font l'objet d'une obligation de réaliser l'identification bactérienne et l'antibiogramme. Ce sont les fluoroquinolones comme la marbofloxacine et l'enrofloxacine, et les céphalosporines de 3ème génération comme la céfovécine injectable (53). Le traitement antibiotique systémique doit être prescrit pour minimum 3 semaines à des doses efficaces selon l'autorisation de mise sur le marché (AMM) et le traitement doit être poursuivi soit une soit trois semaines après guérison clinique constatée par le vétérinaire, pour les pyodermites superficielles et profondes respectivement.

Il est également très important d'identifier et de prendre en charge les causes sous-jacentes qui peuvent inclure une dermatite allergique, la présence de parasites ou des endocrinopathies.

I.2.5 L'antibiorésistance

I.2.5.1 Définitions

L'antibiorésistance est la résistance des bactéries aux antibiotiques, elle peut être naturelle ou acquise. Dans le cas des bactéries impliquées dans les pyodermites, on parle de *Staphylococcus pseudintermedius* résistant à la méthicilline (MRSP) et de *Staphylococcus*

aureus résistant à la méthicilline (MRSA). La « résistance à la méthicilline » fait référence à toute résistance *in vivo* aux béta-lactamines, incluant les céphalosporines de première génération, les pénicillines, l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique, et excluant les céphalosporines de troisième génération. Les MRS peuvent développer une résistance à d'autres classes d'antibiotiques que les betalactamines. On appelle bactérie multirésistante toute bactérie ayant développé une résistance à au moins trois classes d'antibiotiques différentes.

Pour déterminer le caractère sensible ou résistant d'une bactérie, on réalise en général un antibiogramme. La technique la plus fréquemment utilisée est la diffusion en gélose à partir de disques (Figure 5). On obtient alors des cercles d'inhibition de croissance bactérienne dont le diamètre permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la plus faible concentration d'antibiotique permettant d'inhiber complètement la croissance *in vitro* d'une bactérie. Il existe ensuite des valeurs usuelles de CMI pour chaque couple bactérie-antibiotique permettant de classer la bactérie testée comme sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I).

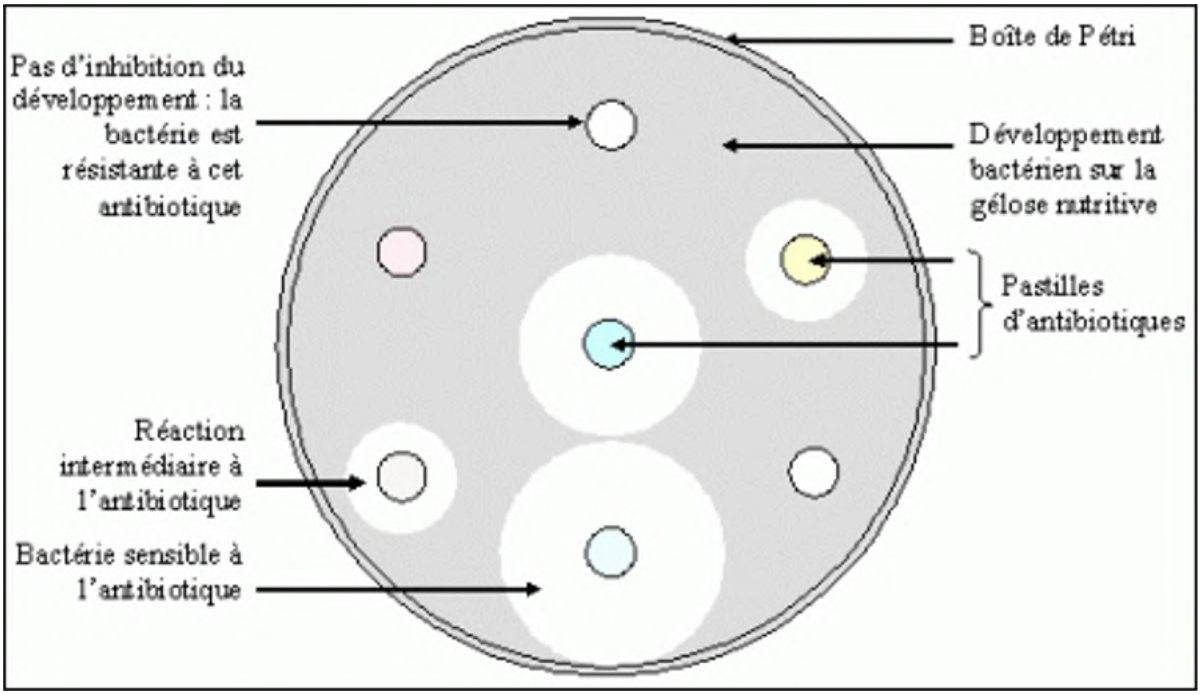

Figure 5 : Schéma explicatif d'antibiogramme par diffusion en gélose (Source : unité de dermatologie VetAgro Sup)

L'acquisition des résistances aux antibiotiques se déroule le plus souvent pendant un traitement antibiotique mais n'est pas directement induit par celui-ci. En effet, lorsqu'on utilise un antibiotique, les bactéries sensibles vont mourir et seules les bactéries résistantes survivront. Les bactéries résistantes sont alors sélectionnées par la pression antibiotique et elles vont pouvoir proliférer, ainsi la proportion de bactéries résistantes augmente. La résistance bactérienne est donc révélée par le traitement antibiotique (42). Cela implique la mise en place de règles de bonnes pratiques en matière de prescription d'antibiotique, dont le but est de limiter leur utilisation au strict nécessaire afin de ralentir la sélection de germes multirésistants. Lorsqu'on doit utiliser un antibiotique, il faut le choisir en fonction de son spectre naturel d'action pour qu'il soit efficace contre la bactérie suspectée, l'utiliser à la bonne dose et pendant la bonne durée.

Il existe une classification règlementaire des antibiotiques qui encadre leur utilisation en médecine vétérinaire, selon les recommandations du GEDAC (52). Tout d'abord, les antibiotiques de première ligne sont des antibiotiques de premier choix pour un traitement empirique, qui sont réputés très efficaces contre *Staphylococcus pseudintermedius* (plus de 90% d'efficacité) et bien tolérés, il s'agit de l'association amoxicilline et acide clavulanique oui de la céfalexine. Dans cette catégorie on utilise dans un second temps la clindamycine et l'association sulfamide-triméthoprime en raison d'une efficacité un peu moindre sur *Staphylococcus pseudintermedius* (70 à 90%). Il n'est pas nécessaire de réaliser un antibiogramme pour les prescrire, mais leur prescription n'est pas recommandée en cas de suspicion de résistance bactérienne. Puis, les antibiotiques de deuxième ligne, dits antibiotiques « critiques », sont de nouvelles molécules à large spectre, dont la prescription nécessite la réalisation d'un antibiogramme (fluoroquinolones, céfovécine). Le but étant de ne les prescrire que lorsque c'est réellement nécessaire afin de limiter au maximum le développement de résistance à leur égard. Ensuite, les antibiotiques de troisième ligne sont des antibiotiques déconseillés en cas de pyodermites, soit pour cause de résistance fréquente (amoxicilline seule, ampicilline), soit parce qu'ils ont une mauvaise diffusion cutanée (tétracyclines) ou une toxicité potentielle (gentamicine). Enfin les antibiotiques de quatrième ligne sont des molécules de haute nécessité en médecine humaine, dont la prescription est strictement interdite en médecine vétérinaire en France (42).

I.2.5.2 Prévalence et conséquences thérapeutiques

Dans le cas de *Staphylococcus pseudintermedius*, de nombreuses études ont été réalisées pour déterminer la prévalence de MRSP et ses conséquences. Selon les études, la prévalence de MRSP varie entre 12 et 17% et parmi les MRSP, une proportion non négligeable est devenue multirésistante (54)(55). Une étude démontre également que la proportion de bactéries résistantes augmente d'année en année sur une période de 5 ans (56). La prise en charge des pyodermites doit donc évoluer pour prendre en compte cette proportion significative et croissante de bactéries résistantes.

Les bétalactamines ne doivent pas être utilisées dans les situations où on suspecte une infection à MRSP. Ces situations incluent les cas de pyodermites chroniques, d'infection précédente à MRSP, ou de réponse insuffisante à un traitement antibiotique systémique bien conduit (diminution de moins de 50% de l'étendue des lésions ou apparition de nouvelles lésions après deux semaines de traitement) (42). Il faut dans ces cas réaliser un antibiogramme et utiliser un antibiotique auquel la bactérie est sensible, s'il en existe un. Dans le cas où la bactérie étudiée est résistante à tous les antibiotiques testés et autorisés, on se trouve dans une impasse thérapeutique, situation qui est malheureusement de plus en plus fréquente. Dans ce cas, seul le traitement topique antiseptique et les nouvelles thérapies peuvent être utiles pour contribuer à la guérison de l'animal.

Les nouvelles perspectives thérapeutiques, dont le but est de trouver des solutions alternatives et/ou complémentaires à l'utilisation des antibiotiques, sont nombreuses mais ont encore besoin d'être étudiées pour prouver leur efficacité. Elles incluent les bactériophages, les vaccins, les immunoglobulines, le miel, les peptides antimicrobiens, la biomodulation par fluorescence et les probiotiques (57). La thérapie à l'ozone est également intéressante et devrait faire partie de ces perspectives thérapeutiques.

I.2.5.3 Mécanismes de transmission

La résistance acquise des bactéries aux antibiotiques provient d'une modification de son capital génétique via différents mécanismes de transfert horizontal de gènes que sont la transduction (via bactériophage), la conjugaison et la transformation. Les séquençages du génome bactérien permettent d'identifier quels gènes de résistance elle comporte et d'en déterminer l'origine. Ainsi, plusieurs lignées de clones de MRSP ont pu être identifiées (58).

La résistance à la méthicilline est permise par une protéine liant la pénicilline, codée par le gène mecA qui est inclus dans un élément génétique mobile appelé la cassette staphylococcique ou « Staphylococcal cassette chromosome mec » (SCCmec). Cette cassette comporte le complexe mec et un complexe de gènes codant des recombinases qui permettent l'excision et l'intégration facile du gène. Elle peut également comporter des gènes de résistance à des antibiotiques autres que les betalactamines (59).

I.2.5.4 Santé publique

Ce développement d'antibiorésistance est un problème de santé publique considérable, les bactéries résistantes étant la cause de 1,3 million de décès humains en 2019 (1). Dans le cas des pyodermites à MRSP chez le chien, des précautions particulières doivent être mises en place par les propriétaires et les vétérinaires. Le risque de développer une infection à MRSP chez l'homme est faible, et concerne surtout les personnes immunodéprimées. Toutefois, des bonnes pratiques d'hygiène doivent être appliquées, notamment une hygiène rigoureuse des mains, ainsi que des précautions particulières lors des contacts entre l'animal atteint et les enfants et personnes immunodéprimées, qui doivent être limités au maximum (42).

Un autre risque pour la santé humaine est la transmission de gènes de résistance entre les MRSP du chien et les bactéries commensales de l'homme, notamment *Staphylococcus aureus*. En effet, il est possible pour les bactéries d'espèces différentes de se transférer des gènes de résistance. Certaines études réalisées sur des propriétaires de chiens atteints de pyodermites à MRSP et sur le personnel de clinique vétérinaire ne montrent pas de concordance des séquences des gènes de résistance entre les MRSP des chiens et les MRSA de l'homme (60)(61). Or, une étude de 2021 a montré qu'il existe des similitudes de séquences génétique dans la cassette SCCmec entre les staphylocoques isolés de chiens atteints de pyodermites et ceux isolés de leurs maitres, sans pour autant identifier de séquences entières identiques (62). Il est difficile de conclure sur un niveau de risque de transmission de gènes de résistance entre les chiens et l'homme, mais la possibilité de transmission existe donc la prudence dans la manipulation de ces chiens est nécessaire.

I.3 Conclusion sur l'intérêt de l'étude de l'ozone topique dans le cadre des pyodermites chez le chien

Pour conclure cette étude bibliographique, nous avons d'une part la thérapie à l'ozone qui paraît prometteuse pour la prise en charge de maladies infectieuses avec des propriétés intéressantes antiseptiques, anti-inflammatoires et stimulantes de la cicatrisation. D'autre part, nous avons les pyodermites qui sont des affections bactériennes dont la prise en charge devient de plus en plus compliquée avec le développement de résistances aux antibiotiques. Cela justifie l'intérêt d'étudier l'efficacité de l'ozone sous forme topique d'huile ozonée pour prendre en charge des pyodermites chez le chien. Aucune étude n'a, à ce jour, été réalisée dans ce cadre.

Il existe une étude réalisée en 2017 en Chine sur l'effet de l'ozone topique sur les infections de la peau à MRSA chez l'homme. Cette étude a tout d'abord démontré l'efficacité *in vitro* de l'huile et de l'eau ozonée pour inhiber la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* et de MRSA. En effet 100% des souches bactériennes testées ont été tuées en 15 minutes de contact avec l'huile ozonée. Elle a ensuite testé l'efficacité de la thérapie à l'ozone pour traiter deux cas d'ulcérations cutanées dues à des infections à MRSA. Le protocole thérapeutique utilisé était de rincer les lésions à l'eau ozonée pendant 10 minutes à l'hôpital chaque jour et de faire appliquer de l'huile ozonée sur les lésions du patient deux fois par jour à domicile. L'étude a démontré une réduction significative de la taille des lésions en quelques semaines, une guérison complète en 2 mois pour le premier patient et en 12 jours pour le second, ainsi qu'une bactérioculture négative suite à l'arrêt du traitement (63). Malgré le faible nombre de cas et quelques anomalies dans le protocole de cette étude, ses résultats soulèvent la question de l'utilité de l'huile ozonée et d'autres études sont nécessaires pour démontrer son efficacité chez l'homme.

Nous avons décidé de suivre un schéma d'étude similaire appliqué au chien. Nous allons donc tout d'abord étudier l'effet *in vitro* de l'huile d'olive ozonée sur la croissance de *Staphylococcus pseudintermedius*, dont certaines souches sont MRSP. Nous ferons également une étude de toxicité de l'huile ozonée sur une lignée de kératinocytes canins, afin de tester l'innocuité du traitement. Enfin nous réaliserons une étude clinique de l'efficacité de l'huile ozonée sur des cas de pyodermites canines recensés au centre hospitalier universitaire vétérinaire pour animaux de compagnie (CHUVAC) de VetAgro Sup Lyon.

PARTIE II : ÉTUDE *IN VITRO* DE L'EFFET DE L'HUILE OZONÉE SUR DES BACTÉRIES IMPLIQUÉES DANS LES PYODERMITES CANINES ET DE CYTOTOXICITÉ

II.1. Identification de souches de bactéries impliquées dans les pyodermites canines

II.1.1 Introduction

Afin d'étudier l'effet de l'huile ozonée sur les bactéries impliquées dans les pyodermites chez le chien, il a été important de commencer par identifier les souches bactériennes impliquées dans ces pyodermites. On s'est ensuite restreint à l'étude de l'effet de l'huile ozonée sur la croissance de la souche majoritaire, *Staphylococcus pseudintermedius*.

II.1.2. Matériels et méthodes

II.1.2.1 Critères de sélection

Les souches bactériennes étudiées provenaient de prélèvements envoyés au Laboratoire des Leptospires et Analyses Vétérinaires (LAV) de Marcy l'étoile entre janvier 2019 et août 2020. Les prélèvements sélectionnés étaient des biopsies cutanées, écouvillons cutanés ou écouvillons de pus prélevés au niveau des lésions de chiens dont le diagnostic clinique établi par le vétérinaire était une « infection cutanée », une « pyodermite », une « cellulite » ou une « furonculose ». Nous avions ainsi sélectionné 20 prélèvements dont les souches bactériennes avaient été identifiées comme *Staphylococcus* à coagulase positive. Toutes les souches avaient également fait l'objet d'un antibiogramme. Les souches ainsi identifiées avaient ensuite été préservées au congélateur dans un milieu de conservation.

II.1.2.2 Méthode d'identification

Afin d'identifier les espèces bactériennes sélectionnées, les souches sélectionnées ont tout d'abord été décongelées avant d'être ensemencées sur gélose au sang et incubées 24 heures dans une étuve à 37˚C afin d'obtenir des colonies bactériennes (Figure 6).

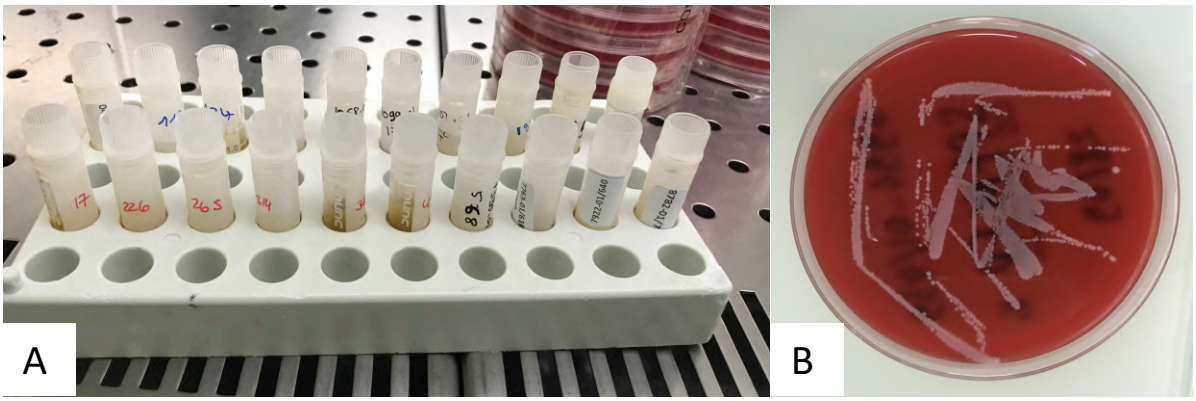

Figure 6 : A : Souches préservées à décongeler, B : Culture bactérienne sur gélose au sang (Source : November Mahéas)

Le protocole d'identification VITEK® 2 GP a été utilisé. Pour cela, 2 à 5 colonies identiques bactériennes ont été mises en suspension une par une dans un tube à essai en plastique transparent contenant 3,0 mL de solution saline jusqu'à obtenir une densité entre 0.5 et 0.63 McFarland à l'aide d'un DensiCHEK™ Plus VITEK® 2 préalablement étalonné. La carte d'identification VITEK® 2 GP était ensuite placée dans le tube avec la suspension bactérienne et l'ensemble mis sur la cassette VITEK® 2 avant d'être chargé dans la machine (Figure 7).

Figure 7 : Cartes d'identification VITEK® 2 GP et tubes de suspension bactérienne dans cassette VITEK® 2 (Source : November Mahéas)

Il fallait ensuite attendre 3 à 8 heures pour que l'identification soit complète. Les résultats étaient obtenus sous la forme d'une fiche avec le germe sélectionné, la fiabilité de l'identification et les détails biochimiques (exemple en Annexe 1).

II.1.3. Résultats

Parmi les vingt souches testées, 18 ont pu être identifiées à plus de 94% de probabilité avec une fiabilité excellente. Les deux autres souches n'ont pas pu être identifiées car il y avait une trop faible discrimination entre deux espèces possibles. Les espèces identifiées étaient *Staphylococcus pseudintermedius* (16 souches sur 18, soit 88,9%), *Staphylococcus aureus* (une souche sur 18, soit 5,6%) et *Staphylococcus epidermidis* (une souche sur 18, soit 5,6%).

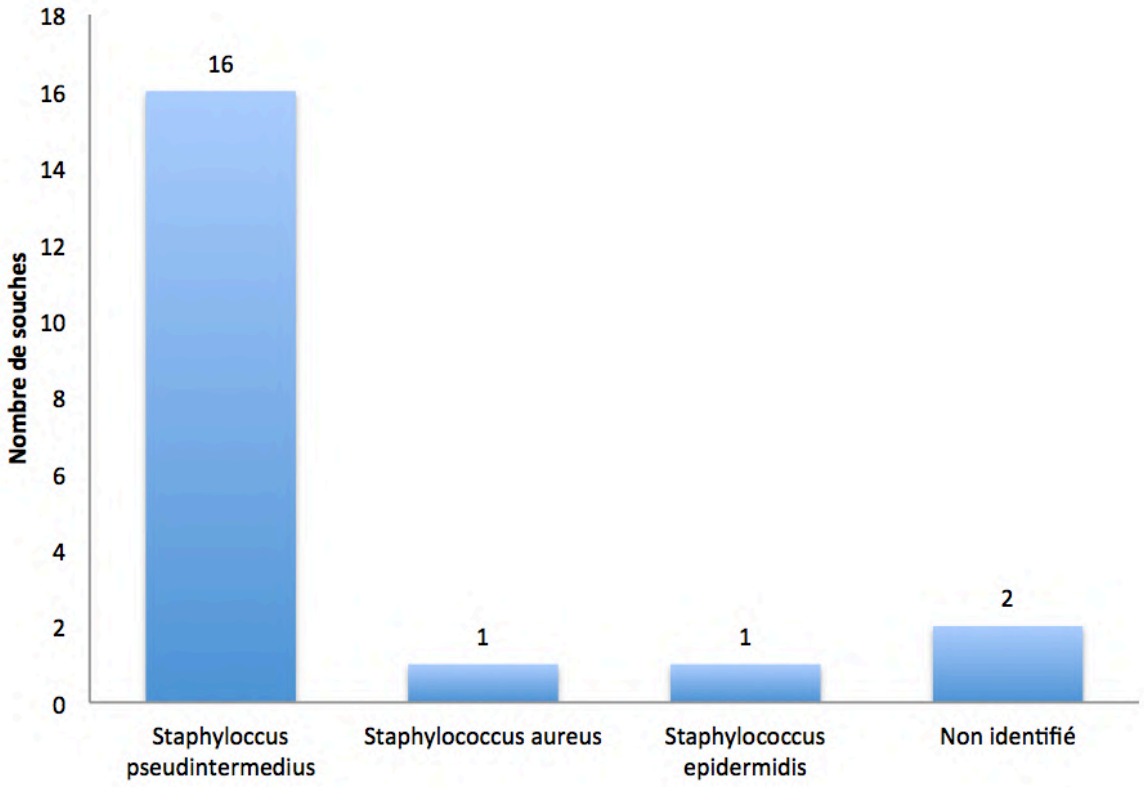

Figure 8 : Nombre de souches de chaque espèce identifiée

Toutes les souches testées avaient préalablement fait l'objet d'un antibiogramme. Les souches ont été classées selon leur profil de sensibilité en souche sensible lorsqu'elle était sensible à tous les antibiotiques testés (dite souche « S/S »), en souche MRSP intermédiaire lorsqu'elle était résistante à la pénicilline et l'amoxicilline mais sensible à la céfovécine (dite souche « R/S »), et en souche MRSP multirésistante lorsqu'elle était résistante à tous les antibiotiques testés sauf la rifampicine qui est interdite d'utilisation en médecine vétérinaire (dite souche « R/R).

Parmi les 16 souches identifiées *Staphylococcus pseudintermedius*, nous avions trois souches sensibles, huit souches intermédiaires et cinq souches multirésistantes ce qui donne la répartition dans le graphique ci-dessous (Figure 9).

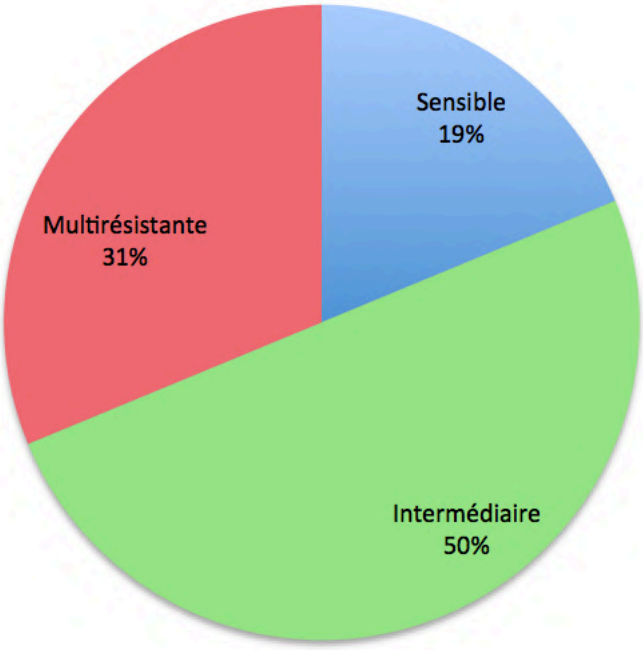

Figure 9 : Répartition des profils de sensibilité des souches de *Staphylococcus pseudintermedius*

II.1.4. Discussion

Cette étude nous a permis d'identifier les espèces bactériennes de Staphylocoque impliquées dans les pyodermites canines. Nous avons ainsi confirmé que *Staphylococcus pseudintermedius* est l'espèce majoritaire, ce qui est en accord avec les données de la littérature.

De plus, en analysant les antibiogrammes des souches étudiées, nous avons pu classifier les souches selon leur profil de résistance et montrer qu'il existe une proportion non négligeable de bactéries multirésistantes ou au moins résistantes à la méthicilline parmi les souches étudiées (81%).

Pour la suite de l'étude, nous allons nous concentrer uniquement sur des souches de *Staphylococcus pseudintermedius*, en étudiant l'effet de l'huile ozonée sur leur croissance *in vitro*. Une sélection de neuf souches a été effectuée : trois souches sensibles, trois souches intermédiaires et trois souches multirésistantes.

II.2. Étude de l'effet de l'huile ozonée sur la croissance *in vitro* de *Staphylococcus pseudintermedius*

II.2.1. Introduction

Comme nous avons pu le voir dans la première partie, il est nécessaire de trouver des nouvelles perspectives thérapeutiques pour soigner les affections bactériennes comme les pyodermites. L'huile ozonée est une préparation topique qui est utilisée en cosmétique humaine. Nous savons que l'ozone contenu dans cette préparation a des propriétés antiseptiques fortes, qui devraient permettre d'inhiber la croissance de toute bactérie, dont *Staphylococcus pseudintermedius*. Le but de cette étude est de tester cette hypothèse et de déterminer une CMI de l'huile ozonée pour *Staphylococcus pseudintermedius*.

II.2.2. Matériels et méthodes

II.2.2.1 Sélection des souches bactériennes

Les souches bactériennes à tester ont été sélectionnées à l'issu de l'étude précédente selon leur espèce et profil de sensibilité aux antibiotiques. Ainsi neuf souches de *Staphylococcus pseudintermedius* ont été choisies, dont trois « S/S » sensibles à tous les antibiotiques testés (les souches « Spencer », « Elara » et « Gribouille »), trois « R/S » MRSP résistantes uniquement à la pénicilline et l'amoxicilline (les souches « Buzz », « Mily » et « Yzon ») et trois « R/R » MRSP multirésistantes (les souches « Philo », « Guismo » et « Pin Up »). Le nom des souches correspondait au nom du chien atteint de pyodermite dont elles étaient issues à l'origine.

II.2.2.2 Huile ozonée et témoin

L'huile d'olive ozonée utilisée était l'huile PurO3 Ozonated Olive Oil ® (Figure 10) qui est solide à température ambiante et liquide lorsqu'elle est chauffée. L'huile d'olive témoin utilisée était de l'huile d'olive bio extra vierge achetée en grande surface.

Figure 10 : Huile d'olive ozonée PurO3 Ozonated Olive Oil ® (Source : November Mahéas)

II.2.2.3 Méthode de l'étude

II.2.2.3.1 Essai de la méthode standard par diffusion en gélose à partir de disques

Afin de déterminer l'effet de l'huile ozonée sur la croissance des souches de Staphylococcus pseudintermedius, la méthode standard utilisée pour établir les antibiogrammes a été testée. Pour cela, les souches ont été ensemencées sur des géloses Trypcase Soy Agar (TSA). Ensuite, des disques de diffusion non imprégnés ont été imbibés avec 30 ou 150µL d'huile d'olive soit ozonée soit témoin, avant d'être placés à l'aide d'une pince stérile sur les géloses ensemencées. Les géloses étaient alors mises à l'incubation à l'étuve à 37˚C pendant 16 à 24 heures.

Cette méthode n'a pas fonctionné car les huiles ne diffusaient pas dans la gélose à partir des disques, il n'y avait donc pas de diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne. Nous avons été contraints d'arrêter les essais avec cette méthode et d'en trouver une nouvelle.

II.2.2.3.2 Méthode d'incorporation de l'huile dans la gélose

Étant donné l'impossibilité d'utiliser la méthode standard, une nouvelle méthode d'incorporation des huiles directement dans le milieu de culture a été créée à l'aide des équipes de virologie et bactériologie du LAV. Les milieux de croissance ont été fabriqués à base d'agar dans lequel des proportions variables d'huile ozonée ou d'huile d'olive témoin ont été incorporées. Pour cela 41g de poudre Agar Tryptose Difco™ ont été dilués dans 1 litre d'eau pure puis le mélange a été mis à chauffer sous agitation mécanique jusqu'à ébullition pendant une minute (Figure 11).

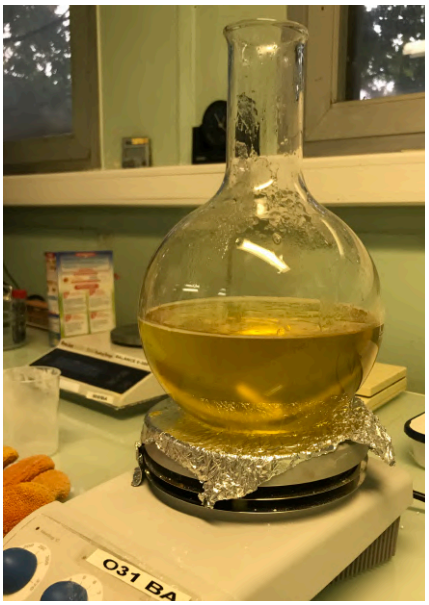

Figure 11 : Fabrication de gélose (Source : November Mahéas)

Ensuite le mélange obtenu a été stérilisé à l'autoclave à 121˚C pendant 15 minutes. Une fois le cycle d'autoclave terminé, le mélange était placé au bain marie à 60˚C.

Des quantités d'huile variables ont ensuite été incorporées dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration en pourcentage définie d'huile d'olive témoin ou d'huile ozonée. L'huile incorporée avait préalablement été placée à l'étuve à 37˚C afin qu'elle soit liquide. Les pourcentages testés ont été choisis à la suite de plusieurs essais préliminaires avec une concentration variant entre 0,5% et 20% d'huile. Pour obtenir une concentration en huile homogène dans chaque boite de pétri, les mélanges ont été fabriqués en proportions individuelles de 20mL pour chaque boite de pétri. Afin de faciliter la mise en suspension des huiles dans l'agar, 400µL de solution détergente Tween™ 80 Surfact-Amps™ ont été ajoutés à chaque mélange, composé de X mL d'huile (ozonée ou témoin) et Y mL d'agar, selon le tableau ci-dessous (Tableau I).

Tableau I : Volumes d'huile et d'agar dans chaque mélange afin d'obtenir une solution de 20mL avec un pourcentage défini en huile

Pourcentage d'huile dans le mélange	X = Volume d'huile (en mL)	Y = Volume d'agar (en mL)
2,5	0,5	19,1
5	1	18,6
7,5	1,5	18,1
10	2	17,6

Les mélanges chauds ainsi obtenus ont été coulés dans les boites de pétri et laissés sous hotte à température ambiante pendant 10 minutes jusqu'à solidification de la gélose, devenue adhérente à la boite de pétri. En tout, les huit types de mélange suivants ont été fabriqués : 2,5% d'huile ozonée, 2,5% d'huile d'olive témoin, 5% d'huile ozonée, 5% d'huile d'olive témoin, 7,5% d'huile ozonée, 7,5% d'huile d'olive témoin, 10% d'huile ozonée, 10% d'huile d'olive témoin. Pour chaque type, neuf boites de pétri ont été créées afin d'en avoir une pour chaque souche testée, ce qui donnait au total 72 boites annotées selon leur composition et la souche à ensemencer (Figure 12).

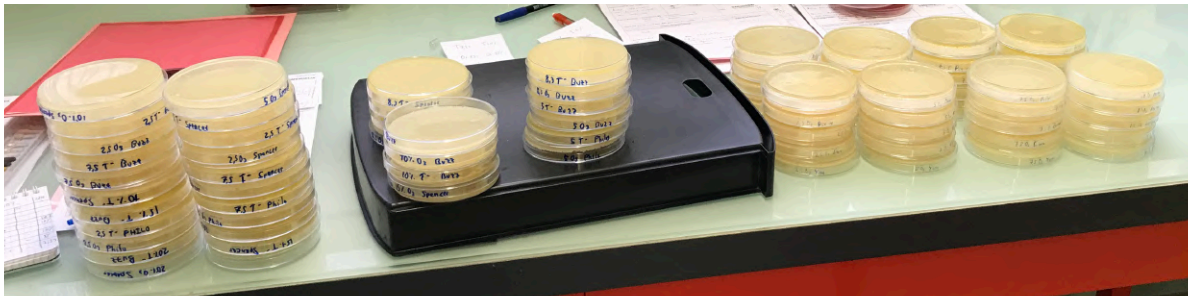

Figure 12 : 72 boites de pétri annotées selon leur composition (Source : November Mahéas)

Les géloses ainsi fabriquées ont ensuite été ensemencées avec chaque souche de *Staphylococcus pseudintermedius* à tester et mises à l'incubation à 37˚C pendant 16 à 24 heures.

II.2.2.4 Évaluation de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne a été évaluée de façon semi-quantitative selon les critères suivants (Tableau II).

Tableau II : Méthode d'évaluation semi-quantitative de la croissance bactérienne

Nombre de colonies présentes	Score de croissance bactérienne
Aucune	0
Quelques colonies isolées (1-10)	1
Plusieurs colonies séparées (10-100)	2
Tapis continu de colonies (>100)	3

II.2.2.5 Tests de contrôle négatif et positif

Des tests de contrôle négatif et positif ont également été réalisés :

- Test de contrôle négatif pour vérifier la stérilité de l'agar : incubation à 37˚C d'une gélose vierge sans huile incorporée et non ensemencée pendant 24 heures. L'absence de croissance bactérienne nous a permis de confirmer que l'agar était bien stérile (Figure 13 A).
- Test de contrôle positif pour vérifier la capacité des bactéries à pousser sur la gélose : ensemencement d'une gélose d'agar tryptose sans huile incorporée puis incubation à 37˚C pendant 24 heures. La croissance bactérienne observée de score 3 nous a permis de confirmer que l'agar utilisé était un bon milieu de culture (Figure 13 B).

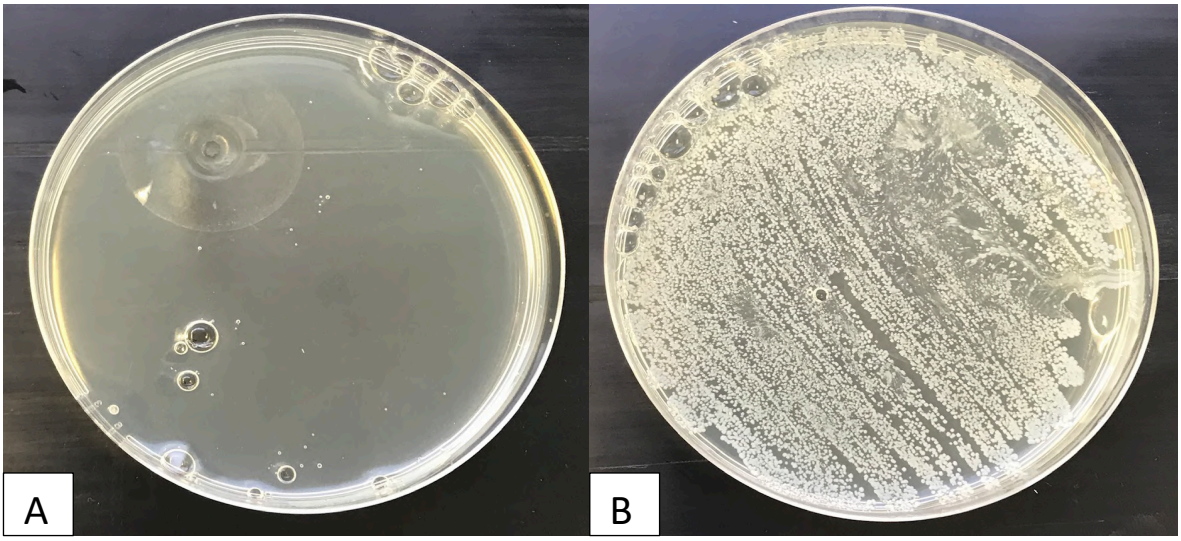

Figure 13 : A : Test de contrôle négatif, B : Test de contrôle positif (Source : November Mahéas)

II.2.3. Résultats

Les scores de croissance bactérienne de chaque souche pour chaque type de gélose ont été renseignés dans le tableau ci-dessous (Tableau III).

Tableau III : Score de croissance bactérienne pour chaque souche dans chaque type de gélose

Profil de résistance	Souche	2,5%		5%		7,5%		10%	
		Témoin	Huile ozonée	Témoin	Huile ozonée	Témoin	Huile ozonée	Témoin	Huile ozonée
Souches S/S	Spencer	3	1	2	0	3	0	3	0
	Elara	2	2	2	1	2	2	1	0
	Gribouille	2	2	3	1	2	1	2	0
Souches R/S	Buzz	3	1	3	0	2	0	2	0
	Mily	3	2	2	2	3	0	2	0
	Yzon	3	3	3	0	2	0	2	0
Souches R/R	Philo	3	0	2	0	2	0	2	0
	Guismo	1	1	1	0	1	0	1	0
	Pin Up	3	2	3	1	3	0	2	0

En faisant la moyenne des valeurs de chaque type de gélose pour les 9 souches testées, nous avons obtenu le graphique suivant (Figure 14).

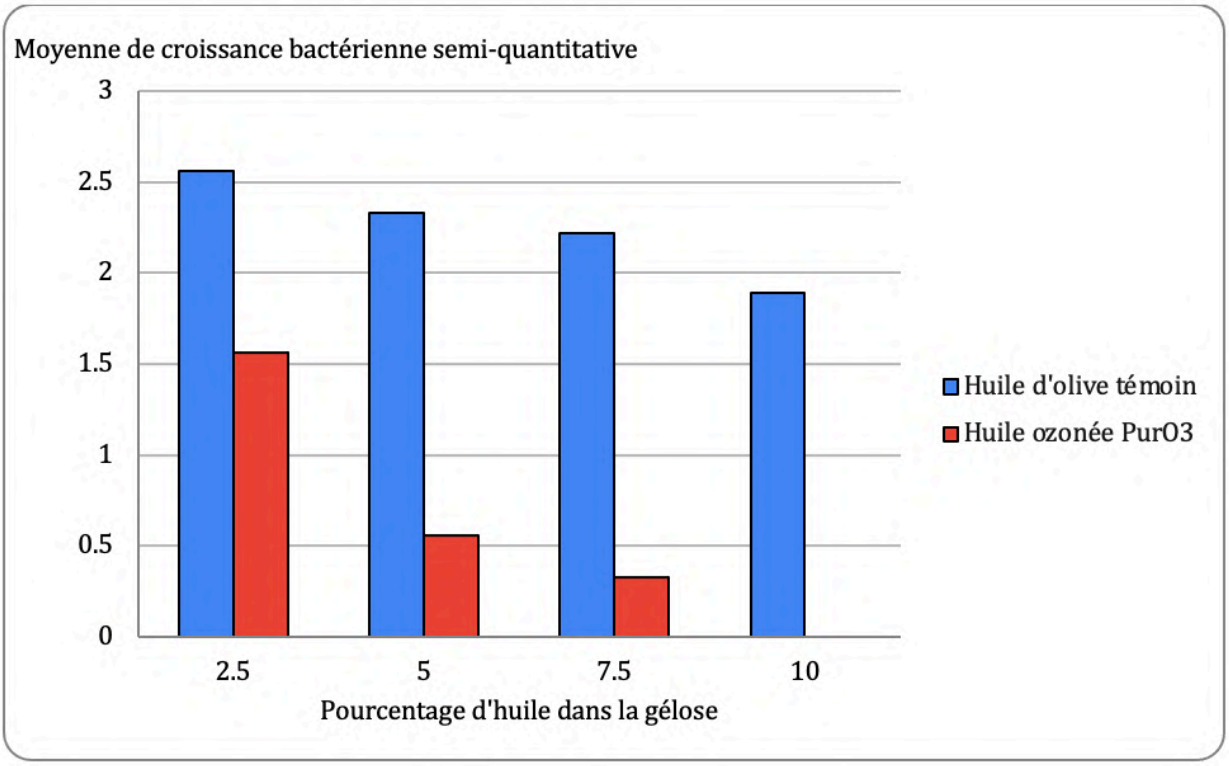

Figure 14 : Effet de la quantité d'huile dans la gélose sur la croissance bactérienne moyenne

La croissance bactérienne était plus faible dans les géloses contenant de l'huile ozonée que dans les géloses contenant de l'huile d'olive témoin, quelle que soit la concentration testée. Nous avons également observé une diminution de la croissance bactérienne lorsque la quantité d'huile ozonée augmente dans le milieu de culture. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque souche correspondait à la concentration pour laquelle la croissance de la souche était complètement inhibée. Les CMI individuelles étaient très variables selon les souches mais la croissance de toutes les souches testées était complètement inhibée à 10% d'huile ozonée dans la gélose. Il n'y avait pas de différence significative de CMI en fonction du profil de sensibilité des souches ($p<0.05$, test de Student). On obtenait donc une CMI globale de 10% d'huile ozonée pour *Staphylococcus pseudintermedius*.

II.2.4. Discussion

Les résultats de notre étude montrent que l'huile ozonée a un effet antiseptique fort, permettant d'inhiber totalement la croissance bactérienne de *Staphylococcus pseudintermedius* à partir d'une concentration de 10% dans le milieu de culture. L'absence de différence significative de CMI entre les différents profils de résistance suggère que les bactéries n'ont pas de moyen de résister à l'ozone. C'est la première étude in vitro sur l'effet de l'huile ozonée sur *Staphylococcus pseudintermedius*. Les autres études ont permis de démontrer l'effet antibactérien de l'ozone topique sur de nombreuses autres espèces de bactéries, dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (29)(64), qui sont aussi impliquées dans les pyodermites canines.

Les résultats de notre étude sont donc compatibles avec ceux des autres études. La concentration de 10% n'est pas retrouvée dans la littérature car nous avons dû utiliser une méthode différente pour déterminer la CMI que la méthode standard des disques de diffusion. Cette méthode standard avait pourtant été utilisée dans une étude in vitro comparant l'effet antiseptique de l'huile ozonée à celui de la chlorhexidine et la povidone iodée, sans qu'ils aient rencontré le problème de la non-diffusion de l'huile dans la gélose (28).

Notre méthode d'incorporation de l'huile directement dans le milieu de culture en facilitant sa diffusion homogène à l'aide du détergent a été très efficace. Nous n'avons cependant pas pu déterminer de concentration précise en mg/mL d'huile ozonée présente dans le milieu, d'où l'utilisation des concentrations en pourcentage. Ainsi, en ayant démontré que toute croissance bactérienne de nos neuf souches de *Staphylococcus pseudintermedius* est inhibée par l'huile ozonée dés 10% dans un milieu de culture *in vitro*, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'application topique *in vivo* d'huile ozonée pure (concentration de 100%) sur des lésions de pyodermite chez le chien sera efficace pour tuer les bactéries en cause.

II.3. Étude de cytotoxicité de l'huile ozonée sur une lignée de kératinocytes canins

II.3.1. Introduction

Avant de réaliser une étude clinique sur des chiens atteints de pyodermite, l'innocuité de l'huile ozonée devait être vérifiée. Pour cela nous avons réalisé une étude de la cytotoxicité de l'huile ozonée sur une lignée de kératinocytes canins cultivés *in vitro*. La technique utilisée est le Cell Counting Kit-8 (CCK-8), un test colorimétrique en microplaques permettant de déterminer le nombre de cellules viables lors de tests de cytotoxicité. Le produit du CCK-8 est le WST-8 (water soluble tetrazolium) qui est réduit par les déshydrogénases cellulaires et forme un produit de formazan de coloration orange. La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules viables et peut être mesurée via la densité optique à 450nm.

II.3.2. Matériels et méthodes

II.3.2.1 Matériels utilisés

La lignée de cellules cultivées *in vitro* utilisée pour l'étude était une lignée de kératinocytes épidermiques canins appelés Canine Progenitor Epidermal Keratinocytes (CPEK), issue du laboratoire CELLnTECK advanced cell systems (Bern, Suisse). L'huile ozonée utilisée était l'huile PurO3 Ozonated Olive Oil ® préalablement chauffée à 37˚C pour être liquide et l'huile d'olive témoin utilisée était de l'huile d'olive bio extra vierge achetée en grande surface. Le milieu de culture des cellules « CnT-09 Canine Epithelial Proliferation Medium », issu du laboratoire CELLnTECK advanced cell systems (Bern, Suisse), n'était pas miscible avec les huiles donc n'a pas pu être utilisé comme témoin pour établir des concentrations croissantes d'huiles. Des mélanges d'huile ozonée et d'huile d'olive témoin (miscibles entre eux) ont donc été réalisés dans des proportions de 0%, 25%, 50%, 75% et 100% d'huile ozonée (Figure 15). Le produit CCK-8 utilisé était issu du laboratoire Sigma-Aldrich (France).

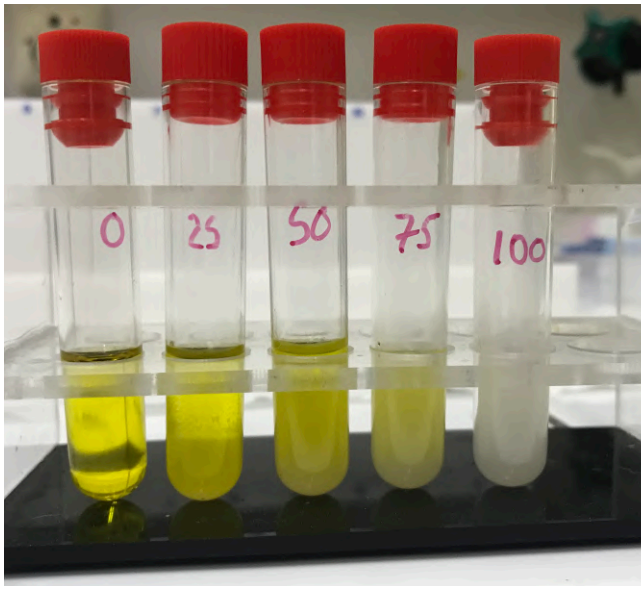

Figure 15 : Mélanges d'huile ozonée et d'huile d'olive témoin dans des proportions de 0 à 100% d'huile ozonée (Source : November Mahéas)

II.3.2.2 Méthode de mise en contact des cellules avec les huiles

Tout d'abord les cellules CPEK ont été mises en culture dans trois plaques à 96 puits appelées P96 à raison de 100µL/puit d'une solution de cellules trypsinées contenant 1.5 x 10^6 cellules/mL. Les plaques ont été mises à l'incubation dans une étuve à 37˚C pendant 24 heures. Le milieu de culture des cellules CnT-09 et les huiles étant non miscibles, il a été décidé de mettre en contact directement les cellules cultivées avec les mélanges d'huile. Pour cela, les plaques P96 ont tout d'abord été vidées stérilement sous hotte par retournement sur lingette absorbante. Cela permettait de garder uniquement le tapis de cellules CPEK cultivées au fond des puits. 100µL d'huile ou de milieu de culture Cnt-09 ont ensuite été distribués dans chaque puit selon le plan de plaque suivant (Tableau IV).

Tableau IV : Plan de plaque P96

	1	2	3	4	5	6
A	CPEK + milieu de culture	CPEK + huile d'olive témoin (0% d'huile ozonée)	CPEK + mélange d'huile à 25% d'huile ozonée	CPEK + mélange d'huile à 50% d'huile ozonée	CPEK + mélange d'huile à 75% d'huile ozonée	CPEK + huile ozonée (100% d'huile ozonée)
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

Les plaques ainsi obtenues ont été incubées à l'étuve à 37˚C pendant deux, quatre et six heures respectivement. À la suite de la période d'incubation les cellules ont été observées au microscope optique, pour mettre en évidence d'éventuels signes de toxicité.

II.3.2.3 Méthode de test colorimétrique de cytotoxicité

À la suite de la période de mise en contact avec les mélanges d'huile, l'huile était remplacée par du milieu de culture Cnt-09. Pour cela, l'huile était retirée de la plaque par retournement sur lingette absorbante complétée par aspiration à la micropipette. Ensuite 100µL de milieu Cnt-09 et 10µL de CCK-8 étaient ajoutés à chaque puit, avant d'incuber la plaque à l'étuve à 37˚C pendant deux heures. À la suite de cette deuxième incubation, la plaque était lue au spectrophotomètre à 450nm afin de mesurer la densité optique de chaque puit (Figure 16).

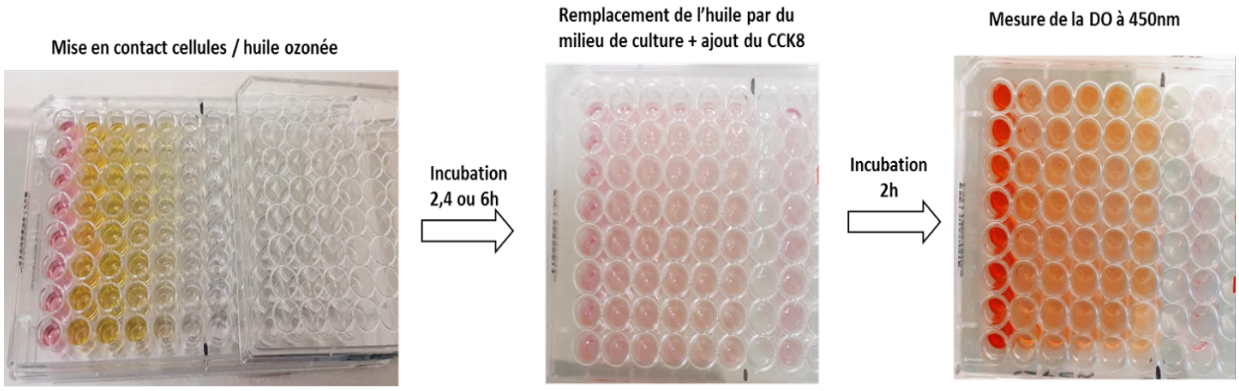

Figure 16 : Méthode d'étude de cytotoxicité CCK-8 à la suite d'une mise en contact avec les différents mélanges d'huile (Source : November Mahéas)

L'huile étant adhérente aux parois des puits et impossible à retirer entièrement, cela influençait la vitesse de dégradation du produit CCK-8 en formazan coloré. Il était donc impossible de comparer les densités optiques des puits ayant contenu de l'huile (quelle que soit sa proportion) avec les densités optiques des puits témoin à milieu de culture. Les résultats de densité optique des puits à huile ozonée dans ses différentes proportions ont donc été directement comparés à ceux des puits à huile d'olive pure, par acquis, non toxique. L'expérience décrite a été réalisée deux fois pour vérifier la répétabilité des résultats.

II.3.3. Résultats

II.3.3.1 Observation des cellules après mise en contact avec les huiles

L'observation des cellules au microscope optique montrait des cellules adhérentes en cours de croissance dans les trois conditions extrêmes testées (cellules en milieu de culture témoin, huile d'olive pure, huile ozonée pure) et pour les trois temps testés (au bout de deux, quatre et six heures d'incubation). Les cellules étaient bien visibles, adhérentes, et aucun débris cellulaire ou signe de dégradation n'était visible sur les tapis cellulaires (Figure 17).

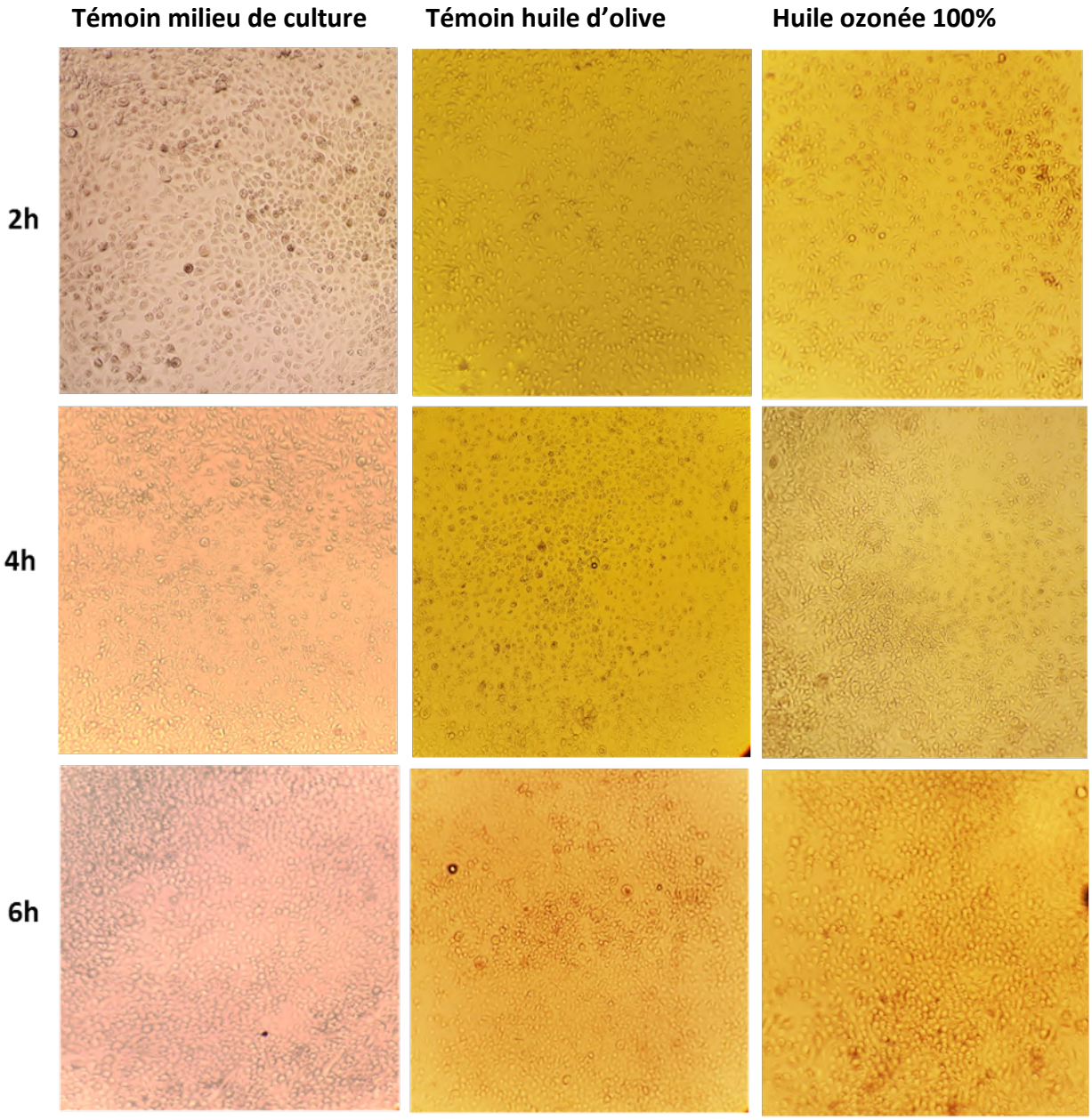

Figure 17 : Observation au microscope optique des cellules dans les trois conditions testées au bout de 2, 4 et 6 heures d'incubation (Source : unité de dermatologie VetAgro Sup)

II.3.3.2 Résultats de l'étude colorimétrique au CCK-8

Les densités optiques obtenues étaient parfaitement similaires entre toutes les conditions testées aux 3 temps d'incubation et de l'ordre de 0.44 pour 2h, 0.53 pour 4h et 0.47 pour 6h (Figure 18). Il n'y avait pas de différence significative entre les différentes concentrations d'huile ozonée et l'huile d'olive, ni entre les différents temps de contact testés ($p<0,05$, test de Student).

	2h	Huile Ozonnée			
Te cellules	Te huile olive	25%	50%	75%	100%
2,951	0,434	0,461	0,478	0,459	0,461
3,223	0,413	0,471	0,451	0,451	0,467
2,943	0,416		0,432	0,437	0,464
3,494	0,399	0,436	0,451	0,409	0,473
3,129	0,432	0,447	0,382	0,415	0,439
3,299	0,452	0,428	0,475	0,496	0,404
3,552	0,429	0,496	0,428	0,411	
3,693	0,488	0,475	0,486	0,409	0,413
	0,433	**0,459**	**0,448**	**0,436**	**0,446**
	4h	Huile Ozonnée			
Te cellules	Te huile olive	25%	50%	75%	100%
3,432	0,574	0,534	0,572	0,603	0,512
3,788	0,497	0,546	0,514	0,558	0,494
3,601	0,499	0,551	0,531	0,475	0,492
3,897	0,484	0,561	0,504	0,578	0,549
3,545	0,548	0,528	0,574	0,487	0,527
3,641	0,561	0,509	0,569	0,511	0,547
3,775	0,582	0,543	0,526	0,576	0,522
3,83	0,499	0,561	0,552	0,57	0,526
	0,531	**0,542**	**0,543**	**0,545**	**0,521**
	6h	Huile Ozonnée			
Te cellules	Te huile olive	25%	50%	75%	100%
3,714	0,482	0,499	0,499	0,472	0,493
3,144	0,434	0,423	0,423	0,515	0,446
3,669	0,453	0,513	0,513	0,482	0,476
3,582	0,518	0,469	0,469	0,467	0,459
3,252	0,462	0,492	0,492	0,495	0,437
3,167	0,45	0,478	0,478	0,499	0,456
3,574	0,467	0,499	0,499	0,524	0,484
3,508	0,477	0,46	0,46	0,491	0,515
	0,468	**0,479**	**0,479**	**0,493**	**0,471**

Figure 18 : Densités optiques des puits après réaction avec le CCK-8

Les moyennes des densités optiques pour chaque condition testée ont été rassemblées dans le tableau suivant (Tableau V). Les résultats de densité optique obtenus étaient similaires entre les deux réalisations successives de l'étude, ce qui montrait une répétabilité de ces résultats.

Tableau V : Densités optiques moyennes après réaction avec le CCK-8

Temps d'incubation	Huile d'olive témoin	25% d'huile ozonée	50% d'huile ozonée	75% d'huile ozonée	100% d'huile ozonée
2 heures	0.43	0.46	0.45	0.44	0.45
4 heures	0.53	0.54	0.54	0.55	0.52
6 heures	0.47	0.48	0.48	0.49	0.47

II.3.4. Discussion

L'observation au microscope de cellules adhérentes en cours de croissance dans les trois conditions testées montre une excellente innocuité de l'huile ozonée sur les kératinocytes CPEK. Cette interprétation est confirmée par l'absence de différence significative entre les densités optiques des différentes concentrations en huile ozonée et l'huile d'olive témoin après la réaction avec le CCK-8. On peut donc déduire de cette étude que l'huile ozonée ne présente aucune toxicité *in vitro* pour les kératinocytes canins.

Ces résultats sont compatibles avec d'autres études ayant démontré l'absence de cytotoxicité de l'huile ozonée ou l'eau ozonée sur des fibroblastes humains (65), des fibroblastes de souris (66) et des kératinocytes humains (67)(68). Une étude bibliographique de 2022 sur les risques de l'huile et de l'eau ozonée pour la peau humaine, incluant des études *in vitro* et cliniques, a conclu qu'il n'existe pas de risques significatifs de l'utilisation de ces solutions topiques pour les affections cutanées chez l'homme (69). Étant donné l'absence de cytotoxicité *in vitro* pour les kératinocytes canins montrée dans cette étude et l'ensemble des études déjà réalisées sur la peau de l'homme, l'huile ozonée semble non toxique pour la peau du chien et peut donc être utilisée en toute sécurité dans le cadre d'une étude clinique.

La principale limite de cette étude est l'impossibilité de comparer les densités optiques à la suite de la réaction avec le CCK-8 entre les conditions de contact avec un mélange d'huile et le témoin parfait contenant du milieu de culture seul. Cela est expliqué par une petite

quantité d'huile résiduelle dans les puits qui provoque un ralentissement de la dégradation du CCK-8 en formazan coloré et donc une densité optique nettement plus faible dans les puits tests que dans les puits témoin. Nous avons donc dû comparer les conditions avec un mélange d'huiles entre elles et utiliser comme témoin les puits où les cellules avaient été mises en contact avec de l'huile d'olive pure, qui est démontrée bénéfique pour la peau et non toxique (70).

Nous avons donc, à l'aide de cette étude, montré que l'huile ozonée PurO3 Ozonated Olive Oil ® peut être utilisée en toute sécurité en application topique chez le chien dans le cadre d'une étude clinique sur le traitement des pyodermites.

II.4. Conclusion de l'étude in vitro

En conclusion, cette étude in vitro avait pour objectifs d'identifier les espèces bactériennes en cause dans les cas de pyodermites canines, d'étudier l'effet de l'huile ozonée sur la croissance de l'espèce majoritaire *Staphylococcus pseudintermedius* et de démontrer que l'huile ozonée n'était pas cytotoxique pour les cellules de la peau du chien. Cette étude in vitro a fait l'objet d'une publication de poster scientifique dans le cadre du congrès européen de dermatologie vétérinaire en 2021 (Annexe 2).

Ainsi, nous avons pu confirmer que parmi les souches bactériennes impliquées dans des pyodermites chez le chien, préalablement identifiées comme Staphylocoque à coagulase positive, la majorité appartiennent à l'espèce *Staphylococcus pseudintermedius*. Nous avons également pu étudier la répartition des différents profils de résistance de ces souches et constater que la majorité des souches testées sont résistantes aux bêta-lactamines et une proportion non négligeable sont résistantes à tous les antibiotiques testés utilisables en médecine vétérinaire. Cela confirme la nécessité d'étudier de nouveaux traitements pour prendre en charge ces infections à germes multirésistants.

Puis nous avons démontré l'effet antibactérien de l'huile ozonée sur les neuf souches étudiées de *Staphylococcus pseudintermedius* avec une CMI de 10% d'huile ozonée dans le milieu de culture, quel que soit leur profil de résistance aux antibiotiques. Cela est en accord avec les autres études réalisées dans lesquelles aucune souche de bactérie résistante au pouvoir antiseptique de l'ozone n'a été identifiée. Cela nous permet de justifier l'intérêt d'étudier l'effet *in vivo* de l'huile ozonée en application topique dans le cadre du traitement de pyodermites chez le chien.

Enfin la dernière partie de l'étude nous a permis de démontrer que l'huile ozonée ne présente aucune cytotoxicité pour les kératinocytes épidermiques canins *in vitro*. Ce résultat, en concordance avec les autres études déjà réalisées en médecine humaine sur la peau, nous permet de procéder à la réalisation d'une étude clinique sans risque pour les chiens traités.

Nous pouvons maintenant vous présenter l'étude clinique de l'effet thérapeutique de l'huile ozonée en application topique pour le traitement de pyodermites localisées chez le chien.

PARTIE III : ÉTUDE CLINIQUE DE L'EFFET THÉRAPEUTIQUE DE L'OZONE TOPIQUE SUR DES PYODERMITES LOCALISÉES CHEZ LE CHIEN

III.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les pyodermites sont des affections fréquentes chez le chien dont le traitement devient de plus en plus difficile avec le développement des résistances. L'huile ozonée est une option thérapeutique qui semble intéressante pour traiter les pyodermites étant donné son efficacité antibactérienne et ses propriétés anti-inflammatoires et stimulantes de la cicatrisation. Nous avons démontré que cette huile ozonée a une bonne innocuité pour une application cutanée chez le chien et qu'elle élimine toute croissance bactérienne *in vitro* de *Staphylococcus pseudintermedius*. Nous allons maintenant étudier l'effet *in vivo* de l'huile ozonée en application topique sur des lésions de pyodermites localisées chez des chiens présentés au CHUVAC de VetAgro Sup. Le protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique de VetAgro Sup (N°2089).

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1 Critères de sélection des cas

Les cas ont été sélectionnés parmi les chiens présentés en consultation de dermatologie au CHUVAC de VetAgro Sup. Pour être inclus dans l'étude, le chien devait être atteint d'une pyodermite dont le diagnostic était établi à la suite d'un examen clinique et cytologique. Il n'y avait pas de discrimination selon l'âge, le sexe ou le poids de l'animal. Seuls les chiens dont la pyodermite était localisée avec une taille maximale de lésions de sept par douze centimètres ont pu être inclus. La pyodermite pouvait être de surface, superficielle ou profonde. Nous avions exclu de l'étude tout chien atteint de dermatose allergique, de maladie générale, de cancer, de troubles du comportement et d'infections parasitaires ou fongiques. Les chiens ayant reçu une corticothérapie dans les 15 jours précédant la consultation avaient également été exclus.

II.2.2 Consultation d'inclusion

Lors de la première consultation, appelée consultation d'inclusion dans l'étude, les commémoratifs et l'anamnèse étaient recueillis puis l'animal faisait l'objet d'un examen clinique et dermatologique. Tous les examens complémentaires raisonnés étaient réalisés (calque cutané, brossage, raclage, etc.). Lorsqu'un diagnostic de pyodermite localisée était établi (sur la base de l'examen clinique et cytologique), l'étude était présentée aux propriétaires du chien qui pouvaient alors choisir de rentrer dans l'étude ou de suivre un protocole thérapeutique classique. Ceux intéressés par l'étude recevaient un document d'information sur l'étude (Annexe 3) à lire et devaient signer un document de consentement éclairé (Annexe 4) avant l'entrée dans l'étude.

Après l'obtention de l'accord des propriétaires, les lésions du chien étaient décrites, mesurées et photographiées et le clinicien évaluait le score clinique de l'animal selon le tableau suivant (Tableau VI). Les scores pour chaque catégorie étaient additionnés pour donner un score clinique total sur 21.

Tableau VI : Score clinique

Score	0	1	2	3
Type de lésions	Absence de lésions primaires	Papules et/ou Pustules	Furoncles	Cellulite/ Ulcères
Érythème	Absent	Léger	Modéré	Sévère
Croûtes	Absentes	1 à 2 croutes	Moins de 10 croûtes	Plus de 10 croûtes
Lichénification	Absente	Légère	Modérée	Sévère
Alopécie	Absente	Légère	Modérée	Sévère
Odeur	Absente	Légère	Modérée	Sévère
Douleur	Absente	Légère	Modérée	Sévère

Il était ensuite demandé au propriétaire d'évaluer le niveau de prurit de son chien sur une échelle visuelle (Figure 19), ainsi que l'impact de l'affection diagnostiquée sur le bien-être de son animal à l'aide d'un court questionnaire à choix multiples (Figure 19). Cela permettait d'identifier un niveau de départ et de faciliter le suivi de l'effet du traitement.

Grille d'évaluation du prurit de votre chien :

Avec un stylo à bille, faites une croix sur l'échelle visuelle analogique à l'emplacement correspondant à votre évaluation du niveau de démangeaisons de votre chien.

Démangeaisons extrêmes – en continu
Les démangeaisons ne cessent jamais, quoi qu'il arrive, y compris tout au long de la consultation au cabinet vétérinaire : seul une contrainte de l'animal l'empêche de chercher à se soulager.

Démangeaisons fortes – épisodes prolongés
Les démangeaisons peuvent survenir durant la nuit (si observé), mais également pendant les repas, lorsqu'il joue, lorsqu'il fait de l'exercice ou lorsqu'il est distrait

Démangeaisons modérées – épisodes réguliers
Les démangeaisons peuvent survenir durant la nuit (si observé), mais jamais pendant les repas, lorsqu'il joue, lorsqu'il fait de l'exercice ou lorsqu'il est distrait

Démangeaisons légères – un peu plus fréquentes
Le chien ne se démange pas lorsqu'il dort, mange, joue, fait de l'exercice ou lorsqu'on le distrait

Très peu de démangeaisons – seulement des épisodes occasionnels
Le chien se démange un peu plus depuis qu'il a des problèmes de peau

Chien normal – je ne pense pas que les démangeaisons soient un problème

Questionnaire d'évaluation du bien-être de votre chien :

1. La maladie de votre chien a-t-elle eu un impact sur son comportement et/ou sur son humeur (plus lent, plus nerveux, plus agressif, etc.)

□ Pas du tout □ Un peu □ Plutôt □ Beaucoup

2. Le sommeil de votre chien a-t-il été perturbé par la maladie ?

□ Pas du tout □ Un peu □ Plutôt □ Beaucoup

3. Les repas de votre chien ont-ils été impactés par la maladie? (Baisse d'appétit, démangeaisons pendant les repas, etc.)

□ Pas du tout □ Un peu □ Plutôt □ Beaucoup

4. Les activités et jeux de votre chien ont-ils été perturbés par la maladie? (Plus fatigué, nerveux, démangeaisons etc.)

□ Pas du tout □ Un peu □ Plutôt □ Beaucoup

Figure 19 : Échelle d'évaluation de prurit et questionnaire d'évaluation du bien-être à remplir par le propriétaire

Nous avions défini un score de prurit selon le niveau établi par le propriétaire sur l'échelle visuelle allant de 0/5 (croix placée face à « Chien normal ») à 5/5 (croix placée face à « Démangeaisons extrêmes – En continu »). Selon les réponses du propriétaire au questionnaire, le bien-être du chien était considéré comme :

- Idéal lorsque toutes les cases cochées par le propriétaire étaient « Pas du tout »
- Légèrement altéré lorsque au moins une case « Un peu » était cochée
- Modérément altéré lorsque au moins une case « Plutôt » était cochée
- Sévèrement altéré lorsque au moins une case « Beaucoup » était cochée

La consultation d'inclusion s'achevait avec la délivrance d'un pot de 59mL d'huile d'olive ozonée PurO3 Ozonated Olive Oil ® et des consignes de traitement et de suivi.

II.2.3 Protocole thérapeutique et suivi clinique

Le protocole de traitement était simple et consistait à appliquer l'huile ozonée sur les lésions, deux fois par jour (matin et soir) pendant toute la durée de l'étude. La durée d'étude prévue était de 6 semaines avec une consultation de suivi toutes les 2 semaines. Quatre consultations étaient prévues pour chaque animal : la consultation d'inclusion à J0, la première consultation de suivi à J14, la deuxième consultation de suivi à J28 et la dernière consultation de sortie de l'étude à J42.

Lors des consultations de suivi à J14 et J28, l'animal faisait l'objet d'un examen clinique et dermatologique permettant d'évaluer l'évolution des lésions et de contrôler son état général. Les lésions étaient mesurées, photographiées et un calque par apposition était réalisé si elles suintaient, un calque cutané sinon. L'observation au microscope à l'immersion après coloration RAL555 ® permettait d'identifier la présence ou non de bactéries. Le clinicien évaluait le score clinique de l'animal et le propriétaire évaluait le niveau de prurit (Figure 19).

Lors de la consultation de sortie d'étude à J42, toutes les étapes précédentes étaient de nouveau réalisées. Le propriétaire devait également évaluer la qualité de vie de son animal à l'aide du même questionnaire que lors de la consultation d'inclusion (Figure 19). Selon les résultats obtenus, le clinicien décidait, avec le propriétaire, de la poursuite ou non du traitement à l'huile ozonée en dehors du cadre de l'étude.

II.2.4 Sortie d'étude

La sortie de l'étude avait normalement lieu au bout de 6 semaines de traitement aboutis lors de la consultation de sortie d'étude à J42. Dans certains cas, il était possible que l'animal soit sorti de l'étude de façon anticipée. Ces cas incluaient une altération de l'état général de l'animal ou l'apparition de nouveaux symptômes, l'apparition d'effets secondaires, la non-présentation de l'animal aux consultations de suivi, le non-respect du protocole par le propriétaire et le décès de l'animal, quelle que soit sa cause.

Le propriétaire était libre de décider à tout moment de la sortie de son animal de l'étude sans avoir à se justifier et sans que cela ne porte préjudice à la qualité des soins dont bénéficierait son animal auprès du vétérinaire dermatologue investigateur.

III.3. Résultats

III.3.1 Cas inclus dans l'étude

Six chiens ont été inclus dans l'étude entre mai et décembre 2021. Les chiens étudiés avaient entre huit mois et dix ans d'âge, il y avait quatre mâles castrés, une femelle entière et une femelle stérilisée. Deux bouledogues français, un berger allemand, un Landseer, un Golden retriever et un croisé Jack Russell terrier composaient la population incluse. Deux cas n'ont pas pu terminer les 6 semaines de traitement de l'étude en raison d'une altération de l'état général et d'une aggravation des lésions pour l'un, et d'une affection concomitante nécessitant la mise sous antibiotiques par voie générale pour l'autre. Les quatre autres chiens ont suivi l'étude jusqu'à la fin des six semaines.

III.3.2 Cas ayant suivi toute l'étude

III.3.2.1 Livaï

Livaï est une chienne Berger Allemand entière de 8 mois présentée pour des lésions au niveau des plis inguinaux évoluant depuis cinq jours. Lors de la consultation d'inclusion, elle présentait des pustules folliculaires et des collerettes épidermiques, associées à un érythème modéré sur une zone lésionnelle alopécique de 7 par 10 cm au niveau des plis inguinaux (Figure 20). L'examen cytologique d'un calque par apposition avait mis en évidence des coques et des polynucléaires neutrophiles avec des images de phagocytose. Une folliculite bactérienne juvénile avait été diagnostiquée. Le score clinique établi par les cliniciens était de 6/21, le prurit était léger (score de 2 sur 5) et le bien-être de la chienne était idéal.

Lors de la première consultation de suivi (à J14), elle présentait uniquement des collerettes épidermiques associées à un léger érythème au niveau des plis inguinaux dans une zone lésionnelle alopécique réduite d'environ 6 par 5 cm (Figure 20). Le score clinique était de 2/21 et le prurit complètement absent (score de 0 sur 5).

Lors de la deuxième consultation de suivi (à J28), elle ne présentait plus aucune lésion mais un léger érythème persistait dans l'ancienne zone des lésions, qui restait alopécique (Figure 20). Le score clinique restait à 2/21 et le prurit était toujours absent (score de 0 sur 5).

Lors de la dernière consultation de sortie d'étude (à J42), la guérison était complète (Figure 20), le score clinique était de 0/21, le prurit absent (score de 0 sur 5) et le bien-être de la chienne était idéal.

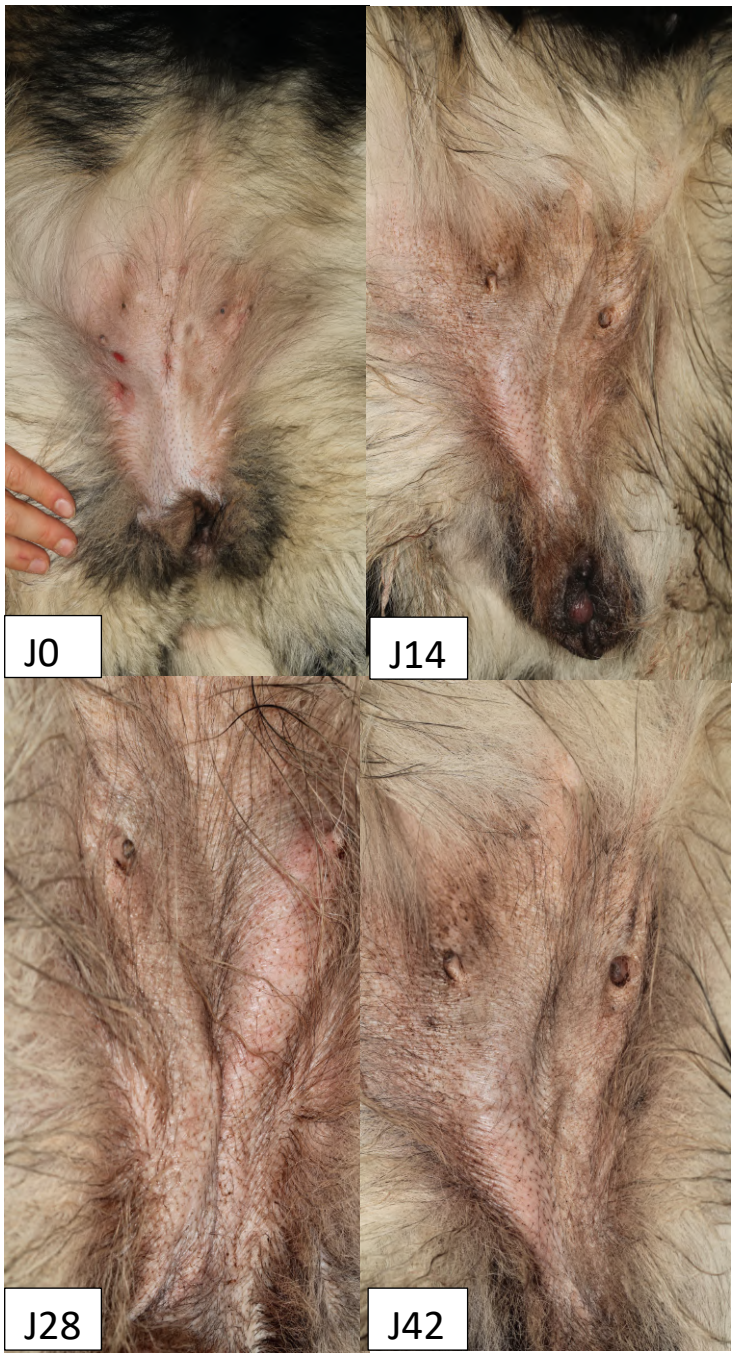

Figure 20 : Évolution des lésions de Livaï au cours de l'étude (Source : unité de dermatologie de VetAgro Sup)

Par ailleurs, la propriétaire avait fait des observations sur le produit qui paraissait appétant pour la chienne qui le léchait excessivement et également sur le fait que le produit donnait un aspect gras et poisseux au pelage et à la peau de la chienne après application.

III.3.2.2 Samy

Samy est un chien Golden Retriever mâle castré de 8 ans présenté pour des lésions de dermatite pyotraumatique au niveau de la joue gauche. Lors de la consultation d'inclusion, il présentait des lésions ulcératives suintantes alopéciques circulaires et des croûtes sur une zone de 3 par 5 cm au niveau de la joue gauche (Figure 21). L'examen cytologique d'un calque cutané avait mis en évidence des coques, des macrophages, des hématies et des polynucléaires neutrophiles. Une pyodermite pyotraumatique compliquée d'une infection bactérienne superficielle avait été diagnostiquée. Le score clinique établi par les cliniciens était de 14/21, le prurit était modéré (score de 3 sur 5) et le bien-être du chien était modérément altéré par sa pyodermite.

Lors de la première consultation de suivi (à J14), il présentait une zone lésionnelle alopécique de taille légèrement réduite de 3 par 4,5 cm, avec une seule croûte et de l'érythème. La lésion ne suintait plus et n'était plus ulcérative (Figure 21). Le score clinique était de 4/21 et le prurit bien réduit (score de 1 sur 5).

Lors de la deuxième consultation de suivi (à J28), il ne présentait plus de croûtes et seul un léger érythème persistait dans une zone alopécique. Le score clinique était de 2/21 et le prurit était absent (score de 0 sur 5).

Lors de la dernière consultation de sortie d'étude (à J42), la guérison était complète, le score clinique était de 1/21 en raison d'une légère alopécie restante, le prurit était absent (score de 0 sur 5) et le bien-être du chien était idéal.

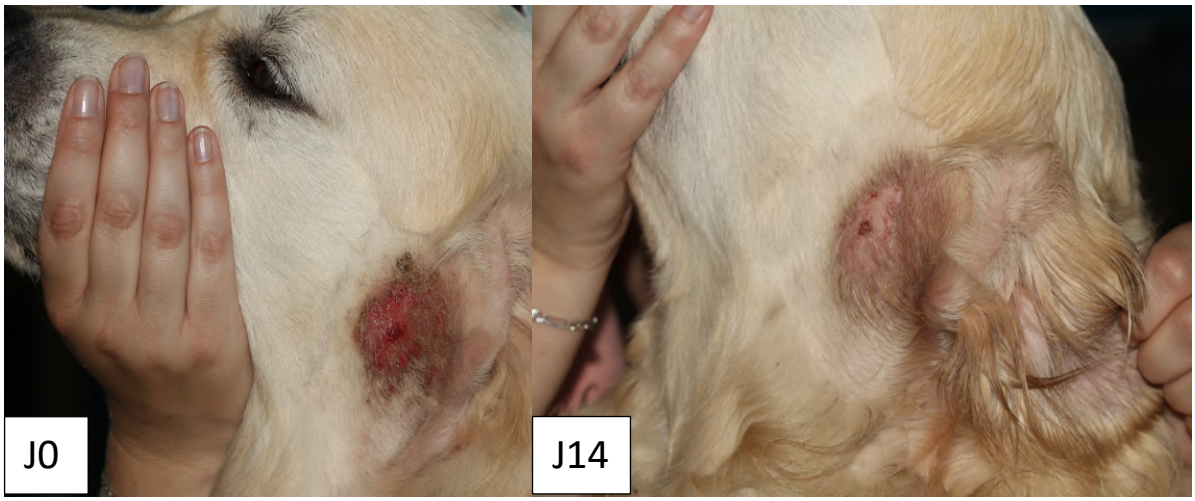

Figure 21 : Bonne évolution des lésions de Samy en 2 semaines (Source : unité de dermatologie de VetAgro Sup)

III.3.2.3 Raymonde

Raymonde est une chienne Bouledogue Français stérilisée de 3 ans présentée pour des lésions au niveau du front, des babines, de la vulve et des espaces interdigités. Lors de la consultation d'inclusion, elle présentait des furoncles et des croûtes dans une zone alopécique hyperpigmentée de 4 par 2 cm au niveau du front (Figure 23). Elle présentait également des pustules, des croûtes de de l'érythème dans les espaces interdigités, de l'érythème et des croûtes au niveau de la vulve et des croûtes et de l'hyperpigmentation au niveau des babines. L'examen cytologique d'un calque par apposition avait mis en évidence des coques, des macrophages et des polynucléaires neutrophiles au niveau des furoncles du front (Figure 22). Une pyodermite profonde avait été diagnostiquée.

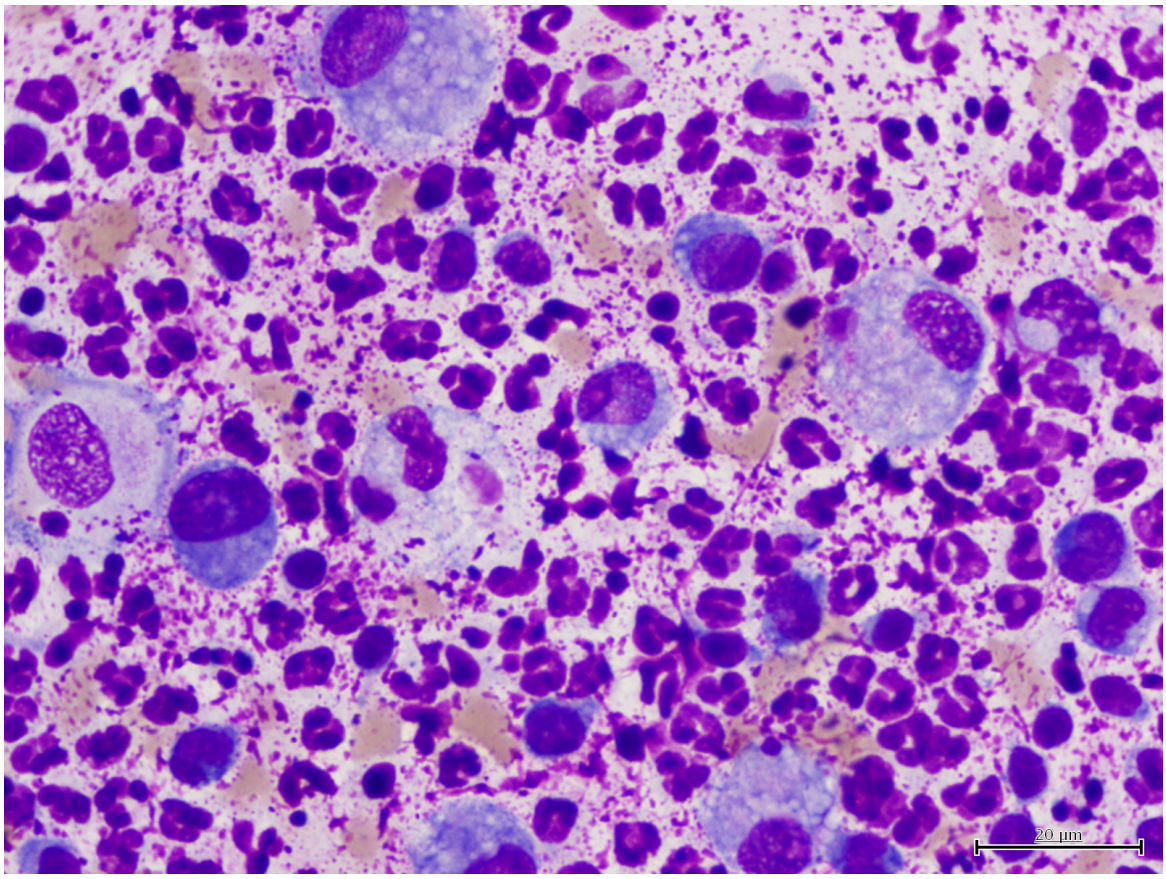

Figure 22 : Cytologie de calque par apposition de pus du furoncle de la tête de Raymonde à J0 (Source : unité de dermatologie de VetAgro Sup)

Il avait été décidé de mettre en place le traitement à base d'huile ozonée uniquement pour les lésions localisées sur la tête, et de traiter les babines, la vulve et les espaces interdigités à l'aide de shampooing et de lingettes antiseptiques. Le score clinique établi par les cliniciens était de 9/21, le prurit était fort (score de 4 sur 5) et le bien-être de la chienne était sévèrement affecté par sa pyodermite.

Lors de la première consultation de suivi (à J14), elle présentait uniquement un furoncle mesurant 1 par 0,8 cm au niveau de la tête (Figure 23). Le score clinique était de 6/21 et le prurit légèrement diminué (score de 3,5 sur 5).

Lors de la deuxième consultation de suivi (à J28), les lésions de la tête avaient régressé (Figure 23). Le score clinique était de 5/21 et le prurit était encore diminué (score de 2 sur 5).

Lors de la dernière consultation de sortie d'étude (à J42), les lésions étaient en cours d'amélioration sans être complètement guéries (Figure 23). Le score clinique était de 4/21, le prurit au même stade (score de 2 sur 5) et le bien-être de la chienne restait légèrement altéré.

Figure 23 : Évolution des lésions de la tête de Raymonde au cours de l'étude (Source : unité de dermatologie de VetAgro Sup)

III.3.2.4 Spotty

Spotty est un chien Landseer mâle castré de 1 an et demi présenté pour une pyodermite récidivante au niveau des plis inguinaux. Sa pyodermite avait préalablement été traitée avec des lingettes désinfectantes à la chlorhexidine avec succès. Lors de la consultation d'inclusion, il présentait des grandes collerettes épidermiques et des croûtes dans une zone lésionnelle érythémateuse de 10 par 3 cm au niveau du pli inguinal gauche (Figure 24). L'examen cytologique d'un calque cutané avait mis en évidence des coques et des polynucléaires neutrophiles. Une pyodermite superficielle extensive avait été diagnostiquée. Le score clinique établi par les cliniciens était de 6/21, le prurit léger (score de 2 sur 5) et le bien-être était idéal.

Lors de la première consultation de suivi (à J14), il présentait une zone lésionnelle alopécique de taille augmentée de 8 par 12 cm, mais beaucoup moins d'érythème et plus du tout de croûtes (Figure 24). Le score clinique était de 3/21 et le prurit était réduit (score de 1 sur 5).

Lors de la deuxième consultation de suivi (à J28), il présentait une lésion érythémateuse étendue de 14 par 18 cm au niveau abdominal mais ne présentait plus de collerettes épidermiques (Figure 24). Le score clinique était de 6/21 et le prurit absent (score de 0 sur 5).

Lors de la dernière consultation de sortie d'étude (à J42), il ne présentait plus de lésions à part un très léger érythème persistant. Le score clinique était de 1/21, le prurit très léger (score de 1 sur 5) et le bien-être était idéal.

Par ailleurs, la propriétaire n'a pas apprécié la coloration et l'aspect poisseux du poil après application de l'huile ozonée.

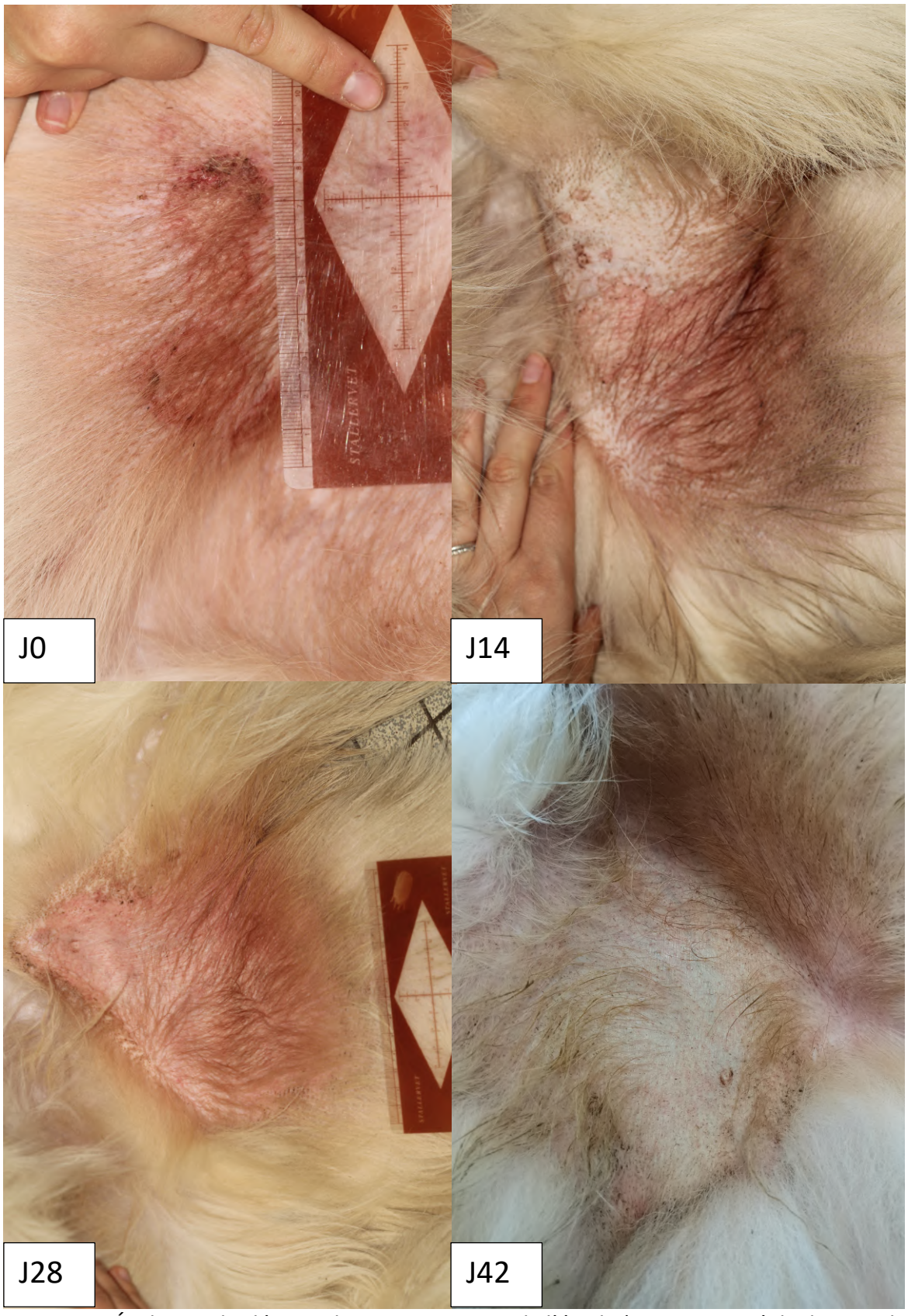

Figure 24 : Évolution des lésions de Spotty au cours de l'étude (Source : unité de dermatologie de VetAgro Sup)

III.3.3 Cas retirés de l'étude

III.3.3.1 Guismo

Guismo est un chien croisé Jack Russell de 10 ans présenté pour un nodule sur le tarse droit évoluant depuis 1 mois. Il avait un historique de pyodermites récidivantes à Staphylocoque multirésistant. Un traitement à base d'acide fusidique en pommade (antibiotique local), lingettes antiseptiques et antibiotique par voie générale pendant une semaine avait été mis en place sans permettre une guérison de la lésion. Lors de la consultation d'inclusion, il présentait un nodule ferme alopécique prurigineux et suintant (liquide séro-hémorragique) de 1,5 par 2 cm au niveau de la face latérale du tarse droit. L'examen cytologique d'un calque par apposition avait mis en évidence des bacilles, des hématies, des macrophages et des polynucléaires neutrophiles dégénérés. Une cellulite bactérienne avait été diagnostiquée. Le score clinique établi par les cliniciens était de 7/21, le prurit modéré (score de 3 sur 5) et le bien-être était légèrement altéré par sa pyodermite.

Lors de la première consultation de suivi (à J14), le nodule sur le tarse droit était affaissé et diminué de taille à 1,8 par 1,4 cm, il ne suintait plus. Le score clinique était de 5/21 et le prurit réduit (score de 1 sur 5). En revanche, Guismo présentait une boiterie du postérieur gauche et un trajet fistuleux faisant suspecter un corps étranger végétal de type épillet. Il avait alors été mis sous antibiotique local (acide fusidique) et systémique (céfalexine) ce qui imposait un retrait de l'étude. Cependant, étant donné l'évolution favorable du nodule sur le tarse gauche, la propriétaire continuait d'appliquer l'huile ozonée dessus matin et soir ce qui avait permis, à terme, une guérison de cette lésion. La propriétaire était très satisfaite de l'effet de l'huile ozonée.

III.3.3.2 Nao

Nao est un chien Bouledogue français de 4 ans présenté pour une furonculose interdigitée récidivante. Sa furonculose avait préalablement été traitée avec des shampooings antiseptiques, de l'Apoquel® (oclacitinib) et des antibiotiques systémiques, sans résolution complète. Lors de la consultation d'inclusion, il présentait des furoncles interdigités suintants associés à de l'érythème et de l'alopécie, au niveau des face palmaire et dorsale des quatre membres. L'examen cytologique d'un calque par apposition avait mis en évidence des coques, des hématies et des polynucléaires neutrophiles. Une furonculose interdigitée bactérienne avait été diagnostiquée. Le score clinique établi par les cliniciens était de 10/21, le prurit modéré (score de 3 sur 5) et le bien-être du chien était légèrement altéré par sa pyodermite.

Lors de la première consultation de suivi (à J14), la furonculose était sévèrement aggravée avec une extension des lésions et une atteinte de l'état général de Nao. Le score clinique était augmenté à 15/21 et le prurit également aggravé (score de 4 sur 5). Le bien-être du chien était alors sévèrement altéré par sa pyodermite. Nao avait alors été retiré de l'étude pour être pris en charge avec un traitement classique de pyodermite profonde (shampooing antiseptique, acide fusidique local et clindamycine par voie générale). La clindamycine a été choisie dans ce cas selon les recommandations du GEDAC étant donné qu'il avait déjà reçu de l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique et de la céfalexine, sans guérison.

III.3.4 Synthèse des résultats pour l'ensemble des cas

Les cas intégrés dans l'étude n'étaient pas facilement comparables étant donné la forte variation des types et localisation des lésions de chaque chien. Nous pouvons tout de même comparer l'évolution des scores clinique établis par les cliniciens et du niveau de prurit estimé par le propriétaire à chaque consultation de l'étude. Nous obtenons les graphiques ci-dessous (Figures 25 et 26).

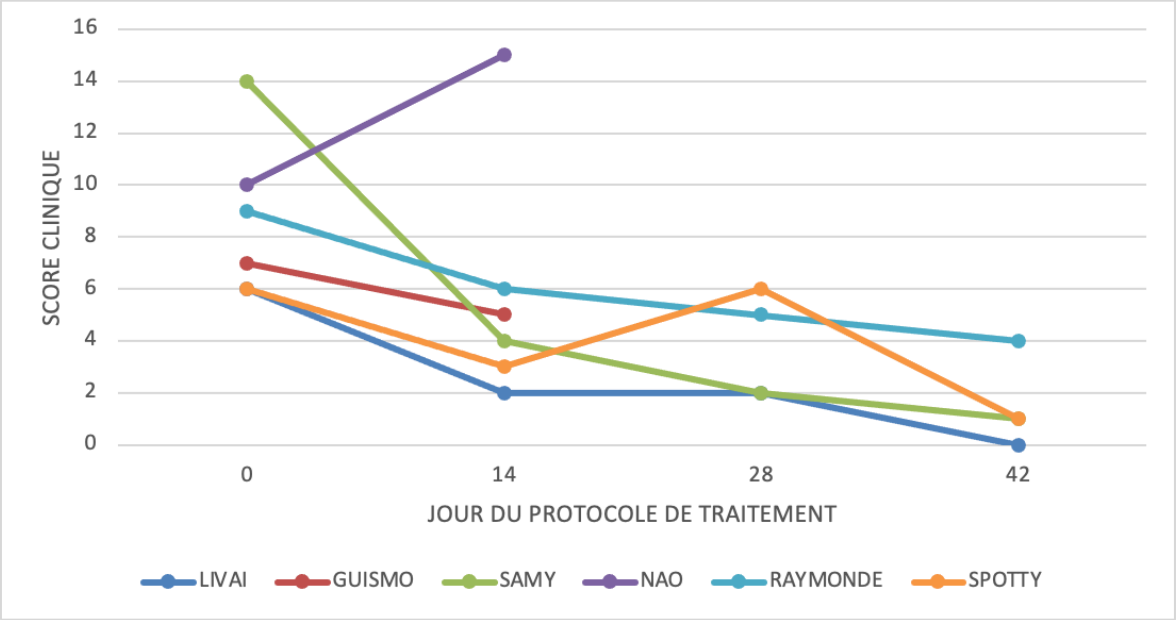

Figure 25 : Évolution du score clinique au cours du traitement

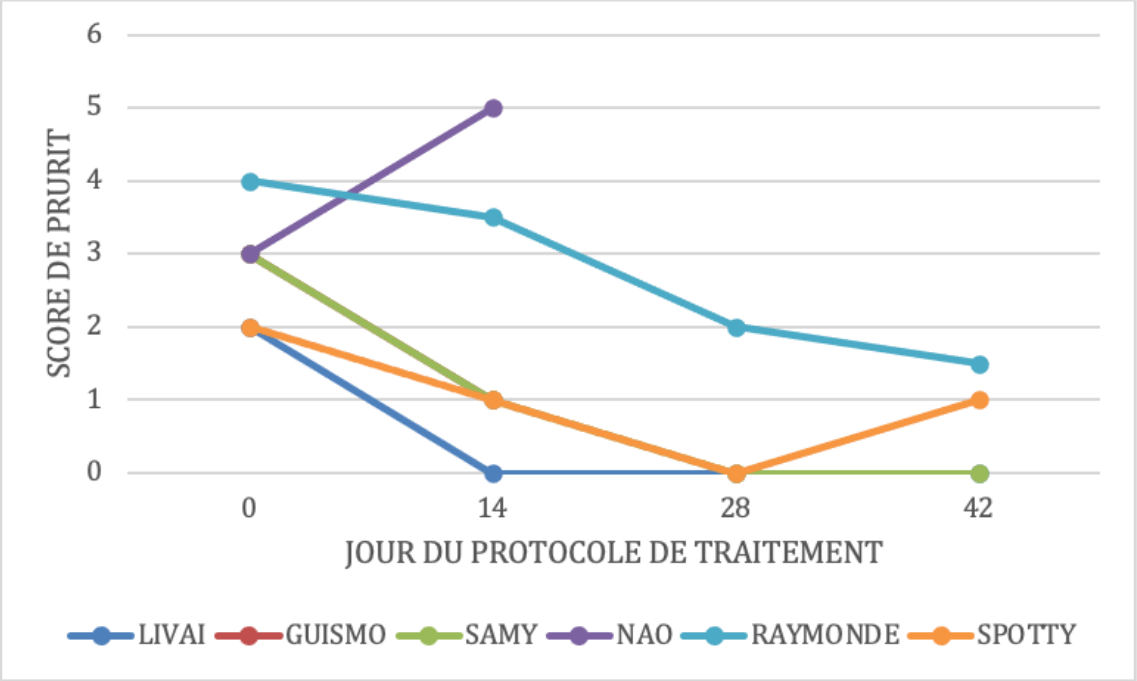

Figure 26 : Évolution du score de prurit au cours du traitement

Nous observons une tendance générale à la diminution du score clinique et du niveau de prurit avec le traitement. Seul Nao présente une forte augmentation du score clinique et du prurit, engendrant sa sortie de l'étude à J14. Les chiens ayant suivi l'étude jusqu'au bout des six semaines ont un score clinique et un niveau de prurit final nettement inférieur à ceux établis lors de la consultation d'inclusion.

Le traitement topique à l'huile ozonée a permis une guérison complète des lésions en six semaines pour trois chiens et une guérison partielle pour un chien.

III.4. Discussion

Les résultats obtenus sont encourageants car ils montrent que l'application topique d'huile ozonée peut permettre, à elle seule, une guérison complète des lésions de pyodermite localisée dans 50% des cas (3 cas sur 6). De plus, 16,7% des cas (1 cas sur 6) ont montré une guérison partielle et 16.7% des cas (1 cas sur 6) ont été retirés de l'étude en raison de l'apparition d'une autre dermatose. Enfin 16.7% des cas (1 cas sur 6) ont montré une aggravation de la dermatose après 14 jours d'application du traitement. La non-réponse de ce dernier cas peut être expliquée par une sévérité plus marquée des lésions : uniquement des lésions profondes et nombreuses. Il est possible que l'huile ozonée n'ait pas pu pénétrer assez profondément pour atteindre les bactéries dans les furoncles. Le propriétaire de Nao avait également rapporté que le chien se léchait les pattes à la suite de l'application du

produit ce qui peut expliquer une efficacité diminuée. Nous n'avons pas de données sur la réponse au traitement classique à la suite de son retrait de l'étude, étant donné qu'il ne s'est pas présenté en consultation de suivi au CHUVAC.

Néanmoins, les propriétaires des chiens de l'étude étaient satisfaits par ce produit qui est facile à appliquer, ce qui permet une bonne observance. Les éléments négatifs rapportés venaient de sa consistance huileuse qui avait tendance à colorer les poils clairs et donner un aspect poisseux au pelage et à la peau. Certains chiens (2 cas sur 6) avaient tendance à lécher le produit dès son application et les propriétaires rapportaient une impression d'appétence de l'huile ozonée. Ceci devra être vérifié lors d'une étude avec plus de cas.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les résultats de cette étude pilote. En effet, le nombre de cas est trop faible pour conclure sur l'efficacité du traitement. Le faible nombre de cas recrutés sur cette période peut s'expliquer par le fait que le centre d'inclusion était le CHUVAC de VetAgro Sup, service universitaire de référé où les consultants sont des spécialistes. Ainsi, la plupart des chiens atteints de pyodermite présentent souvent des lésions généralisées ou ont déjà reçu de nombreux traitements et les propriétaires ne souhaitent pas essayer un nouveau traitement, qui n'a pas encore démontré son efficacité. De plus, la régularité des suivis tous les 15 jours, pour des propriétaires venant fréquemment de loin, était un frein important à l'inclusion. Il pourrait donc être intéressant de réaliser une future étude multicentrique et de viser, notamment, les cliniques vétérinaires généralistes.

De plus, aucun témoin ou traitement de comparaison n'a été utilisé. Une étude avec comparaison à un placebo serait très intéressante (mais peut-être peu éthique). Il serait intéressant de comparer la vitesse de résolution clinique entre l'huile ozonée et un autre traitement des pyodermites localisées (shampoing antiseptique, spray antiseptique, lingette antiseptique associé ou non à un antibiotique topique suivant la profondeur). Cette étude pourrait être mise en place sur des chiens présentant 2 lésions localisées du même type pour éviter l'influence de l'environnement et de l'observance des propriétaires sur les résultats. Pour augmenter la pertinence des résultats, il faudrait préparer un protocole d'étude en double aveugle ce qui semble très compliqué car la galénique de l'huile ozonée est très particulière et laisse systématiquement un aspect gras au pelage et à la peau.

C’est la première étude de ce type à avoir été réalisée. La bonne réponse au traitement des 4 chiens ayant suivi l’étude pendant les six semaines prévues est très satisfaisante et peut nous permettre de dire que l’huile ozonée est une perspective thérapeutique intéressante à envisager pour prendre en charge des pyodermites localisées chez le chien.

III.5. Conclusion de l’étude clinique

En conclusion, cette étude clinique avait pour objectif d’étudier l’effet thérapeutique de l’application d’huile d’olive ozonée sur des lésions de pyodermites localisées chez le chien. Le faible nombre de cas inclus dans l’étude et l’échec du traitement pour l’un d’eux ne permet pas de conclure sur une efficacité de ce traitement dans tous les cas de pyodermites. Cependant, cette étude nous permet de dire que l’application topique d’huile ozonée présente une efficacité intéressante pour traiter des pyodermites localisées chez le chien, notamment puisqu’elle peut permettre à elle seule la guérison complète des lésions en six semaines. D’autres études, multicentriques, en double aveugle, avec plus de cas et comparatives seraient nécessaires pour étudier si ce traitement présente une efficacité similaire à la prise en charge classique des pyodermites.

CONCLUSION

Les pyodermites sont des affections fréquentes chez le chien, définies par un envahissement cutané par des bactéries pyogènes dont l'espèce majoritaire est *Staphylococcus pseudintermedius*. Le traitement de ces affections implique classiquement l'utilisation de shampooing antiseptique, d'antibiotiques en pommade et d'antibiotiques par voie générale, selon la profondeur des lésions. Cependant, avec l'essor de la résistance aux antibiotiques, la prise en charge des pyodermites canines devient de plus en plus complexe et nécessite la recherche de nouveaux traitements. De plus, la prévalence croissante de l'antibiorésistance est une préoccupation majeure en matière de santé publique, qu'il faut absolument limiter en réduisant la prescription d'antibiotiques. Ainsi, tout traitement permettant d'éviter l'utilisation d'antibiotiques est intéressant à étudier.

La thérapie à l'ozone est une option thérapeutique intéressante pour la prise en charge d'affections bactériennes étant donné le fort pouvoir antiseptique de l'ozone. Les autres propriétés anti-inflammatoires et stimulantes de la cicatrisation rendent l'étude de ce traitement pour les pyodermites pertinente. Certaines études ont permis de démontrer l'intérêt de l'ozone topique pour soigner des affections dermatologiques chez l'homme ou le mouton mais aucune étude n'avait, à ce jour, été réalisée sur le traitement des pyodermites chez le chien.

La première partie de notre étude, *in vitro*, a permis de démontrer que l'huile ozonée inhibe complètement la croissance bactérienne de neuf souches de *Staphylococcus pseudintermedius* impliquées dans des pyodermites canines, et cela quel que soit leur profil de résistance aux antibiotiques. Ensuite, nous avons montré que l'huile ozonée ne présente pas d'effet cytotoxique pour les kératinocytes canins, rendant son utilisation *in vivo* possible.

Enfin, l'étude clinique portant sur six chiens atteints de pyodermite du CHUVAC a permis d'établir que l'application topique d'huile ozonée est une perspective thérapeutique intéressante pour le traitement des pyodermites localisées chez le chien. En effet, l'application d'huile ozonée a permis à elle seule la guérison complète des lésions au bout de six semaines de traitement chez 50% des chiens (trois sur les six étudiés) et une guérison partielle pour 16% des cas (un chien). Les deux autres chiens ont dû être sortis de l'étude avant la fin des six semaines.

Les résultats de cette étude pilote prouvent l'intérêt de faire une étude sur un plus grand nombre de chiens sur la thérapie topique à l'ozone dans le cadre des pyodermites canines. Ce type d'étude nous permet d'élargir l'arsenal thérapeutique vétérinaire en y intégrant des thérapies complémentaires à la médecine traditionnelle, afin de pouvoir mieux soigner les animaux et réduire l'impact sur la santé publique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 2022;399(10325):629-55.

2. Batakliev T, Georgiev V, Anachkov M, Rakovsky S, Zaikov GE. Ozone decomposition. Interdiscip Toxicol. 2014;7(2):47-59.

3. Sciorsci RL, Lillo E, Occhiogrosso L, Rizzo A. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. Res Vet Sci. 2020;130:240-6.

4. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Arch Med Res. 2006;37(4):425-35.

5. Nur M, Restiwijaya M, Agustini T. Dielectric barrier discharge plasma reactor analysis as ozone generator. IEEE Conf Publ. 2014;129-32.

6. Borges G, Elias S, Silva S, Magalhães P, Macedo S, Ribeiro AP, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. J Cranio-Maxillofac Surg. 2017;45.

7. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. Int Immunopharmacol. 2018;56:235-41.

8. Dall'Olio M, Princiotta C, Cirillo L, Budai C, de Santis F, Bartolini S, et al. Oxygen-Ozone Therapy for Herniated Lumbar Disc in Patients with Subacute Partial Motor Weakness Due to Nerve Root Compression. Interv Neuroradiol. 2014;20(5):547-54.

9. Tartari APS, Moreira FF, Pereira MCDS, Carraro E, Cidral-Filho FJ, Salgado AI, et al. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. Inflammation. 2020;43(3):985-93.

10. Călin Cosmin R, Cristian C, Oana L. Ozone Therapy in Veterinary Medicine. 2016;26:49-53.

11. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Sticozzi C, et al. Ozonated oils as functional dermatological matrices: effects on the wound healing process using SKH1 mice. Int J Pharm. 2013;458(1):65-73.

12. Wen Q, Liu D, Wang X, Zhang Y, Fang S, Qiu X, et al. A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers. Int Wound J. 2022;19(4):853-70.

13. Izadi M, Kheirjou R, Mohammadpour R, Aliyoldashi MH, Moghadam SJ, Khorvash F, et al. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev. 2019;13(1):822-5.

14. Borrelli E, Bocci V. Visual Improvement Following Ozonetherapy in Dry Age Related Macular Degeneration; a Review. Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol. 2013;2(2):47-51.

15. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith NL, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. Med Gas Res. 2019;9(3):163-7.

16. Cespedes Suarez JC, Martin Serrano Y, Carballosa Peña MR, Dager Carballosa DR. The immune response behavior in HIV-AIDS patients treated with ozone therapy for two years. J Ozone Ther JO3T [Internet]. 2018 [cité 11 sept 2022]; Disponible sur: https://roderic.uv.es/handle/10550/72131

17. Đuričić D, Valpotić H, Samardžija M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. Anim Reprod Sci. 2015;159:1-7.

18. Szponder T, Wessely-Szponder J, Świeca M, Smolira A, Gruszecki T. The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study. Small Rumin Res. 2017;156:50-6.

19. Repciuc CC, Luca V, Chirilă F, Pop G, Oana LI. Antibacterial effect of topic ozone in horses with distal limb infected wounds. Agric - Rev Știință Și Pract Agric. 2019;28(3/4):328-32.

20. Smith AJ, Oertle J, Warren D, Prato D. Ozone Therapy: A Critical Physiological and Diverse Clinical Evaluation with Regard to Immune Modulation, Anti-Infectious Properties, Anti-Cancer Potential, and Impact on Anti-Oxidant Enzymes. Open J Mol Integr Physiol. 2015;05(03):37.

21. Tsuzuki N, Endo Y, Kikkawa L, Korosue K, Kaneko Y, Kitauchi A, et al. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. J Vet Med Sci. 2015;77(12):1647-50.

22. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? Med Gas Res. 2011;1:29.

23. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. Mediators Inflamm. 2010;2010:e610418.

24. Orlandin JR, Machado LC, Ambrósio CE, Travagli V. Ozone and its derivatives in veterinary medicine: A careful appraisal. Vet Anim Sci. 2021;13:100191.

25. Anzolin AP, da Silveira-Kaross NL, Bertol CD. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? Med Gas Res. 2020;10(1):54-9.

26. Riquet S. (2022). *Intégration de l'ozonothérapie dans la gestion de cas complexes à diagnostic défavorable. Rétrospective d'expérimentation clinique*. Thèse de doctorat en chirurgie dentaire. Université de Bordeaux, 61p.

27. Moureu S. (2015) *Identification d'un moyen de lutte alternatif contre les mammites : Synthèse, caractérisation et évaluation de l'activité antibactérienne in vitro d'huile de tournesol ozonée.* Thèse de doctorat universitaire. Université de Toulouse, 184p.

28. Montevecchi M, Dorigo A, Cricca M, Checchi L. Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. New Microbiol. 2013;36(3):289-302.

29. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). J Appl Microbiol. 2001;90(2):279-84.

30. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, et al. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. J Korean Med Sci. 2009;24(3):368-74.

31. Campanati A, De Blasio S, Giuliano A, Ganzetti G, Giuliodori K, Pecora T, et al. Topical ozonated oil versus hyaluronic gel for the treatment of partial- to full-thickness second-degree burns: A prospective, comparative, single-blind, non-randomised, controlled clinical trial. Burns. 2013;39(6):1178-83.

32. Martínez-Sanchez G. Scientific rational for the medical application of ozonized oils, an up-date. Ozone Ther Glob J. 2021;11(1):239-72.

33. Swanson TJ, Jamal Z, Chapman J. Ozone Toxicity [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022 [cité 7 juin 2022]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430751/

34. de Vries J, Hempenius RA, Rietjens IMCM. Ozone-induced lung toxicity: mediated by ozonides? Toxicol Lett. 1994;72(1):243-6.

35. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. Toxicol Appl Pharmacol. 2006;216(3):493-504.

36. Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, Jiang W, Joshi G, Smith NL, et al. Ozone therapy for diabetic foot. Med Gas Res. 2018;8(3):111-5.

37. Zeng J, Dou J, Gao L, Xiang Y, Huang J, Ding S, et al. Topical ozone therapy restores microbiome diversity in atopic dermatitis. Int Immunopharmacol. 2020;80:106191.

38. Gao L, Dou J, Zhang B, Zeng J, Cheng Q, Lei L, et al. Ozone therapy promotes the differentiation of basal keratinocytes via increasing Tp63-mediated transcription of KRT10 to improve psoriasis. J Cell Mol Med. 2020;24(8):4819-29.

39. Modena D. Ozone Therapy for Dermatological Conditions: A Systematic Review. J Clin Aesthetic Dermatol. 2022;15:65.

40. YiPel FA, Acar A, YiPel M. Effect of some essential oils (Allium sativum L., Origanum majorana L.) and ozonated olive oil on the treatment of ear mites (Otodectes cynotis) in cats. Turk J Vet Anim Sci. 2016; :6.

41. Júnior JI de SS, Santos CSF dos, Silva BM da, Santos IFC dos, Ferro BS, Barros TIS, et al. Topical Ozone Therapy in the Treatment of Pharmacodermia in a Dog (Canis lupus familiaris). Acta Sci Vet [Internet]. 2019 [cité 8 juin 2022];47. Disponible sur: https://www.seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/95916

42. Bellanger M. (2019). *Actualités sur les recommandations diagnostiques et thérapeutiques en dermatologie du chien et du chat*. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon: Université Claude Bernard, 227p.

43. Hill PB, Lo A, Eden C a. N, Huntley S, Morey V, Ramsey S, et al. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. Vet Rec. 2006;158(16):533-9.

44. Sykes JE, Nagle TM, White SD. Chapter 84 - Pyoderma, Otitis Externa, and Otitis Media. In: Sykes JE, éditeur. Canine and Feline Infectious Diseases [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2014 [cité 10 juin 2022]. p. 800-13. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437707953000843

45. Gallay J, Pin D. Comment reconnaître et diagnostiquer les pyodermites superficielles chez le chien. Nouv Prat Vet Canine-Féline. 2007;7(34).

46. Laffort-Dassot C. Comment reconnaître et diagnostiquer les pyodermites profondes chez le chie. Nouv Prat Vet Canine-Féline [Internet]. 2007 [cité 10 juin 2022];7(34). Disponible sur: https://neva.fr/course/view.php?id=121&topic=4

47. Bajwa J. Canine superficial pyoderma and therapeutic considerations. Can Vet J. 2016;57(2):204-6.

48. Loeffler A, Lloyd DH. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. Vet J. 2018;235:73-82.

49. Gortel K. Recognizing Pyoderma: More Difficult than it May Seem. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2013;43(1):1-18.

50. Borio S, Colombo S, La Rosa G, De Lucia M, Damborg P, Guardabassi L. Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. Vet Dermatol. 2015;26(5):339-e72.

51. Summers JF, Hendricks A, Brodbelt DC. Prescribing practices of primary-care veterinary practitioners in dogs diagnosed with bacterial pyoderma. BMC Vet Res. 2014;10(1):240.

52. Guaguère E. Référentiel d'utilisation des antibiotiques pour une prescription raisonnée en dermatologie canine : le bon usage des antibiotiques. Bull Académie Vét Fr. 2012;165(2):113-8.

53. Beco L, Guaguère E, Méndez CL, Noli C, Nuttall T, Vroom M. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2— antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. Vet Rec. 2013;172(6):156-60.

54. Wang Y, Yang J, Logue C m., Liu K, Cao X, Zhang W, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius isolated from canine pyoderma in North China. J Appl Microbiol. 2012;112(4):623-30.

55. Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. Screening of Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius, and Staphylococcus schleiferi isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). Vet Dermatol. 2006;17(5):332-7.

56. Jones RD, Kania SA, Rohrbach BW, Frank LA, Bemis DA. Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001–2005). J Am Vet Med Assoc. 2007;230(2):221-7.

57. Lloyd DH. Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects. Vet Dermatol. 2012;23(4):299-e60.

58. McCarthy AJ, Harrison EM, Stanczak-Mrozek K, Leggett B, Waller A, Holmes MA, et al. Genomic insights into the rapid emergence and evolution of MDR in Staphylococcus pseudintermedius. J Antimicrob Chemother. 2015;70(4):997-1007.

59. Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy MÉ, Tristan A, Vandenesch F. Résistance aux antibiotiques chez Staphylococcus aureus - Les points-clés en 2010. médecine/sciences. 2010;26(11):943-9.

60. Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius. Vet Dermatol. 2009;20(5-6):496-501.

61. Guardabassi L, Loeber ME, Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant Staphylococcus intermedius between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet Microbiol. 2004;98(1):23-7.

62. Kang JH, Hwang CY. One health approach to genetic relatedness in SCCmec between methicillin-resistant Staphylococcus isolates from companion dogs with pyoderma and their owners. Vet Microbiol. 2021;253:108957.

63. Song M, Zeng Q, Xiang Y, Gao L, Huang J, Huang J, et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. Mol Med Rep [Internet]. 2017 [cité 17 avr 2020]; Disponible sur: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.8148

64. Skalska K, Ledakowicz S, Perkowski J, Sencio B. Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil. Ozone Sci Eng. 2009;31(3):232-7.

65. Colombo M, Ceci M, Felisa E, Poggio C, Pietrocola G. Cytotoxicity evaluation of a new ozonized olive oil. Eur J Dent. 2018;12(4):585-9.

66. Günaydın Y, Sevim H, Tanyolaç D, Gürpınar ÖA. Ozonated Olive Oil with a High Peroxide Value for Topical Applications: In-Vitro Cytotoxicity Analysis with L929 Cells. Ozone Sci Eng. 2018;40(1):37-43.

67. Oliveira P de, Almeida N de, Conda-Sheridan M, Apparecido R do P, Micheletti AC, Carvalho NC, et al. Ozonolysis of neem oil: preparation and characterization of potent antibacterial agents against multidrug resistant bacterial strains. RSC Adv. 2017;7(55):34356-65.

68. Kashiwazaki J, Nakamura K, Hara Y, Harada R, Wada I, Kanemitsu K. Evaluation of the Cytotoxicity of Various Hand Disinfectants and Ozonated Water to Human Keratinocytes in a Cultured Epidermal Model. Adv Skin Wound Care. 2020;33(6):313-8.

69. Leon BR, Romary DJ, Landsberger SA, Bradner KN, Ramirez M, Lubitz RM. Risks of ozonated oil and ozonated water on human skin: A systematic review [Internet]. 2022 [cité 28 juin 2022]. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iwj.13760

70. Yazihan N, Akdas S, Olgar Y, Biriken D, Turan B, Ozkaya M. Olive oil attenuates oxidative damage by improving mitochondrial functions in human keratinocytes. J Funct Foods. 2020;71:104008.

ANNEXES

Annexe 1 : Résultat d'identification VITEK®2 GP de la souche « Pin Up »

Client bioMérieux :
Référence du système : VK2C 1120

Rapport du laboratoire

Imprimé 30 sept. 2020 09:43 CEST
Imprimé par : bchataig

Isolat : PIN UP-1 (Validé)

Type de carte : GP Code barres : 2421429203530056 Instrument de test : 00000A6EA22C (1120)
Technicien : bchataig(bchataig)

Profil biochimique : 070402077723231
Numération : **Germe sélectionné : Staphylococcus pseudintermedius**

Commentaires :	

McFarland : (0,50 - 0,63)

Informations sur l'identification	**Carte :**	GP	**N° de lot :**	2421429203	**Péremption :**	25 oct. 2021 13:00 CEST	
	Terminée le :	29 sept. 2020 17:15 CEST	**État :**	Final	**Heure de l'analyse :**	5,77 heures	
Origine du germe	VITEK 2						
Germe sélectionné	98% de probabilité		**Staphylococcus pseudintermedius**				
	Profil biochimique :	070402077723231			**Fiabilité :**	Excellente identification	
Germe SRF							
Germes identifiés et tests discriminants :							
Commentaire sur l'ident. :							
Tests à l'encontre							

Détails biochimiques

2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	(-)	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	+	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Version de VITEK 2 Systems installée : 08.02
Norme d'interprétation des CMI :
Nom du jeu de paramètres AES :

Politique d'interprétation thérapeutique :
Dernière modification du paramètre AES :

Page 1 / 1

Annexe 2 : Poster scientifique sur l'étude *in vitro* publié au congrès européen de dermatologie vétérinaire 2021

32nd European Veterinary Dermatology Congress – September 16-18, 2021

In vitro antibacterial effect and cytotoxicity on canine keratinocytes of PurO3 Ozonated Olive Oil

November MAHEAS, Marion MOSCA, Brigitte CHATAIGNIER, Nadège MILHAU, Didier PIN

Dermatology–Dermatopathology Unit, VetAgro Sup Veterinary Campus Lyon, Marcy L'étoile, France

Introduction

Ozone is a gaseous molecule that has antiseptic, healing and anti-inflammatory effects thanks to its oxidative power[1]. PurO3 Ozonated Olive Oil (O3-Oil) is a skin ointment that combines the properties of ozone in a stable product that can be used for treatment of different skin affections. The aim of this study is to prove the antibacterial effect of O3-Oil on *Staphylococcus pseudintermedius* and its lack of toxicity on canine keratinocytes.

Methodology

Four concentrations (2.5%, 5%, 7.5% and 10%) of O3-Oil and control olive oil were incorporated into TSA agar plates and bacterial growth of 9 strands of *S. pseudintermedius* obtained from dogs with pyoderma was measured.
Multiple antibacterial resistance patterns were tested : 3 strands were sensitive to all antibiotics (S/S), 3 were resistant to 1 or 2 antibiotics (R/S) and the last 3 were multiresistant (R/R). Bacterial growth on the plates was measured semi-quantitatively with a scoring from 0 to 3 depending on the amount of colonies (table 1) .

Quantity of colonies on the plate	Bacterial growth score
None	0
A few scattered colonies (1-10)	1
Many separated colonies (10-100)	2
Bed of colonies (>100)	3

Table 1 : Bacterial growth scoring method

Canine progenitor epidermal keratinocytes (CPEK) were cultivated in P96 plates then put in contact with 0%, 25%, 50%, 75% and 100% dilutions of O3-Oil with control olive oil (table 2). The plates were incubated for 2, 4 and 6 hours at 37°C, then the oil was removed and replaced by culture medium and CCK8.

	1	2	3	4	5	6
A	CPEK + culture medium	CPEK + control olive oil	CPEK + oil mixture at 25% O3-Oil	CPEK + oil mixture at 50% O3-Oil	CPEK + oil mixture at 75% O3-Oil	CPEK + 100% O3-Oil
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

Table 2 : 96 well plate organization

The plates were incubated for 2 hours at 37°C and spectrophotometry at 450nm was realized. The color variation due to the bioreduction of WST-8 into an orange formazan product is directly proportional to the number of living cells.
Direct microscopic observations of the cells in 3 culture conditions (control growth medium, pure control olive oil and 100% PurO3 Ozonated Oilve Oil), after 2, 4 and 6 hours of incubation were made.

Results

- Antibacterial effect

Bacterial growth was markedly reduced with O3-Oil in comparison with the control olive oil, at all concentrations (figure 1). The minimum inhibition concentration of O3-Oil varied between 2.5 and 10% depending on the strand. There was no difference of inhibition between the different resistance patterns of the strands. All growth of the 9 strands of *S. pseudintermedius* tested was completely inhibited for a concentration of 10% of O3-Oil within the culture medium.

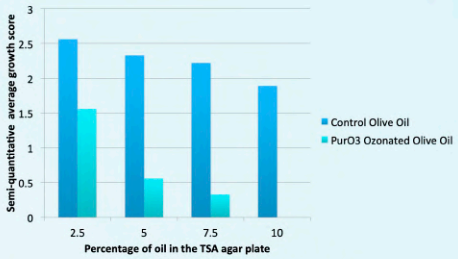

Figure 1 : Bacterial growth inhibition by O3-Oil

- Toxicity evaluation

Microscopic observation showed adherent growing cells without any cellular debris in all 3 conditions tested, which suggests a lack of toxicity of both the control olive oil and the O3-Oil on CPEK.
The CCK8 colorimetric assay showed no significant difference of optical density between all conditions tested for the 3 incubation times, which proves that O3-Oil is non cytotoxic even when used pure (table 3).

Incubation time	Control olive oil	25% O3-Oil	50% O3-Oil	75% O3-Oil	100% O3-Oil
2 hours	0.43	0.46	0.45	0.44	0.45
4 hours	0.53	0.54	0.54	0.55	0.52
6 hours	0.47	0.48	0.48	0.49	0.47

Table 3 : Average optical density of the wells after CCK8 colorimetric assay

Discussion

Ozone therapy is a complementary medicine option that is already used in human and veterinary medicine for treatment of many diseases[2,3]. In the current context of antibiotic resistance, alternative treatments to antibiotics need to be researched and developed. PurO3 Ozonated Olive Oil is safe, simple to use and inexpensive and could be a good option for treatment of skin affections, such as canine pyoderma.

Conclusion

This in vitro study shows promising results that PurO3 Ozonated Olive Oil is a safe to use, non-cytotoxic skin ointment that inhibits growth of *Staphylococcus Pseudintermedius*, making it a good option for topical treatment of pyoderma in dogs. A clinical trial is now in progress to determine its effect on dogs with pyoderma.

References :
1. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Arch Med Res. 2006;37(4):425–35.
2. Sciorsci RL, Lillo E, Occhiogrosso L, Rizzo A. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. Res Vet Sci. 2020;130:240–6.
3. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. J Nat Sci Biol Med. 2011;2(1):66–70.

VetAgro Sup

UNIVERSITÉ DE LYON

Annexe 3 : Document d'information sur l'étude clinique

Document d'information

Contexte :

Votre animal est atteint de pyodermite. Il peut, dès aujourd'hui, être inclus dans une étude clinique. Cette étude est effectuée dans le cadre d'une thèse vétérinaire réalisée à VetAgro Sup.

Objectif :

Évaluer l'efficacité d'un traitement topique à base d'ozone dans la gestion des pyodermites canines.

L'ozone est une molécule gazeuse, composé de trois atomes d'oxygène, utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-infectieuses et pro-cicatrisantes. Chez l'homme, il est utilisé sous forme topique (huile ou eau ozonée) pour le traitement des dermatoses infectieuses (bactériennes, virales et pied d'athlète). Dans le contexte actuel d'antibiorésistance, la recherche de nouveaux traitements limitant l'utilisation des antibiotiques est en plein essor.

Une étude *in vitro*, que nous avons réalisée précédemment, montre l'effet antibactérien de l'huile ozonée sur des souches de bactéries responsables de pyodermites chez le chien. Nous souhaitons désormais étudier son effet clinique, *in vivo*.

Déroulement :

Si vous acceptez l'inclusion dans cette étude, votre animal sera **suivi durant 1 mois et demi** par l'ensemble de l'équipe de dermatologie jusqu'à la fin du protocole clinique. Le protocole inclut **4 visites à 14 jours d'intervalle**, celle d'aujourd'hui étant la première (visite d'inclusion).

L'intégralité des visites prévues au protocole se dérouleront de la même manière. Elles sont toutes **obligatoires**. Les différents actes qui seront effectués par le vétérinaire dermatologue sont les suivants :

- Un examen clinique général de votre animal
- Un bilan des observations cliniques/ évolution de la santé de votre animal depuis votre dernière visite
- Un examen dermatologique de votre animal avec établissement d'un score lésionnel
- La pesée de votre animal
- La prise de photos des lésions
- La remise de l'ensemble des traitements jusqu'au prochain rendez-vous

Il vous sera demander de nous donner des informations concernant l'intensité des démangeaisons de votre animal (remplir une échelle de prurit à chaque consultation) et concernant la qualité de vie de votre chien (questionnaire à remplir lors de la première et de la dernière visite).

Le traitement à mettre en place est le suivant : **appliquer l'huile ozonée sur les lésions de pyodermite de votre animal deux fois par jour** (matin et soir), jusqu'à la fin de l'étude.

Engagement du propriétaire :

La qualité de l'étude et de ses résultats est directement liée à la qualité de l'engagement de chacun des propriétaires. En rentrant dans cette étude, vous acceptez donc d'en respecter les contraintes suivantes jusqu'au terme de l'étude :

- Respecter scrupuleusement le planning de l'étude, notamment concernant les dates de consultation chez le vétérinaire investigateur.
- Administrer rigoureusement les traitements tels que prévus par le protocole.
- Signaler tous les éventuels effets secondaires observés sur votre chien.
- Vous vous engagez à signaler au directeur de l'étude tout écart à ces contraintes : une erreur est toujours possible et rien ne vous sera reproché. Il est cependant important que vous signaliez scrupuleusement toute erreur ou difficulté rencontrée, afin que cette dernière soit prise en compte dans l'analyse finale.

Prise en charge financière :

En échange de votre engagement, outre la satisfaction de permettre à la médecine vétérinaire de progresser, seront intégralement prises en charge par VetAgro Sup :

- La consultation d'inclusion et les consultations de suivi
- le traitement topique à base d'huile ozonée

Les traitements supplémentaires (antibiotiques, shampoings antiseptiques, réhydratants) restent à la charge du propriétaire.

Traitement des données personnelles :

Dans le cadre de la recherche médicale à laquelle nous vous proposons de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats et en vue d'une éventuelle publication dans des revues scientifiques. A ces fins, il n'y aura pas d'utilisation nominative des données, seule une analyse statistique sera effectuée.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification de ces données. Vous

disposez également d'un droit d'opposition à la transmission de ces données. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire du vétérinaire de votre choix à l'ensemble des données médicales de votre animal.

Risques et effets secondaires :

Aucun effet secondaire n'a été rapporté lors d'utilisation d'huile ozonée chez l'homme. Le produit n'est pas dangereux et peut être utilisé comme produit cosmétique pour l'homme. Il n'est donc pas nécessaire de porter des gants ou d'utiliser de précautions particulières lors de son application sur les lésions de votre chien.

Sortie de l'étude :

La sortie de l'étude a normalement lieu à l'issue de la 4ème visite de l'animal, 1 mois et demi après le début du protocole. En fonction des résultats obtenus, le propriétaire sera libre de continuer ce traitement à ses frais.

Une sortie anticipée de l'étude peut avoir lieu dans les cas suivants :

- Altération de l'état général de l'animal ou apparition de nouveaux symptômes
- Effets secondaires délétères
- Non présentation aux consultations de suivi
- Non-respect du protocole par le propriétaire
- Le décès de l'animal, quel que soit sa cause

Le propriétaire est libre de décider à tout moment de la sortie de son animal de l'étude sans avoir à se justifier et sans que cela ne porte préjudice à la qualité des soins dont bénéficiera son animal auprès du vétérinaire dermatologiste investigateur.

Contact :

Vous disposez des coordonnées du directeur d'étude : marion.mosca@vetagro-sup.fr

En cas d'urgence, veuillez contacter le SIAMU (04 78 87 07 07) ou votre vétérinaire traitant.

Annexe 4 : Fiche de consentement éclairé avant entrée dans l'étude clinique

Etiquette d'admission

<u>Formulaire de consentement éclairé</u>

Je soussigné(e),

Propriétaire et/ou dépositaire de l'animal :

Nom : Sexe : Age :

Numéro d'Identification (s'il y a lieu) :

J'accepte que mon animal soit inclus dans l'étude de l'effet de l'ozone topique sur les pyodermites chez le chien.

J'assure avoir été informé :

- des modalités de déroulement des interventions et du traitement sur mon animal
- que je devrais présenter mon animal à toutes les consultations de suivi
- que je devrais signaler tout événement anormal concernant mon animal.

J'assure avoir lu et compris la lettre d'information qui m'a été fournie avec ce consentement et avoir reçu des réponses satisfaisantes à toutes mes questions.

J'assure avoir posé toutes les questions que j'ai jugées utiles pour prendre ma décision et avoir compris les réponses qui m'ont été apportées, sans ambiguïté aucune.

Fait à Le en <u>2 exemplaires</u>

Signature précédée de la mention « Lu et approuvé »

_____

Je soussigné(e), l'investigateur,

Confirme avoir obtenu le consentement écrit et éclairé de Mme/M.

EFFICACITÉ DE L'APPLICATION TOPIQUE D'OZONE DANS LE CADRE DE PYODERMITES CHEZ LE CHIEN : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE, IN VITRO ET CLINIQUE

Auteur

MAHÉAS November

Résumé

Les pyodermites canines sont des affections fréquemment rencontrées et une des causes les plus fréquentes de prescription d'antibiotiques en médecine vétérinaire. La bactérie la plus souvent impliquée, *Staphylococcus pseudintermedius*, acquiert de plus en plus de résistance aux antibiotiques, ce qui rend le traitement de ces affections extrêmement complexe. La recherche de nouvelles perspectives thérapeutiques pour y faire face est nécessaire.

L'application topique d'ozone sous forme d'huile ozonée est une option thérapeutique intéressante à considérer dans ce cadre étant donné ses effets antiseptiques, anti-inflammatoires et stimulants de la cicatrisation. Elle a été étudiée dans différentes espèces : homme, ruminants ou félins mais aucune étude de son efficacité dans les pyodermites canines n'a encore été réalisée.

Le but de cette thèse est d'étudier l'effet de l'ozone sous forme topique sur les pyodermites canines. Pour cela, une étude *in vitro* a permis de déterminer une concentration minimale inhibitrice de l'huile ozonée sur *Staphylococcus pseudintermedius.* L'absence d'effet cytotoxique *in vitro* sur des kératinocytes canins a également été démontrée, ce qui a permis de mettre en place l'étude clinique. Cette étude clinique pilote a démontré un effet thérapeutique intéressant de l'application topique d'huile ozonée pour le traitement de chiens atteints de pyodermite localisée. Ainsi, 50% des cas inclus ont montré une guérison complète, avec uniquement ce traitement, appliqué matin et soir, en 6 semaines. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Mots-clés

Ozone, Pyodermite, Chien, *Staphylococcus pseudintermedius*

Jury

Président du jury	:	**Pr**	**NICOLAS Jean-François**
1er assesseur	:	**Dr**	**MOSCA Marion**
2ème assesseur	:	**Pr**	**PIN Didier**

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

VetAgro Sup