

Université de Montréal

Pharmacocinétique et pharmacodynamie des
tétracyclines administrées via l'aliment chez le porc

Par

Jérôme, Raphaël, Étienne del Castillo

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae doctor

en Sciences pharmaceutiques (option pharmacologie)

Décembre 2000

© Jérôme R.E. del Castillo, 2000



QV

705

U58

2001

v.007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Pharmacocinétique et pharmacodynamie des
tétracyclines administrées via l'aliment chez le porc

présentée par :

Jérôme, Raphaël, Étienne DEL CASTILLO

a été évaluée par un jury composé des personnes
suivantes :

Dr. Laurent CLARETPrésident du jury

Prof. Jean-Guy BESNER..... Directeur de recherche

Prof. Guy P. MARTINEAU Co-directeur de recherche

Prof. Louis CARTILIER Membre du jury

Prof. Pierre-Louis TOUTAIN..... Examineur externe

Thèse acceptée le :

1. SOMMAIRE

La chlortétracycline (CTC) et l'oxytétracycline (OTC) sont les antibiotiques les plus souvent prescrits chez le porc. Ces médicaments administrés via l'aliment sont d'une efficacité mitigée aux doses approuvées et les vétérinaires doivent prescrire des doses hors-normes pour obtenir les résultats escomptés. Aussi, les vétérinaires les utilisent de façon interchangeable sans que leur équivalence thérapeutique n'ait été démontrée. Cette étude a pour but de caractériser et de comparer les relations dose-effet prophylactiques de la CTC et de l'OTC administrés via l'aliment chez le porc.

En premier lieu, les articles de pharmacocinétique orale de ces antibiotiques chez le porc ont fait l'objet d'une méta-analyse de type Mantel-Haenszel. La CTC et l'OTC ont des biodisponibilités orales (F), des volumes de distribution (V) et des constantes d'élimination (k) significativement différentes ($P < 0,05$). Des simulations de dosages réitérés à des posologies identiques montrent que les concentrations plasmatiques de CTC seraient deux fois plus élevées que celles d'OTC, ce qui permet de supposer que leurs efficacités prophylactiques *in vivo* devraient être différentes à des concentrations minimales inhibitrices (CMI) identiques.

Cette hypothèse a été vérifiée avec une expérience de pharmacocinétique jumelée à une infection expérimentale, où 104 porcs de 9 kg ont été répartis en trois groupes : témoin ($n = 36$), CTC et OTC ($n = 34$ / antibiotique). Les porcs ont reçu par voie intraveineuse 5 mg/kg de CTC ou d'OTC, suivi de 11, 22, 33 ou 44 mg/kg via l'aliment ($n \geq 8$ / dose / antibiotique). Ensuite, les porcs ont reçu ces mêmes doses d'antibiotique via l'aliment à 12 h d'intervalle durant 6 jours. Tous les porcs ont reçu au jour 5 de traitement une souche d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sensible aux tétracyclines (CMI = 2 mg/L pour chaque antibiotique) par voie intranasale. Les différences pharmacocinétiques détectées par méta-analyse ont été confirmées, mais la biodisponibilité de la CTC mesurée expérimentalement était plus grande que prévue. Quelle que soit la dose, la concentration plasmatique moyenne à l'équilibre (C_{moy}) de CTC était 4 fois plus élevée que celle d'OTC ($P < 0,0001$). Les signes cliniques et l'étendue des lésions pulmonaires étaient plus importants chez les témoins et le groupe

OTC que chez le groupe CTC ($P \leq 0,0002$). La relation entre la gravité des signes cliniques et C_{moy} , ainsi que celle entre l'étendue des lésions et C_{moy} était compatible avec le modèle de Hill, où les effets prophylactiques maximaux étaient atteints quand $C_{\text{moy}} > 1 \text{ mg/L}$, ce qui n'était possible qu'avec de la CTC, mais à des doses trois fois plus élevées que la dose quotidienne approuvée.

Le design expérimental décrit ci-dessus a aussi servi à comparer les comportements alimentaires des porcs recevant des aliments médicamenteux à ceux du groupe témoin durant les jours où le protocole n'interférait pas avec la prise d'aliment. Trois repas correspondant en tout à 5% du poids vif de chaque animal étaient servis durant la période d'activité des porcs. La durée du repas, le taux d'ingestion et le risque de ne pas manger tout l'aliment prescrit au moins une fois durant la période de suivi n'ont pas été affectés par le type d'antibiotique ni par leur concentration dans l'aliment ($P > 0,05$). Le seul effet zootechnique significatif a été mesuré sur la variance du taux de conversion alimentaire, qui était plus homogène chez les groupes médicamenteux que chez les témoins ($P < 0,01$).

Ces résultats indiquent que la CTC est moyennement absorbée, que l'OTC est mal absorbée et que les doses d'usage actuelles sont insuffisantes pour maîtriser des bactéries considérées sensibles d'après l'antibiogramme. L'augmentation des doses améliore significativement l'efficacité prophylactique, sans pour autant induire de l'aversion envers l'aliment fortement médicamenteux chez les porcs. En raison de sa meilleure biodisponibilité, les vétérinaires devraient privilégier l'usage de CTC pour les traitements via l'aliment chez le porc.

TABLE DES MATIÈRES

<i>1. Sommaire</i>	<i>iii</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>x</i>
<i>Liste des équations</i>	<i>xii</i>
<i>Liste des sigles et des abréviations</i>	<i>xiii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xxi</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xxvii</i>
2. Avant-propos	1
3. Revue de la littérature	4
3.1. Découverte des tétracyclines	4
3.2. Production des tétracyclines	6
3.2.1. Les streptomycètes	6
3.2.2. Biosynthèse	9
3.2.3. Production industrielle	10
3.2.3.1. Autres tétracyclines	11
3.2.4. Semi-synthèse.....	11
3.2.5. Synthèse totale.....	12
3.2.6. Les formulations médicamenteuses pour l'aliment du bétail.....	12
3.3. Caractéristiques des tétracyclines	15
3.3.1. Structure	15
3.3.2. Propriétés physico-chimiques	20
3.3.2.1. Constante de dissociation acide.....	20
3.3.2.2. Coefficient de partage octanol:eau	22
3.3.2.3. Chélation des ions métalliques multivalents	24
3.3.3. Propriétés antibiotiques	26
3.3.3.1. Effet des tétracyclines sur la synthèse protéique.....	26
3.3.3.2. Effets sur la membrane plasmatique	27
3.3.3.3. Pharmacodynamie des tétracyclines et prédiction de l'effet thérapeutique	28
3.3.4. Propriétés anti-inflammatoires	30
3.3.5. Relation structure-activité	31
3.4. Devenir des tétracyclines chez l'animal	32
3.4.1. Résorption	32
3.4.2. Distribution.....	33
3.4.3. Métabolisme	34
3.4.4. Excrétion	34
3.5. Devenir des tétracyclines chez la bactérie	35

3.5.1.	Enveloppes bactériennes et résorption	35
3.5.2.	Résistance aux tétracyclines.....	36
3.5.2.1.	Systèmes d'efflux.....	37
3.5.2.2.	Protection ribosomale.....	38
3.5.2.3.	Métabolisme.....	38
3.6.	Usage des tétracyclines en médecine vétérinaire.....	38
3.6.1.	Usage ergotropique	40
3.7.	Récapitulatif et objectifs.....	41
4.	Méthodologie.....	43
4.1.	Choix de l'approche expérimentale.....	43
4.2.	Infection expérimentale à <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	44
4.3.	Protocole expérimental	46
4.3.1.	Alimentation.....	49
4.3.2.	Étude pharmacocinétique	50
4.3.3.	Étude du comportement alimentaire	51
4.3.4.	Étude pharmacodynamique.....	51
4.4.	Analyse pharmacocinétique	53
4.4.1.	Paramètres pharmacocinétiques	56
4.4.1.1.	Clairance.....	56
4.4.1.2.	Volume de distribution apparent.....	56
4.4.1.3.	Biodisponibilité	57
4.4.1.4.	Temps de séjour moyen.....	57
4.5.	Analyses statistiques.....	58
5.	Publications.....	60
5.1.	Pharmacokinetic modeling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach [<i>Swine Health and Production</i> , 6(5): 189-202 (1998)]......	61
5.1.1.	Summary	61
5.1.2.	Keywords	62
5.1.3.	Introduction	62
5.1.4.	Materials and Methods	67
5.1.4.1.	Meta-analysis and statistical analysis.....	67
5.1.4.2.	The multiple-dosage pharmacokinetic model	69
5.1.4.3.	Feeding behavior	72
5.1.4.4.	Computer iteration procedure.....	72
5.1.4.5.	Model validation	74
5.1.5.	Results	76
5.1.5.1.	Comparing CTC and OTC pharmacokinetics	76
5.1.5.2.	Feeding behavior	77
5.1.5.3.	Model validation	78
5.1.5.4.	Summarizing equation.....	78
5.1.6.	Discussion	81

5.1.6.1.	Model validation	81
5.1.6.2.	Pharmacokinetics	82
5.1.6.3.	Pharmacodynamics and antibiotic sensitivity testing.....	84
5.1.7.	Implications	88
5.1.8.	Acknowledgments	89
5.1.9.	Putting it into practice... ..	90
5.1.9.1.	Hypothetical example.....	91
5.1.10.	Glossary.....	92
5.1.11.	References	97
5.2.	Comparative pharmacokinetics and antimicrobial efficacy of feed-administered tetracyclines in weaned pigs [<i>Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> (2000 – soumis)].	104
5.2.1.	Abstract	104
5.2.2.	Keywords	105
5.2.3.	Introduction	105
5.2.4.	Materials and methods	107
5.2.4.1.	Animals and housing.....	107
5.2.4.2.	Antibiotics and chemicals	107
5.2.4.3.	Medicated feeds.....	108
5.2.4.4.	Experimental procedures.....	109
5.2.4.5.	Blood sample handling and data analysis	110
5.2.5.	Results	112
5.2.5.1.	Pharmacokinetics of i.v. administered CTC and OTC.....	114
5.2.5.2.	Pharmacokinetics of CTC and OTC single in-feed dosage.....	115
5.2.5.3.	Pharmacokinetics of CTC and OTC in feed at steady-state.....	117
5.2.5.4.	Bias in estimates of oral pharmacokinetic parameters	118
5.2.5.5.	Prophylactic efficacy as a function of plasma concentration.....	120
5.2.6.	Discussion	124
5.2.7.	Conclusions	129
5.2.8.	Acknowledgements	131
5.2.9.	References	131
5.3.	Short-term effects of in-feed supplementation of tetracyclines for disease control on feed intake pattern and growth in weaned pigs [<i>Animal Science</i> (2000 – soumis)].	140
5.3.1.	Abstract	140
5.3.2.	Keywords	141
5.3.3.	Introduction	141
5.3.4.	Material and Methods.....	144
5.3.4.1.	Animals and housing.....	144
5.3.4.2.	Diets and antibiotic supplementation	145
5.3.4.3.	Experimental procedure	146
5.3.4.4.	Statistical analyses.....	147
5.3.5.	Results	149
5.3.5.1.	Feeding parameters	149
5.3.5.2.	Growth parameters	152
5.3.6.	Discussion	155

5.3.7.	Conclusion.....	159
5.3.8.	Acknowledgements	159
5.3.9.	References	160
6.	Discussion générale.....	166
6.1.	Étude pharmacocinétique <i>in silico</i>	168
6.2.	Étude PK/PD <i>in vivo</i>	172
6.3.	Effet de la CTC et de l'OTC sur la prise alimentaire et la croissance .	179
7.	Conclusions	182
8.	Références.....	185
9.	Annexes.....	xxviii
9.1.	Annexe I. Étapes de la production industrielle des tétracyclines	xxix
9.1.1.	Isolement de l'organisme	xxix
9.1.2.	Production de l'inoculum	xxix
9.1.3.	Fermentation.....	xxx
9.1.4.	Récupération du principe actif	xxxii
9.2.	Annexe II. Le ribosome bactérien : structure et fonction	xxxiv
9.3.	Annexe III : Antibiothérapie et antibiorésistance	xxxvi
9.3.1.	Le problème d'antibiorésistance chez l'homme.....	xxxvi
9.3.2.	Rôle de l'agriculture dans l'antibiorésistance	xl
9.3.3.	Mécanismes de résistance	xli
9.3.4.	Génétique de l'antibiorésistance	xliii
9.3.5.	L'antibiorésistance : un problème écologique	xlvii
9.3.6.	Conclusions	xlix
9.3.7.	Références	l
9.4.	Teneur nutritive des aliments employés dans l'étude PK/PD.	lvii

Figure 22. Superposition des profils cinétiques d'un médicament administré par les voies extravasculaire (courbe pointillée) et intravasculaire (ligne continue) à 24 h d'intervalle.	55
Figure 23. Étapes de la synthèse protéique chez les <i>Escherichia coli</i> (lettres a-g : séquence des événements).....	xxxiv
Figure 24. Mécanismes d'antibiorésistance chez les bactéries.	xliii
Figure 25. Principaux modes d'acquisition de gènes d'antibiorésistance par les bactéries.....	xliv
Figure 26. Réseau théorique d'échange de gènes d'antibiorésistance entre les écosystèmes humains et agricoles (hexagones : sites d'exposition aux antibiotiques).	xlvi

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nom, structure et mode d'obtention des congénères de la tétracycline, la chlortétracycline et l'oxytétracycline.	19
Tableau 2. Randomisation des doses de chlortétracycline et d'oxytétracycline dans les aliments à distribuer aux porcs des différents lots.	49
Tableau 3. Temps de prélèvements des échantillons sanguins, par rapport au début d'administration.	51
Tableau 4. Grille de pointage de la gravité des signes cliniques de pleuropneumonie.	52
Tableau 5. Formules de calcul de la surface des trapèzes linéaires et logarithmiques d'AUC et d'AUMC (Note : $\delta t = t_2 - t_1$).	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Chronologie de l'âge des antibiotiques.	4
Figure 2. Structure de la tétracycline, groupements facultatifs (caractère gras) et substitutions réalisées pour obtenir la chlortétracycline et l'oxytétracycline (flèches).....	5
Figure 3. Nomenclature de zones de croissance des streptomycètes sur gélose (A), apparence des arthrospores des streptomycètes (B) et caractéristiques morphologiques saillantes de quelques familles de l'ordre <i>Actinomycetales</i> (C)...	7
Figure 4. Disposition des molécules d'acide acétique porteuses d'un carbone radioactif (caractère gras) dans la biosynthèse de la tétracycline.....	9
Figure 5. Étapes de la biosynthèse des tétracyclines.....	10
Figure 6. Synthèse <i>de novo</i> de la (±)-12a-déoxytétracycline.....	12
Figure 7. Procédé de fabrication des pré-mélanges médicamenteux granulaires de chlortétracycline et d'oxytétracycline pour le bétail (NB : l'excipient sec est une source d'ions Ca^{++}).....	14
Figure 8. Numérotation des carbones du squelette de la tétracycline (chiffres) et groupements facultatifs (caractère gras).	16
Figure 9. Schéma d'hydrolyse de l'oxytétracycline dans diverses conditions alcalines fortes (1) ou douces (2) et progrès dans l'élucidation de sa structure.....	17
Figure 10. Schéma d'hydrolyse de l'oxytétracycline dans des conditions de plus en plus acides (chiffres arabes entre parenthèses) et progrès dans l'élucidation de sa structure (chiffres romains).	18
Figure 11. Schéma d'hydrolyse spontanée de la chlortétracycline dans des solutions neutre ou légèrement alcalines.	19
Figure 12. Constantes de dissociation acides apparentes de la tétracycline et portions de sa structure auxquelles elles sont associées (arcs).....	21
Figure 13. Schéma d'ionisation des tétracyclines en fonction du pH (haut) et évolution des concentrations relatives de ses principaux ions en fonction du pH du milieu (bas).....	22
Figure 14. Effet du pH de la phase aqueuse sur le coefficient de partage octanol:eau (log-P) de certaines tétracyclines naturelles et semi-synthétiques.	23
Figure 15. Représentation tridimensionnelle du complexe de tétracycline et d'ion calcium dans un rapport 2:1 (flèches : liens de coordination).....	25
Figure 16. Concentrations de diverses tétracyclines requises pour inhiber 50% de la synthèse de polyphénylalanine par des ribosomes de <i>Escherichia coli</i>	27
Figure 17. Schéma de la relation structure-activité des tétracyclines (A–D : anneaux du squelette tétracycline; 1—12 : numérotation des carbones).....	31
Figure 18. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de diverses tétracyclines envers 20 souches résistantes de <i>Pasteurella multocida</i>	32
Figure 19. Mécanismes de résistance aux tétracyclines chez les bactéries.....	37
Figure 20. Cellule d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> fixée avec des anticorps anti-capsule, observée au microscope électronique de transmission.....	45
Figure 21. Plan des locaux et disposition des porcs traités et contrôles (haut) et calendrier des événements de l'expérience (bas).	48

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1. Moment statistique zéro.....	54
Équation 2. Premier moment statistique.	54
Équation 3. Surface du dernier trapézoïde d'AUC.	55
Équation 4. Surface du dernier trapézoïde d'AUMC.....	55
Équation 5. Formule de calcul de la clairance.	56
Équation 6. Formules de calcul du volume de distribution par la méthode de la surface sous la courbe.	56
Équation 7. Formule de calcul du volume de distribution à l'état d'équilibre.	57
Équation 8. Formule de calcul de la biodisponibilité orale absolue.....	57
Équation 9. Formule de calcul du temps moyen de séjour lors d'administration par voie intraveineuse.....	57
Équation 10. Fonction de densité de probabilité de la distribution log-normale.	58
Équation 11. Moyenne d'une distribution log-normale.	58
Équation 12. Variance d'une distribution log-normale.....	58

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

-- 0	Ion de tétracycline (systèmes tricarbonyl-méthane et β -dicétone phénolique chargés négativement)
- 0 +	Ion de tétracycline (système tricarbonyl-méthane chargé négativement et diméthylamine chargé positivement)
0 0 +	Ion de tétracycline (système diméthylamine chargé positivement)
1A2	Isoenzyme du complexe cytochrome P450
2C	Famille d'isoenzymes du complexe cytochrome P450
2D6	Isoenzyme du complexe cytochrome P450
30S	30 Svedberg (vitesse de sédimentation d'un organelle, dans ce cas une sous-unité du ribosome)
3A4	Isoenzyme du complexe cytochrome P450
70S	70 Svedberg (vitesse de sédimentation d'un organelle, dans ce cas une sous-unité du ribosome)
7S	7 Svedberg (vitesse de sédimentation d'un organelle, dans ce cas une protéine de la sous-unité 30S du ribosome)
°C	Degré Celsius
λ	Pente terminale du profil pharmacocinétique d'un médicament

ADG	Gain moyen quotidien (average daily gain)
ADG _M	Gain moyen quotidien ajusté au poids
Ap _x I	Cytotoxine produite par certains sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Ap _x II	Cytotoxine produite par certains sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Ap _x III	Cytotoxine produite par certains sérotypes d' <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ARN _m	Acide ribonucléique messenger
ARN _r	Acide ribonucléique ribosomal
ARN _t	Acide ribonucléique de transfert
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
AUC	surface sous la courbe de la concentration plasmatique du médicament en fonction du temps (Area Under the Curve)
AUMC	Surface sous la courbe du produit temps × concentration plasmatique du médicament en fonction du temps (Area Under the 1st Moment Curve)
B ₁₂	Cyanocobalamine (vitamine hydrosoluble)
BM	Masse corporelle

$C_{22}H_{23}N_2O_8Cl$	Chlortétracycline
$C_{22}H_{24}N_2O_9$	Oxytétracycline
Ca^{++}	Ion calcium
$CaCO_3$	Carbonate de calcium
C_{avg}	Concentration plasmatique moyenne du médicament à l'équilibre d'un schéma posologique réitéré
CI	Intervalle de confiance à 95%
CL	Clairance systémique
CL_b	Clairance systémique
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
C_{moy}	Concentration plasmatique moyenne du médicament à l'équilibre d'un schéma posologique réitéré
$CoCl_2$	Chlorure de cobalt
CTC	Chlortétracycline
Cu	Cuivre
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Sulfate de cuivre pentahydraté

CV	Coefficient de variation ($CV = 100 \times \text{écart-type} \div \text{moyenne}$)
DDMR	Proportion de repas pris durant la période diurne (Diurnal Daily Meals Ratio)
DFIR	Ingéré quotidien divisé par le poids vif (Daily Feed Intake Ratio)
EPA	Effet post-antibiotique
F	Biodisponibilité
FCR	Indice de conversion alimentaire
Fe ⁺⁺	Ion fer (ferreux)
Fe ⁺⁺⁺	Ion fer (ferrique)
F _{rel}	Biodisponibilité relative (voie d'administration de référence autre qu'intravasculaire)
h	Heure
H ⁺	Ion hydrogène
IGF-I	Facteur de croissance insulino-mimétique de type I (insulin growth factor-I)
K	Potassium
k	Constante d'élimination
k _a	Constante d'absorption

kg	Kilogramme
KH_2PO_4	Phosphate de potassium dihydrogène
L	Litre
lb	Livre (0,454 kg)
log-P	Logarithme du coefficient de partage octanol-eau
mg	Milligramme
Mg	Magnésium
Mg^{++}	Ion magnésium
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	sulfate de magnésium heptahydraté
MIC	Concentration minimale inhibitrice
MIC_{90}	90 ^{ème} percentile d'une distribution de concentrations minimales inhibitrices d'une collection d'isolats bactériens
min	Minute
mL	Millilitre
Mn	Manganèse
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	chlorure de manganèse tétrahydraté
n	Effectifs

N.C.C.L.S.	National Committee for Clinical Laboratory Standards
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Phosphate d'ammonium monohydrogène
NRC	National Research Council
OmpF	Protéine F, porine du feuillet externe de la paroi Gram-négative (Outer membrane protein)
OTC	Oxytétracycline
P	Probabilité d'obtenir la statistique quand l'hypothèse nulle est vraie
PAE	Effet post-antibiotique (Post-Antibiotic Effect)
PALE	Effet post-antibiotique de stimulation des leucocytes (Post- Antibiotic Leucocyte Enhancement)
PD	Pharmacodynami(qu)e
pH	Logarithme de la concentration en ion hydrogène
PK	Pharmacocinétique
pKa	Constante de dissociation acide
PK/PD	Pharmacocinétique-pharmacodynami(qu)e
ppm	Parties par million (par exemple, miligrammes par kilogramme ou grammes par tonne)

PRRS	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
QC	Québec
Q-cluster	Amas d'axones qui véhiculent les influx nerveux déclenchés par la stimulation des papilles gustatives avec la quinine
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i> (genre bactérien)
SD	Écart-type (Standard Deviation)
S.E.M.	Erreur-type (Standard Error of the Mean)
Site A	Site de fixation du complexe aminoacyl-ARN _t
Site P	Site de fixation du complexe peptidyl-ARN _t
SPORE	Single Protein Omission Reconstitution Experiment
spp.	Espèces (toutes celles du genre bactérien qui précède l'abréviation)
$t_{1/2}$	Demi-vie d'élimination
TGE	Gastro-entérite transmissible
TNF	Facteur onconécrosant (Tumor Necrosis Factor)
TPL	Concentration plasmatique visée (Target Plasma Level)
U.S. Pat. #	Numéro de brevet du United States Patent and Trademark Office

UV	Ultraviolet
V	Volume de distribution apparent
$V_{(area)}$	Volume de distribution apparent calculé par la méthode de la surface sous la courbe des concentrations plasmatiques
V_{ss}	Volume de distribution apparent calculé par la méthode des moments statistiques de la courbe des concentrations plasmatiques d'une dose intraveineuse
V_z	Volume de distribution apparent calculé par la méthode de la pente terminale d'élimination (équivalent à $V_{(area)}$)
W	Poids vif (weight)
Zn	Zinc
Zn^{++}	Ion zinc
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	sulfate de zinc heptahydraté

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance envers le Professeur Jean-Guy BESNER d'avoir accepté de me guider dans ces quatre années de périple doctoral. Sa grande ouverture d'esprit lui a permis, dès notre première rencontre, de reconnaître la pertinence de ce projet en pharmacologie vétérinaire chez les animaux de rente, un domaine qui ne figurait pas parmi ses préoccupations habituelles de recherche. En acceptant de me diriger, il m'a ouvert les portes de la Faculté de pharmacie et de ses différentes avenues de recherche. Sa grande disponibilité et la qualité de son encadrement ont été d'un immense secours tout au long de mes études doctorales. Je tiens aussi à souligner sa bonne humeur qui a souvent désamorcé les moments de tension et d'incertitude qui se sont produits durant la réalisation de ce projet et l'écriture de la thèse. Aussi, ses compétences en détermination des médicaments dans les matrices biologiques ont été un atout sans lequel ce projet n'aurait pu être réalisé.

Sincères remerciements au Professeur Guy MARTINEAU, mon co-directeur de recherche, pour les nombreuses choses qu'il a faites pour moi, aussi bien lorsqu'il faisait partie du corps professoral de la Faculté de médecine vétérinaire qu'à son poste actuel à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Entre autres, il a largement participé à ma formation en médecine des populations porcines. Il a accepté de me parrainer auprès de l'Université de Montréal afin que je puisse décrocher le contrat de recherche qui est à l'origine de mon projet doctoral. Enfin, il m'a aidé à ouvrir de nombreuses portes, dont celle de l'Association Européenne de Pharmacologie et Toxicologie Vétérinaires. Si l'adage de Cicéron m'est souvent venu à la bouche à son endroit, la maxime d'Horace est pour moi son enseignement le plus précieux.

Sincères remerciements au Dr Laurent CLARET, de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, qui a assumé les fonctions de Président du jury d'évaluation de cette thèse et qui a largement contribué à ma formation en pharmacocinétique. Son expérience en modélisation et sa rigueur scientifique ont toujours été d'un grand secours chaque fois que je trouvais du temps pour lui rendre visite. J'ai aussi eu la joie de pouvoir m'entretenir avec lui sur la pharmacocinétique de population, un domaine

de recherche qui fait cruellement défaut en médecine vétérinaire en général et en thérapeutique des grandes populations animales en particulier. Dans des aspects moins professionnels mais non moins importants, j'ai aussi eu une grande joie de pouvoir dépoussiérer quelques souvenirs méditerranéens en sa compagnie.

Sincères remerciements au Professeur Louis CARTILIER, de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, qui a accepté de participer au jury d'évaluation de cette thèse. Ses commentaires judicieux, tant pour le contenu de la thèse que pour sa forme, ont grandement contribué à améliorer la qualité de cet ouvrage. J'ai particulièrement apprécié ses critiques sur le style d'écriture et je partage avec lui sa volonté d'apporter autant de soin au travail scientifique qu'au vocabulaire qui le décrit.

Sincères remerciements au Professeur Pierre-Louis TOUTAIN, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, d'avoir accepté le rôle d'évaluateur externe de cette thèse et d'avoir persévéré dans cette tâche malgré la lenteur du *via thesis* à la Faculté des études supérieures. La célérité et l'exhaustivité avec laquelle il a examiné cette thèse, la pertinence de ses remarques et son souci d'y apporter des références pour les justifier ont été grandement appréciées et ont contribué à ma formation.

Je voudrais exprimer aussi ma plus profonde gratitude envers le Professeur Robert HIGGINS, mon mentor à la Faculté de médecine vétérinaire, qui m'a encouragé à développer une expertise en pharmacologie des antibiotiques dès le début de mes études graduées. En participant à ma formation en bactériologie, il m'a donné le complément essentiel à l'étude de l'interaction hôte-bactérie-antibiotique. Ses vastes connaissances, son pragmatisme, son enthousiasme et sa modestie ont toujours été pour moi une source d'inspiration.

Le professeur Serge LARIVIÈRE a été pour moi un excellent interlocuteur dans le domaine de l'interaction bactérie-antibiotique et de l'antibiorésistance. Le choc des optiques microbiologique et pharmacologique s'est toujours avéré très enrichissant, ce que je lui en sais gré. Je suis désolé que des problèmes de santé l'aient écarté du jury de cette thèse, qu'il aurait su bonifier par sa perspective bactériologique.

Je remercie chaleureusement le Dr Denis DU TREMBLAY d'avoir partagé avec moi son expertise en méthodes quantitatives et en informatique, sans laquelle certaines parties de mon travail n'auraient pu se concrétiser, ainsi que pour son indéfectible amitié (du deuxième café matinal jusqu'au dernier petit Armagnac), qui m'a permis de garder le moral tout au long de mon doctorat.

Je remercie, avec la dignité britannique appropriée, le Dr Guy BEAUCHAMP d'avoir partagé avec moi son expertise en éthologie, avec laquelle j'ai pu me familiariser avec l'étude du comportement alimentaire chez le porc. Je le remercie également pour ses qualités d'éditeur qui m'ont tant aidé dans l'écriture de plusieurs communications scientifiques, les articles de cette thèse entre autres. Je lui souhaite vivement de trouver la position académique qu'il recherche et qui lui permettra de s'épanouir pleinement.

Je remercie chaleureusement le Dr Christian KLOPFENSTEIN, mon compagnon d'armes au Ph.D. à la Faculté de médecine vétérinaire, pour son amitié et pour toutes les discussions de corridors qui nous ont permis d'appivoiser les méthodes d'analyse statistique ou qui ont lubrifié l'axe terrestre. Je lui souhaite à lui aussi d'enfin trouver la promotion qui le mènera enfin du poste d'étudiant titulaire à celui de professeur, où il brillera par sa belle éloquence.

Je remercie chaleureusement Mme Julie ROY, mon compagnon d'armes au Ph.D. à la Faculté de pharmacie, pour son amitié, son amour pour la culture sous toutes ses formes, sa bonne humeur, sa disponibilité et ses connaissances en chromatographie liquide. Je la remercie aussi d'avoir facilité mon intégration parmi les étudiants aux cycles supérieurs en pharmacie. Mon seul regret est de ne pas avoir été capable de lui effacer sa crainte des animaux.

Je remercie sincèrement le Professeur Michel BIGRAS-POULIN pour sa significative contribution ($p < 0,05$) à ma formation en méthodes quantitatives, qui m'a permis de développer mon goût pour l'analyse de données et m'a donné assez de flexibilité pour évoluer de l'épidémiologie à la pharmacocinétique. Il a aussi catalysé mon intérêt pour la variabilité inter-individuelle au sein des populations, que je perçois de plus en plus

clairement dans les processus pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Je le remercie aussi d'avoir accepté de s'occuper de mon dossier lorsque le Professeur MARTINEAU a dû nous quitter, avec tout ce que ça implique.

Je remercie sincèrement M. Murray P. DUCHARME, professeur associé à la Faculté de pharmacie, de m'avoir donné ma première vraie formation en pharmacocinétique. Celle-ci m'a été extrêmement bénéfique à une époque où, à la Faculté de médecine vétérinaire, je ne trouvais plus de réponses à mes questions (comment se résigner au dogme que tout est dans le diagnostic et que la thérapie médicamenteuse n'est une simple formalité?). Je le remercie également pour toutes ces discussions qui m'ont introduit à la pharmacocinétique de population et de l'individualisation des schémas posologiques. Je remercie également le Professeur André BLOUIN, de la Faculté de médecine vétérinaire, pour l'intérêt qu'il a porté en moi durant mon parcours aux études doctorales et pour son appui réitéré. Je conserve aussi de bons souvenirs de nos discussions.

Merci aux membres du Pavillon Dessaulles, que j'ai côtoyé durant toutes ces années, et en particulier au Professeur Martine BOULIANNE, qui m'a permis de faire usage de son laboratoire dans mon étude, ainsi qu'aux Professeurs Sylvie D'ALLAIRE et Martine DENICOURT, qui ont aussi participé à ma formation en médecine des populations porcines et qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes réflexions en pharmacothérapie des grandes populations animales. Je voudrais aussi remercier et souhaiter du succès aux étudiants aux cycles supérieurs en épidémiologie ou en médecine de population : Cécile, Dominique, Farouck, Jérôme, Julie, Maryse, Philippe et tous les autres avec qui j'ai partagé ces années au doctorat.

Je voudrais remercier le Dr Mélanie BOILEAU et le Dr Hugo BRUNET-JOLY, qui m'ont assisté dans la phase expérimentale de ce projet alors qu'ils étaient étudiants vétérinaires. Leur discipline, leur savoir-faire et leur esprit d'équipe m'ont été très appréciés et m'ont permis de compléter l'étude dans des délais très raisonnables. En participant à ce projet, ils ont maîtrisé différentes manipulations et techniques qui ont contribué à leur formation vétérinaire, mais ils ont découvert aussi la recherche

scientifique qui, je crois, les a amené à poursuivre leurs études après l'obtention du diplôme vétérinaire.

Je voudrais remercier chaleureusement Mme Laure DUDET, autrefois étudiante aux cycles supérieurs à la Faculté de médecine vétérinaire, pour m'avoir assisté lors des expériences préliminaires de ce projet. Elle m'a libéré d'une partie des manipulations expérimentales le temps d'assister aux cours théoriques en bactériologie. Je lui souhaite bonheur et succès dans ses projets.

Merci au Professeur Sophie CUVELLIEZ pour m'avoir donné les ampoules de propofol utilisées dans ce projet et pour ses conseils judicieux en matière d'anesthésie et analgésie. Je la remercie également pour ses encouragements ainsi que pour m'avoir permis de participer à certains de ses projets de recherche.

Merci au Professeur Marcelo GOTTSCHALK d'avoir fourni la souche FMV 92-8172 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, et à Mme Annie LEBRUN et Mme Marie-France COTÉ d'avoir préparé les suspensions bactériennes et de m'avoir assisté lors des infections expérimentales. Ce projet n'aurait pu être complet sans cet apport.

Je voudrais remercier M. Craig SALISBURY et le Centre des résidus médicamenteux vétérinaires de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments d'avoir mis au point et validé les méthodes de détermination des concentrations de chlortétracycline et d'oxytétracycline dans le plasma et les tissus de porc et pour avoir exécuté les analyses des 2500 échantillons prélevés dans le cadre de ce projet.

Merci à Roche Vitamins Inc. pour le support financier de cette étude. Je voudrais aussi remercier tout particulièrement le Dr Roger SALTMAN, responsable de la supervision du projet pour le compte de Roche, d'avoir cru en mes capacités dès mes premières démarches pour financer ce projet. J'ai grandement apprécié son intégrité et sa transparence, et je salue sa détermination. Je remercie également M. Marc ST-CYR, M. Randy NEALS et le Dr Teddi WOLFF, de chez Roche, pour leur support.

Merci à Mme Lucille et M. Denis VADNAIS d'avoir fourni les porcs employés dans le cadre de cette étude. Ce projet a été réalisé dans l'optique d'un usage rationnel des antibiotiques en production porcine au Québec, qui améliore la santé des porcs et la qualité des produits de consommation qui en sont dérivés.

Merci à M. Florian RIVARD, M Normand LACASSE et M. Paul FORET, animaliers à la Faculté de médecine vétérinaire, de nous avoir assisté lors des infections expérimentales et d'avoir assuré la décontamination et à la stérilisation des locaux d'expérimentation dans les délais requis.

DÉDICACE

Cette thèse est dédiée à Nadia, que j'ai affreusement négligée durant toutes ces années. Maintenant je réalise que cette étape de notre vie a été très éprouvante pour toi aussi : j'ai plongé dans ce travail sans penser que mon abnégation te ferait subir autant de privations.

A mis padres, que pugnan por que no los olvide : os llevo por escapulario. Me habeis dado el cuadrante que me guía por este erial. Leguas de camino, lunas de destierro, frío lapidario: quedareis tras mis huellas, llegaré a destino. Un día volveremos a andar por callejuelas de adoquín, vadearemos arroyos alpujarreños. Pisaremos la cola de espuma que sobre la arena morena deja la resaca moruna. Y la mar lucirá sus mil vetas de sol andaluz...

2. AVANT-PROPOS

La médecine des espèces porcine, aviaire et des espèces aquicoles est radicalement différente des médecines des autres animaux domestiques et de l'homme. En effet, l'élevage de ces premiers est de type industriel, où de grands groupes d'individus sont élevés jusqu'à atteindre le poids d'abattage selon un processus de production en série. Ce système de production, où le rendement économique est un leitmotiv, n'est pas sans conséquences sur le plan sanitaire et zootechnique. Les porcs sont regroupés en grands nombres dans des parcs ou des cases communautaires, à l'intérieur de bâtiments fermés. Dans ce cadre, le vétérinaire en industrie animale exercera plus souvent une médecine de population, où l'unité d'intérêt est l'ensemble des animaux dans leur biotope. Les maladies respiratoires, associées à des bactéries telles que *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* et *Streptococcus suis*, constituent le problème de santé le plus important en industrie porcine (Christensen et coll., 1999). Divers facteurs reliés aux animaux, à la conduite du troupeau ou à leur environnement favorisent l'apparition, le développement, le maintien et la propagation des maladies bactériennes à travers le troupeau (Stärk, 2000). Ainsi, des épisodes cliniques peuvent survenir à la suite d'événements inéluctables en production porcine tel que le sevrage et le transfert des porcs vers les bâtiments de finition, ou encore suite à des changements climatiques marqués. Certains microorganismes pathogènes sont des agents primaires de maladie (Taylor, 1999), mais il est plus fréquent de les rencontrer dans le cadre d'infections mixtes (Dee et coll., 1993), où le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin est un acteur important. Par conséquent, lors de l'enquête diagnostique en médecine de population, on accorde une grande importance à l'identification et à la caractérisation des facteurs de risque, dont la maîtrise est essentielle au contrôle de la maladie dans l'élevage.

Les principales composantes d'une stratégie efficace de lutte contre la maladie sont l'ajustement des conditions de captivité et de la conduite du troupeau, la vaccination systématique des sujets à risque et l'antibiothérapie. Cette dernière est utilisée surtout

durant les phases initiales du plan d'action pour maîtriser les agents pathogènes en attendant que les autres mesures soient mises en place et deviennent pleinement opérationnelles. Les traitements médicamenteux individualisés, tels que l'on prodigue à l'homme et aux animaux de compagnie, ne sont appliqués aux porcs que lorsque les individus malades peuvent être identifiés aisément parmi le groupe, ou dans des sections de la ferme où les animaux sont gardés en cases individuelles. Lorsqu'une maladie contagieuse apparaît dans l'élevage, le traitement des individus malades doit être doublé d'une thérapie de masse pour protéger à court terme les animaux sains en contact avec les malades. Cette mesure peut aussi être envisagée pour protéger un groupe d'animaux infectés sans signes cliniques apparents durant la période d'influence d'un facteur de risque précis. Ainsi, ce type de traitement est à la fois prophylactique (pour les animaux à risque mais pas encore infectés) et métaphylactique (pour les animaux infectés mais cliniquement normaux). En raison de la taille réduite du personnel de ferme, du grand nombre d'animaux à traiter et de leur nature insoumise à l'égard du traitement, les antibiotiques sont administrés via l'eau de boisson ou l'aliment que les porcs consommeront quotidiennement (Larrabee, 1983).

Bien que la plupart des classes d'antibiotiques de la pharmacopée sont théoriquement disponibles pour usage dans l'eau et l'aliment (Agriculture Canada, 1998), en pratique le choix se limite aux antibiotiques les moins chers. En effet, le nombre d'animaux à traiter, la longueur de la période à risque (Higgins et coll., 1990) et le budget disponible pour l'achat de médicaments font que les antibiotiques les plus anciens soient les plus utilisés encore aujourd'hui. Une enquête américaine réalisée durant les années 1980 indique qu'en médecine porcine on utilise environ 60% des médicaments destinés aux animaux de consommation (Prescott, 1997). Cette même étude signale qu'environ 50% de tous les antibiotiques incorporés dans l'aliment du bétail étaient des tétracyclines, ce qui est conforme aux chiffres obtenus lors d'une récente enquête dans l'Union Européenne (FEDESA, 1998).

Les tétracyclines de première génération sont administrées via l'aliment aux animaux de consommation depuis près d'un demi-siècle (Davies, 1999), bien avant que les méthodes d'études de pharmacocinétique-pharmacodynamie (PK/PD) des

antibiotiques ne soient mises au point (Vogelman et coll., 1988; Mattie, 2000). Ainsi, les doses d'usage ont été établies sans pouvoir se baser sur une connaissance précise de leurs relations concentration-effet ni de la variabilité inter-individuelle qui y est associée. Dans le contexte actuel d'émergence de bactéries multi-résistantes, il est impératif de caractériser la relation PK/PD des molécules en service depuis le début de l'ère des antibiotiques pour mettre au point des schémas thérapeutiques qui minimisent les risques de toxicité, de résidus médicamenteux et de sélection de bactéries antibiorésistantes sans compromettre leur efficacité thérapeutique (Apley et coll., 1998).

Selon les directives du Bureau des Médicaments Vétérinaires (Agriculture Canada, 1998), la chlortétracycline (CTC) et l'oxytétracycline (OTC) doivent être prescrites chez le porc à des doses identiques pour les mêmes indications. Cependant, les vétérinaires québécois se prévalent de leur droit de prescrire des doses hors-normes pour pallier l'efficacité mitigée de ces antibiotiques lorsqu'ils sont administrés aux doses d'usage en conditions de champ. Aussi, les fluctuations du prix de détail de ces antibiotiques induisent la substitution sur le formulaire de prescription vétérinaire sans qu'aucune étude n'en ait démontré l'équivalence thérapeutique. Dans l'espoir de fournir des données objectives pour un usage rationnel, cette étude a pour premier but de caractériser la relation dose-effet prophylactique de la CTC et de l'OTC administrées via l'aliment chez le porc sevré avec une étude PK/PD. Le deuxième but est d'évaluer l'effet de la dose de ces antibiotiques sur le comportement alimentaire des porcs afin de déterminer le risque qu'un échec thérapeutique se produise suite à une diminution de l'ingéré volontaire.

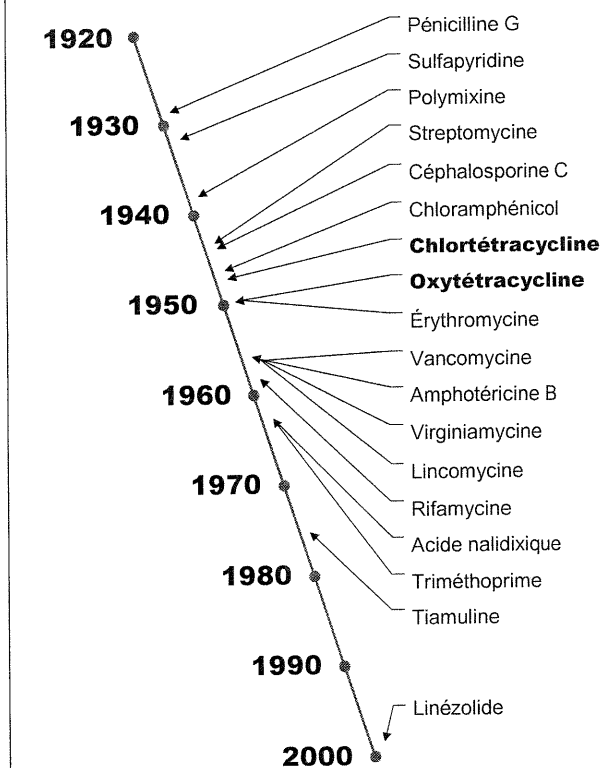
3. REVUE DE LA LITTÉRATURE

3.1. DÉCOUVERTE DES TÉTRACYCLINES

La découverte de la pénicilline G a donné essor, à partir de 1939, à la recherche systématique de microorganismes du sol qui produisent des molécules antibiotiques (Figure 1). L'instigateur et chef de file de cette prospection fut Selman A. Waksman, qui a établi les techniques permettant d'isoler des milliers de souches bactériennes pour en étudier les métabolites. Ceci et la découverte de la streptomycine lui ont valu le prix Nobel de médecine en 1952 (Davies, 1999). Bien que l'apparition de ces molécules constituait un pas de géant en thérapeutique des maladies infectieuses, leur utilisation en clinique était compliquée, car leur spectre d'activité antibiotique était étroit ou elles produisaient des effets aderses dangereux chez les patients. Vers la fin des années 1940, les laboratoires LEDERLE isolent un nouvel organisme du sol dont le mycélium aérien devenait jaune doré après quelques jours d'incubation sur gélose (Duggar, 1948) : ce trait lui valut

d'être baptisé *Streptomyces aureofaciens*. Cet organisme produisait l'auréomycine, une substance qui inhibe la croissance d'une grande variété d'agents pathogènes et qui possède un index thérapeutique très élevé. Peu après, une autre espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques fut identifiée par les laboratoires PFIZER. Cet organisme, nommé *S. rimosus* en raison de son apparence fissurée sur gélose, produisait la terramycine (Finlay et coll., 1950),

Figure 1. Chronologie de l'âge des antibiotiques.

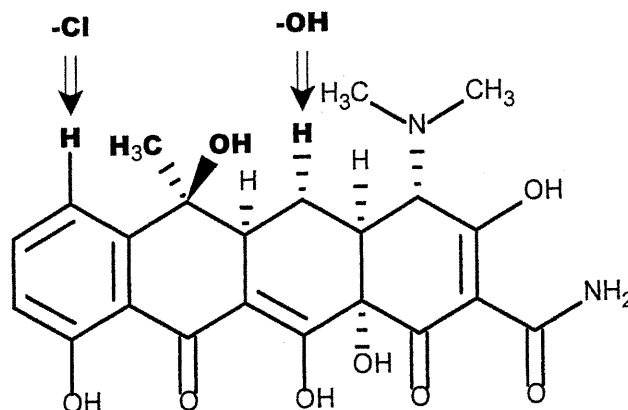


une substance au spectre antibiotique identique à celui de l'auroéomycine.

Durant les années 1950, on découvrit que ces deux antibiotiques possèdent un squelette identique, que l'on nomma tétracycline (Figure 2), sur lequel étaient greffés soit un atome de chlore dans le cas de l'auroéomycine, soit un groupement alcool chez la terramycine (Stephens et coll., 1952). Ces produits furent nommés chlortétracycline et oxytétracycline, respectivement. Entre les années 1950 et 1970, les tétracyclines sont largement utilisées pour le traitement des maladies infectieuses (Kunin et Finland, 1961). À cette époque, on essaya d'obtenir d'autres dérivés de cette famille ayant des propriétés pharmacologiques plus convenables pour l'usage clinique, soit par sélection des souches de *Streptomyces*, soit en modifiant la composition du milieu de fermentation ou encore par des modifications chimiques des produits de fermentation. C'est ainsi qu'apparurent sur le marché :

- la tétracycline 1953
- la déméclocycline 1957
- la méthacycline 1965

Figure 2. Structure de la tétracycline, groupements facultatifs (caractère gras) et substitutions réalisées pour obtenir la chlortétracycline et l'oxytétracycline (flèches).



- la doxycycline 1967
- la minocycline 1972

À partir des années 1970, la popularité des tétracyclines dans les pays occidentaux a diminué en raison de l'émergence de bactéries antibiorésistantes et de la mise en marché de β -lactamines à large spectre (Finland, 1974). Cependant, l'émergence de bactéries pathogènes résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques durant les années 1980 a réanimé la recherche de nouvelles molécules et les travaux d'optimisation des noyaux déjà existants (Sum et coll., 1998). Ainsi, les 8-méthoxychlortétracyclines produites par *Actinomadura brunnea* et *Micromonospora vesca* ont été découvertes par les laboratoires SCHERING. Aussi, les laboratoires BRISTOL-MYERS SQUIBB ont découvert que certaines espèces de *Dactylosporangium* produisent des 8-méthoxychlortétracyclines glycosylées : les dactylocyclines. Les laboratoires LEDERLE (maintenant WYETH-AYERST) ont réussi à implanter un groupe glycine ou des dérivés de celle-ci sur le noyau tétracycline sans qu'il ne perde son activité antibiotique. Ces nouveaux produits semi-synthétiques, les glycylocyclines, seront bientôt disponibles sur le marché pour le traitement de maladies nosocomiales à bactéries multi-résistantes (Sum et coll., 1998).

Enfin, on a récemment découvert des tétracyclines semi-synthétiques qui bloquent certaines protéines d'efflux impliquées dans la résistance aux tétracyclines (Nelson et Levy, 1999). Ces inhibiteurs sont en cours de développement pré-clinique.

3.2. PRODUCTION DES TÉTRACYCLINES

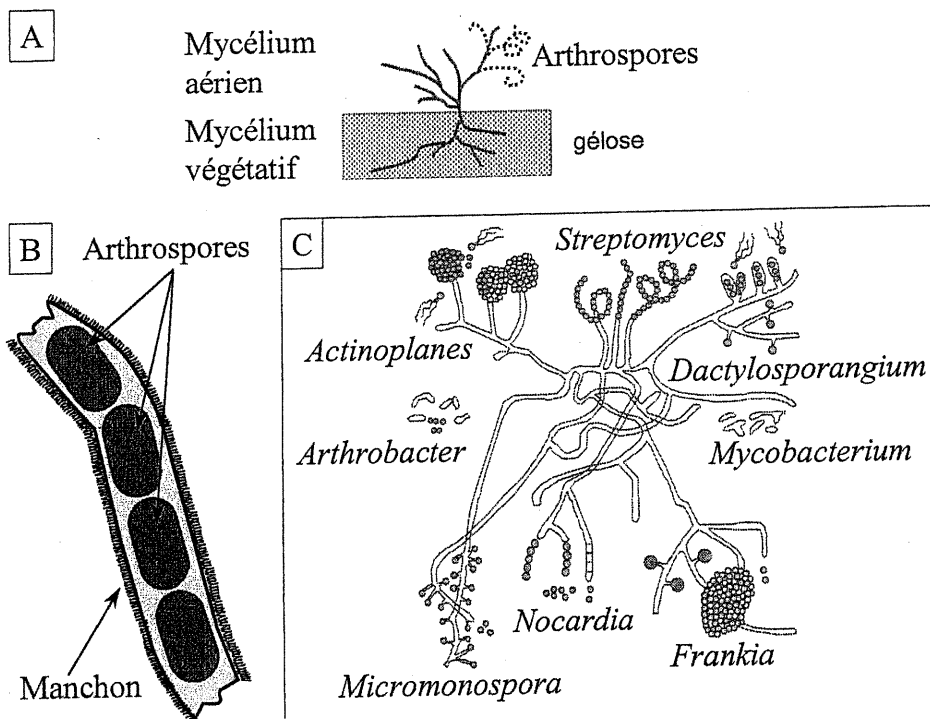
3.2.1. Les streptomycètes

Les tétracyclines naturelles sont produites par des bactéries du genre *Streptomyces* : des organismes Gram-positifs filamenteux au mycélium végétatif profusément ramifié et dont le mycélium aérien porte des chaînes de 3 ou plusieurs arthrospores (Figure 3). Ces organismes forment des petites

colonies dont la texture rappelle le lichen, le cuir ou le beurre. Le mycélium aérien est pigmenté chez plusieurs espèces et certaines espèces produisent des pigments solubles qui diffusent dans le milieu de culture (Locci, 1984). Les streptomycètes forment la famille la plus importante de l'ordre des *Actinomycetales* (Figure 3), tant par leur diversité que par leur capacité à produire des antibiotiques (Waksman, 1967; Locci, 1984).

L'ordre *Actinomycetales* est surtout composé de bactéries aérobiques saprophytes, qui préfèrent les habitats au pH neutre (neutrophiles) et une température de 25° à 30°C (mésophiles) pour croître. Ils sont présents dans le sol, le compost, les fourrages et même l'écosystème aquatique d'eau douce (Goodfellow et Williams, 1983). D'autres actinomycètes importants sont le genre *Micromonospora*, dont certaines espèces produisent des antibiotiques,

Figure 3. Nomenclature de zones de croissance des streptomycètes sur gélose (A), apparence des arthrospores des streptomycètes (B) et caractéristiques morphologiques saillantes de quelques familles de l'ordre *Actinomycetales* (C).



A et B adaptés de : *Bergey's manual of systematic bacteriology – volume 4*. (1984).

C adapté de : 8th International Symposium on Biology of Actinomycetes. *Gene*, 115 (1992).

ainsi que les genres *Actinomyces*, *Dermatophilus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, dont plusieurs espèces sont pathogènes. Certains actinomycètes tel que le genre *Frankia* sont impliqués dans la fixation de l'azote atmosphérique qui sera ensuite utilisé par les plantes. D'autres genres peuvent dégrader les hydrocarbures et sont utilisés pour la décontamination lors de déversements d'agents polluants. Le volume 4 du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et Sharpe, 1984), l'œuvre souche sur la taxonomie bactérienne, est entièrement dédié aux actinomycètes.

Morphologiquement, les actinomycètes se situent à mi-chemin entre les bactéries et les moisissures : dans son article germinal (1948), Duggar qualifiait ces organismes d'« ultra-molds ». Les *Actinomycetales* doivent cependant être classées parmi les bactéries, car ils ne possèdent pas les caractéristiques propres aux moisissures (Waksman, 1967) :

- Ils n'ont pas de noyau (et par conséquent ne sont pas eucaryotes),
- Leur paroi n'est pas formée de cellulose ou de chitine,
- Ils sont résistants aux agents antifongiques mais sensibles aux antibiotiques,
- Ils sont attaqués par les virus bactériophages.

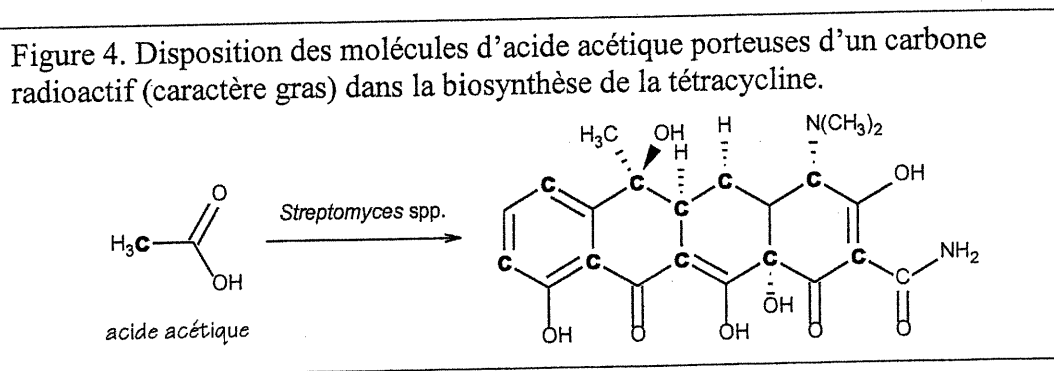
La plupart des antibiotiques sont produits par des streptomycètes (Waksman, 1967). Hormis les tétracyclines, les espèces du genre *Streptomyces* produisent des antibactériens tels que le chloramphénicol, l'érythromycine, la lincomycine, les polymyxines, la streptomycine et la vancomycine. Elles produisent aussi des agents anticancéreux comme les antracyclines, des agents antifongiques comme la nystatine et des anthelminthiques tels que l'ivermectine.

La synthèse de substances actives du point de vue pharmacologique ne peut être réalisée que si la bactérie possède la voie métabolique requise et que les conditions de culture y sont favorables (Okami et Hotta, 1988). Ainsi, la capacité à produire des antibiotiques n'est pas reliée à l'espèce : des souches d'une espèce donnée peuvent produire des substances appartenant à des classes différentes d'antibiotiques, et des souches appartenant à différentes espèces peuvent synthétiser le même antibiotique. La CTC et l'OTC, qui font l'objet de cette thèse, sont produites respectivement par certaines souches de *Streptomyces aureofaciens* et par *Streptomyces rimosus*. Le lecteur peut se référer au *Bergey's manual of systematic bacteriology* pour une description précise de ces bactéries (Locci, 1984).

3.2.2. Biosynthèse

Les antibiotiques sont issus des voies du métabolisme des sucres, du shikimate, de l'acétate/malonate, des nucléosides, du mévalonate ou des acides aminés (Okami et Hotta, K., 1988). L'identification des produits intermédiaires et l'étude du génome bactérien permettent d'élucider la chaîne de réactions dans la biosynthèse des antibiotiques. Il est généralement admis que les tétracyclines sont produites par assemblage séquentiel d'« acétates » (Figure 4) (McCormick, 1965). Ces acétates seraient préalablement convertis en une espèce chimique plus active comme le malonate.

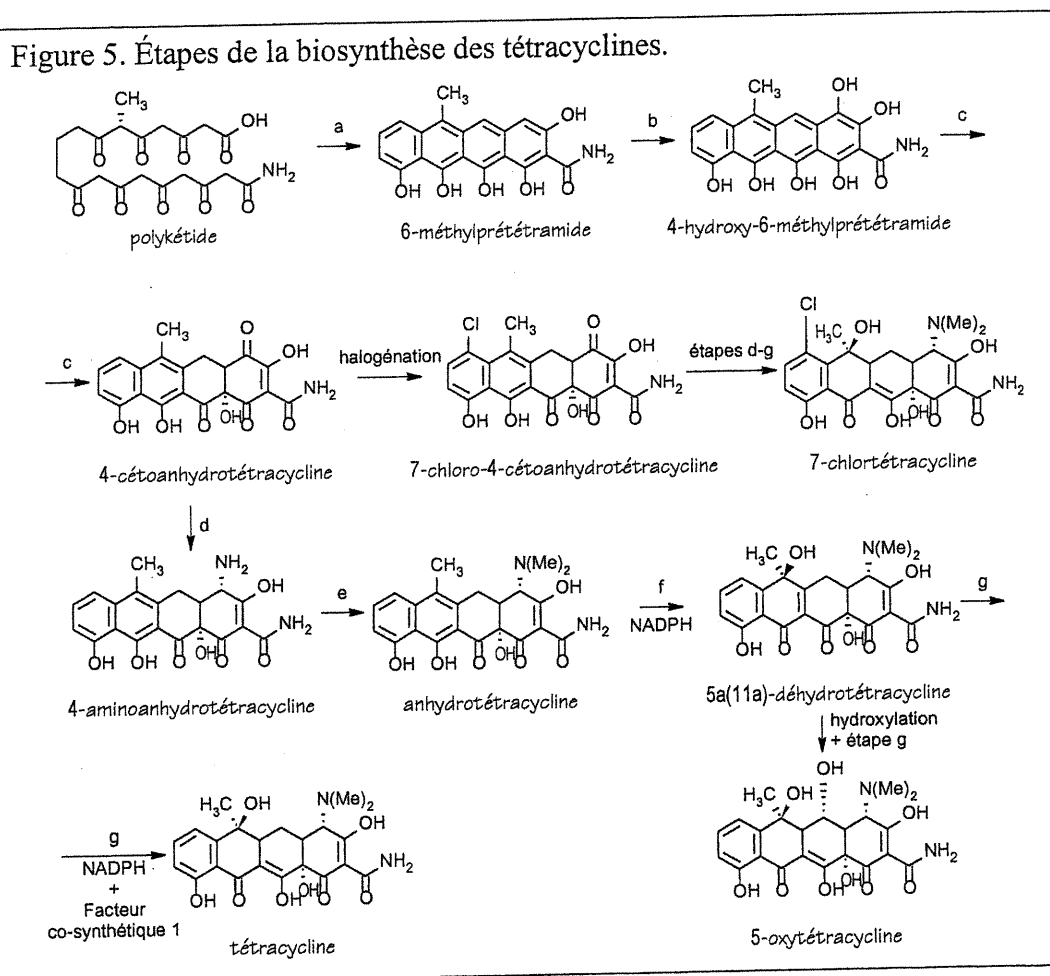
Le point de départ de la synthèse des tétracyclines chez *Streptomyces* est la condensation d'une molécule de malonamyl-CoA sur une molécule de



malonyl-CoA, sur laquelle se greffent successivement sept autres molécules de malonyl-CoA pour former un « polykétide ». Cette réaction est catalysée par le complexe des « polykétide » synthétases, dont certains gènes ont été séquencés chez *S. rimosus*. Par la suite, le « polykétide » s'aromatise et subit une série de substitutions qui sont décrites à la Figure 5. En présence de chlore, les souches de *S. aureofaciens* douées de bromoperoxydase produiront jusqu'à 90% de CTC à partir du précurseur (Behal et Hunter, 1995). Les réactions de formation de l'OTC par *S. rimosus* ne surviennent qu'en fin de synthèse (Figure 5).

3.2.3. Production industrielle

La production industrielle des tétracyclines naturelles se divise en 4 étapes : l'isolement de l'organisme, la production de l'inoculum, la fermentation



proprement dite et la récupération du principe actif. De nombreux brevets témoignent des efforts réalisés afin d'optimiser chacune de ces étapes. Un grand nombre d'entre eux sont recueillis dans l'ouvrage *The technology of the tetracyclines* (Evans, 1968), dont le contenu est résumé à l'annexe I de cette thèse. Il est à noter qu'une grande quantité de cations divalents (entre autres, de calcium) sont ajoutés au milieu de fermentation pour augmenter le rendement de synthèse des tétracyclines, probablement en précipitant le principe actif afin de préserver la viabilité des bactéries productrices d'antibiotique (Evans, 1968).

Il est à noter que le processus d'extraction de la substance active n'est pas réalisé quand le but est de fabriquer des pré-mélanges médicamenteux pour l'aliment du bétail. Par conséquent, les cations destinés à favoriser la fermentation se retrouvent avec le principe actif dans le pré-mélange, ce qui peut avoir un impact considérable sur les propriétés biopharmaceutiques des formulations, notamment leur profil d'absorption et leur biodisponibilité. Ces points seront repris en détail à la Section 3.2.6.

3.2.3.1. *Autres tétracyclines*

La tétracycline et la déméthyl-chlortétracycline sont les seules autres tétracyclines naturelles disponibles pour l'usage clinique. Elles sont produites par des souches mutantes de *S. aureofaciens* respectivement dépourvues des enzymes qui catalysent l'halogénéation de la 4-dédiméthylaminotétracycline ou la méthylation du carbone 6 du « polykétide ».

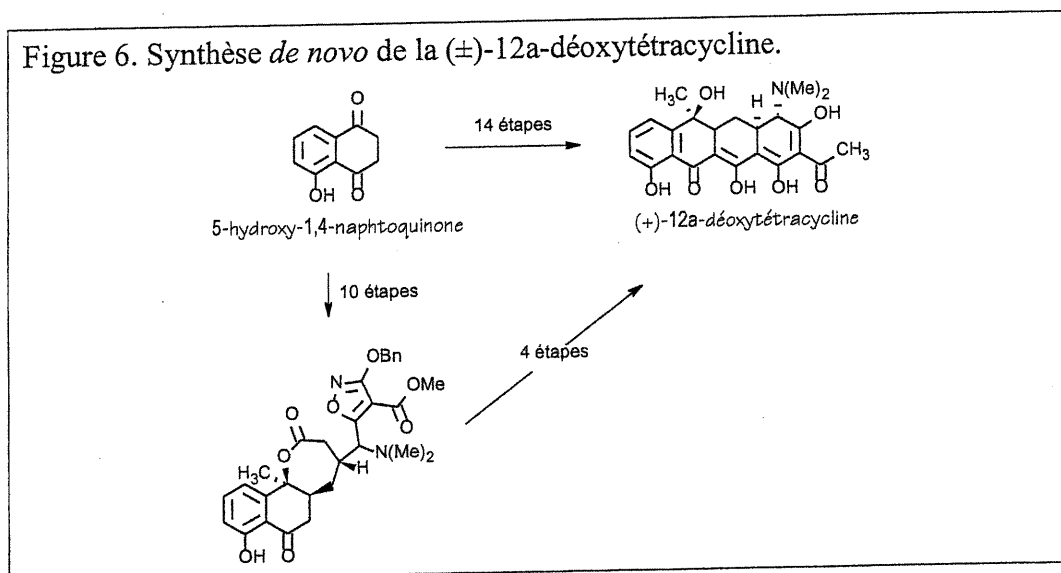
3.2.4. *Semi-synthèse*

Bien que la tétracycline soit maintenant produite par fermentation, le premier brevet concernant sa production était un procédé de déhalogénéation de la CTC en présence de palladium (Lepper, 1956). La méthacycline, la doxycycline et la minocycline sont aussi obtenues par approche semi-synthétique. Pour obtenir les glycylicyclines, ces nouvelles molécules actives envers les bactéries

résistantes aux tétracyclines, les réactions doivent se poursuivre afin de greffer un dérivé de la glycine sur le carbone 9 de la 6-déméthyl-6-déoxytétracycline, de la doxycycline ou de la minocycline (Sum et coll., 1998)

3.2.5. Synthèse totale

Jusqu'à présent, les tétracyclines n'ont jamais pu être synthétisées *de novo* et cette approche a été abandonnée depuis les années 1980 (Sum et coll., 1998). En effet, ces antibiotiques comportent plusieurs groupements difficiles à protéger et plusieurs carbones asymétriques qui influencent grandement leur activité antimicrobienne. La tentative la plus concluante est illustrée à la Figure 6, où la (\pm)-12a-déoxytétracycline est obtenue à partir de la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone après 14 étapes. Le rendement de réaction est faible (15%) mais quand même remarquable pour un schéma de synthèse stéréospécifique aussi complexe.



3.2.6. Les formulations médicamenteuses pour l'aliment du bétail

Au Canada, les seules tétracyclines disponibles sous forme de pré-mélanges médicamenteux sont la CTC et l'OTC, mais en France un pré-mélange de

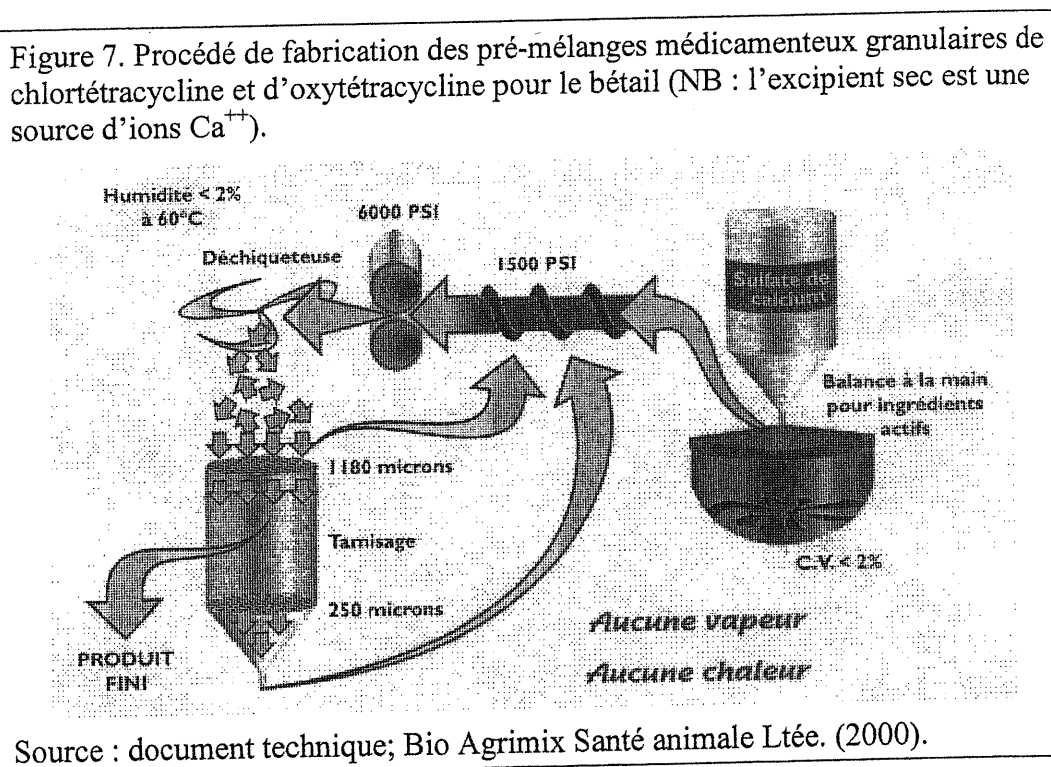
doxycycline est disponible depuis quelques années. Selon les directives du Bureau des Médicaments Vétérinaires, ces pré-mélanges ne peuvent être administrés qu'après avoir été dilués à la concentration appropriée avec l'aliment du bétail (Agriculture Canada, 1998). Le principe actif devrait être dispersé de façon homogène dans le pré-mélange, qui à son tour devrait réussir à s'homogénéiser convenablement dans l'aliment à médicamenter. Aussi, le principe actif devrait être stable tant dans le pré-mélange qu'après avoir été mélangé dans l'aliment et il devrait être biodisponible lorsque il est administré aux animaux (Klink et coll., 1998).

Le principe actif peut être dispersé dans une matrice formée de produits végétaux (par exemple, du tourteau de soja) ou minéraux (entre autres, de la pierre à chaux) afin de donner des caractéristiques physiques précises au pré-mélange et améliorer la stabilité du principe actif (Klink et coll., 1998). À l'inverse des formulations pour usage chez l'homme, les antibiotiques produits par fermentation destinés à la préparation des pré-mélanges pour usage vétérinaire peuvent ne pas être extraits du brassin. Si la biomasse est exempte de substances mutagènes et qu'il est trop dispendieux d'extraire et de purifier le principe actif, il est envisageable de sécher le brassin pour qu'il fasse partie du pré-mélange. Pour considérer cette alternative, d'autres éléments doivent être pris en compte, comme par exemple la teneur en matières grasses du brassin. L'incorporation de la biomasse dans le pré-mélange est avantageuse car :

- L'antibiotique est déjà dispersé de façon homogène dans la biomasse,
- La biomasse contient des éléments nutritifs pouvant être bénéfiques pour les animaux,
- Cette pratique diminue la quantité de déchets de fabrication,
- Cette pratique diminue l'usage de solvants chimiques afin d'extraire et de purifier l'antibiotique (Klink et coll., 1998).

Il est crucial que les particules du pré-mélange aient une taille, forme et masse volumique qui facilitent la dispersion homogène dans l'aliment. La teneur en poussières du pré-mélange est aussi un élément à considérer : elles peuvent entraîner des pertes économiques au meunier, sans compter le risque de contamination par des résidus médicamenteux. La granulation du pré-mélange permet de maîtriser à la fois la taille de ses particules et sa teneur en poussières. Un procédé de granulation a été mis au point par les laboratoires AMERICAN CYANAMID Co. pour la fabrication du pré-mélange médicamenteux de CTC destiné aux animaux de consommation (Klothen, 1984). Les ingrédients du pré-mélange (biomasse, complexe CTC-calcium, résidus nutritifs et agents de filtration) sont mélangés à un agent diluant sec (par exemple, du CaSO_4 , du CaCO_3 , du lactose, des solides de petit lait ou de la cellulose). Par la suite, l'homogénat est compacté à la pression appropriée avec un système de rouleaux texturés (Figure 7), puis les briquettes sont moulues et tamisées afin d'obtenir des granules aux dimensions recherchées.

Les pré-mélanges granulaires sont incontestablement avantageux pour la



fabrication d'aliments médicamenteux : dispersé dans l'excipient compacté, l'antibiotique a une plus grande tolérance à la chaleur et à l'humidité (Klink et coll., 1998), ce qui permet au meunier de préparer des aliments cubés sans qu'il ne perde son activité antibiotique. Cette pratique a de nombreux bénéfices zootechniques, car les aliments cubés ont un plus grand contenu en énergie et en protéines par unité de poids, ils sont plus digestibles et sont plus appétissants pour les porcs et ils produisent moins de poussières dans l'environnement de la ferme. De plus, le cubage permet l'utilisation de certains ingrédients particuliers. Cependant, des inconvénients biopharmaceutiques majeurs découlent des modes de fabrication des pré-mélanges de tétracyclines. En effet, si le principe actif n'est pas extrait du brassin, le pré-mélange fait à partir de la biomasse contiendra une quantité appréciable de cations divalents qui préservent la viabilité des *Streptomyces* durant la fermentation. De plus, des sels de calcium servent d'excipient dans le pré-mélange granulaire (Figure 7). Par conséquent, le pré-mélange médicamenteux fournit d'une part le principe actif et d'autre part les cations divalents avec qui il formera des complexes insolubles, ce qui entravera l'absorption intestinale du médicament. La chélation des cations divalents sera traitée à la Section 3.3.2.3. cette thèse.

3.3. CARACTÉRISTIQUES DES TÉTRACYCLINES

3.3.1. Structure

Woodward, en collaboration avec les laboratoires PFIZER, a réussi à élucider la structure moléculaire des tétracyclines en débutant les recherches avec l'OTC (Hochstein et coll., 1953). Cette réussite est colossale car elle a pavé la voie à l'étude de la corrélation structure-activité des tétracyclines et à l'obtention de molécules mieux adaptées à l'usage clinique. Il faut souligner que la structure de ces antibiotiques, passablement complexe, a été dévoilée à une époque où les moyens techniques étaient assez primitifs. Les chimistes analytiques devaient faire leurs déductions à partir des produits d'hydrolyse et

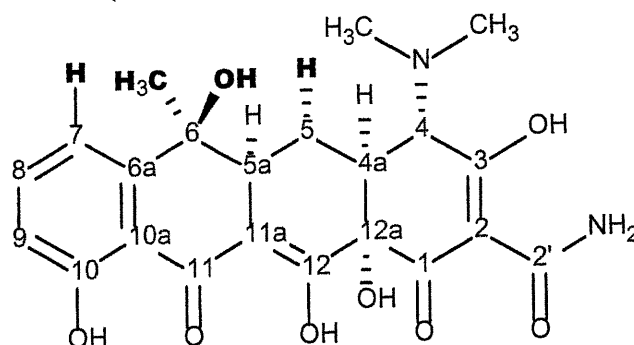
de la synthèse de molécules-hypothèses, qui reproduisent ce que l'on croyait être présent sur la molécule à identifier.

La structure de base des tétracyclines est illustrée à la Figure 8. Ces molécules ont un noyau naphtacène dont trois anneaux sont hydrogénés, où l'on retrouve les systèmes suivants :

- Le système tricarbonyl-méthane, une fonction amide (carbone 2') greffée au milieu d'un système β -dicétone (carbones 1 et 3) dont l'une des cétones apparaît sous la forme d'énol.
- Une amine tertiaire greffée sur le carbone 4.
- Un groupe phénol (carbones 6a—10a) conjugué à un deuxième système β -dicétone (carbones 11 et 12) dont l'une apparaît sous forme d'énol.
- Plusieurs carbones asymétriques : 4, 4a, 5, 5a, 6 et 12a. Les carbones 5, 6 et 7 peuvent recevoir des groupes facultatifs qui peuvent être modifiés ou remplacés pour obtenir les molécules disponibles en clinique.

La CTC, dont la formule empirique est $C_{22}H_{23}N_2O_8Cl$, est le 7-chloro-4-diméthylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-méthyl-1,11-dioxo-2-naphtacèncarboxamide (Stephens et coll., 1954). L'OTC

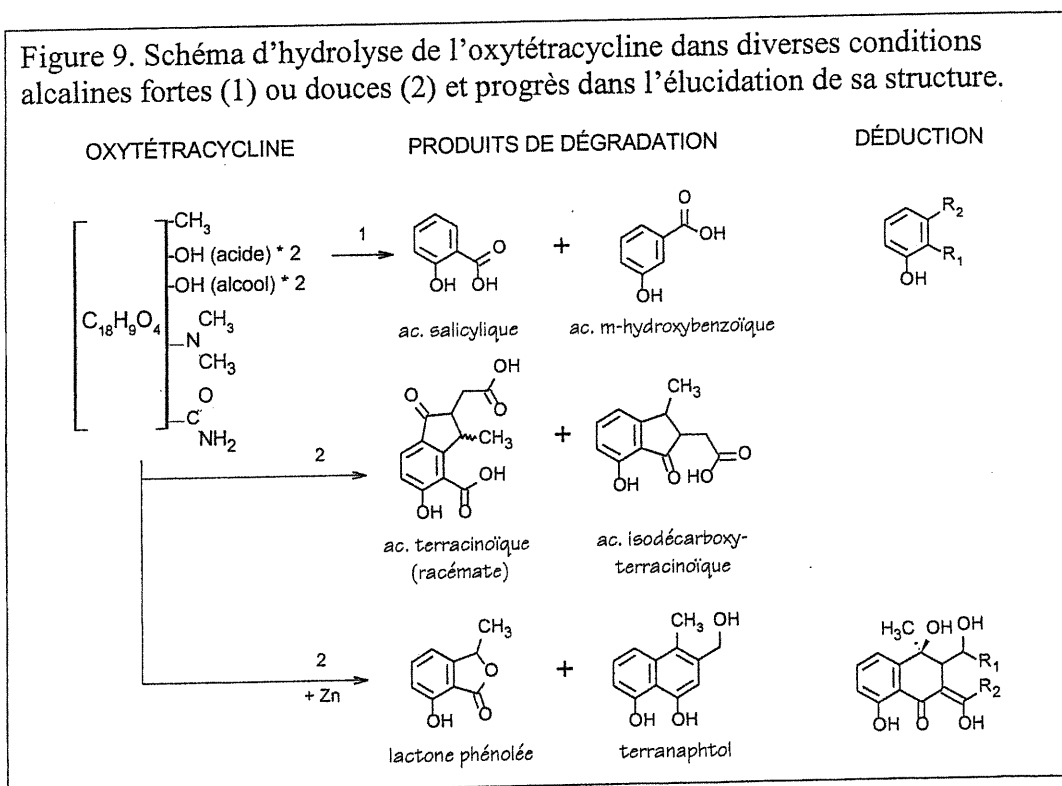
Figure 8. Numérotation des carbones du squelette de la tétracycline (chiffres) et groupements facultatifs (caractère gras).



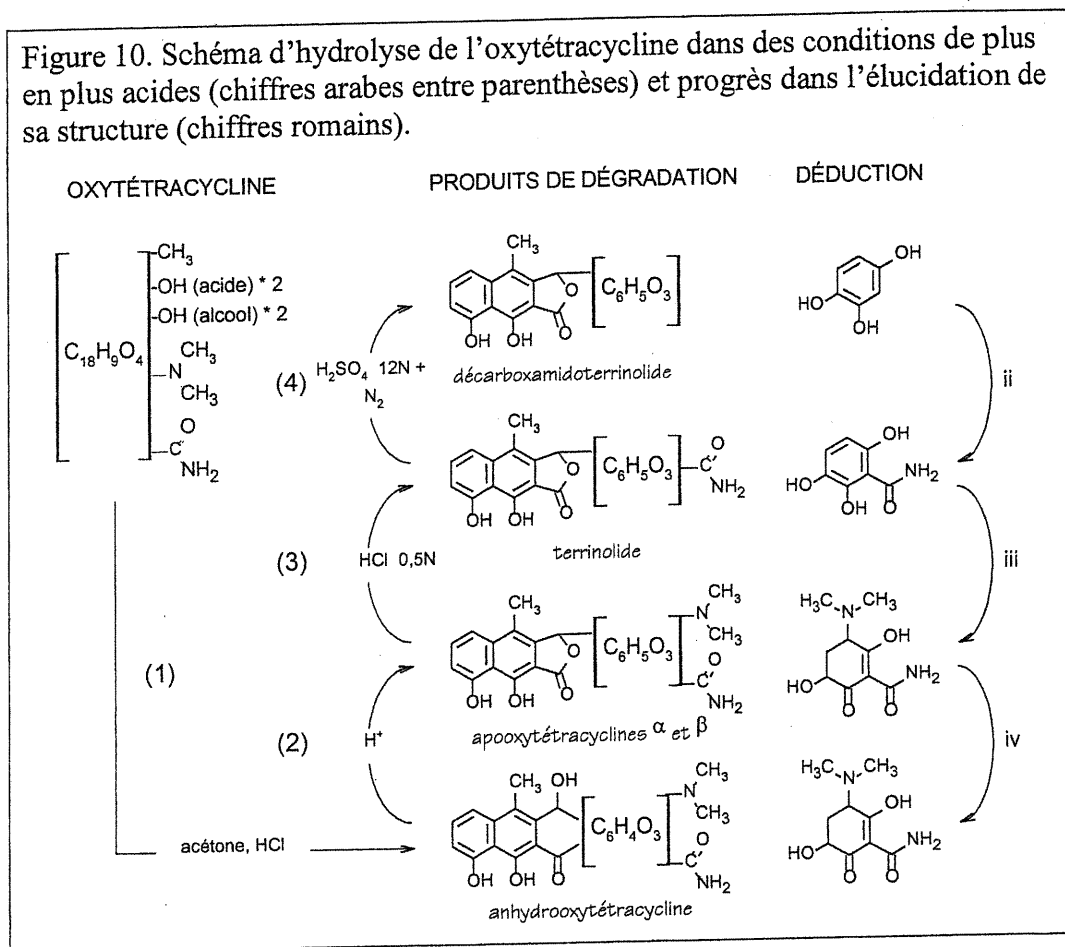
est le 4-diméthylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-méthyl-1,11-dioxo-2-naphtacèncarboxamide (Hochstein et coll., 1953) et sa formule complète $C_{22}H_{24}N_2O_9$. Par conséquent, la seule différence entre les deux antibiotiques est la présence d'une substitution chlore sur le carbone 7 de la CTC et d'un groupe alcool additionnel sur le carbone 5 de l'OTC.

Les analyses préliminaires réalisées par l'équipe de Woodward montrent que l'OTC se dégrade rapidement dans les milieux alcalins (Hochstein et coll., 1953) pour produire divers fragments aliphatiques et aromatiques. De cette série d'hydrolyses, on déduit la présence d'un noyau naphthalène hydraté et richement substitué, qui possède les principales caractéristiques du spectre UV de l'OTC (Figure 9).

Le traitement de l'OTC aux acides est beaucoup moins délétère (Figure 10) et permet de confirmer l'exactitude des déductions de l'hydrolyse alcaline. De plus, ce traitement permet d'identifier la portion de la molécule qui n'a pu être



identifiée précédemment. Enfin, pour résoudre comment sont reliés les deux fragments caractérisés chez l'OTC, l'équipe de Woodward a dégradé cet antibiotique dans des conditions de réduction. Le produit final de cette série de réactions est le naphtacène, ce qui confirme la structure de quatre anneaux fusionnés en ligne.



Une fois la structure de l'OTC élucidée, celle de la CTC devient évidente car leurs propriétés physico-chimiques et antibiotiques sont similaires et la séquence de réactions nécessaires pour élucider leur structure est bien définie (Stephens et coll., 1954). La première différence entre les deux molécules est apparue durant la dégradation de la CTC dans des conditions alcalines fortes, qui produit de l'acide chlorosalicylique. Aussi, l'anhydrochlortétracycline ne se convertit pas en apochlortétracycline lors du traitement de la CTC dans les

3.3.2. Propriétés physico-chimiques

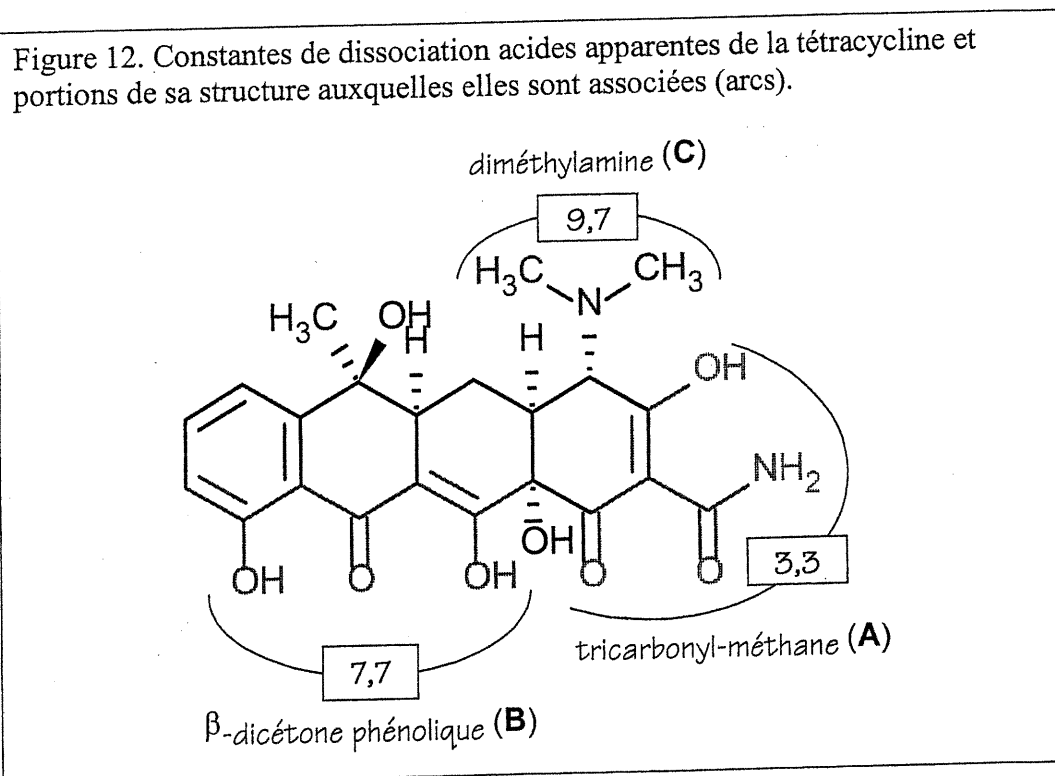
Les tétracyclines sont des substances jaunes, amères, d'un poids moléculaire d'environ 470 (donc environ 510 sous forme de chlorhydrate). Elles forment des sels avec des acides et les bases. Elles sont solubles dans les éthers glycoliques, pyridine, acides et bases dilués, mais faiblement solubles dans l'eau et les alcools de faible poids moléculaire et insolubles dans l'éther et les hydrocarbures (Regna, 1959). Les sels d'acides sont assez solubles : la concentration maximale de chlorhydrate de chlortétracycline dans l'eau est 8 mg/mL et 17 mg/mL dans le méthanol. Les tétracyclines sont fluorescentes et sont sensibles à la lumière. On connaît deux polymorphes pour le chlorhydrate de chlortétracycline, mais cela ne semble pas affecter leur biodisponibilité (Schwartzman et coll., 1979). Les tétracyclines sont stables sous forme sèche mais sont instables en solution, en particulier dans des conditions alcalines mais aussi dans des conditions acides. Ces processus de dégradation sont accélérés par la chaleur. Tel que mentionné précédemment, la CTC est particulièrement instable dans des solutions neutre ou alcalines. De plus, la diméthylamine des tétracyclines s'épimérise à des pH neutre ou alcalins.

3.3.2.1. *Constante de dissociation acide*

Selon le modèle de passage trans-membranaire des médicaments, seules les molécules non-ionisées diffusent à travers les membranes de phospholipides (Rowland et Tozer, 1994). Par conséquent, la constante de dissociation acide apparente (pKa) est un indicateur du comportement biologique des médicaments. Les tétracyclines ont trois groupes ionisants (Figure 12), dont les pKa sont 3,30, 7,40 et 9,30 environ, dépendant de la nature des substitutions présentes sur le squelette de tétracycline (Regna, 1959). Par conséquent, les tétracyclines sont ionisées dans tout le domaine des pH physiologiques (Figure 13) : ils portent une charge positive dans des environnements acides et sont chargés négativement aux pH alcalins. Enfin, ces substances amphotères sont

présentes sous forme de zwitterion dans des conditions proches de leur point isoélectrique, soit à un pH d'environ 5,5 (Colaizzi et Klink, 1969).

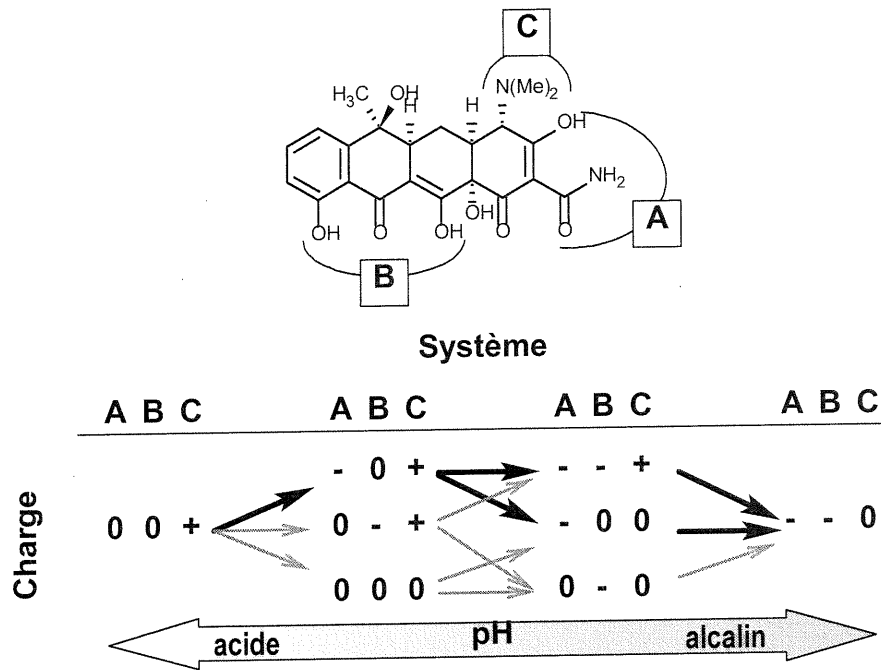
Malgré leur caractère ionique, les tétracyclines diffusent facilement à travers les membranes biologiques. Cette caractéristique serait associée à la dominance du zwitterion dans la majorité des environnements physiologiques (Figure 13 : ion $-0+$), soit à des pH entre 4 et 7,5 (Colaizzi et Klink, 1969). Sur la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle, où le pH est d'environ 5,3 (Baggot et Brown, 1998), plus de 90% des molécules de tétracycline en solution seraient sous forme de zwitterion. La charge nette de cet ion est nulle, ce qui faciliterait sa diffusion à travers les membranes biologiques. Par contre, dans l'environnement gastrique et dans la bile, les ions $(00+)$ ou $(--0)$ domineraient, ce qui entraverait la diffusion trans-membranaire des tétracyclines.



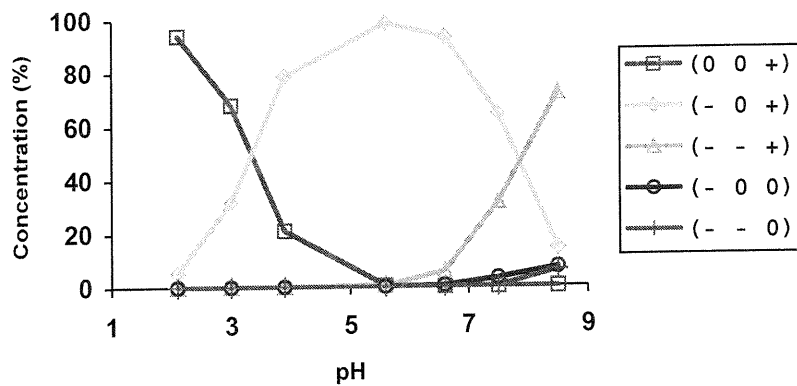
3.3.2.2. Coefficient de partage octanol: eau

Le coefficient de partage octanol: eau (exprimé sous sa forme logarithmique log-P) est une mesure de liposolubilité des substances chimiques. Ce paramètre

Figure 13. Schéma d'ionisation des tétracyclines en fonction du pH (haut) et évolution des concentrations relatives de ses principaux ions en fonction du pH du milieu (bas).



Légende : A, B, C : systèmes associés aux pKa des tétracyclines (voir Figure 12).
 Flèches grasses : directions principales du schéma d'ionisation.
 ± ± ± : charge des systèmes A, B et C.

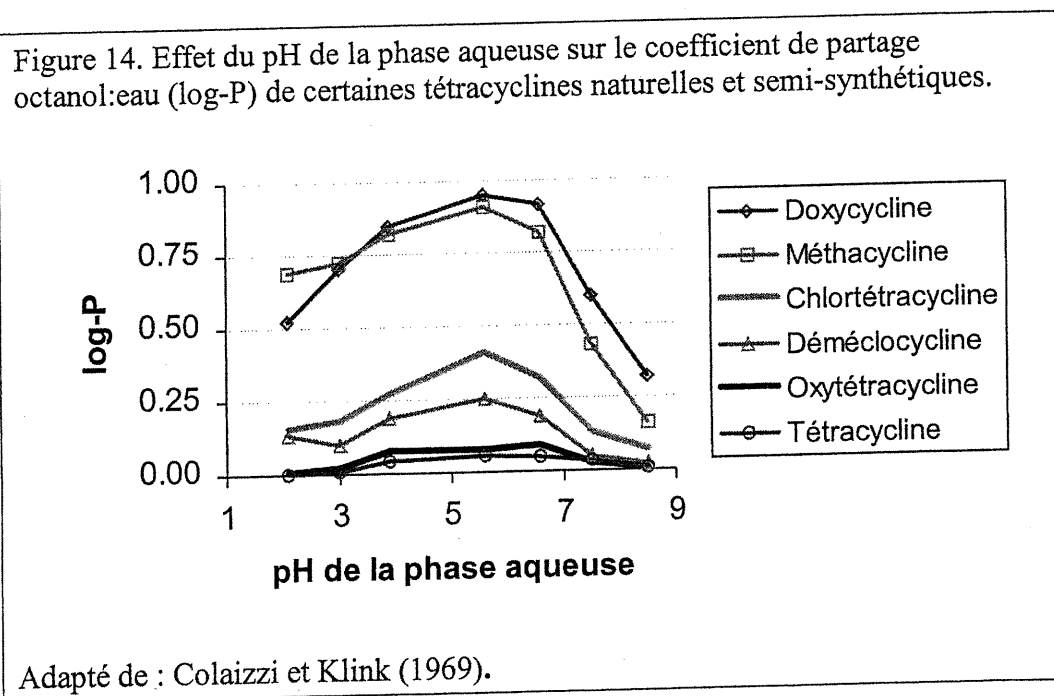


Adapté de : Colaizzi et Klink (1969).

peut constituer un indicateur précieux des propriétés biologiques des médicaments, car la liposolubilité est un déterminant majeur de leur absorption et de leur disposition par les organismes vivants. Colaizzi et Klink (1969) ont étudié l'effet du pH de la phase aqueuse sur le log-P de diverses tétracyclines et de leurs dérivés (Figure 14). Ainsi, la liposolubilité est maximale à des valeurs de pH comprises entre 4 et 6,5 chez la plupart des tétracyclines, ce qui correspond au segment de valeurs de pH où le zwitterion est dominant. Par contre, lors d'acidification ou d'alcalinisation de la phase aqueuse les tétracyclines s'ionisent et leurs valeurs de log-P diminuent abruptement (Figure 14).

Même si les tétracyclines possèdent les mêmes groupes ionisants et se comportent similairement en fonction du pH de la solution, leur liposolubilité est manifestement différente. Ces antibiotiques peuvent être classés en trois groupes relativement à leurs valeurs de log-P (Figure 14) :

- Molécules plus hydrophiles : tétracycline et OTC,



- Molécules intermédiaires : déméthyl-chlortétracycline et CTC,
- Molécules plus lipophiles : tétracyclines semi-synthétiques.

Ainsi, les substitutions sur le noyau tétracycline affectent la polarité et la liposolubilité des molécules qui les portent. Ceci aurait un impact sur plusieurs propriétés pharmacocinétiques : la biodisponibilité et le volume de distribution des congénères les plus liposolubles sont beaucoup plus élevées que celles des molécules les plus hydrosolubles, tandis que l'inverse se produit en rapport à la clairance. Les propriétés pharmacodynamiques semblent aussi être affectées par la liposolubilité, car la diffusion à travers des enveloppes bactériennes, l'affinité pour le récepteur du ribosome, l'inhibition de la synthèse protéique et la concentration minimale inhibitrice (CMI) sont corrélées positivement au log-P. Ces points seront repris dans les sections ultérieures de cette thèse.

3.3.2.3. *Chélation des ions métalliques multivalents*

Le pouvoir de chélater des cations métalliques est une propriété des substances chimiques qui mérite toujours de l'attention, car elle est souvent un déterminant de leur activité biologique. Par exemple, des substances pourraient chélater des cations indispensables au bon fonctionnement de systèmes enzymatiques et le comportement pharmacocinétique des médicaments peut être influencé par leur pouvoir chélateur (Weinberg, 1957).

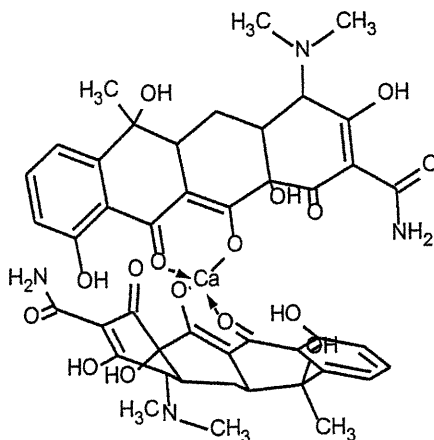
Il est bien connu que les tétracyclines forment des chélates avec les cations métalliques multivalents. Le système β -dicétone phénolique serait responsable de l'interaction entre les tétracyclines et les cations métalliques (Weinberg, 1957), tel qu'illustré à la Figure 15. Normalement, une ou deux molécules d'antibiotique peuvent se complexer selon le pH du milieu (Albert et Rees, 1956), quoique les ions Fe^{+++} peuvent lier jusqu'à trois molécules de tétracycline. La solubilité de ces complexes serait fonction du nombre de

molécules d'antibiotique qui y participent, car on a montré que le complexe tétracycline- Mg^{++} est soluble quand le ratio des espèces est 1:1 et insoluble avec un ratio 2:1 (Weinberg, 1957).

L'affinité de ces antibiotiques est en général plus grande pour les cations trivalents que pour les cations divalents (Albert et Rees, 1956). La stabilité des complexes tétracycline-cation est comparable à celle des complexes acide aminé-cation, sauf que l'affinité des tétracyclines pour les ions Fe^{+++} et Fe^{++} serait exceptionnellement élevée (Albert et Rees, 1956). Leur affinité pour l'ion Ca^{++} serait grande, mais probablement moindre que pour l'ion Fe^{++} , car ce dernier affecte la biodisponibilité orale des tétracyclines de façon plus importante (Leyden, 1985).

La formation de complexes insolubles avec les cations divalents diminue significativement la biodisponibilité des tétracyclines, ce qui sera discuté plus loin dans cette thèse. Cependant, la chélation a des conséquences bénéfiques sur plusieurs aspects : l'effet anti-inflammatoire des tétracyclines serait associé à cette propriété (Golub et coll., 1991). Cette propriété a aussi été mise à profit pour augmenter le rendement de biosynthèse des tétracyclines dans les cuves de fermentation (Evans, 1968). L'effet de chélation a aussi été utilisé pour

Figure 15. Représentation tridimensionnelle du complexe de tétracycline et d'ion calcium dans un rapport 2:1 (flèches : liens de coordination).



Note : optimisation 3D avec ChemSketch v. 4.55.

stabiliser les formulations de tétracyclines. L'effet antibiotique des tétracyclines serait indépendant de leur pouvoir chélateur, car cette capacité existe aussi chez des tétracyclines qui n'ont pas d'activité bactériostatique (Regna, 1959).

3.3.3. Propriétés antibiotiques

Les tétracyclines sont largement utilisées depuis presque 50 ans en médecine vétérinaire et humaine pour le traitement des maladies infectieuses. Il est, par conséquent, surprenant de constater que leur mécanisme d'action demeure encore méconnu, même si il est bien établi que le ribosome bactérien est sa cible principale. Le lecteur trouvera une description sommaire de la structure et de l'activité du ribosome bactérien à l'Annexe II de cette thèse.

3.3.3.1. *Effet des tétracyclines sur la synthèse protéique*

L'effet inhibiteur de la synthèse protéique des tétracyclines est connu depuis les premières années qui suivirent leur découverte (Gale et coll., 1972). Ce n'est que des années plus tard que l'on détermina que ces antibiotiques se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome, où ils empêchent l'attachement au site A du complexe aminoacyl-ARN_t. En se servant de la faculté des protéines ribosomales à spontanément reconstituer le ribosome lorsqu'elles sont mises en solution équimolaire (études SPORE : « Single Protein Omission Reconstitution Experiment »), on a réussi à localiser le récepteur des tétracyclines sur l'unité 30S du ribosome (Buck et Cooperman, 1990). Celui-ci se situerait sur la protéine S7 et d'autres éléments de l'unité 30S participeraient à sa conformation. De plus, il serait stéréosélectif et unique sur le ribosome.

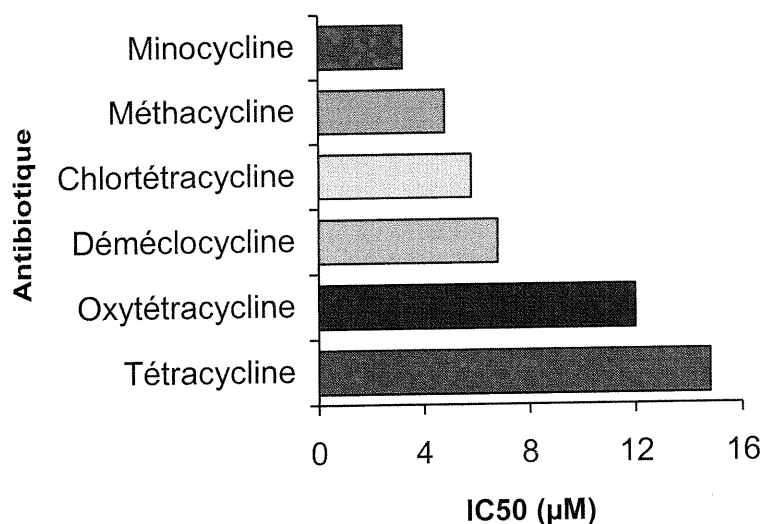
S'il semble qu'une molécule de tétracycline soit suffisante pour enrayer la synthèse protéique d'un ribosome, l'effet inhibiteur n'est pas identique pour les tétracyclines disponibles en clinique (Tritton, 1977). Les concentrations

inhibitrices de 50% de la synthèse protéique (IC_{50}) des différents congénères sont considérablement différentes (Figure 16) et sont corrélées négativement à leur efficacité à stabiliser le ribosome lors de stress thermique (Tritton, 1977). Cela suggère que lorsqu'une tétracycline s'attache sur son récepteur, la fluidité de l'unité 30S diminuerait considérablement et la conformation du site A ou sa capacité à interagir avec le complexe aminoacyl-ARNt seraient altérées, ce qui bloquerait la synthèse peptidique. Une hypothèse alternative est que le complexe aminoacyl-ARNt ne puisse interagir avec l'ARNr 16S en présence de tétracycline (Chopra et coll., 1992). Il est à noter que les valeurs de IC_{50} des différents congénères sont corrélées négativement à leurs log-P respectifs, ce qui souligne l'importance de la liposolubilité et des substitutions présentes sur le noyau tétracycline en rapport avec leur activité biologique (Colaizzi et Klink, 1969).

3.3.3.2. Effets sur la membrane plasmatique

Il est rapporté que certaines tétracyclines semi-synthétiques ayant perdu l'effet

Figure 16. Concentrations de diverses tétracyclines requises pour inhiber 50% de la synthèse de polyphénylalanine par des ribosomes de *Escherichia coli*.



Adapté de : Tritton (1977).

inhibiteur de la fonction du ribosome auraient une activité bactéricide reliée à la membrane bactérienne. Cependant, ces molécules ne peuvent être employées en clinique car elles sont aussi très toxiques pour les cellules eucaryotes (Schnappinger et Hillen, 1996).

3.3.3.3. *Pharmacodynamie des tétracyclines et prédiction de l'effet thérapeutique*

Il est généralement admis que les tétracyclines ont un effet bactériostatique, car le rapport de leurs concentrations minimales bactéricides (CMB)^a sur leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI)^b est supérieur à 10. Divers modèles mathématiques permettent de décrire quantitativement l'activité d'un antibiotique à partir des taux de croissance et de mortalité de la population bactérienne exposée à ce dernier (Courvalin et coll. 1990). Dans le cas d'agents bactériostatiques comme les tétracyclines, le taux de mortalité bactérienne surpasserait de peu le taux de croissance. Par conséquent, ces antibiotiques se comportent de façon analogue aux antibiotiques dits « temps-dépendants » (Vogelman et Craig, 1986), dont l'effet antibiotique sature à des concentrations relativement basses (Mattie, 2000). Plusieurs considèrent que la durée d'exposition des bactéries pathogènes à des concentrations supra-CMI serait le meilleur indicateur de l'efficacité antibiotique des antibiotiques bactériostatiques et bactéricides « temps-dépendants » (AliAbadi et Lees, 2000). Cependant, il n'y a pas de donnée sur la relation dose-effet des tétracyclines naturelles pour guider les décisions thérapeutiques des vétérinaires en pratique porcine.

L'effet suppressif des tétracyclines sur la croissance *in vitro* de *Escherichia coli* peut se prolonger jusqu'à 4 h suivant la fin de l'exposition à l'antibiotique (Gerber et Craig, 1982). Ce phénomène, l'effet post-antibiotique (EPA), serait

^a CMB : plus petite concentration requise pour tuer 99,9% de la colonie dans le milieu de culture (Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999).

^b CMI : plus petite concentration capable de prévenir la croissance visible des bactéries (Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999).

le reflet du temps requis à la bactérie pour réparer les lésions produites par une dose non-létale d'antibiotique (Li et coll., 1997). Cet EPA, qui existe aussi *in vivo*, était considéré par plusieurs comme un indicateur de « l'indulgence » de l'antibiotique à la présence de concentrations sub-CMI durant le schéma posologique (Spivey, 1992). La prise en compte de l'EPA dans le schéma thérapeutique ne semble possible que lorsque l'antibiothérapie fait l'objet d'un suivi pharmacothérapeutique individualisé (Sanders, 1998). Cependant, de récentes études indiquent que l'EPA s'efface progressivement d'un intervalle posologique à l'autre, du moins avec les aminosides (Den Hollander et coll., 1998), ce qui remet en question son intérêt clinique.

Les vétérinaires en pratique porcine utilisent fréquemment des épreuves de sensibilité *in vitro* aux antibiotiques pour choisir l'antibiotique à administrer dans le but de maîtriser les maladies bactériennes. L'antibiogramme, où l'on mesure l'inhibition de croissance sur gélose de la bactérie exposée à une dose étalon d'antibiotique, est une épreuve simplifiée visant à estimer la CMI de la bactérie (Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999). Le diamètre d'inhibition est comparé à deux valeurs-seuil (fin de sensibilité et début de résistance, respectivement) choisies en fonction de la distribution des CMI des bactéries visées et des concentrations plasmatiques obtenues avec les doses d'usage par la voie d'administration d'usage (Lorian, 1996). Selon le National Committee for Clinical Laboratory Standards (N.C.C.L.S.), la tétracycline peut être employée comme unique représentant de cette famille d'antibiotiques dans l'antibiogramme car les différences d'activité entre les divers congénères sont généralement négligeables (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999), même si parfois les molécules semi-synthétiques sont plus actives (Lorian, 1996). Cependant, de récentes études indiquent que la CTC serait plus active que l'OTC et la tétracycline envers des bactéries pathogènes du tractus respiratoire chez le porc telles que *A. pleuropneumoniae* et *P. multocida*, car ses CMI sont significativement plus basses que celles des deux autres (Wu et Wolff, 2000).

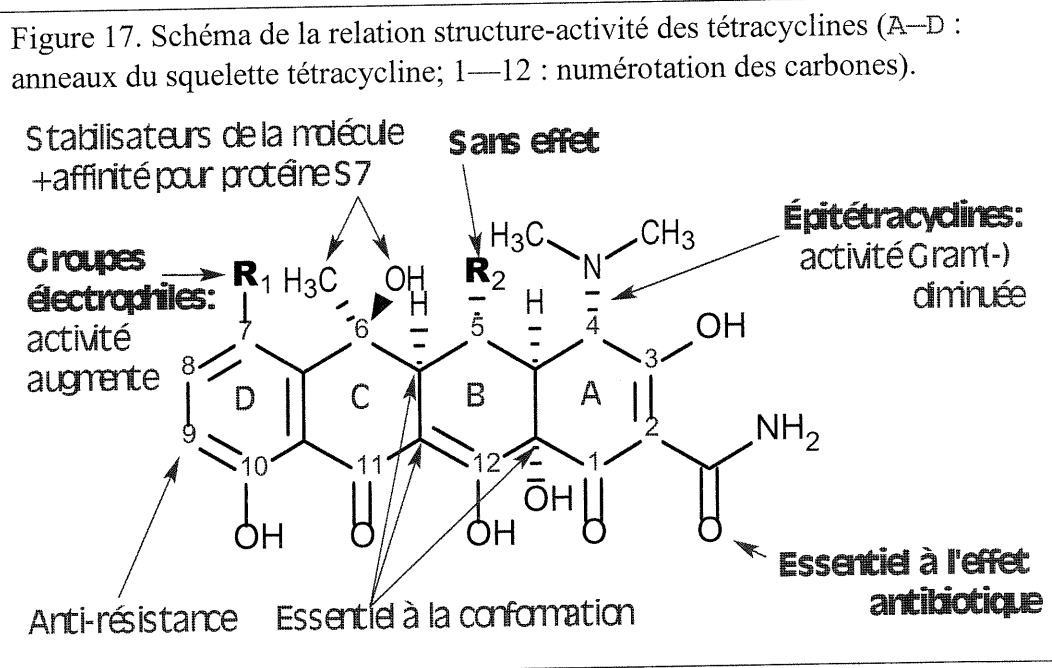
Il est à signaler que le guide du N.C.C.L.S. attribue la catégorie « sensible » aux souches bactériennes dont les CMI sont plus petites ou égales à 4 mg/L, « intermédiaire » aux souches dont la CMI est 8 mg/L, et « résistante » aux souches dont les valeurs de CMI sont de 16 mg/L ou plus (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999). Ces valeurs-seuil, qui ont été déterminées chez l'homme, sont appliquées à toutes bactéries pathogènes des animaux, sans tenir compte des doses ni des modes d'administration d'usage. Les résultats rapportés aux sections 5.1. et 5.2. de cette thèse montrent que ces valeurs-seuil sont irréalistes pour l'antibiothérapie via l'aliment chez le porc.

3.3.4. Propriétés anti-inflammatoires

Des chercheurs ont montré que les tétracyclines ont un effet anti-inflammatoire qui est associé à leur pouvoir de chélation des cations divalents (Golub et coll., 1991). En effet, l'ion Zn^{++} serait un co-facteur de la protéine kinase C et des métalloprotéines de la matrice extracellulaire qui sont secrétées par les leucocytes neutrophiles activés par diverses cytokines telles que le facteur onconécrosant (TNF) et les interleukines. Ainsi, les tétracyclines peuvent modérer l'intensité de la réponse inflammatoire, ce qui a été mis à profit dans des conditions non-infectieuses telles que l'acné ou la polyarthrite rhumatoïde. Cet effet des tétracyclines permet de diminuer le taux de mortalité secondaire à une réponse inflammatoire exacerbée chez le modèle murin de choc endotoxique (Shapira et coll., 1996) et dans le modèle porcin d'insuffisance respiratoire secondaire à l'installation d'un circuit de circulation sanguine extra-corporelle (Carney et coll., 1999).

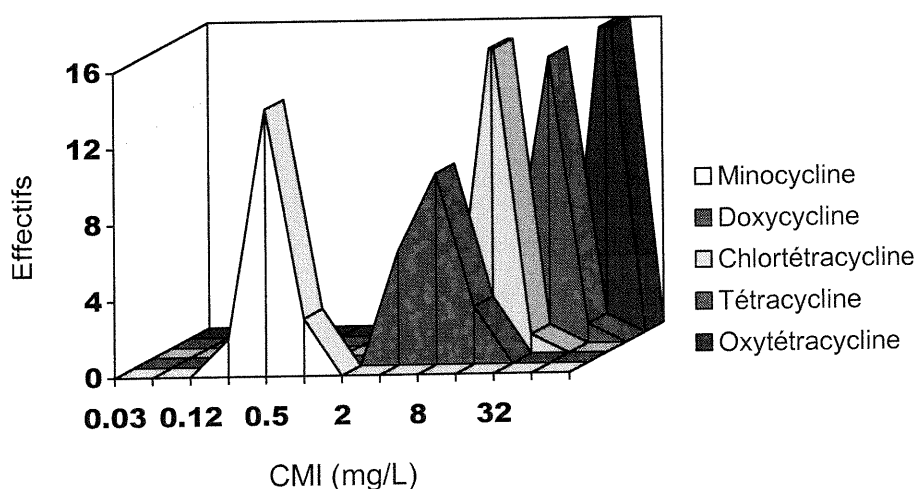
3.3.5. Relation structure-activité

L'élucidation de la structure des tétracyclines a permis d'étudier le rôle des diverses composantes de sa structure dans les propriétés physico-chimiques et l'activité antibiotique (Blackwood et English, 1977). L'intégrité des deux chromophores du squelette de tétracycline (Figure 17 : anneaux A et BCD, respectivement) semble essentielle au pouvoir inhibiteur de la synthèse protéique (quoique certaines altérations vont en échange leur permettre d'acquérir une activité vis-à-vis de la membrane cytoplasmique). L'oxygène de la fonction carboxamide est essentiel et la conformation spatiale de la fonction diéthylamine est importante pour l'activité antibiotique chez les bactéries Gram-négatives. Si la substitution sur le carbone 5 est inerte du point de vue microbiologique, l'activité de la molécule augmente si une fonction halogénée ou diméthylamine est greffée sur le carbone 7 et que les substitutions présentes sur le carbone 6 la stabilisent (Blackwood et English, 1977). Il semble aussi que le groupe méthyle interfère sur l'activité des tétracyclines, car les molécules déméthylées ou planaires (Tableau 1) stabilisent plus efficacement le ribosome lors de stress thermique (Tritton, 1977).



Tel que mentionné à la section 3.3.2.2., la liposolubilité affecte l'affinité des tétracyclines pour le récepteur de l'unité 30S du ribosome (Tritton, 1977). Cet effet se répercute sur leurs CMI et devient manifeste surtout vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (Figure 18), ainsi que des bactéries moins sensibles à la tétracycline (Blackwood et English, 1977).

Figure 18. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de diverses tétracyclines envers 20 souches résistantes de *Pasteurella multocida*.



Adapté de : Pijpers et coll (1989).

3.4. DEVENIR DES TÉTRACYCLINES CHEZ L'ANIMAL

Les tétracyclines ont fait l'objet d'études pharmacocinétiques chez plusieurs espèces d'animaux domestiques, entre autres chez le porc.

3.4.1. Résorption

Les tétracyclines sont résorbées rapidement à partir du tractus gastro-intestinal et la concentration plasmatique maximale est atteinte en 2-4 h chez les carnivores. Chez ces animaux et chez l'homme, la biodisponibilité des tétracyclines est bonne à excellente, selon la liposolubilité de la molécule

administrée (Aronson, 1980). Les particules alimentaires ralentissent la résorption et les cations divalents diminuent significativement leur biodisponibilité orale (Neuvonen, 1976).

Paradoxalement, la biodisponibilité orale de la CTC et de l'OTC chez le porc est faible : selon les études, ce paramètre présente des valeurs oscillant entre 6% et 18% pour la CTC et entre 4% et 6% pour l'OTC. Ces résultats sont respectivement deux et 10 fois plus bas que ce qui a été calculé chez l'homme (Aronson, 1980). Une situation similaire existe chez la volaille et, pour augmenter la biodisponibilité des tétracyclines, les vétérinaires en pratique aviaire ont souvent recours à des acides organiques ou d'autres adjuvants pour diminuer la chélation aux cations divalents (Wyatt et Miller, 1985).

Les causes de la faible biodisponibilité des tétracyclines chez le porc sont méconnues et ne peuvent être expliquées par les propriétés physico-chimiques du principe actif. Il est possible que cette différence inter-espèces soit le résultat de différences entre les profils de libération du principe actif par les formes pharmaceutiques employées (voir section 3.2.6.), ou encore de différences d'expression de glycoprotéine-P dans le tractus gastro-intestinal. En effet, ces protéines d'efflux, présentes sur l'épithélium gastro-intestinal, sont responsables de la clairance intestinale de plusieurs médicaments lipophiles (Benet et coll., 1999) et les tétracyclines seraient des substrats de la glycoprotéine-P (Kavallaris et coll., 1993).

3.4.2. Distribution

La distribution de l'oxytétracycline chez le porc a fait l'objet de deux études (Mercer et coll., 1978; Black et Gentry, 1984) et il est probable que les autres tétracyclines aient des patrons de distribution similaires. L'OTC se distribue largement dans l'organisme et se concentre dans certains organes et tissus, en particulier le rein et le foie. La concentration dans le tissu pulmonaire est légèrement supérieure à celle du plasma et la concentration dans le tissu

musculaire est inférieure à celle du plasma. Les tétracyclines se fixent au tissu osseux actif et demeurent longtemps dans l'os et la dentine.

L'étendue de distribution des tétracyclines chez le chien est corrélée à leur liposolubilité respective (Barza et coll., 1975). Ainsi, les rapports des concentrations cérébrales sur les concentrations sériques de doxycycline et de minocycline sont significativement plus élevées que celles des tétracyclines plus hydrophiles comme l'OTC.

3.4.3. Métabolisme

Les tétracyclines naturelles ne semblent pas être des substrats pour les voies métaboliques chez l'homme et les animaux, mais certaines études portant sur la détection de résidus médicamenteux dans les denrées animales considèrent que les épitétracyclines et l'isochlortétracycline sont leurs métabolites (Kennedy et coll., 1998). Cependant, il est évident que ces molécules ne sont pas issues des voies du métabolisme mais le fruit de la dégradation spontanée *in vivo* de ces antibiotique, tel qu'indiqué à la section 3.3.1. de cette thèse.

Certaines études montrent que la demi-vie d'élimination de la doxycycline et la minocycline diminue lors d'administration concomitante de phénobarbital, de phénytoïne ou de carbamazépine (Aronson, 1980). Ces médicaments sont des inducteurs des isoenzymes 3A4, 2D6, 1A2 ou 2C du complexe des cytochromes P450 (Michalets, 1998), ce qui suggère que ces deux tétracyclines semi-synthétiques pourraient subir un métabolisme de phase I.

3.4.4. Excrétion

Les tétracyclines sont surtout éliminées par filtration rénale sous forme inchangée, mais l'excrétion biliaire est non-négligeable. Le rapport de ces deux types d'excrétion est corrélé au caractère lipophile du médicament (Barza et coll., 1975), probablement en raison d'une diffusion de l'antibiotique présent

dans le filtrat glomérulaire vers le réseau capillaire du tubule contourné rénal. En chiffres absolus, la demi-vie d'élimination des tétracyclines est corrélée positivement avec leurs valeurs de log-P. L'exception à cette règle est la CTC, qui est considérablement plus instable dans les fluides biologiques (Lepper, 1956).

Il est à signaler que chez le chien et chez l'homme, les tétracyclines excrétées dans l'urine peuvent être réabsorbées par la vessie (Milroy et coll., 1974; Wood et Leonard, 1983). En effet, chez les animaux omnivores ou carnivores, le pH de l'urine est proche du point iso-électrique des tétracyclines, ce qui favorise le passage de l'épithélium de bordure en brosse et leur restitution au compartiment sanguin via le système lymphatique.

3.5. DEVENIR DES TÉTRACYCLINES CHEZ LA BACTÉRIE

Les antibiotiques subissent des processus pharmacocinétiques semblables chez les bactéries et chez les animaux, car ce sont des substances exogènes autant pour les uns que pour les autres. Pour exercer leur effet, les tétracyclines doivent franchir les différentes enveloppes bactériennes, car leurs récepteurs sont intracellulaires (Chopra et coll., 1992). Ces antibiotiques doivent ensuite diffuser vers le récepteur de l'unité 30S pour inhiber la synthèse protéique, ce qui sera influencé par leur liposolubilité (Tritton, 1977). Enfin, le phénomène de clairance des tétracyclines existe chez les bactéries, ce qui se traduit par le phénotype de résistance. Les sections suivantes traitent de l'absorption et de la clairance bactérienne des tétracyclines.

3.5.1. Enveloppes bactériennes et résorption

La diffusion des antibiotiques varie considérablement entre les bactéries, car leurs enveloppes externes ne sont pas constantes d'une espèce à l'autre et entre les souches d'une même espèce. En plus de la membrane cytoplasmique, les bactéries possèdent une paroi bactérienne et, souvent, une capsule (Chopra et

Ball, 1982). L'imperméabilité de la paroi bactérienne à la coloration de Gram est le critère taxonomique de base en bactériologie : la paroi Gram-positive est formée d'une couche de peptidoglycanes, tandis que la paroi Gram-négative est formée d'une couche additionnelle de phospholipides surmontée d'une couche de lipopolysaccharides. Entre ces deux feuilletts de la paroi à Gram négatif, il y a un espace vide nommé périplasme où sont présentes des hydrolases et des protéines de transport (Chopra et Ball, 1982).

Le feuillet externe de la paroi Gram-négative est passablement imperméable aux antibiotiques lipophiles car le lipopolysaccharide agit comme une barrière polaire. Pour franchir le feuillet externe, les tétracyclines se complexent avec du Mg^{++} et empruntent la voie des porines OmpF (Chopra et coll., 1992). Les tétracyclines traversent la membrane cytoplasmique à la fois par diffusion passive et par un mécanisme de diffusion dépendant du gradient de pH.

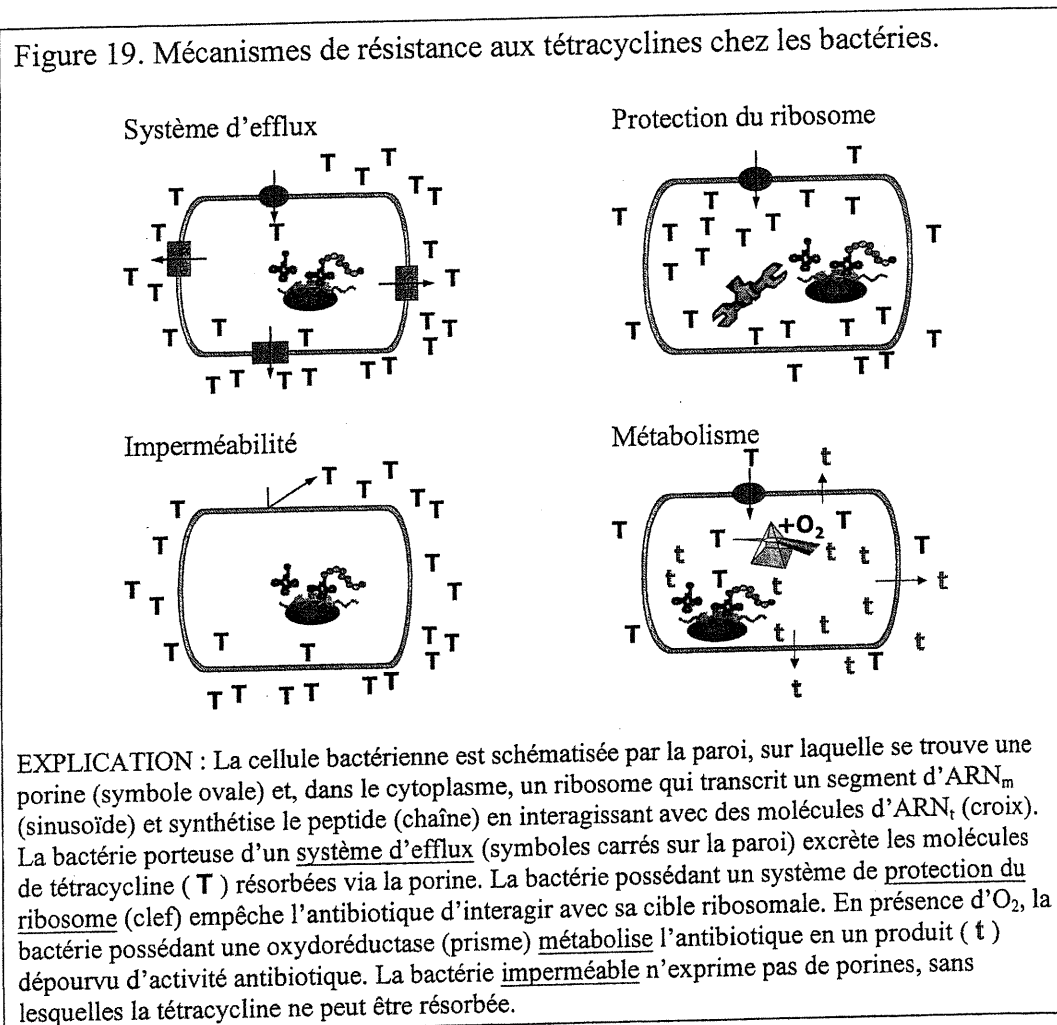
3.5.2. Résistance aux tétracyclines

Si l'usage des tétracyclines en médecine humaine est limité depuis années 1970 dans les pays occidentaux, c'est en partie grâce à l'émergence de mécanismes de résistance parmi les bactéries pathogènes de l'homme (Speer et coll., 1992). Plusieurs équipes de chercheurs travaillent sur les aspects génétiques et les mécanismes de la résistance aux tétracyclines. Cette section présente les mécanismes de résistance aux tétracyclines et le lecteur pourra retrouver à l'Annexe III des informations complémentaires sur ce sujet.

Jusqu'à présent, on connaît 31 ensembles différents de gènes de résistance aux tétracyclines (Levy et coll., 1999), qui encodent trois types de mécanismes spécifiques (Figure 19). À cette liste s'ajoute un mécanisme non-spécifique : la diminution de l'expression des porines OmpF, qui augmente aussi la résistance aux pénicillines et aux fluoroquinolones (Speer et coll., 1992).

3.5.2.1. Systèmes d'efflux

Cette catégorie de mécanismes, qui produit une résistance très élevée, est plus souvent rencontrée chez les entérobactéries mais aussi chez certaines bactéries Gram-positives. Ces protéines membranaires dépendantes d'énergie expulsent un complexe tétracycline-Mg⁺⁺ en dehors du cytoplasme en échange d'un ion H⁺ (Roberts, 1996). Les échangeurs de tétracycline ont des similarités structurelles avec d'autres pompes d'efflux impliquées dans la résistance aux désinfectants et autres antibiotiques. De nouvelles classes de pompes d'efflux ont récemment été identifiées chez les *Enterobacteriaceae* multi-résistantes (Nikaido, 1998) : il s'agit de systèmes peu spécifiques de substrat qui peuvent excréter diverses classes d'antibiotiques, des désinfectants, des métaux lourds



et d'autres substances toxiques pour les bactéries.

3.5.2.2. *Protection ribosomale*

Certaines protéines cytoplasmiques permettent au ribosome de poursuivre la synthèse protéique malgré la présence de tétracycline. Le degré de résistance que procure ce type de mécanismes est moindre que celle des pompes d'efflux. Le mécanisme exact de cette protection demeure inconnu, mais on soupçonne que ces protéines empêchent l'antibiotique de se fixer sur son récepteur ou encore de minimiser son effet sur la fluidité du ribosome (Taylor et Chau, 1996). Dans ce cas, le complexe aminoacyl-ARNt pourrait réussir à interagir avec le site A du ribosome.

3.5.2.3. *Métabolisme*

Des chercheurs ont trouvé chez certaines bactéries anaérobies un transposon qui encode une enzyme d'oxydoréduction pouvant inactiver la tétracycline chez *Escherichia coli* (Speer et coll., 1992). L'impact clinique de ce type de mécanisme de résistance est probablement négligeable chez les bactéries anaérobies, car cette biotransformation dépend de l'oxygène, mais on ne connaît pas sa prévalence chez d'autres bactéries dans l'écosystème.

3.6. USAGE DES TÉTRACYCLINES EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

Tel que mentionné dans la Section 2 de cette thèse, les tétracyclines sont les antibiotiques les plus souvent prescrits en santé animale. Ces médicaments sont utilisés principalement par voie orale, via l'aliment ou l'eau de boisson, pour la prophylaxie ou la métaphylaxie de diverses maladies respiratoires, telles que la pleuropneumonie, la rhinite atrophique, la pneumonie enzootique et les complications bactériennes de maladies respiratoires d'origine virale. Pour le traitement des animaux cliniquement atteints de maladie, chez qui l'ingéré volontaire est fortement réduit, la voie

intramusculaire est privilégiée (Henry et Apley, 1999). Les directives en rapport avec les doses via l'aliment varient d'un pays à l'autre et certains pays décrètent des lois fixant les doses d'antibiotique pouvant être incorporées à l'aliment (Waddell et AASP Pharmaceutical Issues Committee, 2000). Jusqu'à tout récemment, ces directives ne tenaient pas compte des variations du comportement alimentaire des porcs. En effet, la dose d'usage est une concentration fixe dans l'aliment complet qui sera offert aux animaux à risque pour consommation *ad libitum*. Cependant, l'ingéré volontaire des porcs est influencé par plusieurs facteurs associés, entre autres, à l'âge, la génétique et le statut sanitaire des animaux, la composition de l'aliment, les conditions environnementales et au comportement social des animaux. L'antibiotique peut aussi diminuer l'ingéré volontaire de l'aliment médicamenté par les porcs à risque (Becker, 1993). L'efficacité clinique de la CTC et de l'OTC aux doses d'usage via l'aliment est souvent médiocre et des résultats d'études indiquent qu'elles produisent des concentrations plasmatiques beaucoup plus basses que les 90^{èmes} percentiles de CMI pour les agents pathogènes visés (Nielsen et Gyrd-Hansen, 1996). Ce constat incite les vétérinaires en pratique porcine à avoir recours à des doses hors-norme pour tenter d'atteindre les concentrations efficaces, ce qui est plus économique que d'inclure un adjuvant lors de la préparation de l'aliment médicamenté.

Si les doses de CTC et d'OTC sont déterminées empiriquement, le schéma posologique est un deuxième canevas où les vétérinaires en pratique porcine laissent libre cours à leur créativité. En effet, ces antibiotiques sont souvent administrés selon des rythmes pulsatiles, dont certains prétendent qu'ils permettent à l'immunité de s'établir plus adéquatement (Walter et coll., 2000).

Si les vétérinaires profitent de leur droit de prescrire des doses hors-norme dans l'exercice de la pratique porcine, en revanche ils établissent prudemment les délais d'attente pour l'abattage. En effet, la période de retrait est augmentée de plusieurs jours, voire des semaines pour faire l'usage de doses 2—4 fois plus élevées que les doses approuvées de CTC et d'OTC, dont la demi-vie d'élimination est d'environ 6 h (Riviere et coll., 1998).

3.6.1. Usage ergotropique

La CTC et l'OTC sont utilisées à des fins de promotion des performances zootechniques en Amérique du Nord et dans plusieurs autres pays sauf dans les pays de l'Union Européenne, où cette pratique est interdite (Prescott, 1997). L'usage ergotropique des tétracyclines date du tout début de l'âge des antibiotiques, alors qu'il était nécessaire de trouver le « facteur protéique animal », dont les aliments pour le porc et la volaille faits à base de soja semblaient être carencés (Jukes, 1977). On nota que *Streptomyces aureofaciens* produit de la vitamine B₁₂ (voir Annexe I), qui à l'époque était prise pour le facteur recherché. L'ajout, après l'extraction de CTC, du brassin aux aliments pour le porc et la volaille se solda par une augmentation de la croissance plus grande que celle causée par le « facteur protéique animal » recherché : on réalisa plus tard que cet effet était dû à des quantités résiduelles de CTC présents dans la biomasse.

La promotion de croissance chez l'animal sain est le résultat d'une interaction extrêmement complexe entre les tétracyclines, la flore gastro-intestinale et l'animal. Le mode d'action n'est pas encore élucidé, mais la grandeur de l'effet est corrélée négativement avec le statut sanitaire des animaux (Thomke et Elwinger, 1998). La présence de bactéries dans le tube digestif entraînerait des dépenses d'énergie et de protéines chez les animaux pour éliminer leurs toxines qui sont absorbées et pour maintenir l'activité mitotique des entérocytes, dont le remplacement est accéléré. La réaction immunitaire déclenchée au niveau du tube digestif en réponse à l'agression se solderait par l'épaississement de sa paroi et une diminution de l'efficacité d'absorption des nutriments, ainsi que par la sécrétion de cytokines qui induisent le catabolisme protéique. Enfin, il y a compétition entre les bactéries et leur biotope animal pour l'utilisation des nutriments (Thomke et Elwinger, 1998). Par conséquent, les antibiotiques diminueraient l'intensité de l'agression bactérienne, ce qui permettrait à l'animal d'augmenter l'utilisation des nutriments à des fins de croissance. Il est à noter que l'effet de promotion de croissance est associé à l'activité

antibiotique des médicaments et que les progrès en zootechnie ont considérablement réduit l'intérêt de cet usage des antibiotiques par rapport aux années 1950.

3.7. RÉCAPITULATIF ET OBJECTIFS

On peut constater à la lecture de cette revue de littérature que les tétracyclines disponibles en clinique ont beaucoup de ressemblances structurelles, mais leurs substitutions facultatives (c'est à dire, celles que portent les carbones 5, 6 et 7) sont responsables de différences physico-chimiques qui ne peuvent être négligées. Si les organismes normatifs considèrent que l'efficacité antibiotique des tétracyclines de première et deuxième générations est équivalente, des données biochimiques, microbiologiques et pharmacologiques tendent à indiquer le contraire. Cependant, les données sur le comportement pharmacocinétique des tétracyclines naturelles sont fragmentaires et il n'y a aucune information disponible en relation à leurs relations dose-effet clinique.

Un deuxième constat est que la biodisponibilité orale des tétracyclines naturelles chez le porc est beaucoup plus basse que chez d'autres animaux monogastriques. Si les causes exactes de cette dissemblance sont inconnues, il est probable que la nature des pré-mélanges médicamenteux pour le bétail soit en cause. En effet, le pré-mélange est fait à partir du brassin déshydraté, qui contient aussi des cations divalents avec lesquels le principe actif peut se complexer. Cette réaction de chélation est susceptible de se produire dans le duodénum, où le pH favorise l'ionisation du système β -dicétone phénolique. Ainsi, la cinétique de libération du principe actif peut être altérée.

En raison de la faible biodisponibilité orale des tétracyclines chez le porc, les doses approuvées produisent des concentrations plasmatiques beaucoup plus basses que prévues, ce qui enlève toute pertinence aux critères d'interprétation des épreuves de sensibilité bactérienne pour les pathogènes porcins. Ces critères d'interprétation ont été développés avec des données pharmacocinétiques chez l'homme et ont été extrapolés à toutes les bactéries pathogènes vétérinaires, indépendamment de l'espèce hôte. Le

sous-dosage est un facteur prédisposant au développement d'antibiorésistance chez les bactéries lors d'antibiothérapie (Thomas et coll., 1998).

Par conséquent, il est justifié de procéder à une évaluation de la relation dose-effet de la CTC et de l'OTC administrés via l'aliment chez le porc. Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

- 1) De comparer la pharmacocinétique de la CTC et de l'OTC chez le porc lors d'administration intraveineuse et orale via l'aliment,
- 2) De comparer, à diverses doses administrées via l'aliment, leur effet prophylactique contre l'infection expérimentale.
- 3) De comparer l'effet de la CTC et de l'OTC sur le comportement alimentaire des porcs en fonction de la concentration dans l'aliment.

Ces informations sont indispensables pour jeter les bases d'un usage rationnel de ces antibiotiques en médecine porcine, en attendant que d'autres travaux réussissent à élucider les causes de leur faible biodisponibilité orale chez le porc et de développer des formes pharmaceutiques qui ne compromettent pas leur libération.

4. MÉTHODOLOGIE

4.1. CHOIX DE L'APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Diverses approches sont disponibles pour étudier la relation dose-effet antibiotique. Le problème qui fait l'objet de cette thèse est relié à la discordance entre les indicateurs de sensibilité antibiotique *in vitro* et les résultats dans des conditions de champ. Par conséquent, l'efficacité des tétracyclines contre les bactéries pathogènes visées doit être évaluée avec un protocole expérimental *in vivo*.

Deux approches *in vivo* sont possibles : l'essai clinique et l'expérience de pharmacocinétique-pharmacodynamie (PK/PD). Nous avons opté pour cette dernière, car l'effet anti-infectieux est le résultat d'une interaction complexe de l'hôte, la bactérie et le médicament, qui est sujette aussi à un nombre de facteurs de variation. L'essai clinique, où l'animal est une « boîte noire », ne permet pas de mesurer adéquatement toutes les variables qui influencent le résultat, surtout lorsqu'il s'agit de relations non-linéaires. Par conséquent, l'inférence à la population des résultats d'essais cliniques est risquée et il est difficile de déterminer avec ce type d'information la direction et l'intensité des changements à réaliser afin d'optimiser le traitement antibiotique.

L'étude PK/PD permet de faire un suivi des variables d'influence, en particulier celles qui sont liées aux processus physiologiques de disposition des médicaments et à l'impact que les facteurs de variation externes ont sur les individus. Le désavantage de ce type de protocole est sa lourdeur : un grand nombre de prélèvements d'échantillons et de mesures de l'effet sont nécessaires pour décrire avec précision la cinétique du médicament chez l'individu et la corrélation concentration-effet. En revanche, il est difficile et onéreux d'appliquer un tel protocole sur un grand nombre d'individus, et l'inférence à la population des estimés des paramètres cinétiques et de l'effet est passablement risquée. Ces préoccupations ont mené au développement des méthodes de PK/PD de population et à l'application du théorème de Bayes pour réconcilier l'approche expérimentale et l'approche observationnelle (Martin-Jimenez et Riviere,

1998). Il est possible d'identifier par méta-analyse des facteurs de variation de la corrélation PK/PD au sein d'une population : ce type de procédures statistiques permet de traiter un ensemble d'études indépendantes pour combiner leurs données et produire des estimés globaux (Dickersin et Berlin, 1992). Il est donc possible d'avoir une idée de la relation dose-concentration et de sa variance.

Cette information sur la relation dose-concentration des antibiotiques permet d'établir des critères pour choisir une bactérie à inoculer. L'effet *in vivo* des antibiotiques peut être modélisé avec l'équation de Hill (Mattie, 2000), mais pour ce faire il est crucial de bien documenter le segment de concentrations où se produit la transition de l'effet nul à l'effet maximal. On a récemment proposé d'utiliser des protocoles de titration où l'on emploie plusieurs doses sub-optimales (Mattie, 2000). Par conséquent, le protocole doit être ajusté à la sensibilité de la bactérie et à la variabilité pharmacocinétique inter-individuelle de l'antibiotique.

4.2. INFECTION EXPÉRIMENTALE À *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

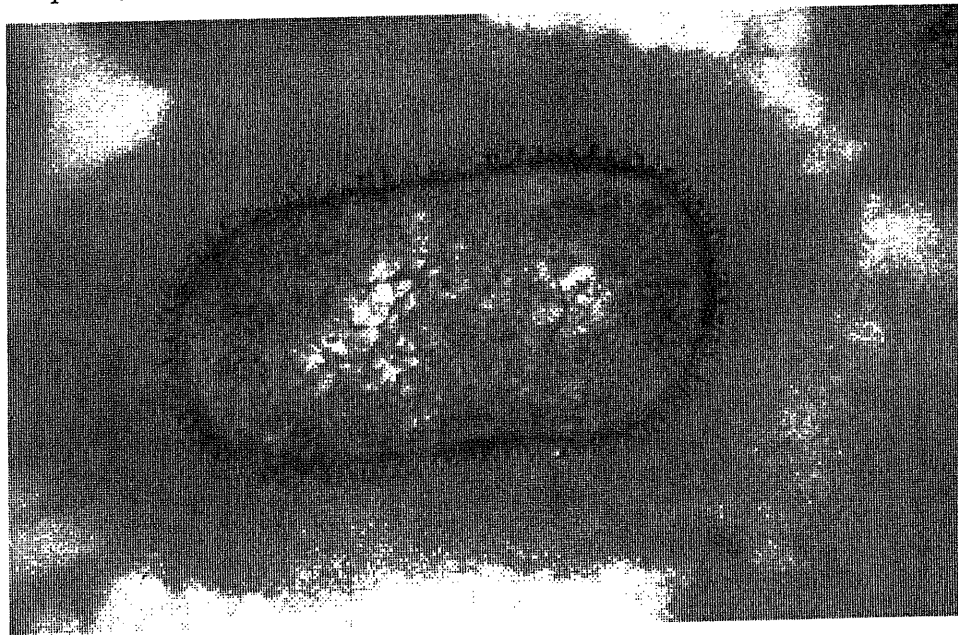
Chez le porc, le modèle d'infection expérimentale à *Actinobacillus pleuropneumoniae* est particulièrement intéressant pour l'étude de l'activité antibiotique. C'est un agent pathogène spécifique à l'espèce porcine, il produit des signes cliniques caractéristiques en peu de temps et il existe plusieurs techniques d'infection validées. La pathogénie de la pleuropneumonie à *Actinobacillus* est complexe, car cette bactérie possède plusieurs facteurs de virulence tels que la capsule (Figure 20), l'endotoxine, des sidérophores et des protéases (Haesebrouck et coll., 1997). Les facteurs de virulence les plus importants chez cette bactérie sont les protéines ApxI, ApxII et ApxIII, qui forment des pores sur la membrane cytoplasmique des cellules de l'épithélium respiratoire (Frey et coll., 1993; Kamp et coll., 1997). Cette attaque toxique déclenche chez les macrophages alvéolaires la sécrétion de cytokines comme le facteur oncogène et plusieurs interleukines, qui favorisent l'arrivée massive de neutrophiles activés. La relâche de radicaux libres et d'enzymes par les neutrophiles entraîne une aggravation

de l'inflammation. Par conséquent, cette bactérie offre plusieurs caractéristiques intéressantes pour l'étude d'efficacité clinique des tétracyclines.

Le Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) étudie *A. pleuropneumoniae* depuis bientôt 20 ans et possède une collection de plusieurs centaines d'isolats de cette bactérie. D'après les simulations pharmacocinétiques réalisées avec les estimés de méta-analyse (décrites à la Section 5.1), nous avons établi les critères suivants pour la sélection de la bactérie à utiliser durant nos expériences :

- Appartenance au sérotype 1 (les souches de ce sérotype possèdent les opérons complets des toxines ApxI et ApxII, et sont par conséquent très virulentes),
- Concentrations minimales inhibitrices de CTC et d'OTC identiques (requis pour vérifier l'équivalence thérapeutique des deux antibiotiques),

Figure 20. Cellule d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* fixée avec des anticorps anti-capsule, observée au microscope électronique de transmission.



Source : Dr Mario JACQUES, Université de Montréal.

Description : la bactérie, un bacille trapu, possède une épaisse capsule (gris moyen) qui recouvre la paroi Gram-négative (palissade grise foncée).

- Être classée sensible à l'antibiogramme et selon les critères d'interprétation des CMI établis par le N.C.C.L.S. (requis pour éviter de donner des doses toxiques d'antibiotique aux animaux et, accessoirement, pour vérifier la fiabilité des épreuves de sensibilité antibiotiques),
- Avoir été isolée dans une ferme porcine québécoise aux prises avec une épidémie de pleuropneumonie (confirmation du caractère pathogène de la souche),
- Avoir été isolée durant les années 1990 (afin d'éviter de travailler avec une souche trop sensible aux antibiotiques).

La souche FMV 92-8172, employée dans cette étude, remplit tous ces critères. Des concentrations de 2 µg/mL de CTC ou d'OTC inhibent toute croissance visible de cette bactérie sur le milieu de culture. Cette souche a été inoculée par voie intrapéritonéale à des souris pour vérifier sa viabilité et l'intégrité de ses facteurs de virulence. Des études préliminaires ont permis de déterminer la taille de l'inoculum requise pour obtenir des résultats reproductibles chez des porcs.

4.3. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Le protocole de PK/PD de cette étude a été approuvé par le comité bioéthique de l'Université de Montréal. Les soins apportés aux porcs sont conformes aux recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux (Olfert, 1993).

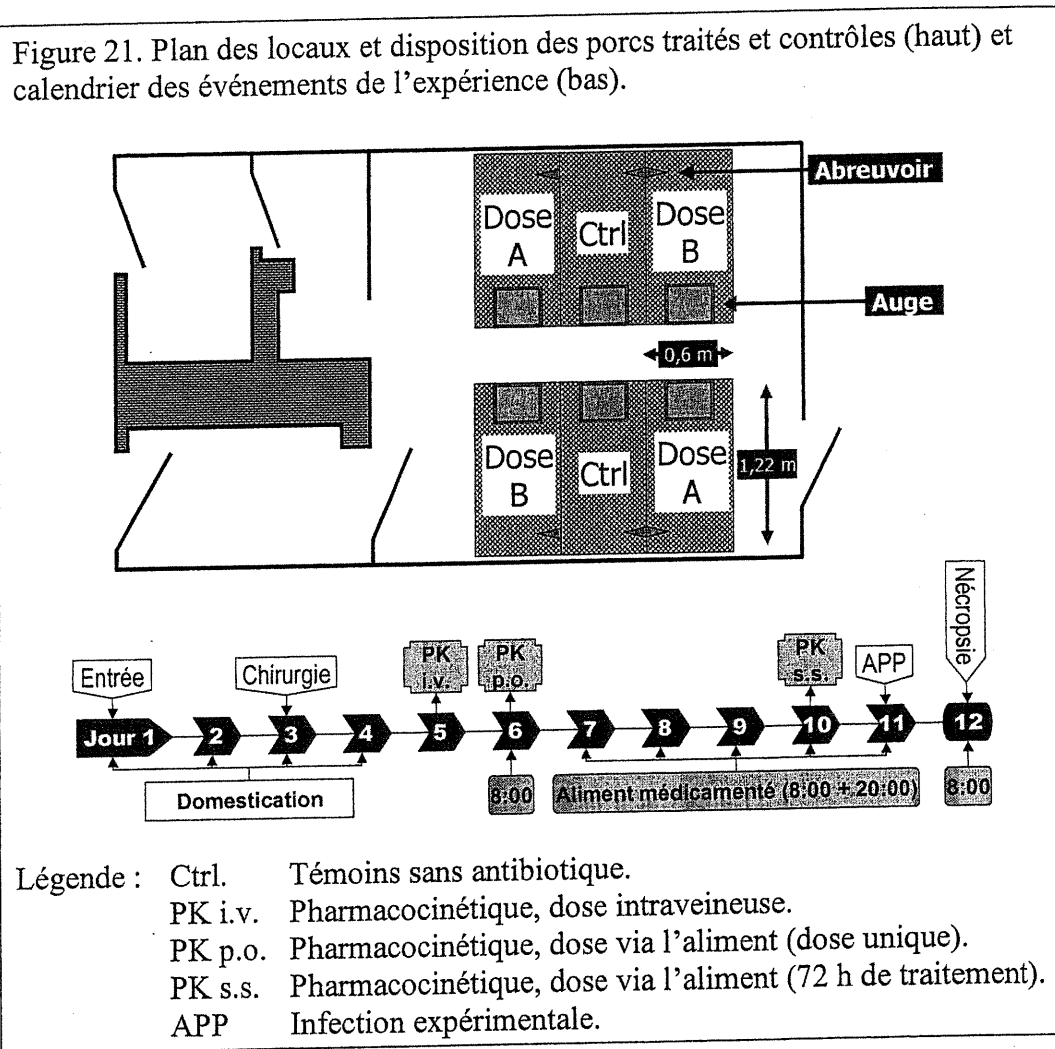
Les porcs en phase de post-sevrage (de 3 à 10 semaines d'âge) forment la population à risque pour les maladies infectieuses du système respiratoire (Christensen et coll., 1999; Stärk, 2000) et reçoivent la majorité des traitements antibiotiques en production porcine. Par conséquent, l'expérience de PK/PD a été réalisée avec des porcelets mâles castrés, âgés de 5 semaines (d'environ 9 kg) et sevrés à 3 semaines d'âge.

L'origine des animaux doit faire l'objet de considérations particulières. Les animaux d'expériences à employer dans cette étude doivent être exempts de tous les pathogènes respiratoires porcins (surtout les virus) pouvant être source de biais dans l'évaluation de l'effet antibactérien des tétracyclines. En conséquence, cette étude a été réalisée avec des lots de 12 porcelets provenant d'une ferme apparemment exempte depuis plus de deux ans, d'après les résultats d'examens cliniques, sérologiques et de nécropsie périodiques, des agents pathogènes suivants :

- *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sérotypes 1, 2, 3, 5, 7 (l'agent de la pleuropneumonie porcine),
- *Mycoplasma hyopneumoniae* (l'agent de la pneumonie enzootique porcine),
- *Pasteurella multocida* produisant les toxines A et D (les agents de la rhinite atrophique progressive),
- Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin,
- Virus de la gastro-entérite transmissible,
- *Brachyspira hyodysenteriae* (l'agent de la dysenterie porcine),
- *Sarcoptes scabiei* (l'agent de la gale sarcoptique du porc).

Les 12 porcs de chaque lot ont été répartis également dans trois groupes : CTC, OTC et témoin sans antibiotique. Suite à l'examen clinique, les animaux ont été distribués aléatoirement dans deux locaux désinfectés des animaleries de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, où ils ont été placés aléatoirement dans des cages individuelles de 0,74 m² (Figure 21, partie supérieure). Les parois des cages permettaient aux porcs de garder entre eux un contact visuel et auditif, mais limitait les contacts physiques. La température ambiante des locaux était réglée à 25°C, le débit de ventilation était conforme aux normes et de l'éclairage artificiel était présent entre 7:00 et 22:00. Les cages étaient nettoyées avant le repas du matin et après le repas du soir.

Le calendrier des événements est schématisé dans la partie inférieure de la Figure 21. Le jour d'arrivée, les porcs étaient laissés sous surveillance pour qu'ils s'habituent à leur nouvel environnement. Les activités de domestication avaient lieu entre le jour 2 et le jour 4 de séjour afin de permettre aux techniciens d'entrer dans les cages et manipuler les porcs sans leur causer de stress. Durant cette période, les porcs étaient aussi dressés à entrer dans une cage de transport sans craintes dans le but de les peser quotidiennement. Au jour 3, des cathéters jugulaires ont été placés chez tous les porcs sous anesthésie au propofol.



4.3.1. Alimentation

Un aliment standard pour porcelets en post-sevrage^c, exempt d'antibiotiques, a été acheté le jour d'arrivée de chaque lot d'animaux. Les ingrédients de l'aliment sont du maïs, du soja et d'un supplément de vitamines et minéraux. En cours d'expériences, le fournisseur d'aliment a modifié la recette du supplément vitaminique et minéral, ce qui, tel qu'indiqué à l'Annexe 4, a modifié l'apport de divers éléments nutritifs de la diète. Les 5 premiers lots d'animaux ont reçu la diète A tandis que les 4 derniers ont reçu la diète B.

Deux pré-mélanges antibiotiques commerciaux^{d,e} ont été utilisés pour médicamenter l'aliment à des concentrations équivalentes à 550, 1100, 1650 ou 2200 mg/kg de chlorhydrate de CTC et de chlorhydrate d'OTC. Deux taux d'incorporation d'antibiotiques ont été employés pour chaque lot de porcs, suivant une séquence aléatoire (Tableau 2).

Tableau 2. Randomisation des doses de chlortétracycline et d'oxytétracycline dans les aliments à distribuer aux porcs des différents lots.

Antibiotique	Dose (mg/kg)*	Lot								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
CTC	550		X	X			X		X	X
	1100		X		X	X		X		
	1650	X		X		X			X	X
	2200	X			X		X	X		
OTC	550		X	X			X		X	X
	1100		X		X	X		X		X
	1650	X		X		X			X	X
	2200	X			X		X	X		X

* Équivalents en chlorhydrate d'antibiotique.

^c VITA Distribution 1988 Inc. St-Valérien, Qc, Canada.

^d Aureomycin® 100 G. Lot # D606 E. Hoffmann – La Roche Ltd. Cambridge, On, Canada.

^e Terramycin* 100. Lot # 602 50097. Pfizer Canada Inc. Animal Health Group. London, On, Canada.

Durant leur séjour dans les locaux d'expérimentation, les porcs ont reçu, à 8:00, 14:00 et 20:00, des quantités d'aliment correspondant respectivement à 2%, 1% et 2% du poids de l'individu. L'eau de boisson était disponible en tout temps.

Tous les porcs ont reçu de l'aliment non-médicamenté durant la période d'acclimatation (jours 1-4) et au jour 5. Les porcs témoins ont reçu de l'aliment non-médicamenté durant toute la durée des expériences. Les aliments médicamentés ont été distribués aux porcs des groupes CTC et OTC au jour 6, uniquement à 8:00, et entre les jours 7 et 12, lors des repas de 8:00 et 20:00 (Figure 21 – partie inférieure). Tous les autres repas étaient non-médicamentés. La durée des repas de 8:00 et 20:00 a été chronométrée quotidiennement pour chaque individu, ainsi que toute interruption de ceux-ci pour des motifs autres que l'abreuvement.

4.3.2. Étude pharmacocinétique

Un seul antibiotique a été employé par chambre, mais en alternance d'un lot à l'autre (avec le lot 1, les porcs traités de la chambre A ont reçu de l'OTC tandis que ceux de la chambre B ont reçu de la CTC, et vice-versa avec le lot 2). Les traitements antibiotiques suivants ont été administrés :

1. Au jour 5, du chlorhydrate de CTC^f ou du chlorhydrate de d'OTC^g par voie intraveineuse (environ 5 mg/kg de produit),
2. Au jour 6, à 8:00, un repas médicamenté correspondant à 2% du poids vif (dose équivalente à 11, 22, 33 ou 44 mg/kg de chlorhydrate d'antibiotique – voir Tableau 2),
3. Du jour 7 au jour 12, à 8:00 et à 20:00, des repas médicamentés correspondant à 2% du poids vif (dose quotidienne équivalente à 22, 44, 66 ou 88 mg/kg de chlorhydrate d'antibiotique),

^f Chlortetracycline hydrochloride. Lot # 27H7703, 79% purity. Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

^g Oxytetracycline hydrochloride. Lot # 96H0571, 100% purity. Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Des échantillons de sang ont été prélevés à divers temps (Tableau 3) suite à l'administration des doses uniques par voie intraveineuse et via l'aliment, ainsi que celle du matin du 4^{ème} jour du schéma posologique réitéré via l'aliment. Les échantillons de sang hépariné ont été centrifugés à 7°C et 1500 G durant 15 minutes immédiatement après leur prélèvement et le plasma recueilli a été conservé à -70°C dans des fioles de verre.

Tableau 3. Temps de prélèvements des échantillons sanguins, par rapport au début d'administration.

Administration	Temps de prélèvement (h)								
	0	0,5	1,0	1,5	2	4,5	6	12	24
I.V. (jour 5)	0	0,5	1,0	1,5	2	4,5	6	12	24
P.O. ₁ (jour 6)	0,5	1	1,5	2	3	6	9	12	24
P.O. ₂ (jour 10)	0	1	2	3	4	6	12		

4.3.3. Étude du comportement alimentaire

Les données de comportements alimentaires (quantité d'aliment servie, durée du repas, nombre d'interruptions, durée des interruptions et quantité d'aliment non-ingérée volontairement à la fin du repas) ont été enregistrés lors des repas de 8:00 et 20:00 chez tous les porcs des trois groupes. Seules les données correspondant aux jours 7, 8, 9 et 11 ont fait l'objet d'analyses (Section 5.3), car la prise alimentaire des porcs était interrompue par la prise d'échantillons de sang aux autres jours de traitement.

4.3.4. Étude pharmacodynamique

Dans chaque chambre, les porcs témoins ont été placés systématiquement entre une paire de porcs traités pour égaliser les chances de contact avec chacun d'eux suite à l'infection expérimentale (Figure 21, partie supérieure). Un échantillon de sang a été prélevé avant l'inoculation de la bactérie (à 15:00), afin d'y déterminer la concentration plasmatique d'antibiotique. Par la suite, tous les porcs ont subi un examen clinique à 20:00 et à 8:00 (5 h et 17 h post-

inoculation), où l'importance des signes cliniques a été notée selon la grille présentée dans le Tableau 4. La somme des points de chaque examen permet d'établir une cote de gravité de la maladie chez l'individu. Avec ce système, la plus haute cote possible pouvant être attribuée à un porc qui survit à l'infection est 22. Par conséquent, une cote de 23 est attribuée aux porcs qui meurent des suites de la maladie.

Conformément aux directives du comité de bioéthique de l'Université, les porcs souffrant d'insuffisance respiratoire aiguë ont reçu l'euthanasie aux barbituriques pour abrégier leurs souffrances. Vingt deux heures après l'inoculation, tous les porcs ont fait l'objet d'un examen anatomo-pathologique dans le but de déterminer l'étendue des lésions de pleuropneumonie avec une méthode standard (Straw et coll., 1986). Avant de recevoir l'euthanasie, un échantillon de sang est prélevé chez les porcs ayant survécu à l'infection afin de déterminer la concentration plasmatique d'antibiotique. Lors de la nécropsie, un échantillon de poumon lésé, de poumon non-lésé, de muscle diaphragme, de foie et de rein ont été prélevés afin d'y déterminer les concentrations d'antibiotique. Tous les échantillons ont été conservés à -70°C.

Tableau 4. Grille de pointage de la gravité des signes cliniques de pleuropneumonie.

Signe clinique	Gravité*			
	Absent	Présent/modéré	Grave	Très grave
Dyspnée	0	1	2	3
Apathie	0	1	2	-
Prostration	0	1	2	-
Inappétence	0	0,75	1,5	-
Toux	0	1	-	-
Vomissement	0	1	-	-
Respiration superficielle	0	0,5	-	-

* NB : le pointage accordé aux divers signes cliniques est fonction de leur importance dans le cadre de la maladie.

4.4. ANALYSE PHARMACOCINÉTIQUE

Avant de procéder à l'analyse pharmacocinétique, les doses de chlorhydrate de CTC et de chlorhydrate d'OTC ont été converties en les multipliant respectivement par 0,929245099 et par 0,926625075 pour obtenir leurs équivalents sous forme de base.

Les séries de concentrations plasmatiques d'antibiotique prélevées chez les porcs ont fait l'objet d'une analyse pharmacocinétique par l'approche des moments statistiques (Yamaoka et coll., 1978). Cette approche permet de décrire les propriétés générales du système pharmacocinétique étudié sans qu'il soit nécessaire d'élucider sa structure et son fonctionnement (Gillespie, 1991). De plus, elle produit des estimés des paramètres pharmacocinétiques robustes, qui ont un sens physiologique, pourvu que les postulats suivants soient respectés (Dunne, 1993) :

1. L'élimination du médicament est proportionnelle à sa concentration et a lieu au site de mesure,
2. Les propriétés pharmacocinétiques du médicament sont indépendantes de la dose et du temps,
3. Toutes les molécules qui pénètrent dans le système pharmacocinétique doivent en sortir éventuellement.

Des résultats d'études indiquent que les cinétiques de la CTC et de l'OTC sont conformes aux conditions énumérées ci-dessus (Aronson, 1980; Kilroy et coll., 1990; Pijpers et coll., 1991), ce qui rend possible ce type d'analyse. Les données de cette étude ont été analysées avec le logiciel WinNonlin^h.

Les moments zéro et un de la courbe des concentrations plasmatiques du médicament en fonction du temps sont calculées avec les formules suivantes :

^h WinNonlin Professional, 1.5 version. Pharsight Corporation. Cary, NC, U.S.A.

Équation 1. Moment statistique zéro.

$$AUC = \int_{t=0}^{t=\infty} C_p dt$$

Équation 2. Premier moment statistique.

$$AUMC = \int_{t=0}^{t=\infty} t \cdot C_p dt$$

Où AUC est la surface sous la courbe des concentrations plasmatiques – C_p – en fonction du temps – t – et $AUMC$ est la surface sous la courbe du produit $t \cdot C_p$ en fonction de t . En raison de sa facilité d'utilisation et de sa robustesse (Purves, 1992), l' AUC et l' $AUMC$ ont été calculées avec la méthode des trapézoïdes linéaires/logarithmiques (Tableau 5) :

Tableau 5. Formules de calcul de la surface des trapèzes linéaires et logarithmiques d' AUC et d' $AUMC$ (Note : $\delta t = t_2 - t_1$).

Trapèze	$AUC_{t_1}^{t_2}$	$AUMC_{t_1}^{t_2}$
Linéaire	$\delta t \cdot \frac{C_{p1} + C_{p2}}{2}$	$\delta t \cdot \frac{t_1 \cdot C_{p1} + t_2 \cdot C_{p2}}{2}$
Log	$\delta t \cdot \frac{C_{p2} - C_{p1}}{\ln\left(\frac{C_{p2}}{C_{p1}}\right)}$	$\delta t \cdot \frac{t_2 \cdot C_{p2} - t_1 \cdot C_{p1}}{\ln\left(\frac{C_{p2}}{C_{p1}}\right)} - \delta t^2 \cdot \frac{C_{p2} - C_{p1}}{\ln\left(\frac{C_{p2}}{C_{p1}}\right)}$

Note : la méthode des trapèzes linéaires/logarithmiques consiste à calculer les surfaces des trapèzes pour les temps inférieurs au moment où la concentration plasmatique maximale se produit (t_{max}) avec les formules linéaires, puis avec les formules logarithmiques pour les temps supérieurs à t_{max} .

Les derniers trapézoïdes d' AUC et d' $AUMC$ (extrapolation à l'infini) sont calculés respectivement à l'aide de λz , la pente terminale du profil de C_p en fonction du temps :

Équation 3. Surface du dernier trapézoïde d'AUC.

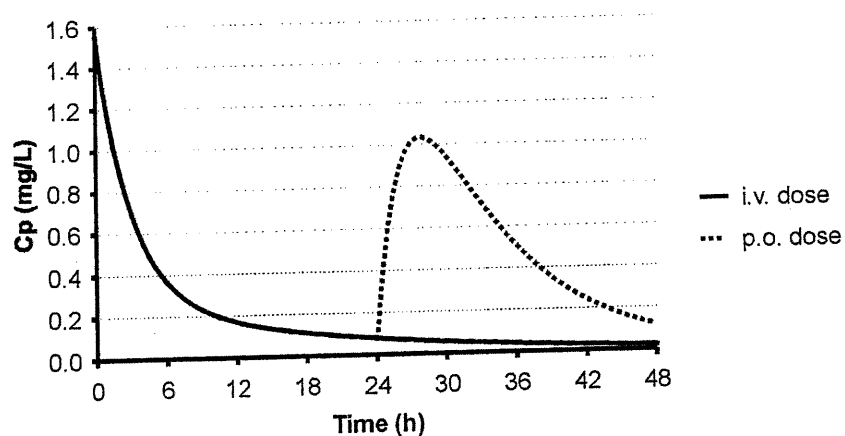
$$AUC_t^\infty = \frac{Cp_t}{\lambda_z}$$

Équation 4. Surface du dernier trapézoïde d'AUMC.

$$AUMC_t^\infty = \frac{t_t \cdot Cp_t}{\lambda_z} + \frac{Cp_t}{\lambda_z^2}$$

Il est à noter que l'administration de la dose orale unique des antibiotiques à l'étude est trop rapprochée de la dose administrée par voie intraveineuse pour permettre l'élimination complète de cette dernière (Figure 22). Par conséquent, il est nécessaire de déduire la portion terminale d'AUC de la dose intraveineuse (Équation 3) pour obtenir des estimés non-biaisés de biodisponibilité orale, de clairance et de volume de distribution. Ce problème n'est pas rencontré lorsque le médicament est administré à des intervalles constants et à une dose constante par rapport au poids du sujet. Dans ce cas, l'AUC et l'AUMC déterminés durant l'intervalle thérapeutique est égal à l'AUC et l'AUMC du temps zéro à l'infini lorsqu'une seule dose est administrée.

Figure 22. Superposition des profils cinétiques d'un médicament administré par les voies extravasculaire (courbe pointillée) et intravasculaire (ligne continue) à 24 h d'intervalle.



4.4.1. Paramètres pharmacocinétiques

4.4.1.1. *Clairance*

La clairance – CL – est la constante de proportionnalité liant l'élimination du médicament (sous toutes ses formes et par toutes les voies) à sa concentration plasmatique (Équation 5). Il correspond au volume de liquide (plasma ou sang) qui est complètement épuré par unité de temps. L'estimé obtenu lors d'administration extra-vasculaire est affecté par la biodisponibilité du médicament (Section 4.4.1.3).

Équation 5. Formule de calcul de la clairance.

$$CL = \frac{D}{AUC}$$

4.4.1.2. *Volume de distribution apparent*

Le volume de distribution apparent V est la constante de proportionnalité reliant la concentration plasmatique et la dose administrée. L'Équation 6 présente une formule générale pour l'estimation du volume de distribution qui est valide pour tous les types de systèmes cinétiques (estimé de V par la méthode de la surface sous la courbe – $V_{(area)}$ – ou de la pente terminale – V_z). L'Équation 7 présente une formule spécifique à l'administration intravasculaire (volume à l'état d'équilibre – V_{ss}). Il est à noter que V_{ss} n'est pas affecté par les biais d'estimation de la pente terminale d'élimination. À l'instar de la clairance, l'estime de V obtenu lors d'administration par voie extra-vasculaire est affecté par la biodisponibilité du médicament.

Équation 6. Formules de calcul du volume de distribution par la méthode de la surface sous la courbe.

$$V_z = \frac{D}{AUC \cdot \lambda_z}$$

Équation 7. Formule de calcul du volume de distribution à l'état d'équilibre.

$$V_{SS} = CL \cdot MRT = \frac{D \cdot AUMC}{AUC^2}$$

4.4.1.3. Biodisponibilité

La biodisponibilité F est la fraction de la dose administrée par une voie extra-vasculaire qui atteint le site de mesure. Le restant de la dose peut demeurer au site d'administration sous une forme qui l'empêche d'atteindre le site de mesure ou avoir été éliminé avant d'atteindre ce dernier. Le calcul de ce paramètre requiert l'estimation de l'AUC du médicament lorsque administré par une voie de référence : dans le cas de la voie intravasculaire, le résultat est nommé biodisponibilité absolue (Équation 8), tandis que le résultat est nommé biodisponibilité relative – F_{rel} – quand la voie de référence est extra-vasculaire,

Équation 8. Formule de calcul de la biodisponibilité orale absolue.

$$F = \frac{AUC_{p.o.} / D_{p.o.}}{AUC_{i.v.} / D_{i.v.}}$$

4.4.1.4. Temps de séjour moyen

Le temps de séjour moyen MRT est la moyenne du temps total que les molécules de médicament séjournent dans le système étudié (espace systémique) après y avoir pénétré par une voie donnée (Équation 9).

Équation 9. Formule de calcul du temps moyen de séjour lors d'administration par voie intraveineuse.

$$MRT = \frac{AUMC_{i.v.}}{AUC_{i.v.}}$$

4.5. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS¹, en employant le seuil de signification statistique (α) de 0,05.

Les données pharmacocinétiques, physiologiques, cliniques et éthologiques de chaque individu ont fait l'objet d'analyses exploratoires avant de procéder au calcul des statistiques univariées et à l'analyse de corrélation. Certaines variables telles que la clairance et le volume de distribution ont été corrigées pour le poids de l'animal. Tel que suggéré par Lacey et coll. (1997), la fonction log-normale (Mood et coll., 1974) a été appliquée (Équation 10) pour décrire la distribution des paramètres cinétiques montrant une asymétrie vers la gauche.

Équation 10. Fonction de densité de probabilité de la distribution log-normale.

$$f(x; \mu; \sigma^2) = \frac{1}{x \cdot \sqrt{2\pi\sigma}} \cdot e^{-\frac{1}{2\sigma^2} (\ln x - \mu)^2}$$

Où $\mu = E[\ln(X)]$ qui peut prendre des valeurs entre $-\infty$ et ∞ , et $\sigma^2 = Var[\ln(X)]$ qui est une valeur positive. La moyenne et la variance d'une variable X à la distribution log-normale ont été calculées avec les Équations 11 et 12, respectivement :

Équation 11. Moyenne d'une distribution log-normale.

$$E[X] = e^{\mu + \frac{1}{2}\sigma^2}$$

Équation 12. Variance d'une distribution log-normale.

$$Var[X] = e^{2\mu + 2\sigma^2} - e^{2\mu + \sigma^2}$$

¹ SAS system for Windows, 6.12 release. Cary, NC, U.S.A.

Les paramètres cinétiques de la CTC et de l'OTC (bruts ou, lorsque indiqué, après transformation logarithmique) ont été comparés statistiquement avec le test de Student et des modèles de régression linéaire et logistique. Les paramètres du comportement alimentaire et de croissance des porcs ont été analysés avec un modèle linéaire à effets mixtes (Littell et coll., 1998). Les paramètres de l'infection expérimentale ont fait l'objet d'analyses non-paramétriques (test de Chi-deux et de Kruskal-Wallis) et de régression non-linéaire.

5. PUBLICATIONS

- Jérôme R.E. del Castillo, Elsener J. et Martineau G. P. (1998). Pharmacokinetic modelling of in- feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. *Swine Health and Production*, 6(5): 189-202.
- Jérôme R.E. del Castillo, Martineau G. P. et Besner J.-G. (2000). Comparative pharmacokinetics and antimicrobial efficacy of feed-administered tetracyclines in weaned pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (soumis).
- Jérôme R.E. del Castillo, Beauchamp G., Martineau G. P. et Besner J.-G. (2000). Short-term effects of in-feed supplementation of tetracyclines for disease control on feed intake pattern and growth in weaned pigs. *Animal Science* (soumis).

5.1. PHARMACOKINETIC MODELING OF IN-FEED TETRACYCLINES IN PIGS USING A META-ANALYTIC COMPARTMENTAL APPROACH [*SWINE HEALTH AND PRODUCTION*, 6(5): 189-202 (1998)].

Jérôme R.E. del Castillo (1), J. Elsener (2), Guy P. Martineau (1).

(1) Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire. CP 5000
St-Hyacinthe Quebec, J2S-7C6 Canada;

(2) Ayerst Laboratories Inc.

5.1.1. Summary

OBJECTIVE: To assess effect of pharmacokinetic differences between chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC), the effect of day/night variations in ad libitum intake of medicated feeds on variation in plasma and tissue concentrations of both drugs, and the influence on the overall efficacy of metaphylactic strategies for bacterial respiratory disease in growing pigs.

METHODS: A multidosage pharmacokinetic model was created for feed-administered CTC and OTC in pigs. Parameters obtained by meta-analysis of published pharmacokinetic articles and a computerized iteration procedure were used to find minimum CTC or OTC in-feed dosage to maintain a selected plasma drug concentration in pigs incorporating feeding behavior variables.

RESULTS: The model accounted for daily feed consumption, ad libitum feeding behavior, time-kill activity of tetracyclines, and the span of their postantibiotic effect. The model successfully passed an external validation procedure. The bioavailability ($P=.0001$), apparent volume of distribution ($P=.001$), and elimination constant rate ($P=.03$) differed between CTC and OTC. When identical in-feed dosages are consumed, plasma concentrations of

CTC were twice the concentrations of OTC. Ad libitum feeding behavior, which becomes increasingly diurnal as pigs grow from weaning to finishing, induced major daily variations in plasma concentrations of both drugs. We devised two equations that easily calculate any specific result generated by the computerized iteration procedure for CTC and OTC.

IMPLICATIONS: The use of either equation will allow swine practitioners to create more precise CTC or OTC metaphylactic strategies from weaning to finishing. Matching daily antibiotic dosages to what is needed can improve the efficacy of metaphylaxis.

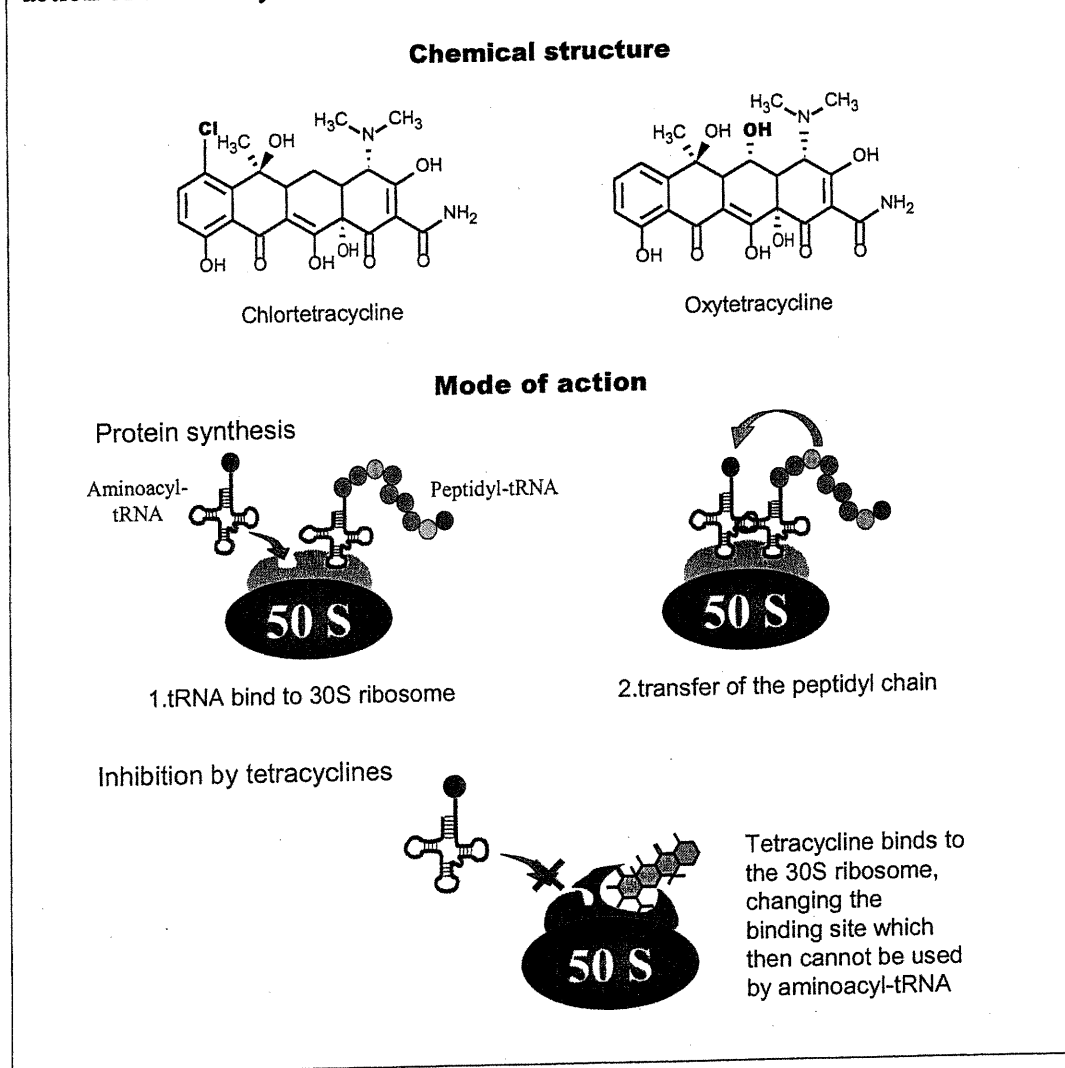
5.1.2. Keywords

Pharmacokinetics, antibiotics, feeding behavior, meta-analysis, chlortetracycline, oxytetracycline, in-feed.

5.1.3. Introduction

Controlling respiratory diseases is a major health concern for intensively raised weaner, grower, and finisher pigs. Often, the only realistic short-term option to prevent outbreaks of respiratory disease is to control infection pressure in colonized, subclinically infected animals (i.e., **metaphylaxis** — see glossary beginning page 200 for other terms). Typically, metaphylaxis is accomplished through the large-scale use of antibiotics, which are delivered in feed and/or drinking water to minimize animal stress and labor and drug costs. However, while cost is an important factor in choosing a medication and administration route, oral **bioavailability** must also be considered. Tetracyclines, the most frequently used drugs for treating respiratory disease, inhibit bacterial protein synthesis (Figure 1) (Pijpers *et al.*, 1991a). The number of bacterial cells that die when exposed to greater than the minimum inhibitory concentrations (MIC) of tetracyclines is related to the duration of the exposure, not to drug concentration (e.g., time-dependent **kinetics of bactericidal activity**)

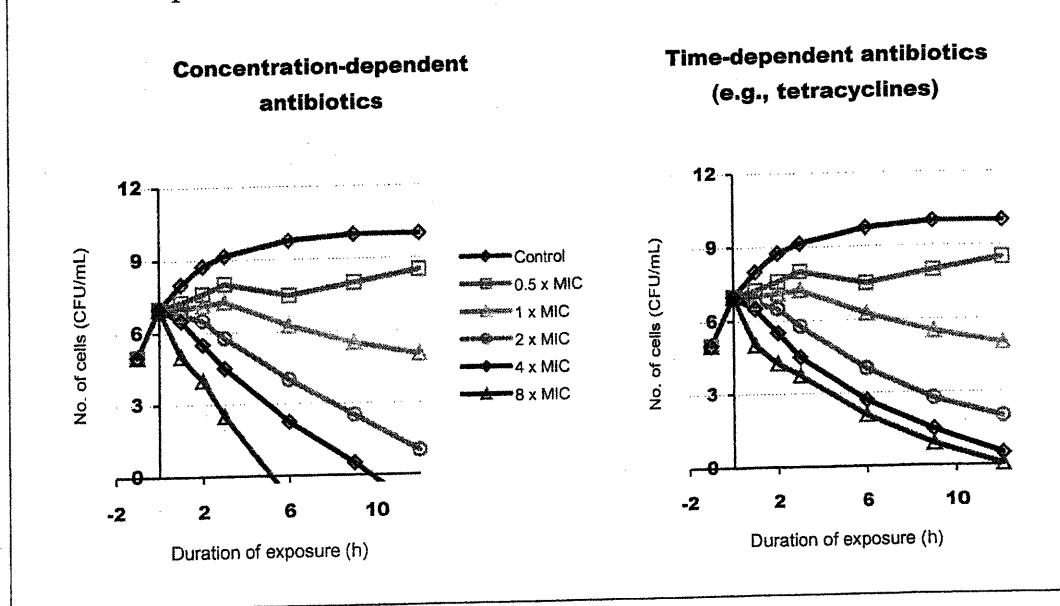
Figure 1. Chemical structure of chlortetracycline and oxytetracycline; mode of action of the tetracyclines.



(Figure 2) (Keck and Borne, 1995). With non-intestinal diseases, the antibiotic must be absorbed in the intestinal lumen before it can reach the targeted tissue. Thus, bioavailability is a factor in drug waste. The plasma concentration of a drug is influenced by three factors:

- bioavailability,
- dosage, and
- pig feeding behavior.

Figure 2. Kinetics of bactericidal activity for concentration-dependent antibiotics and time-dependent antibiotics.



If any of these three factors is not addressed, then drug concentrations in plasma and tissue, when delivered in feed or water, are unlikely to meet the MIC for the targeted pathogens (Wages, 1993).

A number of feed factors and characteristic pig behaviors affect the intake of medicated feeds. For example, when drugs are administered in moist or liquid feeds (Sutter and Wanner, 1990), top dressing, or drinking water, the drug residence in the stomach, bioavailability, and/or **absorption** rate of drugs can be different than when they are administered in dry feed (Gibaldi, 1991a). Supplemental citric acid in feeds medicated with tetracyclines is known to interfere with unavailable calcium-drug complexes that form in the intestines. The bioavailability of orally delivered tetracyclines, especially chlortetracycline (CTC), is thus enhanced by citric acid (Wanner *et al.*, 1991).

Feed intake (National Research Council, 1988) and ad libitum feeding behavior are also both influenced by pig age (Labroue *et al.*, 1995). Feed consumption in pigs is related to metabolic weight ($W^{0.75}$) (Henry *et al.*, 1984) rather than crude weight (W); thus, ad libitum ingestion of a given medicated feed will

result in higher drug dosages and higher plasma concentrations in 10-kg (22-lb) pigs than in 40-kg (88-lb) pigs. Moreover, Labroue, et al. (Labroue *et al.*, 1995), have observed that as pigs get older, they consume an increasing percentage of their overall feed intake during the day (Table 1). This suggests that feeding behavior might be less affected by day/night cycles in 10-kg (22-lb) piglets than in 40-kg (88-lb) pigs. For a given in-feed tetracycline dosage, the daily variations in plasma concentrations of the drug are positively associated with the age of the pigs.

Table 1. Proportion of diurnal daily meals in pigs of distinct growth stages and fed ad libitum (Labroue *et al.*, 1995).

Weight (kg)	Diurnal daily meals
40	67.5%
60	74.0%
90	83.3%

Feeding behavior of pigs and the amount of feed ingested per meal are also affected by the size of groups placed within a pen (Nielsen and Lawrence, 1993), even when pen density is equal. Pigs housed in groups of ≤ 15 pigs per pen eat approximately twice as often as those penned in groups of ≥ 20 (Nielsen and Lawrence, 1993). To maintain the same daily feed consumption, then, pigs housed in groups of ≥ 20 must eat twice as much at each meal. These feed characteristics and feeding behaviors may have an effect on the drug concentrations in plasma and tissues and on the degree of protection against disease. No pharmacokinetic study has taken into account actual pig feeding behavior.

Pharmacokinetics is what the body does to the drug and **pharmacodynamics** is what the drug does to the body (both of the animal and of the bacterium) (Holford and Sheiner, 1982). It is important to consider both pharmacokinetics and pharmacodynamics when designing metaphylactic strategies. Although both CTC and oxytetracycline (OTC) have been the subject of pharmacokinetic

studies in pigs, the pigs were given a single oral treatment (Kilroy *et al.*, 1990; Sutter and Wanner, 1990; Wanner *et al.*, 1990; Wanner *et al.*, 1991; Pijpers *et al.*, 1991a), or the drug plasma concentrations were modeled over time in a population of pigs fed according to a fixed-interval schedule (Sutter and Wanner, 1990). Little is known, therefore, about the pharmacokinetics of tetracyclines when medicated feeds are consumed ad libitum. It is risky to generalize from any one of these studies to a population of pigs that have ad libitum access to feed; however, by using meta-analysis we can synthesize the findings of many studies to obtain an average that can allow us to generalize more reliably to a wide variety of herd situations.

Meta-analysis is a process whereby a collection of research results from individual studies are statistically analyzed in a way that allows one to integrate their findings (Dickersin and Berlin, 1992). Meta-analysis is currently used in epidemiological studies to obtain stronger, more reliable information that can be applied to a wider range of situations than can the findings of individual studies. It produces a set of parameters that represents average, not individual, findings across studies. This type of analysis can determine associations between disease and risk factors, risk estimates, or other parameter estimates when the original studies do not have adequate statistical power to report such findings.

The objectives of the present investigation were to:

- perform meta-analysis on a number of pharmacokinetic studies to allow us to obtain reliable pharmacokinetic parameters for CTC and OTC, and then use these parameters in a pharmacokinetic model that describes the ad libitum feeding behavior of growing pigs;
- compare the meta-analytically derived pharmacokinetic parameters of feed-administered CTC and OTC in pigs;

- assess the validity of our meta-analytic model by comparing its predictions to actual observations of the plasma concentrations of CTC and OTC that appear in the literature; and
- assess the influence of feeding behaviors (diurnal patterns of feeding behavior and the number of pigs per pen) on daily variations of CTC and OTC concentrations in plasma.

5.1.4. Materials and Methods

5.1.4.1. *Meta-analysis and statistical analysis*

Meta-analysis was performed with all available studies treating the pharmacokinetics of in-feed tetracyclines in pigs to obtain reliable parameters that could be further used in a multiple-dosage pharmacokinetic model, using the Mantel-Haenszel method (Dickersin and Berlin, 1992). Briefly, Mantel-Haenszel meta-analysis consists of a series of steps:

- (1) The materials and methods of the set of independent research studies are critically evaluated. Evaluation criteria can be both objective and subjective. Possible confounding factors and effect modifiers are identified and the studies are ranked according to quality based on those evaluation criteria.
- (2) The relevant results (e.g., means and variances; risk ratios; P values) are extracted from each of the studies.
- (3) Exploratory data analysis to assess the link between the results and any confounding factors is performed. If the results correlate with a confounding factor (e.g., age of animals, calcium content in feed (Henry *et al.*, 1984; National Research Council, 1988), type of analysis used), a

weight is given to this variable, so that its confounding effects will be accounted for in the calculations.

- (4) An estimate of the results of all studies, as well as a global variance, is calculated. In this study, we calculated an inverse-variance weighted average (Mantel-Haenszel estimate) and a global variance of the pharmacokinetic parameters.

Compartmental pharmacokinetic analysis (Gibaldi, 1991b) was performed on all but one (Kilroy *et al.*, 1990) of the articles included in the meta-analysis; the statistical moment kinetic approach (Yamaoka *et al.*, 1978) was used in the later study. A one-compartment kinetic analysis (Gibaldi, 1991b) was thus performed with the individual sets of plasma CTC concentrations reported in this latter article (Kilroy *et al.*, 1990). Experiments (Wanner *et al.*, 1990; Wanner *et al.*, 1991) using feeds supplemented with 1.4% of calcium were included in the meta-analysis, because somewhat lower concentrations of calcium are recommended in Europe for weaned pigs (Henry *et al.*, 1984), but their reported bioavailabilities were weighted at a 50% level.

To be included in our meta-analysis, a study had to meet several criteria:

- antibiotics had to have been administered to clinically healthy animals. Diseased pigs have been observed to have reduced feed and water intake compared to clinically healthy pigs (Pijpers *et al.*, 1991a). In addition, the pharmacokinetic profile is completely different in diseased pigs (Kilroy *et al.*, 1990);
- The OTC and CTC had to have been delivered in medicated dry feed (as opposed to wet or moist feed);
- The feed had to meet both American and European calcium requirements; (Henry *et al.*, 1984; National Research Council, 1988) and

- The feed had to be free of supplemental citric acid.

Studies excluded from meta-analysis were reports of experiments performed on disease-challenged animals (Pijpers *et al.*, 1991a), those where moist or liquid medicated-feeds were used (Sutter and Wanner, 1990), those with citric acid-supplemented feed (Wanner *et al.*, 1990; Wanner *et al.*, 1991), and those that did not investigate the individual evolution of plasma concentrations of the drug over time (Asanuma *et al.*, 1984; Andrews *et al.*, 1988).

Five studies, two reporting on OTC (Wanner *et al.*, 1990; Pijpers *et al.*, 1991a) and three reporting on CTC, (Kilroy *et al.*, 1990; Sutter and Wanner, 1990; Wanner *et al.*, 1991), met all the criteria and were included in the meta-analysis. To derive mean parameter values to use in calculations that describe the fluctuations in drug concentrations over time, two separate Mantel-Haenszel meta-analyses were then performed on the sets of studies (Tables 2--3). These pharmacokinetic parameters were compared statistically using the Mann-Whitney *U* tests (Daniel, 1990) at a .05 significance level.

5.1.4.2. *The multiple-dosage pharmacokinetic model*

The fluctuations of drug concentrations in plasma over time for one single dosage can be calculated with the following nonlinear equation (Rowland and Tozer, 1994):

$$C_p(t) = \frac{F \cdot Dose}{V} \cdot \frac{k_a}{(k_a - k)} \cdot \left(e^{-k \cdot t} - e^{-k_a \cdot t} \right) \quad (\text{Equation 1})$$

Where:

- $C_p(t)$ is drug plasma concentration at time t ,
- F is the absolute bioavailability,

- Dose is the administered dosage of drug,
- k_a is the absorption rate constant,
- k is the **elimination rate constant**,
- e is the natural base of logarithms, i.e., 2.71828..., and
- V is the apparent **distribution volume**.

To calculate V , the equation is:

$$V_{(area)} = \frac{F \cdot Dose}{AUC \cdot k} \quad (\text{Equation 2})$$

Where AUC is the area under the curve of plasma drug concentration over time measured with the linear trapezoidal rule (Rowland and Tozer, 1994).

Table 2. Estimates (mean±SD) of the pharmacokinetic parameters of feed-administered CTC in pigs reported in the literature and average values obtained with a Mantel-Haenszel meta-analysis.

Parameter	Units	Reference				Meta-analysis
		Sutter <i>et al.</i> 1990	Wanner <i>et al.</i> 1991 (Ca=0.7%)	Wanner <i>et al.</i> 1991 (Ca=1.4%)	Kilroy <i>et al.</i> 1990	
F (absolute bioavailability)	%	17.6±4.0	12.6±1.3	9.5±4.0	17.9±5.3	13.6±6.17
$V_{(area)}$ (apparent distribution volume)	L/kg	2.03±0.66	1.76	2.34	1.29±0.21	1.85±0.44
k_a (absorption rate constant)	hours ⁻¹	1.30±0.50	2.03±2.15	1.57±1.51	0.92±0.92	1.27±1.67
k (elimination rate constant)	hours ⁻¹	0.15±0.02	0.20±0.05	0.25±0.05	0.17±0.05	0.17±0.07
$t_{1/2}$ (elimination half-life)	hours	4.62	3.46	2.77	3.99	4.08
CL_b (systemic clearance)	L/hour/kg	0.304	0.411	0.467	0.224	0.314

Table 3. Estimates (mean±SD) of the pharmacokinetic parameters of feed-administered OTC in pigs reported in the literature and average values obtained with a Mantel-Haenszel meta-analysis.

Parameter	Units	Reference			Meta-analysis
		Pijpers <i>et al.</i> 1990	Wanner <i>et al.</i> 1990 (Ca=0.7%)	Wanner <i>et al.</i> 1990 (Ca=1.4%)	
F (absolute bioavailability)	%	4.8±1.7	3.6±0.9	3.7±0.9	3.80±1.53
V _(area) (apparent distribution volume)	L/kg	1.44	1.43	1.61	1.50±0.10
k _a (absorption rate constant)	hours ⁻¹	1.89±0.29	4.54±4.56	3.19±3.35	1.910±3.901
k (elimination rate constant)	hours ⁻¹	0.12±0.03	0.13±0.03	0.14±0.05	0.127±0.048
t _{1/2} (elimination half-life)	Hours	5.68	5.33	4.95	5.33
CL _b (systemic clearance)	L/hour/kg	0.176	0.187	0.225	0.194

To conduct the meta-analysis, we used a crude average estimate of V_(area) instead of a Mantel-Haenszel (Dickersin and Berlin, 1992) weighed average, because a majority of authors did not report the variance associated with their estimate (Tables 2-3).

Systemic clearance (CL_b) and elimination half-life (t_{1/2}) of CTC and OTC were calculated with the following equations:

$$CL_b = V_{(area)} \cdot k \quad (\text{Equation 3})$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (\text{Equation 4})$$

We derived the estimates of CL_b and t_{1/2} with parameters derived from the meta-analysis.

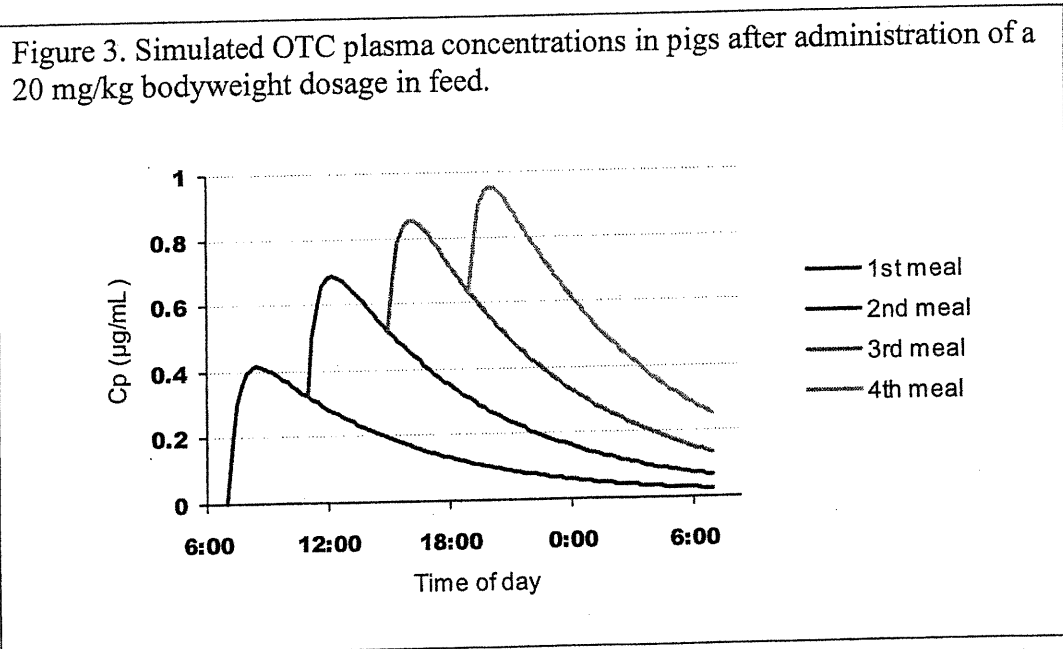
The multiple-dosage pharmacokinetic model was devised from equation 1 using the **method of superposition** (Gibaldi, 1991c); e.g., repeatedly adding Equation 1 (Figure 3) based on the proportion of daily meals taken during daytime (Table 1) (Labroue *et al.*, 1995), and the amount of feed consumed ad libitum per meal.

5.1.4.3. Feeding behavior

Based on observations of the influence of the size of the group of pigs within a pen (not pig density) on feed consumption and feeding behavior (Nielsen and Lawrence, 1993), we modeled a scenario with ≤ 15 pigs per pen, and another scenario with ≥ 20 pigs per pen.

5.1.4.4. Computer iteration procedure

A computerized iteration procedure was devised to find the minimum in-feed dosage of either CTC or OTC (in ppm) that would maintain plasma MIC over a 20-hour interval (to allow for a 4-hour postantibiotic effect [PAE]). We focused on the minimum concentration of antibiotic in plasma to take into account the time-dependent antimicrobial effect of tetracyclines. A procedure was



programmed in Turbo Basic (Corel Inc., Ottawa, Ontario). A Basic compiler is needed to run the program.

Variables we included in this program were the following:

- F,
- $V_{(\text{area})}$,
- k_a and k ,
- the targeted plasma concentration of drug (TPL),
- the weight of the average pig,
- the feed intake of the average pig during daytime,
- the number of daytime meals (this proportion can be estimated from Labroue's data (Labroue *et al.*, 1995) (Table 1),
- feed intake during nighttime, and
- the number of nighttime meals.

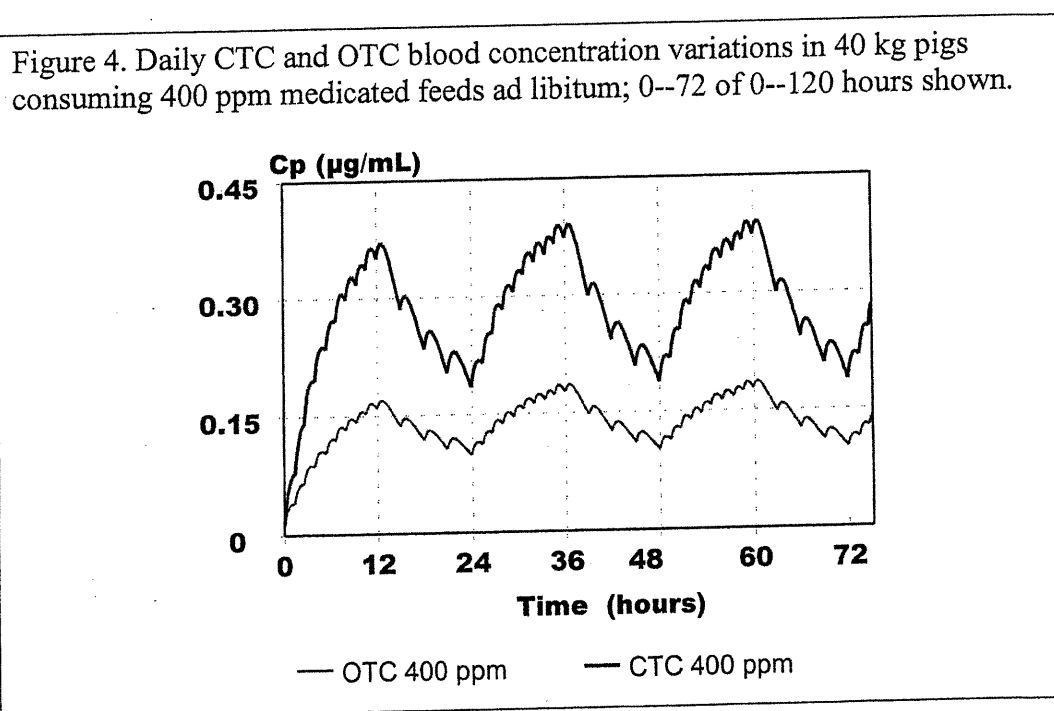
Begin and end values for the in-feed dosage and the iteration step are also variables in this program.

Values of the parameters derived from meta-analysis were then input into Equation 1, which was superposed at even intervals according to the number of daytime meals during the 0- to 12-hour (daytime) period. Thus, if the pigs were assumed to eat 4 meals during the day, the equation was superposed 4 times at 4-hour intervals (e.g., 07:00, 11:00, 15:00, 19:00) (Figure 3). During the 12- to 24-hour (night-time) period, Equation 1 was superposed at even intervals according to the number of nighttime meals. Daytime and nighttime superpositions were repeated for a continuous 120-hour period (Figure 4). Dose was determined by dividing respective feed intakes (i.e., daytime or nighttime) by the number of meals assumed to have been taken during daytime and nighttime.

A pharmacokinetic profile was then generated for 200 hours (to ensure that the data would include the period of equilibrium) with 0.2-hour intervals. The minimum in-feed dosage (in ppm) required to achieve TPL was found by backward iteration according to the following criterion: the resulting plasma concentration profile had to fall below TPL for exactly 4 hours (the span of post-antibiotic effect with tetracyclines) somewhere between 36 and 60 hours after the medicated feed is first offered, the time at which equilibrium of drug between plasma and tissue has been achieved. Finally, the program generated an ASCII file with the final pharmacokinetic profile, giving pairs of time and plasma drug concentration values in the 0- to 200- hour period in 0.2-hour intervals. This iteration procedure was run twice, once for the OTC profile and once for the CTC profile.

5.1.4.5. *Model validation*

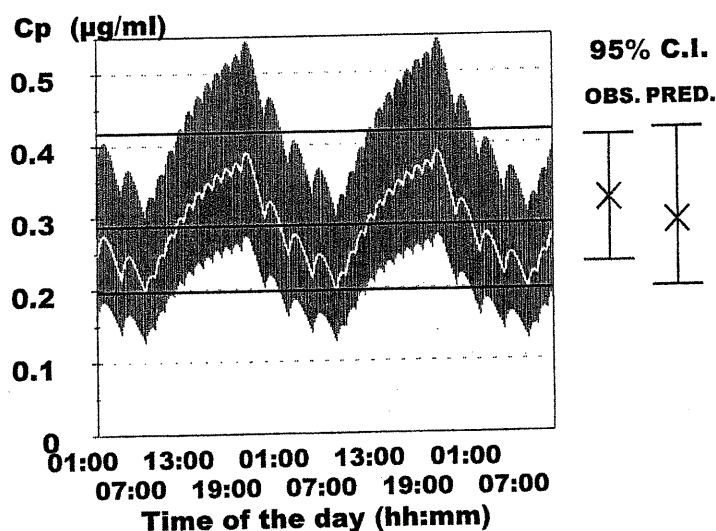
To assess the accuracy of the meta-analytic model, we used an external validation procedure to compare the antibiotic plasma concentrations the models predicted to actual plasma concentrations reported by Black and Gentry



(Black and Gentry, 1984), Asanuma, et al. (Asanuma *et al.*, 1984), Mevius, et al. (Mevius *et al.*, 1986), Reichert (Reichert, 1988), Andrews, et al. (Andrews *et al.*, 1988), Hall, et al. (Hall *et al.*, 1989), and Hunneman, et al. (Hunneman *et al.*, 1994). In some papers (Andrews *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 1989), the mean \pm SD of plasma concentrations was reported graphically; thus, we used approximate estimations of the mean and confidence intervals in our validity calculations. "Agreement" between the models and the literature was defined as $\geq 50\%$ overlap between their respective 95% confidence intervals (CI).

The predicted confidence intervals of CTC and OTC plasma concentrations were obtained by using F and k values equal to the upper and lower 95% confidence limits in the models instead of average Mantel-Haenszel estimates (Dickersin and Berlin, 1992). The upper limit represents a model with greater bioavailability (i.e., F at the upper limit) and slower elimination (i.e., k at the lower limit), whereas the lower limit represents a model with lesser bioavailability (i.e., F at the lower limit) and faster elimination (i.e., k at the upper limit) (Figure 5).

Figure 5. Observed (Andrews *et al.*)¹⁸ and predicted 95% confidence intervals of CTC plasma concentrations in pigs consuming a 220 ppm medicated feed ad libitum.



5.1.5. Results

5.1.5.1. Comparing CTC and OTC pharmacokinetics

The absolute bioavailability of CTC (13%) was significantly greater than that of OTC (4%) ($P = 0.0001$) (Table 4). Peak plasma concentration (C_{max}) of OTC was half of the C_{max} of CTC (Figure 6). The apparent distribution volumes (V_{area}) of CTC and OTC were also significantly lower for OTC than for CTC ($P = 0.0014$) (Table 4). The speed of intestinal uptake of the drugs, measured by k_a , was not significantly different ($P = 0.9$). On the other hand, CTC was eliminated more quickly than OTC, as shown by the statistically significant difference in their respective k ($P = 0.033$). The elimination half-life ($t_{1/2}$) of CTC is thus 75% of OTC. Because CTC is absorbed more slowly and eliminated more quickly than OTC, the models predicted slightly greater daily variations in plasma concentrations of CTC compared to OTC (Figure 4).

Figure 6. Simulated chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC) plasma concentrations in pigs after administration of a 20 mg/kg bodyweight dosage in feed.

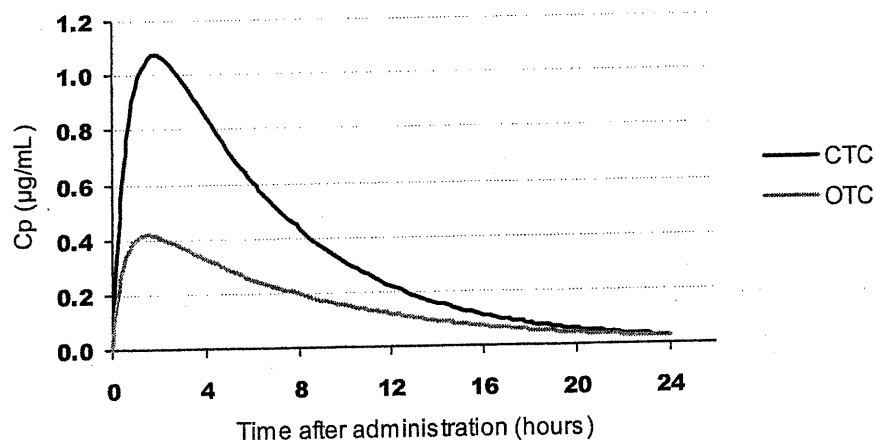


Table 4 Statistical comparison of mean pharmacokinetic parameters of CTC and OTC obtained with a Mantel-Haenszel meta-analysis

Parameter	Units	CTC	OTC	P
F (absolute bioavailability)	%	13.6±6.17	3.80±1.53	0.0001
V _(area) (apparent distribution volume)	L/kg	1.85±0.44	1.50±0.10	0.001
k _a (absorption rate constant)	hours ⁻¹	1.27±1.67	1.910±3.901	0.9
k (elimination rate constant)	hours ⁻¹	0.17±0.07	0.127±0.048	0.03
t _½ (elimination half-life)	Hours	4.08	5.33	-
CL _b (systemic clearance)	L/hour/kg	0.314	0.194	-

5.1.5.2. Feeding behavior

DIURNAL FEEDING PATTERNS

Ad libitum feeding behavior of pigs induced a marked daily variation in both CTC and OTC plasma concentrations. In-feed dosages of both CTC and OTC differ between more-diurnal pigs and less-diurnal pigs when a targeted plasma drug concentration is required (Table 5). Because 40-kg (88-lb) pigs consume about 70% of their daily meals during the daytime (Labroue *et al.*, 1995), the model should predict that the drug accumulated in the body during the day and was eliminated during the night. The model did predict that drug plasma concentrations were lowest by the beginning of the diurnal period (approximately 7:00 a.m.), and highest at its end (7:00 p.m.) (Figure 4).

PIG NUMBERS IN PEN

The number of pigs in the pen (holding pen density constant) did not prove to be a significant factor in determining plasma drug concentration over time (data not shown).

Table 5. Dosages of CTC and OTC (in mg/kg bodyweight) to be given in feed to provide selected targeted plasma concentrations for 20 hours per day in pigs weighing 40 kg with a daily feed intake equivalent to 4% of their body weight, and distinct diurnal feeding behaviors.

Drug type	CTC		OTC	
	65%	85%	65%	85%
% of meals eaten during the day				
Targeted plasma concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Dose required (mg/kg bodyweight)			
0.10	5	11	11	21
0.25	15	21	32	42
0.50	33	38	67	77
0.75	50	55	103	112
1.00	67	73	138	148

5.1.5.3. Model validation

In general, our model generated predictions that were consistent with the literature (Figures 7--8). The model for OTC was in slightly better agreement with reported plasma concentrations (Figure 8) than was the model for CTC (Figure 7).

5.1.5.4. Summarizing equation

The simulations were used to devise an equation where the drug dosage to be given to pigs is calculated by the antibiotic concentration in plasma, the daily feed intake of pigs, as well as their feeding behavior, in the nonlinear equation:

$$D_{\text{CTC}} = 69 \times \text{TPL} - 35 \times e^{\text{DFIR}} + 18 \times e^{\text{DDMR}} \quad (\text{Equation 5})$$

$$D_{\text{OTC}} = 141 \times \text{TPL} - 62 \times e^{\text{DFIR}} + 32 \times e^{\text{DDMR}} \quad (\text{Equation 6})$$

Where:

- D_{CTC} and D_{OTC} are the dosage concentrations of OTC and CTC (in mg per kg bodyweight) to be administered in feed to pigs achieve the targeted plasma concentration TPL (in μg per mL),
- DFIR is daily feed intake of pigs, which is represented as a BW ratio (i.e., if the amount of feed ingested daily is equivalent to 4% of BW, then a value of 0.04 is given to DFIR), and
- DDMR is the ratio of daily meals eaten during the day by the pigs (i.e., if pigs eat nine of their 12 daily meals during the day, then DDMR has a value of 0.75).

Figure 7. Plasma concentrations of CTC (mean \pm 95% CI) reported in the articles used for the validation procedure, predicted blood concentrations (mean \pm 95% CI), and agreement between them.

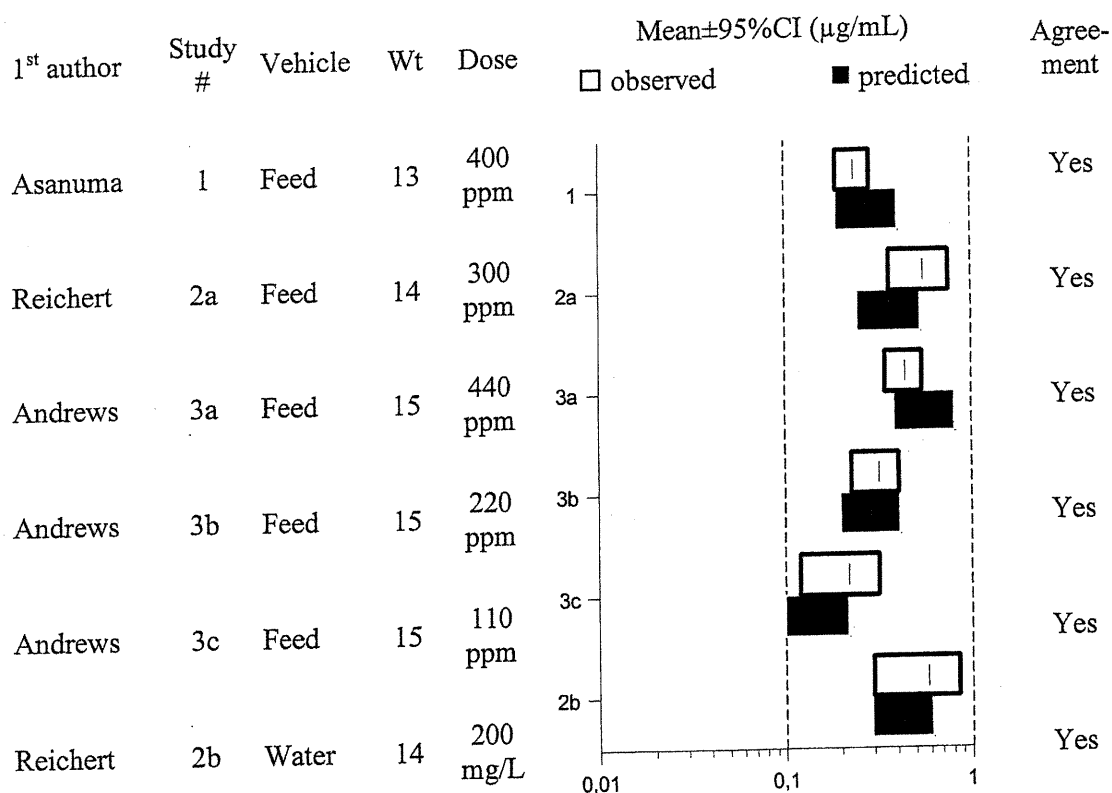
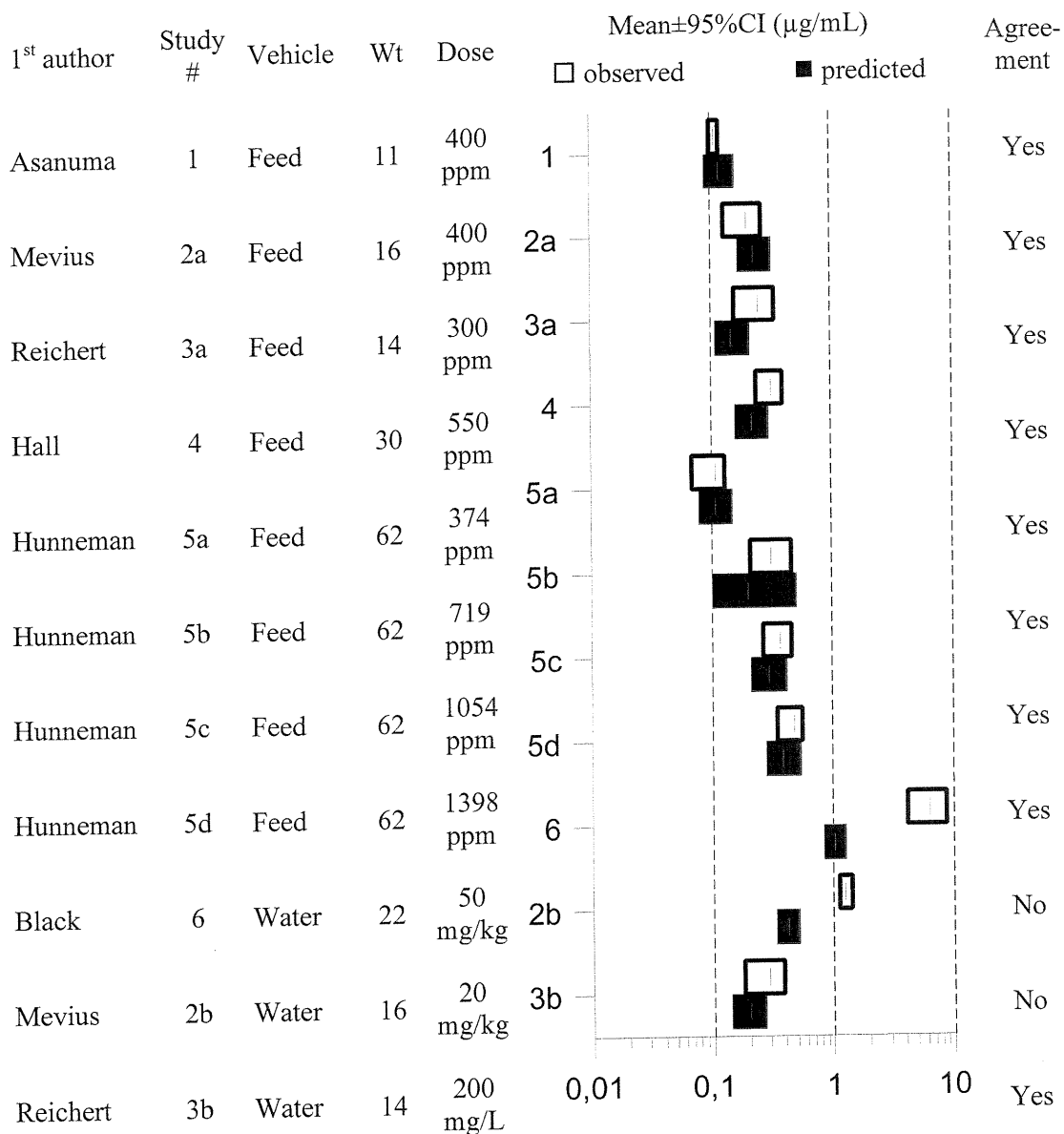


Figure 8. Plasma concentrations of OTC (mean \pm 95% CI) reported in the articles used for the validation procedure, predicted blood concentrations (mean \pm 95% CI), and agreement between them.



5.1.6. Discussion

5.1.6.1. *Model validation*

The plasma concentrations of OTC and CTC predicted by our models were in close agreement with those reported by Asanuma, et al. (Asanuma *et al.*, 1984), Mevius, et al. (Mevius *et al.*, 1986), and Hunneman, et al. (Hunneman *et al.*, 1994), strongly indicating that our model is valid. Moreover, the models made surprisingly accurate predictions for CTC and OTC plasma concentrations given by the 7-day use of medicated drinking water (Reichert, 1988). However, the latter findings are not adequate to support the application of the models to administration of medicated water.

As expected, these models were not able to predict plasma concentrations of OTC in fasted piglets dosed with a medicated drench (Black and Gentry, 1984; Mevius *et al.*, 1986). Plasma OTC concentrations found with medicated drench administration to fasted (Black and Gentry, 1984; Mevius *et al.*, 1986) or fed (Black and Gentry, 1984) pigs were considerably higher than both concentrations predicted with the equations and those from their experiments using medicated feeds (Hall *et al.*, 1989; Hunneman *et al.*, 1994). Intestinal absorption of OTC is reduced by the presence of food (Gibaldi, 1991a).

Our model for CTC was also in close agreement to observations reported by Andrews, et al. (Andrews *et al.*, 1988) in pigs that were challenged with *Pasteurella multocida* and then received CTC-medicated feed. This agreement is somewhat surprising, because the disease challenge is known to modify drug disposition in animals (Pijpers *et al.*, 1991a).

The effect of OTC and CTC dosage on consumption of medicated feed by pigs has not been considered in the models. We do not know whether higher in-feed dosages of CTC or OTC would significantly change the palatability of medicated feeds offered to pigs, but Pijpers, et al. (Pijpers *et al.*, 1991b),

reported that pigs offered feed with 2400 ppm of OTC showed similar appetites to those of pigs fed with a much lower dosage of OTC-medicated feeds. Also, the rate of feed intake of 10-kg pigs offered a diet fortified with 3600 ppm of CTC was identical to that of a drug-free diet (del Castillo, 1997 – unpublished observations).

The diurnal pattern of drug plasma concentrations that our model predicted is consistent with the observation of fluctuations in tetracycline plasma concentrations in pigs offered medicated drinking water for ad libitum consumption (Luthman *et al.*, 1989).

Labroue, et al. (Labroue *et al.*, 1995), and Nielsen, et al. (Nielsen and Lawrence, 1993) used an electronic monitoring device placed on each individual pig that allowed them to monitor feeding frequency and individual feed intake in a noninvasive way. In their studies, then, normal feeding behaviors were not altered by human interaction. Unfortunately, in the studies used for model validation (Asanuma *et al.*, 1984; Black and Gentry, 1984; Mevius *et al.*, 1986; Reichert, 1988; Andrews *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 1989; Hunneman *et al.*, 1994), feed intake of pigs was monitored by a stocksperson who entered the facility. This intrusive method of monitoring pig intake and plasma concentration is a potential confounder of pig feeding behavior. Factors related to feed characteristics (i.e., citric acid supplementation, calcium content, etc.) and pig feeding behaviors (i.e., diurnal feeding patterns, intrusive management) might be responsible for the differences between CTC and OTC plasma concentrations that were predicted by the models and those reported in some papers (Reichert, 1988; Hall *et al.*, 1989) used for the validation procedure.

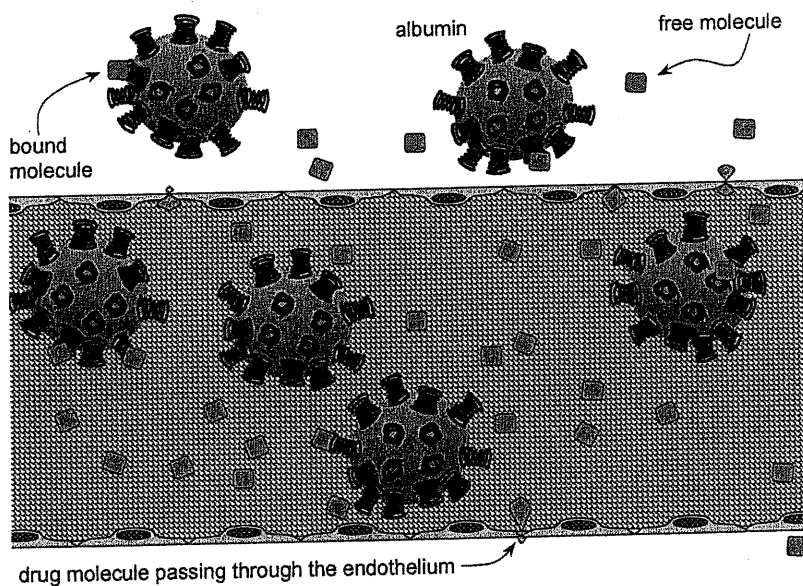
5.1.6.2. *Pharmacokinetics*

The pharmacokinetics of both CTC and OTC are linear. The time-evolution concentration parameters are thus assumed to remain constant throughout a

wide range of in-feed dosages. The superposition method we used is valid and the drug plasma concentrations it predicts are directly related to the administered dosage, which is consistent with reports in literature (Kilroy *et al.*, 1990; Pijpers *et al.*, 1991b). The better agreement between our model and the OTC literature than for the CTC literature may be due to the greater variation in bioavailability of CTC. The Mantel-Haenszel estimate of F for CTC may appear conservative, however, because two independent studies reported mean values near 17%. Large variance is associated with these F values.

Plasma concentrations are not necessarily equivalent to concentrations of drug in target tissue. Diffusion of antimicrobials to extra-vascular fluids is restricted to free molecules, whereas molecules transiently bound to proteins remain in plasma (Craig and Suh, 1978) (Figure 9). Plasma-protein binding rate is negatively related to drug distribution to lung and other tissues in a nonlinear way; only drugs possessing plasma protein binding rates over 85%-90% have significantly reduced free drug-plasma concentrations (Craig and Suh, 1978). On the other hand, the rate of protein binding of tetracyclines is positively

Figure 9. Illustration of binding of drug molecules to plasma and extravascular albumin at a given instant, and diffusion across endothelium in a small blood vessel.



correlated to lipid solubility (Craig and Suh, 1978), which enhances tissue penetration. Consequently, the clinical significance of this balance between protein binding and lipid solubility is difficult to assess. As 20%--25% of less lipid-soluble OTC and 50%--70% of more lipid-soluble CTC are bound to plasma proteins (Reichert, 1988), similar free drug concentrations should be found with identical plasma concentrations (Scheife, 1989), and free CTC tissue penetration might be greater than that of OTC. Lung CTC and OTC concentrations reported by Asanuma, et al. (Asanuma *et al.*, 1984), were higher than plasma concentrations and the mean of tissue:plasma concentration ratios of CTC is about 30% greater than that of OTC. Nonetheless, these findings are affected by last-meal-to-slaughter intervals, which were not specified. Concentrations of CTC in lung reported by Andrews, et al. (Andrews *et al.*, 1988), were also greater than plasma concentrations, but data represented in this article was from *P. multocida*-challenged pigs, and distribution kinetics could also be affected by this situation. The clinical significance of the comparison of CTC and OTC plasma and lung pharmacokinetic profiles at a given time is difficult to assess, because both functions are nonlinear and have different parameter values. In this case, however, it is less important than bioavailability; the dosage to be administered to pigs to obtain a given concentration of OTC in plasma is twice that of CTC (Figure 4). The greater lipid solubility of CTC is also likely to enhance diffusion to the site of infection.

5.1.6.3. *Pharmacodynamics and antibiotic sensitivity testing*

Tetracyclines achieve full antimicrobial activity when supraMIC concentrations are reached at the site of potential infection: the prevalence of signs and lesions in pigs experimentally infected with pathogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* decreased as the steady-state OTC plasma concentrations approached the MIC (Hunneman *et al.*, 1994). Andrews *et al.* (1988),

performed a similar study with *P. multocida*, but the assessment of a prophylactic effect of subMIC concentrations of CTC was not included.

It is important, then, that the MICs of CTC and OTC serve as the basis for the design of strategies that ensure optimal prophylactic efficacy. Although this information is reported for several swine respiratory pathogens, only semi-quantitative information (sensitive, intermediate, or resistant) is typically given to veterinary practitioners. For human bacteria other than *Neisseria* spp., and *Haemophilus* spp., the sensitivity breakpoint of tetracycline is equivalent to an MIC of 8.0 mg per mL (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990). Hence, strains with MIC ≤ 4 μg per mL are sensitive, and strains with MIC ≥ 32 μg per mL are resistant. Many veterinary diagnostic laboratories use this breakpoint for veterinary pathogens. In the case of *A. pleuropneumoniae*, some veterinary laboratories (Messier *et al.*, 1993) use the breakpoint for human *Haemophilus* spp. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990), which is equivalent to 4 μg per mL. Strains with MIC ≤ 2 μg per mL are susceptible, while strains with MIC ≥ 8 μg per mL are resistant to tetracycline. Drug concentrations equivalent to these two breakpoints are easily exceeded with parenterally administered OTC, but rarely achieved with medicated feeds. The use of this breakpoint in diagnostic laboratories, consequently, creates misleading information for swine practitioners (Elsener *et al.*, 1998).

Many papers report the MICs of CTC and OTC for *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pijpers *et al.*, 1989; Hannan *et al.*, 1989; Kuwano and Takei, 1992; Flaus and Tan, 1994; Kim and Jung, 1994), *Bordetella bronchiseptica* (Pijpers *et al.*, 1989; Hannan *et al.*, 1989), *Haemophilus parasuis* (Hannan *et al.*, 1989; Barigazzi *et al.*, 1994), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Yamamoto and Koshimizu, 1984; Hannan *et al.*, 1989; Ter Laak *et al.*, 1991; Kuwano and Takei, 1992; Cooper *et al.*, 1993), and *P. multocida* (Pijpers *et al.*, 1989; Hannan *et al.*, 1989; Kuwano and Takei, 1992; Flaus and Tan, 1994). This list is restricted to articles that report the sample

distribution of MICs. Differences noted among these reports may be associated with geographic variations, but may also be due to the MIC determination technique chosen (Ter Laak *et al.*, 1991).

The 90th percentile of the MIC distribution (MIC_{90}) is often considered as a target to reach. The use of such a parameter by itself is unfair, since it is often derived from bacterial isolates whose collection is based on taxonomy, with little consideration of their pathological and epidemiological importance as a cause of respiratory disease. Nonvirulent strains, or virulent ones that are seldom implicated with disease in the field, could be added to the test sample. This could lead to the inclusion of several subgroups of strains with different concentrations of both antimicrobial susceptibility and clinical interest. The MIC_{90} can thus be biased by strains possessing extreme MIC values but that are epidemiologically irrelevant, while much lower concentrations could inhibit a majority of more prevalent pathogenic strains (del Castillo, 1995).

Precise evaluation of MIC sample distribution is necessary to discriminate between more- or less-sensitive subgroups of bacterial isolates and identify outlying values. The geometric dilution procedures that are used to determine MICs produce an increasing error to the right side of sample distributions, where the MIC_{90} is always located. Therefore, the bias created by outliers is exacerbated by the dramatic imprecision associated with its value (Turnidge, 1990; del Castillo, 1995; Elsener *et al.*, 1998).

Another source of bias is when practitioners submit samples for bacteriological analysis to diagnostic laboratories only in cases of metaphylactic failure. The proportion of unusually resistant strains in the bacterial collection eventually increases, and inference of the MIC_{90} to the population of field strains will no longer be valid. The MIC target should be representative of field strains commonly implicated in disease outbreaks. Veterinary practitioners should routinely send animals or tissue specimens to diagnostic laboratories to

maintain the relevance of the MIC target. Additionally, developing techniques to predict in vivo MIC would be of major clinical interest.

It is critically important to consider the type of activity provided by the antimicrobial to obtain effective metaphylaxis. So far, tetracyclines have been observed to exert a time-dependent bactericidal activity (Keck and Borne, 1995). In addition, sub-MIC concentrations of drug could reduce the growth rate of exposed bacteria, but without any decrease in bacterial population being induced. Nevertheless, this effect could help the immune system in controlling infectious pressure.

The post-antibiotic effect (PAE) of tetracyclines has only been studied on human enterobacteria, but the extrapolation to other Gram-negative rods, such as swine respiratory pathogens, seems to be acceptable (Zhanet *et al.*, 1991). *Escherichia coli* cultures exposed for 1 hour to supra-MIC concentrations of tetracycline did not show any noticeable in vitro growth for over 3 hours after drug had been washed off (Gerber and Craig, 1982). This PAE has been reported with other protein synthesis inhibitors for *E. coli* and other Gram-negative bacilli as well (MacKenzie and Gould, 1993). Theoretically, if in-feed medication regimens can deliver supra-MIC concentrations of CTC and OTC to the site of infection for some period of time, their effect would be maintained for at least 3 hours even after an instantaneous and complete elimination (Gerber and Craig, 1982). This instant elimination does not exist in animals; CTC and OTC elimination half-lives are > 4 hours in pigs (Table 4). Sub-MIC concentrations of drug are thus found for several hours before complete elimination, which may increase the length of PAE effect (MacKenzie and Gould, 1993). However, the length of in vivo PAE effect caused by CTC and OTC is not yet known. Consideration of PAE is thought to be of major importance for the design of more effective treatment strategies. For example, schedules that give transient sub-MIC plasma concentrations of drug could be tolerated for antimicrobials possessing a PAE (Spivey, 1992). The computerized iterative procedure we used in our study took into

consideration a 4-hour-long postantibiotic phase, which allowed short-term sub-MIC plasma concentrations of CTC and OTC.

Post-antibiotic leukocyte enhancement effect (PALE) has not been taken into account in our model (Zhanel *et al.*, 1991). After exposure to antibiotics, enhanced phagocytosis and intracellular killing of bacteria is noted during the antibiotic-free phase. Modifications in the bacterial cell surface caused by the drug may cause this phenomenon (MacKenzie and Gould, 1993). The *in vivo* extent of PALE, which has been noted *in vitro*, is unknown but likely plays a major role in the outcome of metaphylaxis with antimicrobials. The addition of subMIC concentrations of some antibiotics has also been reported to induce a PALE effect (Spivey, 1992). The PALE effect of the tetracyclines has not been studied to our knowledge, but is likely to exist as suggested by the sometimes successful results of metaphylaxis with low drug in-feed dosage concentrations.

Our observation that the number of pigs in the pen didn't affect plasma concentrations of OTC and CTC could be predicted by Nielsen's observation that pigs housed in larger groups (with pen density kept constant) ate less frequently, but ate more at each meal (Nielsen and Lawrence, 1993). Thus, the frequency of feeding would have an effect on dosage and dosage interval, but not an overall effect on drug concentrations in plasma. In our simulations, we kept pen density constant and altered only the number of pigs in the pen. Our result therefore cannot be safely generalized to situations in which pig density has been increased beyond standard commercial guidelines.

5.1.7. Implications

- In-feed dosage concentrations currently used are related neither to targeted pathogens nor to populations at risk, and often provide much lower antibiotic concentrations to pigs than the MIC alone indicates. Consequently, the outcome of metaphylaxis is somewhat unpredictable.

- Effective metaphylaxis in the whole pig herd should be achieved by using the drug MIC for the targeted pathogen. This information allows practitioners to customize therapeutic strategies to what is really needed. Diagnostic laboratories could provide a restricted MIC estimate by the use of linear series of dilutions (Table 5) or at least use sensitivity breakpoints that could be obtained with oral administration of realistic antibiotic dosages.
- The computerized iteration procedure used in this study was the first multiple-dosage pharmacokinetic model of in-feed tetracyclines that took into effect actual ad libitum feeding behavior of pigs.
- The outcome of metaphylaxis could be affected by age, daily feed intake, day/night variations in feeding behavior, and pen density, all of which may produce variations in plasma drug concentrations. Improving our knowledge of these sources of variation might be helpful in the design of better medication strategies. The equations proposed here can be helpful in designing metaphylactic strategies by accounting for some of these factors.
- CTC plasma and lung concentrations obtained in our models with ad libitum intake of medicated feed were at least twice that achieved with OTC. The pharmacokinetic response for CTC and OTC has been observed in a number of studies to differ significantly. Therefore, it is likely that there can be an economic benefit to the proper antibiotic choice when designing a metaphylactic strategy in intensive swine production.

5.1.8. Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Denis Du Tremblay for his assistance in the computer programming of the multi-dosage pharmacokinetic simulations, to

Dr. Michel Bigras-Poulin for his advice in meta-analysis, and to Dr. Jean-Guy Besner and Dr. Robert Higgins for the critical reviewing of the manuscript.

5.1.9. Putting it into practice...

It is easy to calculate daily CTC and OTC feed dosages for metaphylaxis of swine respiratory diseases. Practitioners can predict plasma drug concentrations in pigs offered medicated feeds, according to daily feed intake and nycthemeral feeding behavior, and correlate this and the MIC for targeted bacteria to reduce the incidence or severity of clinical disease. These equations might be of special interest to practitioners in countries where antibiotic prescription is left to the practitioner's judgement.

Given the importance of the diurnal feeding behavior we observed in this study, we propose the following equations to calculate in-feed dosages of CTC and OTC dosages, from nursery to finishing phases:

$$\bullet \quad D_{CTC} = 69 \times TPL - 35 \times e^{DFIR} + 18 \times e^{DDMR} \quad (\text{Equation 5})$$

$$\bullet \quad D_{OTC} = 141 \times TPL - 62 \times e^{DFIR} + 32 \times e^{DDMR} \quad (\text{Equation 6})$$

Where:

- D_{CTC} and D_{OTC} are the dosage concentrations of OTC and CTC (in mg per kg BW) to be administered in feed to pigs in order to achieve the targeted plasma concentration TPL (in μg per mL).
- DFIR is daily feed intake of pigs, which is represented as a BW ratio (i.e., if the amount of feed daily ingested is equivalent to 4% of BW, then a value of 0.04 is given to DFIR).

- DDMR is the ratio of daily meals eaten during the day by the pigs (i.e., if pigs eat nine of their 12 daily meals during the day, then DDMR has a value of 0.75).

As shown by the equation coefficients, the CTC dosage level needed to achieve a given plasma target concentration is almost 50% of the OTC level. On the other hand, coefficients of DFIR and DDMR in the equation to determine CTC dosage concentrations are 55% of those in the equation for OTC. This difference in the ratio of coefficients is associated with the higher clearance of CTC, as shown by k (Table 4).

5.1.9.1. Hypothetical example

You find pathogenic *Pasteurella multocida* is increasing the severity of respiratory signs caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in the growing section of a finisher operation. Affected pigs are 40 kg when they start to show clinical signs. Daily feed intake is 4.5%. You expect pigs at this weight to eat 67.5% of their daily meals during daytime (Table 1). The MIC of both CTC and OTC for the targeted bacterium is 0.25 μg per mL.

You would solve Equation 6 to determine the in-feed dosage for OTC:

$$D_{\text{OTC}} = 141 \times 0.25 \mu\text{g/mL} - 62 \times e^{0.045} + 32 \times e^{0.675}$$

$$D_{\text{OTC}} = 35.25 - 64.85 + 62.85$$

$$D_{\text{OTC}} = 33.25 \text{ mg/kg BW/day}$$

And the required feed dosage for this hypothetical situation will thus be:

$$D_{\text{OTC}} (\text{feed}) = 33.25 \div 0.045$$

$$D_{\text{OTC}} (\text{feed}) = 739 \text{ ppm}$$

In the United States, this dosage exceeds the approved prescription dosage and is therefore not legal. You would then consider the alternative use of CTC, using Equation 5:

$$D_{CTC} = 69 \times 0.25 \mu\text{g/mL} - 35 \times e^{0.045} + 18 \times e^{0.675}$$

$$D_{CTC} = 17.25 - 36.61 + 35.35$$

$$D_{CTC} = 15.99 \text{ mg/kg BW/day}$$

And the required in-feed dosage for this hypothetical situation will thus be:

$$D_{CTC} (\text{feed}) = 15.99 \div 0.045$$

$$D_{CTC} (\text{feed}) = 355 \text{ ppm}$$

This prescription dosage is legal in the United States.

The approximate dosages of OTC and CTC needed to achieve some specific concentrations in plasma are listed in Table 5.

5.1.10. Glossary

ABSORPTION: The process by which unchanged drug proceeds from the site of administration to the site of measurement within the body (e.g., blood). Some of the drug may remain in the administration site (i.e., adsorbed by feed particles; or in insoluble salts when injected intramuscularly or subcutaneously) or may be metabolized during transit between the administration site and the measurement site (i.e., destroyed by the liver or other tissues that possess the appropriate enzymes). Drug absorption is described with two pharmacokinetic parameters: **BIOAVAILABILITY** and **ABSORPTION RATE CONSTANT**.

ABSORPTION RATE CONSTANT: The rate at which the drug is transferred from the administration site to the site of measurement. In other words, it is the proportion of the dose that proceeds to blood per unit of time. That is, $k_a = 0.75 \text{ h}^{-1}$ means that 75% of the dose remaining in the administration site is absorbed per hour of time.

BIOAVAILABILITY: The rate and extent of drug absorption. In other words, it is the fraction of the dose that will reach the site of measurement after extravascular administration, compared to a standard route. When the standard route is an intravascular administration, the result is called **ABSOLUTE BIOAVAILABILITY**. When the standard route is also extravascular, the result is called **RELATIVE BIOAVAILABILITY**.

BIOEQUIVALENCE: When two different formulations of the same product possess equal pharmacokinetic properties, so they can be used interchangeably. Tetracyclines are erroneously considered to be “bioequivalent,” and many practitioners switch from one to another according to economic criteria.

CLEARANCE: The loss of drug by the blood when passing across an organ of elimination. It is also defined as the volume of a body fluid (e.g., plasma) that is totally purified of drug molecules per unit of time.

DISTRIBUTION: The process of reversible transfer of a drug to and from the measurement site. Once in blood, the drug proceeds to tissues so an equilibrium between blood and tissues is achieved. Distribution is affected by the blood supply to the tissue, the ability of the drug to cross tissue membranes, binding of the drug within blood and tissues, and partitioning into fat. **DISTRIBUTION VOLUME** is a pharmacokinetic parameter describing the distribution of drug within the body.

ELIMINATION: The irreversible loss of drug from the site of measurement.

Some drugs will be metabolized when passing through the liver or some other tissue that has the required set of enzymes. Others will be directly eliminated when passing through the kidney or other excretion tissues.

CLEARANCE, ELIMINATION RATE CONSTANT, and ELIMINATION HALF-LIFE are pharmacokinetic parameters describing the elimination of drugs.

ELIMINATION RATE CONSTANT: The rate at which a drug disappears from the site of measurement. In other words, it is the proportion of the dose that proceeds outside the blood per unit of time (e.g., $k=0.13 \text{ h}^{-1}$ means that 13% of the dose remaining in the site of measurement is eliminated per hour of time).

ELIMINATION HALF-LIFE: The amount of time required to eliminate half of the amount of drug remaining in the body.

EXCRETION: The irreversible loss of chemically unchanged drug (through target or nontarget tissues. This is one type of elimination.

KINETICS OF BACTERICIDAL ACTIVITY: Drugs are historically divided into bactericidals and bacteriostatics. This classification does not take into account the effect of drug concentration over time. When studying the effect of antibiotics on bacteria over time, it is apparent that drugs behave in two different ways that are not reflected by the old classificatory system. With drugs possessing concentration-dependent bactericidal activity (Figure 2), the number of bacterial cells that die is direct function of how much the drug concentration exceeds the MIC (e.g., the more drug you add, the more cells die and the faster they die). Fluoroquinolones and some aminoglycosides, as well as metronidazole with anaerobic bacteria, show this type of bactericidal activity. With drugs possessing time-dependent bactericidal activity, the number of cells that die reaches a

maximum (e.g., no further addition of drug will increase bacterial death or death rate). Cephalosporins, macrolides, and other bacteriostatic protein inhibitors show this type of activity. Many antibiotics exhibit either types of bactericidal activity, depending on the Gram type of the test bacteria (e.g., concentration-dependent with Gram-positive organisms and time-dependent with Gram-negative organisms).

LINEAR PHARMACOKINETICS: When pharmacokinetic properties of a drug remain constant throughout a wide range of dosages. Concentrations at the site of measurement are always directly related to dose, both for single and multiple doses.

METABOLISM: The conversion of one chemical species to another.

Metabolism may have an effect on the biological activity of a drug (i.e., metabolism can decrease, increase, or have no effect on the activity of drugs). There are minor reactions (known as Phase I metabolism) and major reactions (Phase II metabolism) that increase the ability of the body to eliminate the drug.^j Enzymes such as the cytochrome P450 isoenzymes are responsible for the metabolism of drugs.

PHARMACOKINETICS: the study of the evolution of drug absorption and disposition by the living body over time and the use of mathematics to describe and predict the whole process. Drug disposition is characterized by two events that occur simultaneously: **DISTRIBUTION** through the body and **ELIMINATION** by means of **METABOLISM** or **EXCRETION**.

PHARMACODYNAMICS: The study of the relationship between drug concentrations at the site of action and drug effects, factors influencing this relationship, and the use of mathematics for the description of the process.

^j N.B. : Lors de réactions métaboliques de phase I, le substrat subit petites modifications (« minor reactions »), telles que l'hydroxylation ou la déméthylation. Ceci n'implique pas que ces réactions soient d'intérêt secondaire (« minor importance ») dans le devenir du médicament.

Models that can both describe the observations and offer some insight into the underlying biological process are usually preferred. Determining the **POST-ANTIBIOTIC EFFECT**, the **POST-ANTIBIOTIC LEUKOCYTE ENHANCEMENT EFFECT**, and the **KINETICS OF BACTERICIDAL ACTIVITY** are different ways to study the pharmacodynamics of antimicrobial drugs. The minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration, and antimicrobial sensitivity testing do not provide any information on the time course of antimicrobial activity or the persistent effects of antimicrobial agents, and thus are not considered to be pharmacodynamic parameters.

POST-ANTIBIOTIC EFFECT: The persistent suppression of bacterial growth after exposure to an antimicrobial. It can be conceived of as the time it takes for an organism to recover from the effects of exposure to an antimicrobial. The post-antibiotic effect has been observed both under in vitro and in vivo conditions. The span of the post-antibiotic effect is affected both by the concentration and the duration of exposure of bacteria to drug. SubMIC concentrations of antibiotics are known to slow growth, produce morphological changes, and prolong the duration of the in vivo post-antibiotic effect produced by supraMIC concentrations.

POST-ANTIBIOTIC LEUKOCYTE ENHANCEMENT EFFECT: The increase in susceptibility of bacteria in the post-antibiotic phase to phagocytosis or intracellular killing by leukocytes. The inhibition of bacterial repair mechanisms or antiphagocytic substance production by antibiotics is thought to be the cause of this phenomenon.

PRINCIPLE OF SUPERPOSITION: For drugs that possess linear pharmacokinetics, all kinetic profiles corrected for the administered dose can always be superimposed---i.e., added to the concentration of the drug already available in plasma at the time of the next administration. When kinetic profiles fail to superimpose, the drug possesses nonlinear

pharmacokinetics for either dose (e.g., saturation of transport across membranes, protein binding, etc) or time (e.g., induction/ inhibition of metabolism).

VOLUME OF DISTRIBUTION: The apparent volume in which a drug distributes in the body at equilibrium of drug between blood and tissue. It is a direct measure of the extent of distribution, but it rarely corresponds to a real volume (e.g., plasma; extracellular water; total body water).

5.1.11. References

- Andrews, J. J., Lucas, T. E., Johnston, D. D.** (1988). Prevention and control of experimentally induced *Pasteurella multocida* pneumonia in swine by the use of chlortetracycline administered in feed. *Agri-Practice*, **9**: 33-38.
- Asanuma, K., Shimazaki, M., Hirata, K.** (1984). [A study on the distribution of OTC and CTC in the lung and blood in pigs]. *Doyaku*, **6**: 8-14.
- Barigazzi, G., Candotti, P., Raffo, A.** (1994). Determinazione della minima concentrazione inibente (MCI) di 23 farmaci antibatterici nei confronti di 97 ceppi di *Haemophilus parasuis* isolati dal suino. *Meeting Annuale della Societa Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, **21**: 135-141.
- Black, W. D., Gentry, W. D.** (1984). The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. *Canadian Veterinary Journal*, **25**: 158-161.
- Cooper, A. C., Fuller, J. R., Fuller, M. K., Whittlestone, P., Wise, D. R.** (1993). In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against

mycoplasmas of veterinary importance. *Research in Veterinary Science*, **54**: 329-334.

Craig, W. A., Suh, B. (1978). Theory and practical impact of binding of antimicrobials to serum proteins and tissue. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplementum 14*: 92-99.

Daniel, W. W. (1990). *Applied nonparametric statistics - 2th edition*. Boston, MS, U.S.A., PWS-Kent Publishing Co.

del Castillo, J. R. E. (1995). *Biodisponibilités orale et parentérale des pénicillines naturelles utilisées en prophylaxie de la streptococcie chez le porcelet sevré*. M.Sc. Thesis, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire. St-Hyacinthe, QC, Canada, 145 pp.

Dickersin, K., Berlin, J. A. (1992). Meta-analysis: state-of-the-science. *Epidemiological Reviews*, **14**: 154-176.

Elsener, J., del Castillo, J. R. E., Martineau, G. P. (1998). MIC interpretation: flaws behind the scene. *Swine Health and Production*, (1997 - submitted).

Flaus, L., Tan, A. T. S. C. (1994). Synergy study between lincomycin and oxytetracycline and between lincomycin and chlortetracycline against *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *International Pig Veterinary Society Congress*, **13**: 186.

Gerber, A. U., Craig, W. A. (1982). Experimentelle studien zur frage des optimalen dosisintervalls in der antibiotikatherapie. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, **112**: 42-45.

- Gibaldi, M.** (1991a). Gastrointestinal absorption - biologic considerations. pp. 24-39. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics - 4th edition* Philadelphia, PA, U.S.A., Lea & Febiger.
- Gibaldi, M.** (1991b). Introduction to pharmacokinetics. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics - 4th edition* Philadelphia, PA, U.S.A., Lea & Febiger.
- Gibaldi, M.** (1991c). Method of superposition. pp. 379. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics - 4th edition* Philadelphia, PA, U.S.A., Lea & Febiger.
- Hall, W. F., Kniffen, T. S., Bane, D. P., Bevill, R. F., Koritz, G. D.** (1989). Plasma concentrations of oxytetracycline in swine after administration of the drug intramuscularly and orally in feed. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **194**: 1265-1268.
- Hannan, P. C., O'Hanlon, P. J., Rogers, N. H.** (1989). In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Research in Veterinary Science*, **46**: 202-211.
- Henry, Y., Perez, J. M., Seve, B.** (1984). Alimentation des porcs en croissance. pp. 49-66. *L'alimentation des animaux monogastriques* (J. C. Blum, Ed.). Paris, France, Institut National de la Recherche Agronomique.
- Holford, N. H., Sheiner, L. B.** (1982). Kinetics of pharmacologic response. *Pharmacology and Therapeutics*, **16**: 143-166.
- Hunneman, W. A., Pijpers, A., Lommerse, J., Crauwels, A. P., Verheijden, J. H.** (1994). Prophylaxis of pleuropneumonia in pigs by in-feed

medication with oxytetracycline and the subsequent transmission of infection. *Veterinary Record*, **134**: 215-218.

Keck, G., Borne, P. M. (1995). Nouvelles conceptions en antibiothérapie et leurs applications pratiques en médecine vétérinaire. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **146**: 309-320.

Kilroy, C. R., Hall, W. F., Bane, D. P., Bevill, R. F., Koritz, G. D. (1990). Chlortetracycline in swine--bioavailability and pharmacokinetics in fasted and fed pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **13**: 49-58.

Kim, B., Jung, B. (1994). Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from the pneumonic lungs of Korean swine. *International Pig Veterinary Society Congress*, **13**: 126.

Kuwano, A. Y., Takei, M. K. (1992). Evaluation of the effect of ofloxacin in experimentally induced mycoplasmal pneumonia in swine. *International Pig Veterinary Society Congress*, **12**: 320.

Labroue, F., Guéblez, R., Marion, M., Sellier, P. (1995). Influence de la race sur le comportement alimentaire de porcs en croissance élevés en groupe. Premiers résultats d'une comparaison Large White-Piétrain. *Journées de la Recherche Porcine en France*, **27**: 175-181.

Luthman, J., Jacobsson, S. O., Bengtsson, B., Korpe, C. (1989). Studies on the bioavailability of tetracycline chloride after oral administration to calves and pigs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A*, **36**: 261-268.

MacKenzie, F. M., Gould, I. M. (1993). The post-antibiotic effect. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **32**: 519-537.

- Messier, S., Higgins, R., Nadeau, M.** (1993). À propos des épreuves de sensibilité pour *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Médecin Vétérinaire du Québec*, **23**: 127-129.
- Mevius, D. J., Vellenga, L., Breukink, H. J., Nouws, J. F., Vree, T. B., Driessens, F.** (1986). Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration. *Veterinary Quarterly*, **8**: 274-284.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards** (1990). *Performance standards for antimicrobial susceptibility tests* [NCCLS Document M2-A4] – 4th (approved) edition. Villanova, PA, U.S.A.,
- National Research Council** (1988). *Nutrient requirements of swine - 9th edition*. Washington D.C., U.S.A., National Academy Press.
- Nielsen, B. L., Lawrence, A. B.** (1993). The effect of group size on the behaviour and performance of growing pigs using computerised single-space feeders. *Pig News and Information*, **14**: 127N-129N.
- Pijpers, A., van Klingerren, B., Schoevers, E. J., Verheijden, J. H. M., van Miert, A. S. J. P. A. M.** (1989). In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **12**: 267-276.
- Pijpers, A., Schoevers, E. J., van Gogh, H., van Leengoed, L. A. M. G., Visser, I. J. R., van Miert, A. S. J. P. A. M., Verheijden, J. H. M.** (1991a). The influence of disease on feed and water consumption and on pharmacokinetics of orally administered oxytetracycline in pigs. *Journal of Animal Science*, **69**: 2947-2954.

- Pijpers, A., Schoevers, E. J., Haagsma, N., Verheijden, J. H.** (1991b). Plasma levels of oxytetracycline, doxycycline, and minocycline in pigs after oral administration in feed. *Journal of Animal Science*, **69**: 4512-4522.
- Reichert, J.** (1988). *Blutspiegel von Chlor- und Oxytetrazyklin beim Ferkel nach Futter- oder Wasser-medikation bei unterschiedlicher Fütterungstechnik*. M.Sc. Thesis, University of Zurich, Switzerland., 51 pp.
- Rowland, M., Tozer, T. N.** (1994). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications - 3th edition*. Media, PA, U.S.A., Williams & Wilkins.
- Scheife, R. T.** (1989). Protein binding: what does it mean? *DICP: the annals of pharmacotherapy*, **23**: S27-S31.
- Spivey, J. M.** (1992). The postantibiotic effect. *Clinical Pharmacy*, **11**: 865-875.
- Sutter, H. M., Wanner, M.** (1990). Futterzubereitung und Pharmakokinetik von Chlortetrazyklin beim Ferkel. *Schweizerische Archiv für Tierheilkunde*, **132**: 175-181.
- Ter Laak, E. A., Pijpers, A., Noordergraaf, J. H., Schoevers, E. C., Verheijden, J. H.** (1991). Comparison of methods for in vitro testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 228-233.
- Turnidge, J. D.** (1990). Prediction of antibiotic dosing intervals from in vitro susceptibility, pharmacokinetics and post-antibiotic effect: theoretical considerations. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplementum 74*: 137-141.

- Wages, D.** (1993). Volumetric versus mg/kg dosing in poultry. *Proceedings, North Central Avian Diseases Conference and Symposium on Poultry Therapeutics*, **44**: 22-24.
- Wanner, M., Nietlispach, G., Sutter, H. M.** (1990). Einfluss von citronensäure und calcium auf die bioverfügbarkeit oral verabreichten oxytetracyclins beim ferkel. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **97**: 515-518.
- Wanner, M., Walker, W., Sutter, H. M., Riond, J. L., Broz, J.** (1991). Influence of dietary citric acid and calcium on the bioavailability of orally administered chlortetracycline in piglets. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A*, **38**: 755-762.
- Yamamoto, K., Koshimizu, K.** (1984). In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics. *International Pig Veterinary Society Congress*, **8**: 116.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T.** (1978). Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **6**: 547-558.
- Zhanel, G. G., Hoban, D. J., Harding, G. K.** (1991). The postantibiotic effect: a review of in vitro and in vivo data. *DICP.*, **25**: 153-163.

5.2. COMPARATIVE PHARMACOKINETICS AND ANTIMICROBIAL EFFICACY OF FEED-ADMINISTERED TETRACYCLINES IN WEANED PIGS [*JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS* (2000 – SOUMIS)].

Jérôme R. E. del Castillo (1, 2), Guy P. Martineau (3), Jean-Guy Besner (1)

(1) Faculté de pharmacie, Université de Montréal. CP 6128 - Succ. Centre-Ville. Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

(2) Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 Canada

(3) École Nationale Vétérinaire de Toulouse. 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

5.2.1. Abstract

Five week-old barrows were used in a dose-escalation study to assess and compare the pharmacokinetics and clinical efficacies of feed-administered chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC). Medicated pigs (n=34 per drug) received either drugs intravenously (5 mg/kg) and in feed (11, 22, 33 or 44 mg/kg/meal; n_≥8 pigs/dose/drug). Non-compartmental pharmacokinetic analysis was applied on data from i.v. and single in-feed dosages of these drugs, and at steady state of a feed dosing regimen given at 12 h intervals. At 103 h of the dosing regimen, medicated pigs and drug-free pigs (n=36) were inoculated with a serotype-1 *A. pleuropneumoniae* isolate (MIC=2 µg/mL for both drugs). Significant differences (p<0.05) between CTC and OTC were found for oral bioavailability, systemic clearance and steady-state volume of distribution. The average plasma concentrations at steady state (C_{avg}) of these drugs increased linearly with dose. The severity and lesions of

pleuropneumonia decreased nonlinearly as a function of C_{avg} , and reached minimum values with concentrations approximately half the MIC. At identical doses, plasma concentrations and prophylactic efficacy against pleuropneumonia given by feed-administered CTC were significantly greater than those of OTC. Therefore, these drugs should not be treated as clinical equivalents for oral administration in pigs.

5.2.2. Keywords

Pharmacokinetics; Pharmacodynamics; Chlortetracycline; Oxytetracycline; In-feed; Experimental infection; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Pigs;

5.2.3. Introduction

Antimicrobial chemotherapy is not a straightforward task because bacteria are heterogeneous, genetically non-stationary targets, and because pharmacokinetic behaviour of drugs markedly depends on the nature of tissues that potentially harbour infection. The use of antimicrobials in animal populations brings an additional level of complexity because of intrinsic inter-individual variability, the use of feed and drinking water as vehicles for medication and the presence of external factors that affect both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses of drugs. Due to the number of animals to treat in a patient population and the limited pharmacy budget, veterinary practitioners working with pigs, poultry or other industry-sized herds often chose older, less expensive antimicrobials for disease control. In 1985, approximately 60% of antibiotic usage in food animals in the United States of America was for pig production (Prescott, 1997), and according to recent European data (FEDESA, 1998) tetracyclines are the most heavily prescribed drugs in animal health.

Resistance to the tetracyclines became widespread among human pathogenic bacteria and the use of these drugs in human medicine was curtailed (Chopra *et al.*, 1992) before therapeutic regimens could be optimised with

pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) methods (Vogelman *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1998). Hence, prospective studies must be performed to better document the concentration-response relationship of the older tetracyclines and find dosing regimens that maximise the therapeutic effect in pigs and minimise the risks of toxicity, drug residues in edible tissues and drug resistance development (Apley *et al.*, 1998). In population therapeutics, accurate estimations of inter-individual variability in the dose-concentration and concentration-effect relationships are mandatory to optimise the drug regimen: the intended effect should be reached in as much animals at risk as possible. Therefore, classic PK/PD protocols with intensive individual sampling and measurement schedules are not appropriate because too few subjects are used, and their results can not be safely generalised to a population scale. Increasing sample size improves the accuracy in estimating the magnitude of inter-individual PK/PD variability and sometimes allows to identify its sources.

In pig veterinary practice, chlortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) and tetracycline (TC) are generally considered to be equivalent with respect to antimicrobial and therapeutic efficacies and thus are prescribed at identical regimens for the same indications (Agriculture Canada, 1998). However, significant differences in lipid solubility between these drugs are found in the range of physiological pH (Colaizzi and Klink, 1969), and a meta-analysis of peer-reviewed publications showed that their bioavailabilities, clearances and distribution volumes after oral administration in pigs differ as well (del Castillo *et al.*, 1998). In the latter study, simulated plasma concentrations of CTC were twice as high as those of OTC when identical in-feed dosages are administered, which agrees with experimental data (Nielsen and Gyrd-Hansen, 1996). These differences in plasma concentrations may significantly reflect on their respective clinical efficacies.

As no formal PK/PD comparison between these drugs has been performed yet, the aims of this study were (1) to assess and compare the pharmacokinetics and bioavailabilities of CTC and OTC given in feed to a large sample of growing

pigs, and (2) to correlate their plasma concentrations at steady state with clinical efficacy against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype-1 experimental disease when using different in-feed doses in the range of current pig veterinary practice. Focus will be placed on the inter- and intra-individual variabilities in the PK and PD responses in each group.

5.2.4. Materials and methods

The experimental protocol was approved by the University's Ethics Committee, and pigs were handled according to the directives of the Canadian Council on Animal Care (Olfert, 1993).

5.2.4.1. *Animals and housing*

Mixed-breed barrows (n=104), weaned at 3 weeks of age, were purchased in groups of 12 at the age of 4-5 weeks (approximately 9 kg body mass – BM) from a herd apparently free of PRRS virus, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 3, 5 and 7, *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, TGE virus, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Sarcoptes scabiei*, as determined by periodic clinical, serology and slaughter checks. After clinical examination, pigs were randomly placed in individual cages in two disinfected rooms with a capacity of holding 6 cages. From the day of entry (day 1) to day 4, pigs were allowed to acclimatize to the new environment and handling and were trained to enter a transport box for daily weighing before morning meals. On day 3, jugular catheters were placed surgically in all pigs.

5.2.4.2. *Antibiotics and chemicals*

Hydrochloride salts of CTC and OTC (Sigma Chemical Co.), with respective purities of 79% and 100%, were used for i.v. administration. Commercial feed premixes with potencies equivalent to 0.220 g of drug hydrochloride per g of product were used for oral administration (CTC: Aureomycin® 100G).

Hoffmann – La Roche Ltd.; OTC: Terramycin* 100. Pfizer Canada Inc. Animal Health Group). Equivalences in antibiotic base were calculated for the pharmacokinetic analysis. Reagent grade chemicals were used in the HPLC determination of drug concentrations in plasma.

5.2.4.3. *Medicated feeds*

A batch of drug-free, standard corn-soy feed (VITA distribution 1988 Inc. St-Valérien, QC, Canada) purchased the day of pig arrival was divided into 5 aliquots: one non-medicated, two to medicate with the CTC premix, and two to medicate with the OTC premix. Equivalent concentrations of CTC hydrochloride and OTC hydrochloride in feed were 550, 1100, 1650 or 2200 mg kg⁻¹. Two feed dosage levels of each drug were tested per block, following a randomised sequence (Table 1).

Pigs had free access to water during the whole stay in the facilities, and were fed at 8:00, 14:00 and 20:00 with amounts corresponding respectively to 2%, 1% and 2% of body mass, in agreement with guidelines (National Research Council, 1988).

Table 1. Randomisation of medicated feeds across blocks.

Drug	Dose (mg/kg feed)	Block								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9 [§]
CTC	550		X	X			X		X	X
	1100		X		X	X		X		
	1650	X		X		X			X	X
	2200	X			X		X	X		
OTC	550		X	X			X		X	X
	1100		X		X	X		X		X
	1650	X		X		X			X	X
	2200	X			X		X	X		X

§ “add-on” group: CTC and OTC tested in both rooms.

5.2.4.4. Experimental procedures

In each block, pigs were randomly distributed among drug-free (n=36), CTC and OTC groups (n=34 pigs/drug). One drug was tested per room, and drugs alternated between rooms from one block to another (e.g. block 1: CTC in room A and OTC in room B; block 2: vice-versa). In each room, drug-free pigs were systematically placed between a pair of medicated pigs to allow an equal amount of contact with each of them during the disease challenge. All pigs received drug-free feed during the acclimatization period and on day 5. On day 5, immediately before the 8:00 meal, pigs in the medicated groups were injected intravenously with approximately 5 mg kg⁻¹ BM of CTC or OTC products. Blood was sampled before and at 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 4.5 – 6 – 12 and 24 h after dosage. On Day 6, immediately after the 24 h blood sampling, CTC and OTC pigs were served one of the two medicated feeds to be tested (Table 1), providing 11, 22, 33 or 44 mg/kg BM of CTC or OTC hydrochlorides (n_≥8 pigs/dose/drug). Blood samples were taken at 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 3 – 6 – 9 – 12 and 24 h after the medicated meal was served and the other two meals were drug-free. From Day-7 to the end of experiment, pigs in the CTC and OTC groups were given the same medicated feeds at 8:00 and 20:00 (14:00 servings were drug-free). Control pigs received drug-free feed at all times. On Day-10, blood samples were taken in medicated pigs immediately before and at 1 – 2 – 3 – 6 – 9 and 12 h after the 8:00 meal.

On Day-11, 7 h after the morning meal, all pigs were inoculated intra-nasally with a serotype-1 *A. pleuropneumoniae* suspension (range: [1.50—5.28] × 10⁸ colony forming units per pig). The minimum inhibitory concentration (MIC) of the test bacterium was 2 µg/mL for both drugs. Pigs were examined at 20:00 and 8:00 (i.e. 5 and 17 h after inoculation): posture, demeanour, breathing (rate, depth, movements and effort), feeding (behaviour, duration and intake), and the occurrence of cough or vomiting were assessed at each monitoring time. Each symptom was rated (Table 2) and a clinical score (SCORE) was developed

with the sum of ratings recorded at each clinical examination. The maximum possible SCORE for a surviving pig was 22, so dead pigs were attributed a SCORE of 23.

Table 2. Rating chart of pleuropneumonia clinical signs.

Clinical sign	Severity			
	Absent	moderate or present	severe	extreme
Dyspnea	0	1	2	3
Apathy	0	1	2	N/A
Feed refusal	0	0.75	1.5	N/A
Prostration	0	1	N/A	N/A
Cough	0	1	N/A	N/A
Vomiting	0	1	N/A	N/A
Shallow breathing	0	0.5	N/A	N/A

N/A: not applicable

Pigs that survived up to 22 h after inoculation received barbiturate euthanasia. Lungs were examined at necropsy, and pleuropneumonia lesions (hemorrhagic necrosis, oedema, fibrinous pleuritis, lung abscesses) were characterized and measured on each pulmonary lobe. The proportion of lungs affected by pleuropneumonia (EXTENT) was determined with standard methods (Straw *et al.*, 1986). Blood, normal lung and diseased lung samples were taken at necropsy.

5.2.4.5. *Blood sample handling and data analysis*

Blood samples taken with heparinized evacuated tubes were centrifuged for 15 min at 1500 g and 7°C immediately after collection, and harvested plasma was kept at -70°C pending analysis. CTC and OTC concentrations in plasma were measured with an HPLC-UV method. Briefly, 1 mL plasma samples were supplemented with 1.5 µg of purified demethyl-chlortetracycline internal

standard, followed by 100 μ L of trifluoroacetic acid for precipitation of plasma proteins, incubated for 20 min at 37°C, and centrifuged at 16000 g. Filtered supernatants were injected in the HPLC apparatus. The lower limit of quantification was 0.03 mg/L for both drugs. The technique successfully passed the validation process.

Plasma concentration data was subject to standard two-stage pharmacokinetic analysis. In the first stage, non-compartmental pharmacokinetic analysis was applied on individual sets of data (Yamaoka *et al.*, 1978). The areas under the zero- and first-moment curves (i.e. AUC and AUMC, respectively) were calculated with WinNonlin (Pharsight Corp. Cary, U.S.A.) using the linear/log trapezoidal rule (Purves, 1992). As measurable plasma concentrations of the i.v. dose which were present at the time of the single in-feed dosage, the corresponding portion of the AUC was subtracted from the AUC of the single in-feed dosage for the calculation of bioavailability (F), clearance (CL), volume of distribution (V) and mean residence time (MRT). The average plasma concentration at steady state (C_{avg}) and all other kinetic parameters were calculated with standard formulas (Anonymous, 1985).

In the second stage of analysis, descriptive and inferential statistic analysis was performed on the collection of individual pharmacokinetic results. Analysis was performed with SAS 6.12 (SAS Institute. Cary, U.S.A.), and significance level was set to 0.05 for all tests. The natural logarithmic transformation was applied on variables showing left-skewed asymmetrical distributions before statistical analysis. The density of the lognormal distribution was used to derive the mean and standard deviation of variables showing left-skewed distributions (Mood *et al.*, 1974).

Linear regression analysis was applied on AUC, C_{max} and t_{max} of each drug to assess the independence of their oral pharmacokinetics with respect to dose. Appropriate weighting schemes were used in the regression to obtain homoscedastic, randomly scattered residuals (Draper and Smith, 1998). If C_{max}

and AUC prove to increase linearly with dose, and t_{\max} remains unchanged, then plasma concentrations are normalized with the formula

$$C_p(\text{normalized}) = C_p \times \text{DOSE}_{\text{std}} / \text{DOSE}$$

to compare the AUC, C_{\max} , and t_{\max} of CTC and OTC oral kinetic profiles (Rowland and Tozer, 1994). The DOSE_{std} was set to 22 mg/kg for the single dose kinetic profile, and to 11 mg/kg for the steady-state kinetic profile (i.e. 22 mg/kg/day). Student's tests (paired or two-sample), Mann-Whitney or Wilcoxon signed-rank tests, least-squares linear regression analysis or logistic regression analysis were used depending on the nature of the pharmacokinetic parameter to be analysed and the identification of covariates. The χ^2 test of homogeneity was used to compare the distributions of ratings among treatment groups for each symptom used in the clinical score. The effect of drug on SCORE and EXTENT was first assessed with a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test for *post-hoc* multiple comparisons (Daniel, 1990). Bivariate relationships among SCORE, EXTENT, and C_{avg} were assessed with nonlinear regression analysis. As the SCORE- C_{avg} and EXTENT- C_{avg} relationships could be described both with negative exponential and inhibitory Hill models (Holford and Sheiner, 1981), final model selection was made by evidencing breakpoints of the new variables

$$Y'_i = \text{rank}^{-1} \times \sum_{l=1 \rightarrow \text{rank}} Y_l$$

created after sorting each Y variable by ascending C_{avg} and by descending C_{avg} .

5.2.5. Results

No adverse effects related with drug administration were observed during the whole duration of the study. Three pigs (one per treatment group) became ill, probably because of catheter contamination, and were retired from the study. Four pigs (two medicated with CTC and two with OTC) whose catheters lost patency during the course of the study were kept for the *A. pleuropneumoniae* challenge. All other pigs had complete data sets. The estimates of CTC and OTC pharmacokinetic parameters associated with the three sampling periods are respectively presented in Tables 3 and 4.

Table 3. Estimates (mean \pm standard deviation) of pharmacokinetic parameters of CTC after intravenous and single in-feed administrations, and 72 h after the onset of a multiple dose regimen q.12h (oral doses equivalent to 11, 22, 33 or 44 mg/kg BM of CTC-HCl per meal).

Parameter	Unit	Administration		
		Intravenous	Feed (single)	Feed (72 h)
Body mass	kg	10.57 \pm 1.35	11.29 \pm 1.39	13.04 \pm 1.77
Dose (drug base)*	mg/kg	3.84 \pm 0.47	-	-
Meal duration*	h	-	0.62 \pm 0.24	0.50 \pm 0.15
F*	%	-	27.2 \pm 9.5	24.1 \pm 9.9
CL	L h ⁻¹ kg ⁻¹	0.47 \pm 0.12	0.44 \pm 0.11	0.37 \pm 0.10
V* ^a	L kg ⁻¹	3.79 \pm 1.24	3.51 \pm 1.01	3.72 \pm 1.61
MRT	h	8.32 \pm 2.38*	10.63 \pm 1.14	11.27 \pm 2.56*
λ_z	h ⁻¹	0.099 \pm 0.022	0.126 \pm 0.018	0.110 \pm 0.030
Accumulation*	%	-	-	142 \pm 20

* Estimates derived from the density of log-normal distributions.

^a V_{ss} for intravenous administration, V_z for feed administration.

Table 4. Estimates (mean \pm standard deviation) of pharmacokinetic parameters of OTC after intravenous and single in-feed administrations, and 72 h after the onset of a multiple dose regimen q.12h (oral doses equivalent to 11, 22, 33 or 44 mg/kg BM of OTC-HCl per meal).

Parameter	Unit	Administration		
		Intravenous	Feed (single)	Feed (72 h)
Body mass	kg	10.63 \pm 1.65	11.26 \pm 1.78	13.00 \pm 2.23
Dose (drug base)*	mg kg ⁻¹	4.64 \pm 0.44	-	-
Meal duration*	h	-	0.58 \pm 0.23	0.45 \pm 0.13
F*	%	-	5.06 \pm 1.95	5.05 \pm 2.18
CL*	L h ⁻¹ kg ⁻¹	0.35 \pm 0.05	0.33 \pm 0.05	0.28 \pm 0.07
V* ^a	L kg ⁻¹	2.54 \pm 0.40	3.64 \pm 0.93	3.30 \pm 0.81
MRT	h	7.32 \pm 0.63*	12.87 \pm 2.14	13.39 \pm 2.96*
λ_z	h ⁻¹	0.116 \pm 0.011	0.095 \pm 0.018	0.089 \pm 0.023
Accumulation	%	-	-	158 \pm 23

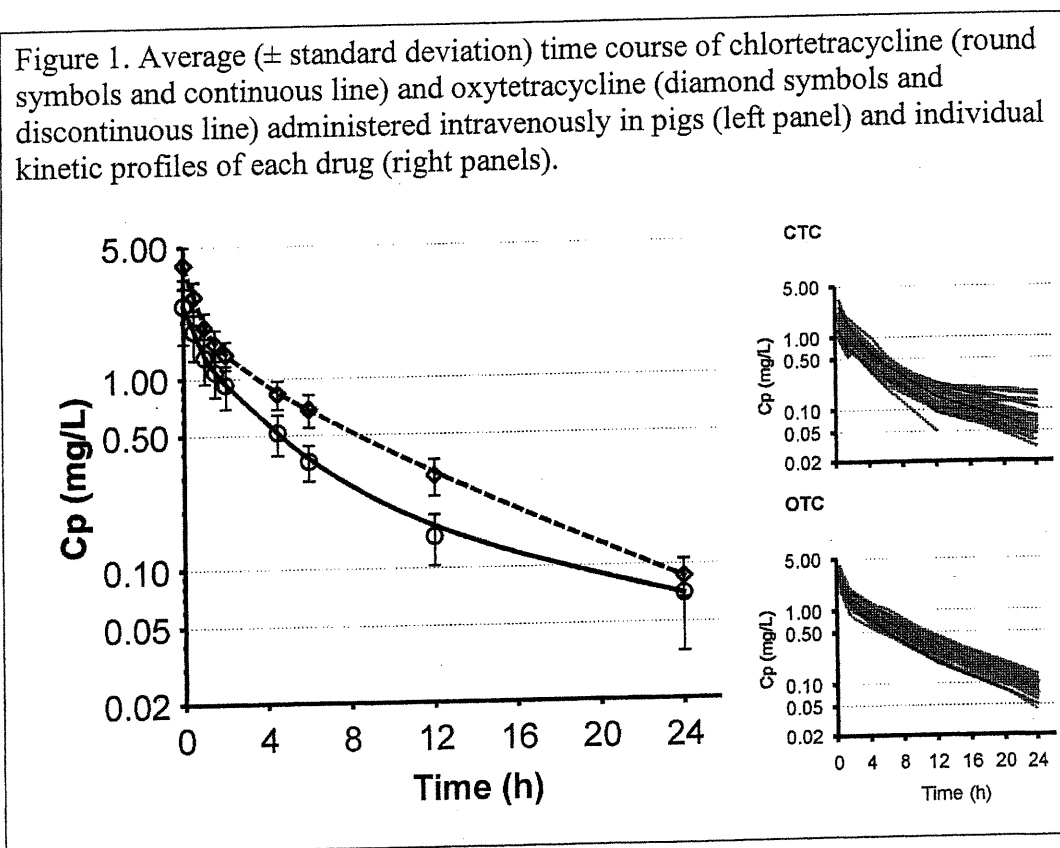
* Estimates derived from the density of log-normal distributions.

^a V_{ss} for intravenous administration, V_z for feed administration

5.2.5.1. Pharmacokinetics of i.v. administered CTC and OTC

Medicated pigs were 10.6 ± 1.5 kg on day 5. Measurable plasma concentrations of these drugs were found for 24 h in all pigs but one, which received CTC. The kinetic profile of OTC showed two distinct phases, with a rapid fall of plasma concentration during the first 2 h after dosage and a slower decay afterwards (Figure 1). The CTC kinetic profile was similarly shaped, but its terminal elimination phase appeared to be more concave.

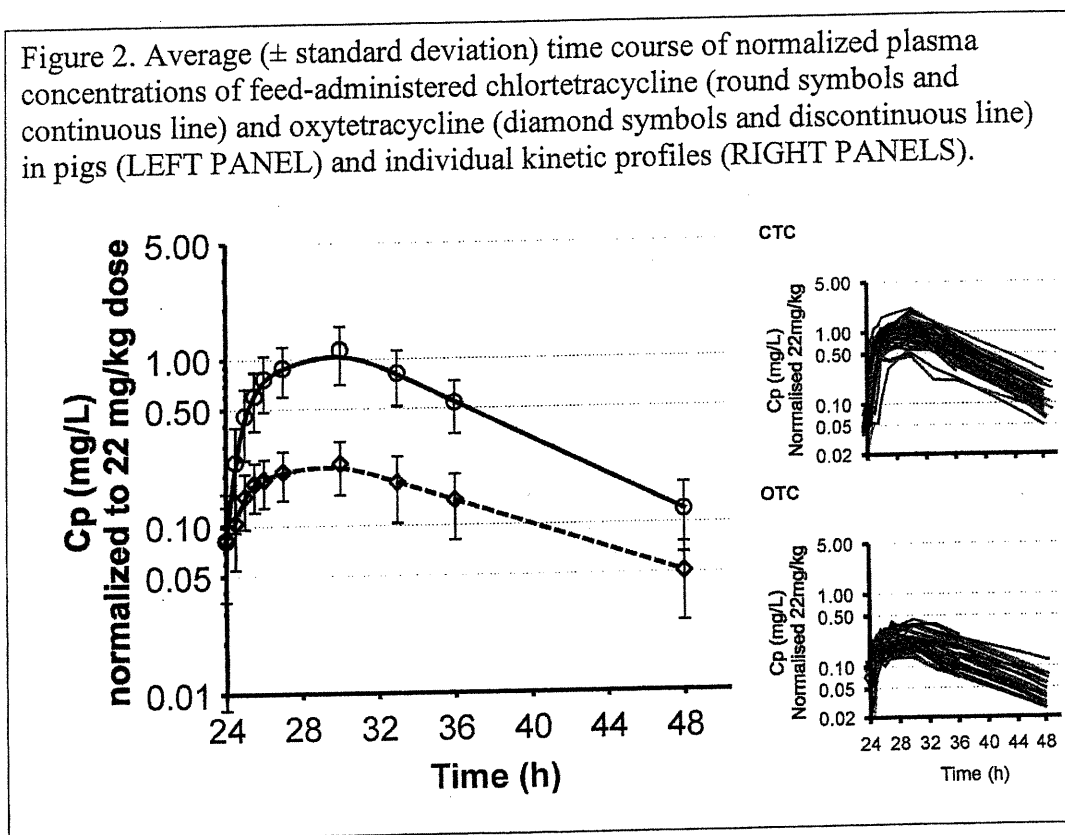
Estimates of CL and V_{ss} of CTC and OTC significantly differed ($p=0.0001$ in both cases): both were greatest for CTC. No significant difference was found for their MRT, but the one for λ_z was significant ($p=0.0001$), which correspond to half-lives of 7.4 ± 1.9 h for CTC and 6.0 ± 0.5 h for OTC (lognormal distribution).



5.2.5.2. Pharmacokinetics of CTC and OTC single in-feed dosage

Medicated feeds were totally consumed in 36 ± 14 min (lognormal distribution), irrespective of the type of drug and in-feed concentration. Drug concentrations in plasma were above the limit of quantification during 24 h in 33 of 34 pigs receiving CTC, but in 21 of 34 pigs receiving OTC. The likelihood of finding a measurable concentration 24 h after serving was significantly influenced by the type of drug and in-feed concentration ($p=0.0023$ and $p=0.0147$, respectively). As shown in Table 5, the AUC and C_{max} of both drugs increased linearly with dose and t_{max} remained constant (mode=6 h for both drugs). Inter-individual variation in C_{max} and AUC also increased with dose.

Figure 2 illustrates the time course of dose-normalised concentrations of each drug in plasma. Their normalised C_{max} and AUC significantly differed ($p < 0.0001$ in both cases): those of CTC were respectively about 4.6 and 4.2



times greater than those of OTC. These drugs also shown significant differences in F ($p < 0.0001$), CL ($p = 0.0001$), λ_z ($p < 0.0001$) and MRT ($p = 0.0001$). As opposed to the i.v. dosage, λ_z of feed-administered CTC was steeper than that of OTC, which respectively correspond to half-lives of 5.6 h and 7.6 h. Individual variation was large for most kinetic parameters: F ranged between 12.7% and 44.5% for CTC and between 2.2% and 9.9% for OTC, which result in coefficients of variation (CV) of 35% and 39%, respectively. The CV of these drugs were respectively 26% and 15% for CL, and 33% and 25% for Vz.

Table 5. Effects (weighted linear regression coefficient \pm standard error) of dose and meal duration on the area under the curve of plasma concentration over time, peak plasma concentration and the time of peak plasma concentration of feed-administered CTC and OTC in pigs.

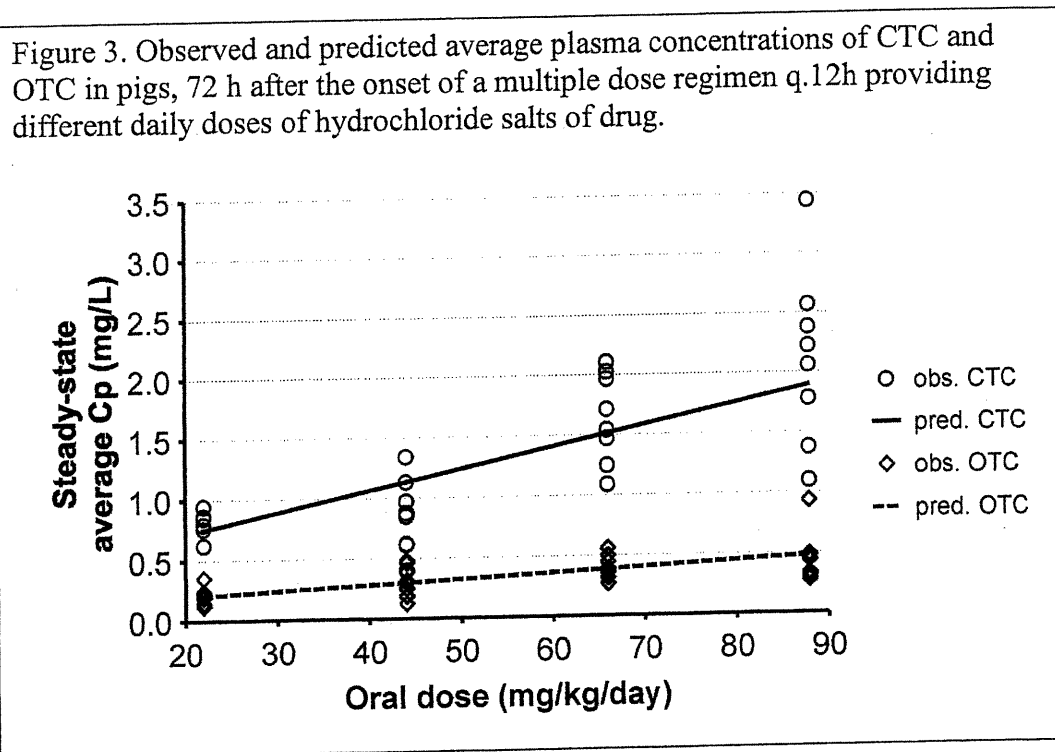
Dosage	Parameter (units)	Drug	Dose (mg/kg)		Duration (h)	
			Coefficient *	Significance	Coefficient *	Significance
Single dose	AUC (h mg L ⁻¹)	CTC	0.478 \pm 0.068	0.0001	-0.25 \pm 2.57	NS
		OTC	0.096 \pm 0.018	0.0001	-0.85 \pm 0.76	NS
	C _{max} (mg L ⁻¹)	CTC	0.044 \pm 0.07	0.0001	-0.15 \pm 0.27	NS
		OTC	0.007 \pm 0.001	0.0001	-0.07 \pm 0.04	NS
	t _{max} (h)	CTC	-0.006 \pm 0.026	NS	0.88 \pm 0.98	NS
		OTC	0.053 \pm 0.031	NS	-2.74 \pm 1.32	0.0461
Steady state §	AUC (h mg L ⁻¹)	CTC	0.470 \pm 0.079	0.0001	6.27 \pm 6.23	NS
		OTC	0.101 \pm 0.023	0.0001	-0.42 \pm 1.74	NS
	C _{max} (mg L ⁻¹)	CTC	0.052 \pm 0.008	0.0001	0.67 \pm 0.67	NS
		OTC	0.011 \pm 0.003	0.0003	0.03 \pm 0.21	NS
	t _{max} (h)	CTC	0.007 \pm 0.022	NS	-2.06 \pm 1.73	NS
		OTC	0.008 \pm 0.018	NS	-3.96 \pm 1.37	0.0074

* Null hypothesis: coefficient=0 (i.e. variable is independent of dose or meal duration); NS: P>0.05.

§ Steady-state: AUC associated with the dosing interval ($\tau = 12$ h).

5.2.5.3. Pharmacokinetics of CTC and OTC in feed at steady-state

According to the lowest λ_z calculated from the kinetic profiles of the single in-feed dose, more than 99% of steady state was reached theoretically at day 10 when blood sampling was performed (i.e. 72 h after the onset of the multiple dose regimen). At this time, pigs were 13.0 ± 2.0 kg BM. Medicated meals were totally consumed in 28 ± 8 min. Measurable plasma concentrations of CTC and OTC were found during the 12 h sampling period in the 60 pigs whose catheters remained functional. Plasma concentrations of drug at 8:00 were approximately 50% higher (lognormal distribution) than at 20:00 in all pigs, a significant difference ($p=0.0001$). Peak plasma concentration occurred 2-4 h after the beginning of the meal, and a terminal elimination phase was found in the 6-12 h interval. The AUC and C_{max} increased linearly with dose, and t_{max} remained constant for both drugs (Table 5). The C_{avg} of both drugs increased linearly with dose, and individual variation also increased as a function of mass-adjusted dose (Figure 3). The following equations were obtained with



1/Dose weighted regression:

- CTC: $C_{avg} = 0.276 + 0.019 \cdot \text{Dose}$
- OTC: $C_{avg} = 0.124 + 0.004 \cdot \text{Dose}$

Where Dose is the equivalent daily dosage of drug hydrochloride (mg/kg/day). Dose-normalized C_{avg} were significantly different ($p < 0.0001$): 3.7 times higher for CTC than for OTC. The F and CL of CTC at steady state still significantly differed from those of OTC ($p < 0.0001$ and $p = 0.0001$, respectively), but not their V_z . In addition, significant differences were found for their MRT and λ_z ($p = 0.0044$ and $p = 0.0031$, respectively), and their elimination half-lives were respectively 6.8 ± 1.9 h and 8.3 ± 2.1 h. Hence, the dosing regimen at 12 h intervals resulted for both drugs in about 42% and 58% accumulation with respect to the first oral dose.

5.2.5.4. *Bias in estimates of oral pharmacokinetic parameters*

Figure 4 illustrates the mean kinetic profiles of CTC and OTC as a function of the route of administration. Linear regression through the origin showed that estimates of disposition kinetic parameters of both drugs derived from the oral experiment correlated to those derived from the i.v. administration (Table 6), but regression coefficients significantly differed from 1. Residual variance could not be explained by dose. For both drugs, CL estimates associated with the single in-feed dosage were lower than those of the i.v. administration. The oral kinetic profile of OTC had a lower λ_z than that of the i.v. administration and its V_z was higher than V_{ss} . In contrast, λ_z and V_z associated with the single in-feed dosage of CTC produced the opposite results with respect to the i.v. administration. At steady state during the dosage regimen, the above-described discrepancies between drugs disappeared, but coefficients of V_{ss} and λ_z of i.v. administered CTC did not significantly differ from 1 (Table 6). The

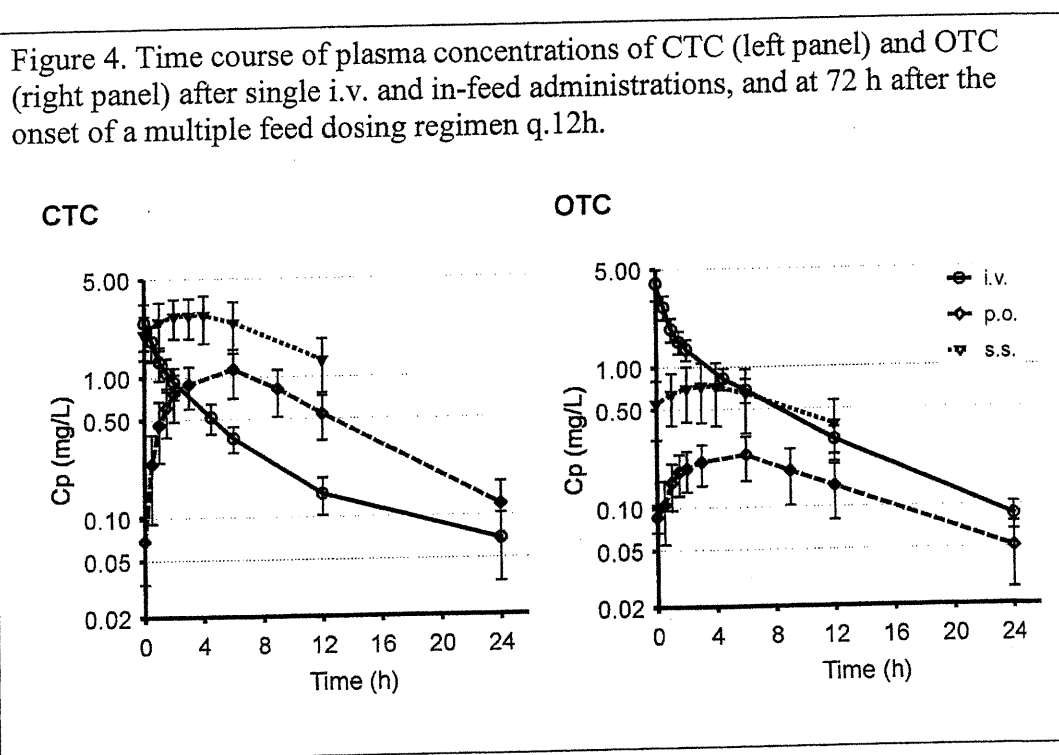
F estimates of both drugs at steady state were lower than those associated with the single in-feed dosage, but the difference was significant only for CTC ($p=0.02$).

Table 6. Effect (linear regression coefficient \pm standard error) of feed administration (single and steady state doses) on the estimates of clearance, volume of distribution and terminal slope of CTC and OTC in pigs with respect to i.v.-derived estimates (Note: regression through the origin).

Drug	Parameter	Unit	Single dose		Steady-state	
			Coefficient	Significance*	Coefficient	Significance*
	CL	$L h^{-1} kg^{-1}$	0.936 ± 0.006	0.0001	0.806 ± 0.007	0.0001
CTC	V	$L kg^{-1}$	0.885 ± 0.042	0.0106	0.949 ± 0.063	NS
	λ_z	h^{-1}	1.228 ± 0.049	0.0001	1.071 ± 0.063	NS
	CL	$L h^{-1} kg^{-1}$	0.944 ± 0.006	0.0001	0.807 ± 0.016	0.0001
OTC	V	$L kg^{-1}$	1.416 ± 0.054	0.0001	1.258 ± 0.060	0.0001
	λ_z	h^{-1}	0.810 ± 0.029	0.0001	0.764 ± 0.035	0.0001

* Null hypothesis: coefficient=1 (i.e. oral estimate = i.v. estimate);

NS: $P > 0.05$



5.2.5.5. *Prophylactic efficacy as a function of plasma concentration*

Pigs were 13.5 ± 2.2 kg BM at the time of challenge with *A. pleuropneumoniae*, 103 h after the onset of the feed dosage regimen. Disease was clinically evident at the time of first monitoring, and 15 pigs died within 22 h post-infection. Death rate was different across medicated groups ($p=0.017$): 3% in the CTC group, and 21% in the OTC group.

The main symptoms of experimental pleuropneumonia were dyspnoea, apathy, anorexia and vomiting (Table 7). Clinical signs ratings were significantly different across the drug-free, CTC and OTC groups at one or both examination times ($p<0.05$): pigs in the CTC group had significantly lower ratings than the other two groups.

Hence, SCORE significantly differed among drug-free, CTC and OTC groups ($P<0.0001$). *Post-hoc* comparison revealed that SCORE had lower values in CTC pigs than in OTC and drug-free pigs, which had similar SCORE values. EXTENT values were significantly different among treatment groups ($p<0.0001$): those in CTC pigs were smaller than those in OTC and drug-free pigs. In the two latter groups, EXTENT values were similar (Figure 5).

The relationship between SCORE and EXTENT was adequately described with the Hill model (Table 8). Plots of the transformed SCORE and EXTENT versus C_{avg} revealed two breakpoints, one at 0.25 mg/L and the other at 1.0 mg/L, which is compatible with an inhibitory Hill model (Figure 6; Table 8). Highest values and largest inter-individual variabilities in SCORE and EXTENT were found at $C_{avg} < 0.25$ mg/L, and lowest values and smallest inter-individual variabilities were found at $C_{avg} > 1$ mg/L. Between these two breakpoints, disease severity and inter-individual variability in SCORE and EXTENT declined as a function of C_{avg} .

Table 7: Number of pigs per rating for the more relevant clinical parameters monitored in pigs following the *A. pleuropneumoniae* inoculation.

Symptom	Group	No. of pigs per rating									
		Rating, 5 h post-challenge					Rating, 17 h post-challenge				
		0	1	2	3	Significance	0	1	2	3	Significance
Dyspnea	DF [#]	6	16	11	2		6	9	9	6	
	CTC	19	12	2	0	0.009	20	9	3	0	0.003
	OTC	11	11	8	3		7	12	4	4	
Apathy	DF	8	11	16	N/A*		5	8	17	N/A	
	CTC	19	10	4	N/A	0.002	25	4	3	N/A	0.001
	OTC	8	7	18	N/A		8	9	9	N/A	
Prostration	DF	34	1	N/A	N/A		21	9	N/A	N/A	
	CTC	32	1	N/A	N/A	NS	32	0	N/A	N/A	0.004
	OTC	30	3	N/A	N/A		23	4	N/A	N/A	
Feed refusal [§]	DF	8	10	17	N/A		4	6	20	N/A	
	CTC	21	8	4	N/A	0.001	24	5	3	N/A	0.001
	OTC	7	8	18	N/A		10	6	10	N/A	
Vomiting	DF	20	15	N/A	N/A		22	8	N/A	N/A	
	CTC	31	2	N/A	N/A	0.001	30	2	N/A	N/A	0.037
	OTC	18	15	N/A	N/A		24	2	N/A	N/A	

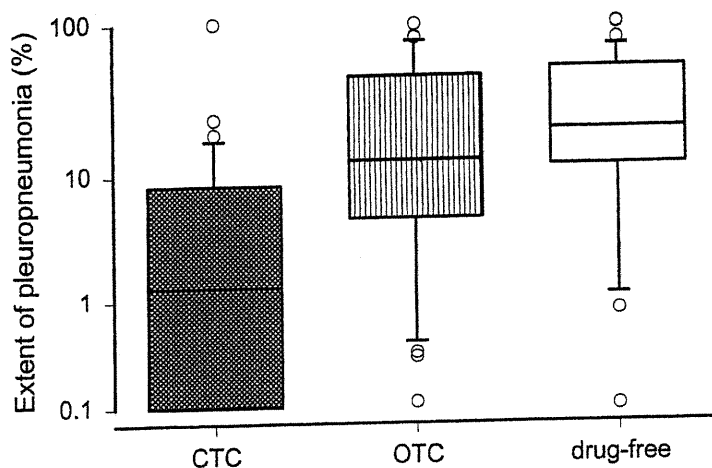
[#] DF: drug-free

* N/A: not applicable.

NS: $P > 0.05$ (i.e. no significant heterogeneity across groups).

[§] Ratings of FEED REFUSAL rounded to the next higher whole number

Figure 5. Distribution of the relative extent of pleuropneumonia (i.e. EXTENT) among pigs receiving drug-free feed, or feeds supplemented with CTC or OTC.



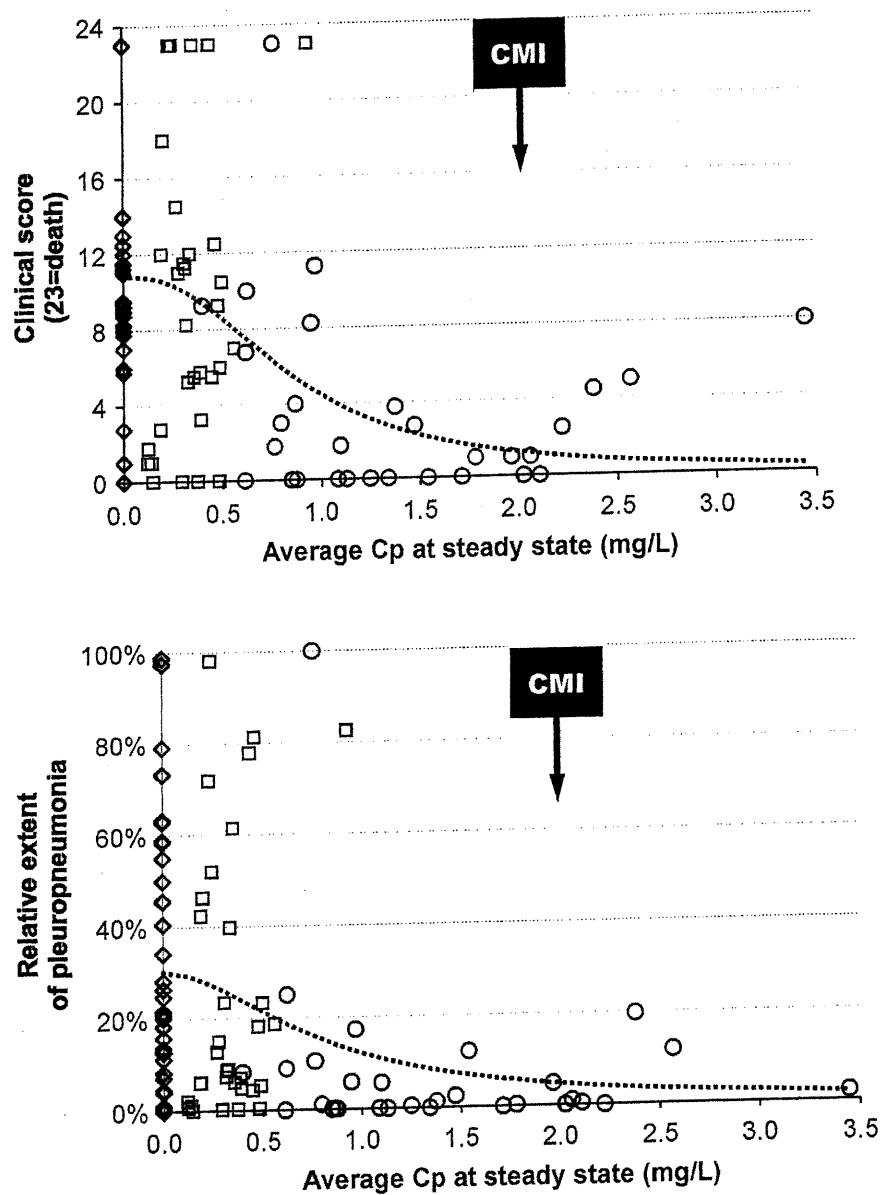
LEGEND: Box: interquartile range; horizontal bar: median; whiskers: 10th and 90th percentiles of the distribution; circles: pigs with EXTENT values outside of the 10th – 90th percentile range.

Table 8. Relationships between SCORE (range: 0—23), EXTENT (range: 0—1) and the average plasma concentration of drug at steady state (Note: in the models, ε represents the residual error term).

Y variable	Score		Lesions		Score	
X variable	C_{avg}		C_{avg}		Lesions	
Model	$Y = Y_{max} \cdot \left(1 - \frac{X^\gamma}{X_{50}^\gamma + X^\gamma} \right) + \varepsilon$		$Y = Y_{max} \cdot \left(1 - \frac{X^\gamma}{X_{50}^\gamma + X^\gamma} \right) + \varepsilon$		$Y = \frac{Y_{max} \cdot X^\gamma}{X_{50}^\gamma + X^\gamma} + \varepsilon$	
Correlation (Y_{obs}, Y_{pred})	0.43		0.34		0.90	
Parameter	Estimate	SEM*	Estimate	SEM	Estimate	SEM
Y_{max}	10.85	1.04	0.302	0.042	23.0	3.4
X_{50}	0.862	0.210	0.806	0.319	0.213	0.070
γ	2.42	1.28	1.86	1.27	1.14	0.24

* SEM: standard error of the estimate

Figure 6. Effect of average CTC or OTC plasma concentrations on clinical score and relative extent of lesions in pigs experimentally challenged with serotype-1 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (MIC = 2 mg/L for both drugs)



SYMBOLS: dotted line = predicted (Table 8); diamonds = drug-free; squares = OTC; circles = CTC.

5.2.6. Discussion

This study aimed to document the dose-effect relationship of the first-generation tetracycline derivatives used in pig veterinary practice. The comparative efficacy of this family of drugs has been controversial for many years, both in veterinary and human therapeutics (Kunin and Finland, 1961). To be clinically equivalent, their dose-effect relationships should be similarly shaped and located, but this type of correlation in a population is typically obscured by inter-individual variation in drug absorption, distribution and elimination, as well as in the response to infection (Hashimoto and Sheiner, 1991). Therefore, in this study the pharmacokinetics of CTC and OTC was determined in pigs to be infected with *A. pleuropneumoniae*. The test bacterium was equally susceptible to CTC and OTC, which otherwise would have been a confounding factor. Hence, clinical efficacy is evaluated as a function of both dose and plasma concentration, which allows to discriminate between pharmacokinetic and pharmacodynamic sources of variability.

Experimental *A. pleuropneumoniae* inoculation produces a known, reproducible systemic disease which has been used to evaluate the efficacy of antibiotic regimens in pigs (Moore *et al.*, 1996). Upon inoculation, *A. pleuropneumoniae* cells divide and intimately adhere on respiratory tract cells by means of the LPS (Rioux *et al.*, 1999). Pore-forming Apx toxins released by this pathogen (Frey *et al.*, 1993) destroy pneumocytes, alveolar macrophages and capillary endothelium, and induce an oxydative burst in macrophages and neutrophils (Haesebrouck *et al.*, 1997). Moreover, injured lung cells release cytokines TNF, IL-1 β and IL-8, which lead to polymorphonuclear leukocyte infiltration and an exacerbation of the inflammatory response (Huang *et al.*, 1999). Other virulence factors such as LPS, proteases, capsule and iron-scavenging proteins contribute to the disease, but Apx I and Apx III toxins are able by themselves to reproduce the overall clinical and pathological portrait of pleuropneumonia (Kamp *et al.*, 1997).

The prophylactic effect of the tetracyclines against experimental pleuropneumonia may be associated with their antimicrobial and anti-inflammatory activities. These drugs decrease the rate of division and increase death rate in *A. pleuropneumoniae* (Norcia *et al.*, 1999), and may decrease the rate of synthesis or the expression of its proteic virulence factors (Lorian 1996). In addition, tetracyclines inhibit the activities of protein kinase C and matrix metalloproteinases in phagocytes, which would lead to decreased cytokine secretion and prevent an exaggerated inflammatory response (Golub *et al.*, 1991; Shapira *et al.*, 1996). Bacteriostatic drugs apparently possess time-dependent pharmacodynamics, for which the duration of bacterial exposure to supra-MIC drug concentrations is said to be the best predictor of therapeutic efficacy (AliAbadi and Lees, 2000). In this study, the regimen provided no appreciable protection at C_{avg} lower than 0.25 mg/L, but further increases in C_{avg} improved its mean prophylactic effect up to 1.0 mg/L of drug, where saturation of effect occurred. As lung:plasma drug concentration ratio at the time of necropsy is 1 for both drugs, maximum prophylactic effect was achieved at a C_{avg} that is half the MIC of the test bacterium (i.e. 2 μ g/mL for both drugs). Therefore, inhibition of bacterial growth is not the only factor associated with clinical outcome, and concentration determines the effect. The conceptual scheme of the E_{max} model does not invalidate the empiric classification of concentration- and time-dependent antimicrobials (Mattie, 2000): effect saturates for both types of drugs at some finite concentration, but transition from no effect to maximum effect is steeper for time-dependent ones.

The response to *A. pleuropneumoniae* infection was quite variable among drug-free pigs, which may reflect inter-individual differences in IL-1 and TNF secretion (Huang *et al.*, 1999). Population variability in cytokine secretion may also influence the prophylactic effect of the tested drugs: low C_{avg} may provide adequate protection for some pigs but some others may respond to infection so intensely that clinical signs can not be completely prevented even with high C_{avg} . Nonetheless, the objective of prophylaxis is to provide adequate

protection to the largest possible proportion of the population at risk with the smallest dose. In this study, maximum prophylaxis was achieved only with CTC at doses of at least 66 mg/kg BM per day, which consistently produced C_{avg} greater than 1 mg/L.

Differences in C_{avg} between CTC and OTC are mainly the product of their respective oral bioavailabilities: the F of CTC was 5 times greater than that of OTC. This is compatible with what has been predicted with the meta-analysis, and correlates with their respective pH partition behaviours. Our estimated bioavailability for OTC was in the range of previous reports (Mevius *et al.*, 1986; Wanner *et al.*, 1990; Pijpers *et al.*, 1991; Küng *et al.*, 1994; Nielsen and Gyrd-Hansen, 1996), but that of CTC was greater than in all previously published studies (Kilroy *et al.*, 1990; Sutter and Wanner, 1990; Wanner *et al.*, 1991; Nielsen and Gyrd-Hansen, 1996) (Table 9). Blood sampling protocol is unlikely to cause such discrepancy, as this would similarly affect the estimates of both drugs. The method of determining drug concentrations and the choice of the biological matrix may contribute to this difference. At room and incubator temperature, CTC is unstable in biofluids and bacterial growth media (Lepper, 1956), and degradation may be considerable when blood samples are allowed to clot to harvest serum and when serum concentrations are determined with a bioassay (Ray and Newton, 1991). When using HPLC methods, an internal standard should be used to account for differences in recovery of the tetracyclines and increase accuracy (Limpoka, 1979). In this study, blood samples were immediately refrigerated, centrifuged and plasma concentrations of drug were determined with a validated HPLC method where samples were supplemented with an internal standard. In fact, the only other study where samples were similarly processed produced the closest bioavailability estimate to ours (Kilroy *et al.*, 1990). On another point, small samples tend to give biased estimates of the population mean when the probability density function is asymmetrical: in the case of a lognormal distribution, values greater than the true mean may be less prevalent when using small sampling sizes and be

treated as outliers. Therefore, both the use of an appropriate sample size, prompt sample processing and an accurate, robust HPLC method are necessary to derive reliable bioavailability estimates with respect to current pig husbandry and prescription practices.

Clearance of CTC was approximately 35% higher than that of OTC, which would seem at variance with their partition behaviour because first-generation tetracyclines are not metabolised (Aronson, 1980). However, for these drugs the fraction excreted through the bile correlates with lipid solubility, and during their transit within the body some proportion of CTC may convert into isochlortetracycline (Stephens *et al.*, 1954). The CL estimates derived from the oral kinetic experiments were biased by absorption, but were highly correlated with those of the i.v. administration. This result, the stability of t_{\max} and the linear increases of C_{\max} and AUC indicate that dose does not affect the ability of the body to eliminate CTC or OTC.

With respect to the sum of stomach and small intestine blood flows in pigs (Tranquilli *et al.*, 1982), i.v. administered CTC and OTC had low clearance values. Therefore, the incomplete systemic absorption of these drugs when administered in feed is unlikely to be the result of hepatic first-pass. Factors affecting dissolution of the tetracyclines in the gastro-intestinal lumen may be associated with this problem: feed particles (Nielsen and Gyrd-Hansen, 1996), dry matter content of the medicated feed (Sutter and Wanner, 1990; Küng *et al.*, 1994), and divalent metallic cations (Weinberg, 1957; Wanner *et al.*, 1990; Wanner *et al.*, 1991) have been shown to affect bioavailability of the tested drugs in pigs. Inter-individual variability in extracting and dissolving drug molecules may also be associated with gastro-intestinal motility, pH and the volume of digestive secretions (Rowland and Tozer, 1994). In addition, P-glycoprotein has recently been recognised as an important barrier for oral absorption of drugs (Benet *et al.*, 1999). Tetracyclines share some structural and physicochemical features of P-glycoprotein substrates, and human cell lines have been reported to export tetracycline by means of P-glycoprotein

(Kavallaris *et al.*, 1993). In humans, this efflux system is present in the oesophagus, stomach, jejunum and colon, but no specific information is available in pigs.

Table 9. Key pharmacokinetic parameters of CTC and OTC administered intravenously and orally in pigs reported in peer-reviewed publications.

Drug	First author	# pigs i.v.	AUC/D i.v.	CL (L/h/kg)	V _{ss} (L/kg)	λ_z (h ⁻¹)	# pigs p.o.	AUC/D p.o.	F (%)
OTC	Mercer	14	4.50	0.222	0.81	0.186	0	-	-
	Xia	3	3.83	0.263	1.21	0.185	0	-	-
	Mevius	3	4.06	0.249	1.64	0.049	3	0.15	3.7
	Wanner	18	4.37	0.229	1.09	0.19	6	NA*	3.7
	Pijpers	6	5.75	0.173	1.13	0.117	6	0.27	4.8
	Küng	14	4.55	0.228	1.13	0.202	7	0.23	5.0
	Nielsen	6	4.57	0.22	1.4	0.132	6	0.13	2.8
CTC	Kilroy	5	3.66	0.27	1.13	0.226	5	0.64	17.9
	Sutter	18	2.55	0.39	1.42	0.25	6	0.46	17.6
	Wanner	18	2.13	0.47	1.81	0.22	6	0.20	12.6
	Nielsen	6	5.19	0.20	0.7	0.144	6	0.28	6.1

* NA: not available.

The steady-state volumes of distribution of CTC and OTC were largely above 1 L kg⁻¹, which suggest that these drugs diffuse widely across swine tissues. Volume estimates derived from the oral dosages were biased, but still were useful to confirm that they were independent of dose. The V_{ss} estimate for CTC was higher than the one for OTC, which agrees with their respective partition behaviours. The distribution kinetics across organs and body fluids in pigs has only been reported for OTC (Mercer *et al.*, 1978; Black and Gentry, 1984), but CTC is likely to have a similar distribution pattern. These drugs

concentrate at a greater extent in kidney and liver, and lung concentrations were slightly higher than in plasma/serum. In this study, the lung:plasma concentration ratio was slightly above 1 for both drugs, but this result must be taken with caution as disease significantly changes the pharmacokinetic behaviour of the tetracyclines (Pijpers *et al.*, 1990).

In the steady-state oral kinetic experiment, plasma concentrations of CTC and OTC were significantly higher at 8:00 than at 20:00 in all pigs. This reveals the existence of nycthemeral variations in the pharmacokinetic behaviour of the tetracyclines. The rhythm of physiologic functions induce temporal variation patterns both in the pharmacokinetic and pharmacodynamics of drugs (Labrecque and Bélanger, 1991). In dogs, large amounts of tetracycline are reabsorbed from the urinary bladder and gain access to the systemic circulation through lymphatic vessels (Milroy *et al.*, 1974; Wood and Leonard, 1983). In these studies, urinary pH, tetracycline concentration in urine and retention time of urine in the bladder significantly affected the extent of drug reabsorption, but not the volume of urine in the bladder. Moreover, the elimination kinetics of tetracycline in man varied with urination frequency (Wood and Leonard, 1983). The normal pH of urine in pigs (i.e. 6.5), and their diurnal nature are likely causes of the differences at the beginning and the end of dosing interval at steady state. This may be beneficial to pigs, as body response to cytokines (Pollmacher *et al.*, 1996) and death rate (Hrushesky *et al.*, 1994) increase during the resting period. Circadian pharmacokinetic variations seem to be greater for more lipophilic drugs than for highly water-soluble drugs (Bruguerolle, 1998). This might explain the log-concavity of the i.v. kinetic profile of CTC, and the discrepancy in the bias associated with λ_z and V_z estimates after the single oral administrations of CTC and OTC.

5.2.7. Conclusions

This study showed that clinical efficacy of the tetracyclines is not independent of their pharmacokinetic behaviour. At steady state, drug concentrations in

plasma are a surrogate marker of tissue concentrations and of the relative level of protection against pathogenic bacteria. In veterinary practice, pharmacokinetic parameters should be addressed for drug and dose selection. For the drugs tested here, bioavailability was the most important factor in therapeutic efficacy.

In microbial sensitivity testing, the *in vitro* growth of bacteria exposed to antibiotics is used as a predictor of the *in vivo* outcome of therapeutic regimens. While the size of the bacterial population at site of infection is an important factor in disease, other parameters such as bacterial adherence, toxin production, cytokine and phagocyte responses of animals, and drug toxicity are important as well. This is evidenced in our study, where the prophylactic effect of CTC saturated at plasma and lung concentrations half as high as the MIC. Disease is a complex phenomenon, and PK/PD studies involving antibiotics should not limit to the description of time course of bacterial populations when inference on clinical efficacy is sought.

Underdosing never is judicious use of antibiotics. When the purpose is to treat an animal population, veterinary practitioners should use the smallest dose that provides the intended effect not to the average animal but to the largest possible proportion of the population at risk. Therefore, knowledge of the inter-individual PK/PD variability of drugs is mandatory. This study shown that absorption, disposition and effect of CTC and OTC is quite variable among pigs, even in an experimental setting. In addition, genetic, nutritional, zootechnical, biopharmaceutical and environmental factors may increase this variability. Therefore, population PK/PD studies are needed to determine the effect of covariates in field conditions. Our data will be subject to mixed-effect PK/PD modelling in order to precise the relationship between absorption, distribution, elimination and clinical effect of feed-administered CTC and OTC in pigs and identify effect modifiers.

5.2.8. Acknowledgements

The authors are grateful to Mélanie Boileau and Hugo Brunet-Joly for technical assistance, to Dr. Marcelo Gottschalk for providing the *A. pleuropneumoniae* infection model, to Mr. Craig Salisbury for HPLC analyses, and to Dr. Denis Du Tremblay, Dr. Serge Larivière, Dr. Mario Jacques and Mr. Guy Beauchamp for advice. Financial support for this project was provided by Hoffmann – La Roche Ltd.

5.2.9. References

Agriculture Canada (1998). Compendium of Mediating Ingredient Brochures - 8th edition. Hull, Canada, Canada Communications Group Inc.

AliAbadi, F. S., Lees, P. (2000). Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **14**: 307-313.

Anonymous (1985). *WinNonlin user guide*. Cary, NC, U.S.A. Pharsight Corporation Inc.

Apley, M. D., Brown, S. A., Fedorka-Cray, P. J., Ferenc, S., House, J. K., Riviere, J. E., Rice, L. B., Thornsberry, C., Waddell, J. (1998). Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public health perspectives. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **212**: 1209-1213.

Aronson, A. L. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **176**: 1061-1068.

Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A., Wacher, V. J. (1999). Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **62**: 25-31.

- Black, W. D., Gentry, W. D.** (1984). The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. *Canadian Veterinary Journal*, **25**: 158-161.
- Bruguerolle, B.** (1998). Chronopharmacokinetics. Current status. *Clinical Pharmacokinetics*, **35**: 83-94.
- Chopra, I., Hawkey, P. M., Hinton, M.** (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **29**: 245-277.
- Colaizzi, J. L., Klink, P. R.** (1969). pH-Partition behavior of tetracyclines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **58**: 1184-1189.
- Daniel, W. W.** (1990). *Applied nonparametric statistics - 2th edition*. Boston, MS, U.S.A., PWS-Kent Publishing Co.
- del Castillo, J. R. E., Elsener, J., Martineau, G. P.** (1998). Pharmacokinetic modeling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. *Swine Health and Production*, **6**: 189-202.
- Draper, N. R., Smith, H.** (1998). *Applied regression analysis - 3th edition*. New York, NY, U.S.A., John Wiley & Sons, Inc.
- FEDESA** (1998). *The use of antibiotics in animals* [internet communication]. Available at: <http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/ABKit/abkit.htm>.
- Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. F., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., Jansen, R., Kamp, E. M., Macdonald, J., MacInnes, J. I., Mittal, K. R., Nicolet, J., Rycroft, A. N., Segers, R. P. A. M., Smits, M. A., Stenbaek, E., Struck, D. K., van den Bosch, J. F., Willson, P. J., Young, R.** (1993). *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins,

cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology*, **139 (Pt 8)**: 1723-1728.

Golub, L. M., Ramamurthy, N. S., McNamara, T. F., Greenwald, R. A., Rifkin, B. R. (1991). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **2**: 297-321.

Haesebrouck, F., Chiers, K., van Overbeke, I., Ducatelle, R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology*, **58**: 239-249.

Hashimoto, Y., Sheiner, L. B. (1991). Designs for population pharmacodynamics: value of pharmacokinetic data and population analysis. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **19**: 333-353.

Holford, N. H., Sheiner, L. B. (1981). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling in vivo. *CRC Critical Reviews in Bioengineering*, **5**: 273-322.

Hrushesky, W. J., Langevin, T., Kim, Y. J., Wood, P. A. (1994). Circadian dynamics of tumor necrosis factor alpha (cachectin) lethality. *Journal of Experimental Medicine*, **180**: 1059-1065.

Huang, H., Potter, A. A., Campos, M., Leighton, F. A., Willson, P. J., Haines, D. M., Yates, W. D. (1999). Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumonia*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **63**: 69-78.

Kamp, E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., van Leengoed, L. A., Smits, M. A. (1997). Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus*

pleuropneumoniae leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity*, **65**: 4350-4354.

Kavallaris, M., Madafiglio, J., Norris, M. D., Haber, M. (1993). Resistance to tetracycline, a hydrophilic antibiotic, is mediated by P- glycoprotein in human multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **190**: 79-85.

Kilroy, C. R., Hall, W. F., Bane, D. P., Bevill, R. F., Koritz, G. D. (1990). Chlortetracycline in swine--bioavailability and pharmacokinetics in fasted and fed pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **13**: 49-58.

Kunin, C. M., Finland, M. (1961). Clinical pharmacology of the tetracycline antibiotics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2**: 51-69.

- Küng, K., Racine, A., Wanner, M.** (1994). Einfluss der Futterzubereitung (trocken vs. suppig) auf die Pharmakokinetik der Antibiotika Oxytetracyclin und Sulfadoxin Beim Ferkel. *Tierärztliche Umschau*, **49**: 172-177.
- Labrecque, G., Bélanger, P. M.** (1991). Biological rhythms in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, **52**: 95-107.
- Lepper, M. H.** (1956). *Aureomycin (chlortetracycline)*. New York, U.S.A., Medical Encyclopedia, Inc.
- Limpoka, M.** (1979). Disposition of oxytetracycline in cattle, sheep and swine. Ph.D. Thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign, 137 pp.
- Lorian, V., Ed.** (1996). *Antibiotics in laboratory medicine - 4th edition*. Baltimore, MD, U.S.A., Lippincott, Williams & Wilkins.
- Mattie, H.** (2000). Antibiotic efficacy in vivo predicted by in vitro activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **14**: 91-98.
- Mercer, H. D., Teske, R. H., Long, P. E., Showalter, D. H.** (1978). Drug residues in food animals II. Plasma and tissue kinetics of oxytetracycline in young cross-bred swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **1**: 119-128.
- Mevius, D. J., Vellenga, L., Breukink, H. J., Nouws, J. F., Vree, T. B., Driessens, F.** (1986). Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration. *Veterinary Quarterly*, **8**: 274-284.

- Milroy, E. J., Cockett, A. T., Roberts, A. P.** (1974). The bladder lymphatics. A study of drug transport. *Investigative Urology*, **12**: 69-73.
- Mood, A. M., Graybill, F. A., Boes, D. C.** (1974). Continuous distributions. **Ch. 3**, pp. 105-124. *Introduction to the theory of statistics - 3th edition*. New York, NY, U.S.A., McGraw-Hill
- Moore, G. M., Mowrey, D. H., Tonkinson, L. V., Lechtenberg, K. F., Schneider, J. H.** (1996). Efficacy dose determination study of tilmicosin phosphate in feed for control of pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine. *American Journal of Veterinary Research*, **57**: 220-223.
- National Research Council** (1988). *Nutrient requirements of swine - 9th edition*. Washington D.C., U.S.A., National Academy Press.
- Nielsen, P., Gyrd-Hansen, N.** (1996). Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**: 305-311.
- Norcia, L. J., Silvia, A. M., Hayashi, S. F.** (1999). Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including *Pasteurella*, *Actinobacillus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **52**: 52-60.
- Olfert, E. D., Olfert, E. D., Cross, B. M., McWilliam, A. A., Eds.** (1993). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation - 2th edition*. Ottawa, Canada, Conseil Canadien de Protection des Animaux.

- Pijpers, A., Schoevers, E. J., van Gogh, H., van Leengoed, L. A. M. G., Visser, I. J. R., van Miert, A. S. J. P. A. M., Verheijden, J. H. M.** (1990). The pharmacokinetics of oxytetracycline following intravenous administration in healthy and diseased pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **13**: 320-326.
- Pijpers, A., Schoevers, E. J., van Gogh, H., van Leengoed, L. A. M. G., Visser, I. J. R., van Miert, A. S. J. P. A. M., Verheijden, J. H. M.** (1991). The influence of disease on feed and water consumption and on pharmacokinetics of orally administered oxytetracycline in pigs. *Journal of Animal Science*, **69**: 2947-2954.
- Pollmacher, T., Mullington, J., Korth, C., Schreiber, W., Hermann, D., Orth, A., Galanos, C., Holsboer, F.** (1996). Diurnal variations in the human host response to endotoxin. *Journal of Infectious Diseases*, **174**: 1040-1045.
- Prescott, J. F.** (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food? *Canadian Veterinary Journal*, **38**: 763-766.
- Purves, R. D.** (1992). Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **20**: 211-226.
- Ray, A., Newton, V.** (1991). Use of high-performance liquid chromatography to monitor stability of tetracycline and chlortetracycline in susceptibility determinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 1264-1266.

- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, J. D., Jacques, M.** (1999). Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 1017-1026.
- Rowland, M., Tozer, T. N.** (1994). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications - 3th edition*. Media, PA, U.S.A., Williams & Wilkins.
- Shapira, L., Soskolne, W. A., Hourri, Y., Barak, V., Halabi, A., Stabholz, A.** (1996). Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infection and Immunity*, **64**: 825-828.
- Stephens, C. R., Conover, L. H., Pasternack, R., Hochstein, F. A., Moreland, W. T., Regna, P. P., Pilgrim, F. J., Brunings, K. J., Woodward, R. B.** (1954). The structure of Aureomycin. *Journal of the American Chemical Society*, **76**: 3568-3575.
- Straw, B. E., B ckstrm, L., Leman, A. D.** (1986). Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **8**: S106-S112.
- Sutter, H. M., Wanner, M.** (1990). Futterzubereitung und Pharmakokinetik von Chlortetrazyklin beim Ferkel. *Schweizerische Archiv für Tierheilkunde*, **132**: 175-181.
- Thomas, J. K., Forrest, A., Bhavnani, S. M., Hyatt, J. M., Cheng, A., Ballow, C. H., Schentag, J. J.** (1998). Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 521-527.

- Tranquilli, W. J., Parks, C. M., Thurmon, J. C., Benson, G. J., Koritz, G. D., Manohar, M., Theodorakis, M. C.** (1982). Organ blood flow and distribution of cardiac output in nonanesthetized swine. *American Journal of Veterinary Research*, **43**: 895-897.
- Vogelman, B., Gudmundsson, S., Leggett, J., Turnidge, J., Ebert, S., Craig, W. A.** (1988). Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 831-847.
- Wanner, M., Nietlispach, G., Sutter, H. M.** (1990). Einfluss von citronensäure und calcium auf die bioverfügbarkeit oral verabreichten oxytetracyclins beim ferkel. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **97**: 515-518.
- Wanner, M., Walker, W., Sutter, H. M., Rioud, J. L., Broz, J.** (1991). Influence of dietary citric acid and calcium on the bioavailability of orally administered chlortetracycline in piglets. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A*, **38**: 755-762.
- Weinberg, E. D.** (1957). The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations. *Bacteriological Reviews*, **21**: 46-68.
- Wood, J. H., Leonard, T. W.** (1983). Kinetic implications of drug resorption from the bladder. *Drug Metabolism Reviews*, **14**: 407-423.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T.** (1978). Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **6**: 547-558.

5.3. SHORT-TERM EFFECTS OF IN-FEED SUPPLEMENTATION OF TETRACYCLINES FOR DISEASE CONTROL ON FEED INTAKE PATTERN AND GROWTH IN WEANED PIGS [*ANIMAL SCIENCE* (2000 – SOUMIS)].

Jérôme R. E. del Castillo * (1, 2), Guy Beauchamp (2), Guy P. Martineau (3), Jean-Guy Besner (1)

- (1) Faculté de pharmacie, Université de Montréal. CP 6128 - Succ. Centre-Ville. Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada
- (2) Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 Canada
- (3) École Nationale Vétérinaire de Toulouse. 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

5.3.1. Abstract

Chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC) are often administered in feed to pigs at extra-label doses to increase the efficacy of disease control strategies, but the bitterness of these antibiotics may significantly depress the voluntary feed intake of pigs at risk, compromising growth and the efficacy of the therapeutic regimen. We examined individual feed intake patterns and growth of 5-week old early-weaned pigs that received either drug-free feed (n=36 pigs) or feed medicated with CTC or OTC at 12 h intervals for a period of 5 days. Each tested drug was mixed in feed at concentrations of 550, 1100, 1650 and 2200 mg/kg (n_≥8 pigs/dose/drug). Neither drug nor dose significantly affected the rate of feed intake (excluding interruptions), duration of meal, and the likelihood of leaving feed uneaten at the end of at least one meal. Average daily gain and feed conversion ratio (FCR) showed similar mean values across

treatment groups, but variance of FCR varied significantly: CTC < OTC < drug-free. Meal duration and feeding rate, and the likelihood of leaving feed uneaten were significantly influenced by the size of pigs, the occurrence of infection or spontaneous feeding interruptions during the meal. Feeding rate increased with experimental days. Results show that CTC and OTC are not feed deterrents in weaned pigs in the range of therapeutic doses currently used, but other sources of variation in feed intake indicate that drug input could vary among pigs.

5.3.2. Keywords

Pigs; Feeding behaviour; Chlortetracycline; Oxytetracycline; Prophylaxis; Palatability

5.3.3. Introduction

The control of infectious diseases is of critical importance in pig production. As pigs are reared intensively and housed in large groups, environment, herd management, nutrition, health status, and genetic factors significantly contribute to the development, spread, severity and duration of disease. Therefore, the strategy for disease control must address both risk factors and etiologic agents (Harris and Alexander, 1999). Bacteria play a significant role in the health of pig herds and antimicrobials are obviously a major component of the disease-control strategy. When short-term protection from a highly contagious bacterium is needed, the group of pigs at risk may receive antibiotics while other disease-control measures become operational and effective (FEDESA, 1998). The tetracyclines are the most heavily prescribed drugs in veterinary medicine, and in most herds medication of pigs at risk is achieved by supplementing the drug into the feed for *ad libitum* consumption.

Efficacy of the drug regimen is a function of drug concentration at the site of infection with respect to the sensitivity of the targeted pathogen (Koritz and

Bevill, 1991). Feeds medicated with chlortetracycline (CTC) or oxytetracycline (OTC) at the approved dose often do not provide the expected level of protection against disease. This is likely associated with underdosing, as plasma concentrations of these drugs after oral administration in fed pigs are considerably lower than minimum inhibitory concentrations (MIC) of OTC for the most prevalent swine respiratory pathogenic bacteria (Nielsen and Gyrd-Hansen, 1996). As a consequence, veterinary practitioners need to prescribe these drugs at higher than approved in-feed doses, but dose adjustments are performed empirically because data on their concentration-response relationships are lacking.

Taste is especially important for feed acceptance, discrimination and control of intake (Kare, 1971). In particular, animals have a natural aversion towards bitter taste, probably to minimize the likelihood of poisoning (Garcia and Hankins, 1975; Glendinning, 1994). Although palatability is a concern in the development of drug formulations for animal feeds (Larrabee, 1983), their use at higher levels could alter the taste of feed and conceivably decrease acceptance. By decreasing the amount of drug entering the body, decreased intake could be a significant factor underlying variation in drug effectiveness and resistance development (Vogelman *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1998; Schentag, 1999). In addition, a lowered feed intake decreases the resistance of animals to infection, ingested toxins and environmental stressors (Baetjer, 1983; Campbell and Richardson, 1988; Kremer *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1995).

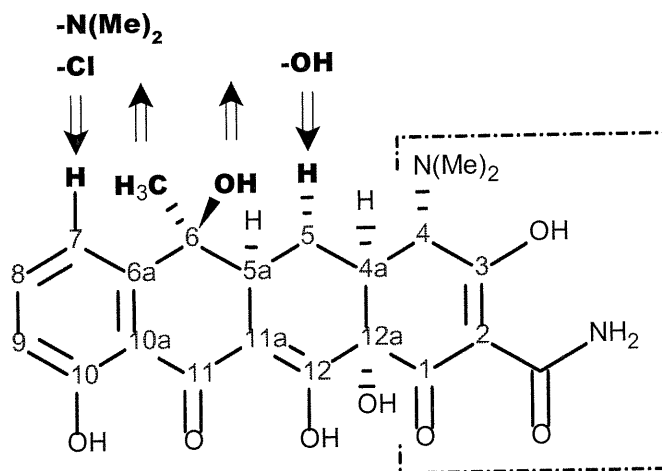
Few studies thus far have focused on the deterrent effect of feed antimicrobials in pigs (Becker, 1993) or in other animals (Wray *et al.*, 1990; Toften *et al.*, 1995; Toften and Jobling, 1997). Depression of medicated feed intake with the tetracyclines is conceivable in pigs for two reasons:

1. Tetracyclines possess bitter taste. Requirements for bitterness (Shallenberger and Acree, 1971; Gardner, 1978; Belitz *et al.*, 1983;

Kubo, 1994) are apparent from the tetracycline structure (Figure 1) and corresponding physicochemical properties. The C1 carbonyl and C2 amide groups of the tetracycline ring are compatible with the so-called bitter unit. The C4 dimethylamine may also contribute to bitterness or, when protonated, in attaching with a bitter receptor (Kurihara *et al.*, 1994). Additionally, the magnitude of bitter response positively correlates with lipid solubility, which differs among members of the tetracycline family (Colaizzi and Klink, 1969).

2. With more than 20000 taste buds (at least twice as many as in humans), pigs possess high taste acuity (Hellekant and Danilova, 1999). Taste buds trigger large responses in the Q-cluster of nerve fibres when exposed to quinine or other bitter substances such as tilmicosin and sucrose octaacetate (Hellekant and Danilova, 1999). Further, pigs are sensitive to unpalatable feed ingredients, such as canola meal and supplements with high contents in chloride (Roch G. and Vignola M., 2000 – personal communications).

Figure 1. Molecular structure of the tetracyclines. Carbons of the tetracycline structure are numbered, sites of chemical substitution are identified with arrows, and potential sites of interaction with bitter taste receptors are isolated within the bracket.



We performed a study to examine the dose-response relationship of feed-administered CTC and OTC on their pharmacokinetics in pigs, their pharmacodynamics, and on the feed-intake pattern and growth of pigs given access to fixed amounts of feed (with respect to body mass) at fixed times of the day. Here, we report their short-term effects on the feed intake and growth of weaned pigs. We additionally documented sources of variation in feed intake pattern among pigs, as individual variation in feed intake may lead to a loss of effectiveness in drug treatment.

5.3.4. Material and Methods

The experimental protocol was approved by the University's Ethics Committee, and pigs were handled according to the directives of the Canadian Council on Animal Care (Olfert, 1993).

5.3.4.1. *Animals and housing*

One hundred and four mixed-breed barrows, 4-5 week-old and weaned at 21 days of age, were purchased in batches of 12. The source herd was apparently free of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 3, 5 and 7, *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, PRRS virus, TGE virus, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Sarcoptes scabiei*, as determined by periodic clinical, serology and slaughter checks for over 2 years. Pigs were housed in 0.74 m² plastic-floored individual steel cages in one of two aseptic rooms capable of holding a maximum of six cages. Cage disposition and cage walls allowed visual, auditory and some physical contact among pigs. Room temperature was kept at 25°C and artificial lighting was provided between 07:00 and 22:00. Cages were washed twice daily after morning and evening meals.

Pigs were given 5 days to habituate to surroundings and were trained to enter a transport box for daily weighing before morning meals. On day 3, pigs were anaesthetized for surgical insertion of a venous catheter for the pharmacokinetic experiments, which took place on days 5, 6 and 10. Feeding behaviour data associated with the pharmacokinetic protocol have been dropped because blood was sampled during meals. Health status was recorded daily. Pigs that developed bacterial infections during the course of the study were treated with ampicillin and arthritis was additionally managed with phenylbutazone.

At all time, pigs enjoyed free access to water and received each day an amount of feed corresponding to 5% of body mass (BM), in agreement with NRC guidelines (National Research Council, 1988). Portions of feed were served at 08:00, 14:00 and 20:00. In a pilot study in the same environment, using the same feeds and pigs of the same origin, age and body mass, the maximum amount of feed that pigs could eat in a single meal was 2% BM. Moreover, some pigs left feed uneaten at 20:00 when offered 2% BM of feed at 14:00. Consequently, feed was divided across the above serving times in amounts corresponding to 2%, 1% and 2 % BM, respectively. Meals were provided in 30×30×20 cm individual metallic troughs. A receptacle was placed under the floor of the cage to collect feed wastage.

5.3.4.2. *Diets and antibiotic supplementation*

A drug-free, standard corn-soy feed providing approximately 185 g/kg of crude protein and 13.7 MJ/kg of digestible energy was purchased the day of pig arrival (VITA distribution 1988 Inc. St-Valérien, QC, Canada). Midway through the experiment, the feed supplier company modified the vitamin and mineral premix formulation (diet B) thus altering levels of lysine and of some other dietary nutrients (Table 1). The first 60 pigs received diet A and the remaining 44 pigs received diet B. We divided batches of feed into several aliquots. One aliquot was used for all non-medicated meals. Four aliquots were

supplemented with CTC (Aureomycin® 100G. Hoffmann – La Roche Ltd. Cambridge, ON, Canada) or OTC (Terramycin* 100. Pfizer Canada Inc. Animal Health Group. London, ON, Canada) at 550, 1100, 1650 or 2200 mg/kg.

5.3.4.3. *Experimental procedure*

Drug supplementation levels were randomly allocated in the first eight experimental blocks. The remaining ("add-on") block was used to balance the number of pigs per drug and dose. In each experimental block, a total of 4 pigs were randomly assigned to each of the following treatment groups: 1) drug-free feed, 2) feed supplemented with CTC, or 3) feed supplemented with OTC. Two randomly selected doses of drug were used in each block. The in-feed drug regimen started on day 7, and individual data on feeding behaviour were collected over days 7, 8 and 9, and on the morning of day 11. Feed intake data were collected at the 8:00 and 20:00 meals, where 2% BM of feed was served at each time. The pharmacokinetic experiment required constant in-feed doses

Table 1. Nutrient concentrations in the two experimental diets

Nutrient	Diet		Relative content (B/A)
	A	B	
Digestible energy (MJ/kg)	13.73	13.68	1.00
Crude protein (g/kg)	185.9	187.1	1.01
Fat (g/kg)	29.8	30.6	1.03
Fibre (g/kg)	27.5	28.2	1.03
Calcium (g/kg)	10.3	8.1	0.79
Phosphorus, available (g/kg)	5.2	4.2	0.81
Salt (g/kg)	3.2	4.9	1.53
Choline (g/kg)	1.8	1.2	0.71
Lysine (g/kg)	11.5	13.1	1.14
Threonine (g/kg)	7.1	8.3	1.17

of drug (with respect to body mass) to be administered at 12 h intervals to produce a clear drug elimination phase, and therefore the 14:00 meal was drug-free for all pigs. With this feeding protocol, pigs received either 22, 44, 66 or 88 mg/kg BM of drug per day, which are 1, 2, 3 or 4 times the approved daily dosage in the United States, respectively.

All meals and drinking events were visually monitored during the whole duration of the experiment. Feed was made available for at least 60 min during morning and evening meals. If individuals were still eating at the end of this period, feed was left until the end of the intake bout. A meal was considered interrupted if individuals spent time outside the trough for a purpose other than drinking during the period of access to feed. During the meal, feed wastage was offered again to pigs, and the amount of feed voluntarily left following meal termination was weighed. The amounts of feed offered and left at the end of the meal, the number and duration of meal interruptions, and meal duration (excluding interruptions) were recorded for all pigs. The proportion of feed left at the end of the meal was calculated. Feeding rate was calculated as the amount of feed offered minus the amount left divided by meal duration. The mass-adjusted average daily gain (ADG_M) was defined as the slope of the linear regression of body mass against experimental days (ADG) divided by initial body mass. Feed conversion ratio (FCR) was calculated as the average amount of feed ingested during the experiment divided by ADG. Hence, pigs with lower FCR have better feed efficiencies than pigs with higher FCR.

5.3.4.4. *Statistical analyses*

Level of statistical significance was set at 0.05 for all analyses. The density of a lognormal distribution (Mood *et al.*, 1974) was used to calculate the mean and standard deviation of variables showing left-skewed sample distributions. For each pig, the occurrence of INFECTION, MEAL INTERRUPTION, and MEAL COMPLETION were coded as binary variables (0=absent; 1=present).

A linear mixed-effect model for repeated measures was used to examine the effect of DIET (A or B), ROOM (1 or 2), body mass (coded by FEED OFFERED = 2% BM), MEAL INTERRUPTION and INFECTION across TIME (days 7 – 9, and day 11) on log-transformed meal duration (min) and on feeding rate (g/min). The covariance structure of data was determined for each model after inspection of the correlation matrix for the dependent variable over TIME, followed by selection of the best covariance structure with the Schwarz-Bayesian criterion of goodness-of-fit (Littell *et al.*, 1998). The effect of TREATMENT (CTC, OTC, drug-free) and DOSE (550 – 2200 mg/kg feed) on each variable was tested with specific *a priori* contrasts. To quantify changes in meal duration and feeding rate as a function of TIME, the time, initial body mass and the time \times body mass interaction effects were further examined with linear regression analysis of the residuals (i.e., difference between values observed and predicted by the mixed-effect linear models for repeated measures where body mass and time are excluded).

The proportion of feed left was not normally distributed. Consequently, a binary variable (0=no; 1=yes) was created to investigate the likelihood of voluntarily leaving feed uneaten at the end of one or more meals during the course of the experiment. Logistic regression analysis (Hosmer and Lemeshow, 1989) was used to examine the effect of explanatory variables on meal completion, with stepwise inclusion of variables. Odds ratios (i.e., the exponential transformation of the logistic regression coefficient estimated for a given independent variable) and their 95% confidence interval (CI) were calculated to measure the influence of an explanatory variable on the outcome variable. An odds ratio which CI does not include 1 indicates that the explanatory and outcome variables are not associated.

The effect of meal presentation time (morning or evening) on proportion of feed left, meal duration and feed intake rate for all pigs regardless of treatment was examined on days 7, 8 and 9. Paired *t*-tests or Wilcoxon signed-rank tests

were used to examine the effect of meal presentation time depending on distribution normality tests.

General linear models were used to examine effects of TREATMENT, ROOM, body mass (i.e. FEED OFFERED), MEAL INTERRUPTIONS and INFECTION on the following zootechnical parameters obtained over the course of the experiment: ADG_M (kg/kg/day), and FCR (kg/kg). Homogeneity of ADG and FCR variances among CTC, OTC and drug-free TREATMENT groups was assessed with the F-test.

5.3.5. Results

Results are presented as means \pm 1 standard deviation unless otherwise stated. At the beginning of the experiment (i.e. day 7), pigs receiving diet A weighed 11.0 ± 1.9 kg while pigs receiving diet B weighed 12.3 ± 1.5 kg, a significant difference ($P < 0.001$). Five pigs developed an infection (3 cases of arthritis, 2 cases of pneumonia) during the experiment. The remaining 99 pigs remained healthy for the whole duration of the study. Nine pigs (8.6%) showed interruptions while feeding at least once during the course of the experiment. These pigs weighed initially the same as their mates ($P > 0.05$) and were equally distributed among CTC, OTC and drug-free groups. Only one pig with feeding interruptions became infected during the study.

5.3.5.1. *Feeding parameters*

In terms of average values, neither TREATMENT nor DOSE influenced meal duration, likelihood of not finishing at least one meal, and feeding rate ($P > 0.05$).

The average duration of a meal was 28.6 ± 0.3 minutes (based on a lognormal distribution), with 95% of meals lasting less than 45 minutes. Meals lasted longer in heavier pigs (Table 2) and their duration became shorter with TIME

but duration was not significantly affected by other factors examined in the model (Table 2). Regression analysis of residuals indicated that meal duration in pigs was 0.6 ± 0.2 min (mean \pm S.E.M) longer per kg of initial body mass ($P < 0.001$) and decreased by 1.0 ± 0.3 min per day ($P < 0.001$). No significant time \times body mass interaction was identified (Figure 2).

Table 2. Repeated-measures linear models of the relationship between meal duration and feeding rate and several independent variables in weaned pigs (effect for time not shown).

Variables	Meal duration		Feeding rate	
	Coefficient	Significance [□]	Coefficient	Significance
DIET	-0.066		0.91	
ROOM	0.015		-0.25	
FEED OFFERED [†]	0.0022	***	0.014	**
MEAL INTERRUPTIONS	0.028		-0.77	*
INFECTION	-0.052		-2.23	**

[□] From the linear mixed-effect model for repeated measures: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; variables without symbols $P > 0.05$.

[†] Equal to 2% of body mass.

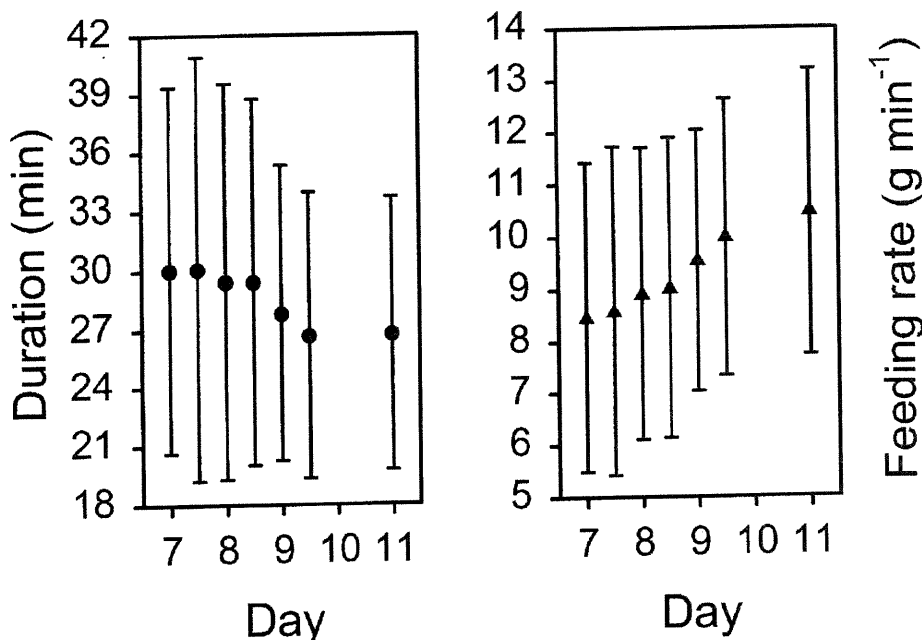
The amount of feed offered was totally eaten in 677 (94%) out of 721 meals. Ten pigs voluntarily left feed in the trough at the end of one or more meals. The odds of not finishing at least one meal increased by a factor of 31.1 (CI: 4.5-215.3; $P < 0.001$) when meal interruptions occurred, increased by a factor of 14.2 (CI: 1.1-180.1; $P < 0.05$) when infection was recorded and decreased by a factor of 0.5 (CI: 0.29-0.97; $P < 0.05$) per extra kilo of initial body mass. The odds of not finishing at least one meal were not associated with DIET or ROOM ($P > 0.05$). Clinically healthy pigs only left feed uneaten during the

initial days of the study, whereas all pigs that became infected always finished their meals prior to the onset of infection (Figure 3).

The average rate of feed intake was 9.3 ± 2.9 g/min. Feeding rate increased with TIME (Figure 2) and body mass (Table 2) but decreased in pigs showing meal interruptions and in infected pigs (Table 2). Quantitatively, the occurrence of infection caused a 2.23 g/min decrease in feeding rate and pigs showing meal interruptions ate at a 0.77 g/min lower intake rate. Regression analysis of residuals revealed that feeding rate was 0.30 ± 0.05 g/min (mean \pm S.E.M.) faster per kg of initial body mass ($P < 0.001$) and increased by 0.55 ± 0.08 g/min per day ($P < 0.001$). Again, no significant time \times body mass interaction was identified.

Differences in feeding behaviour between morning and evening meals were noted on day 9 but not on the previous two days ($P > 0.05$; Figure 4). On day 9, duration of the evening meal was 1.1 min shorter than that in the morning, and

Figure 2. Changes in average (s.d.) duration of meal (left panel) and feeding rate (right panel) as a function of experimental days.

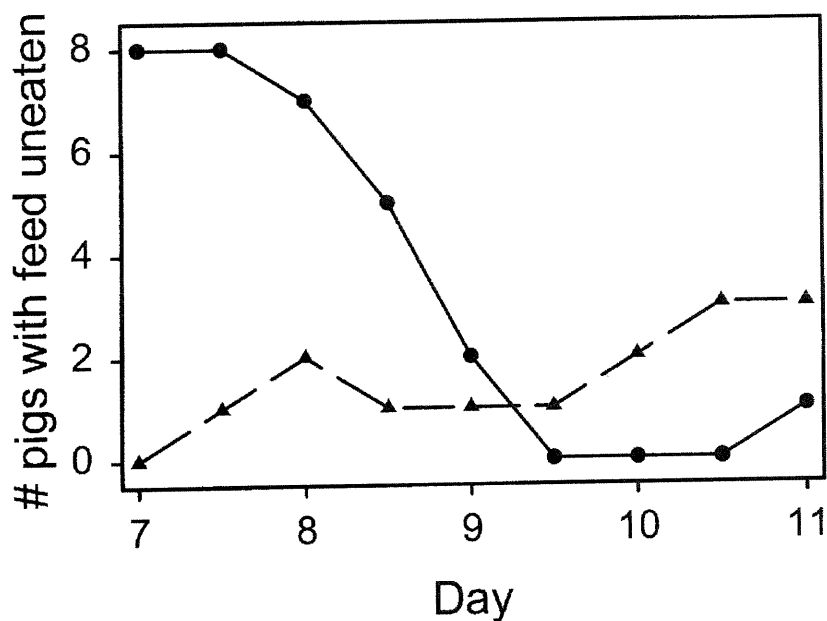


the rate of feed consumption was 0.43 g/min faster ($P < 0.05$ in both cases).

5.3.5.2. Growth parameters

The ADG_M of pigs during the experiment was 0.035 ± 0.009 kg/kg/day, i.e. 3.5% of initial body mass (kg),^k and was affected by DIET and MEAL COMPLETION (Table 3). On average, growth of pigs fed diet A was 0.006 kg/kg/day lower than that of pigs fed diet B. Growth of pigs was additionally reduced by a factor of 0.002 when feed was left uneaten at the end of one or more meals. No other factors proved significant (Table 3).

Figure 3. Number of healthy (n=99) and infected (n=5) pigs leaving feed uneaten at the end of the meal as a function of experimental days.



Legend: Healthy pigs: round symbols with continuous line
 Infected pigs : triangle symbols with discontinuous line

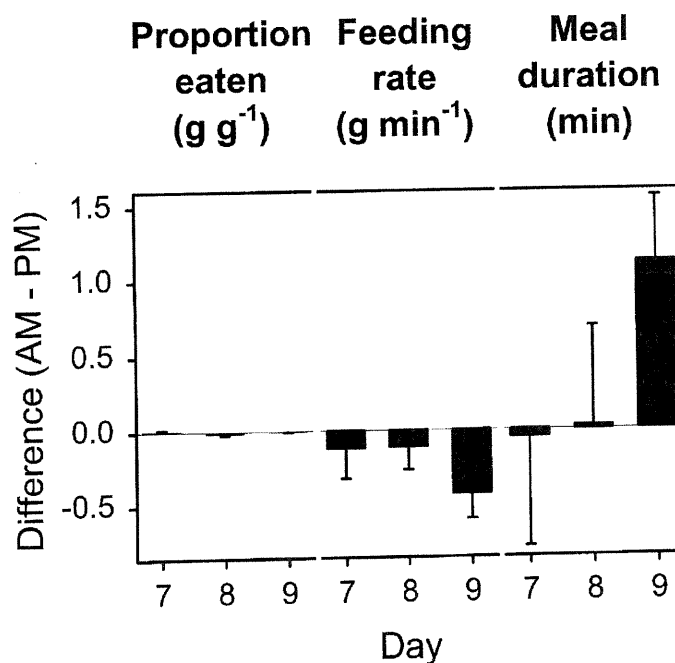
^k L'exemple suivant est destiné au lecteur qui est familier avec le gain moyen quotidien (GMQ) calculé avec la formule (POIDS FINAL - POIDS INITIAL)/INTERVALLE mais peu familier avec la notion que le gain de poids est un phénomène d'ordre un. Le porcelet moyen de notre étude, qui pèse 11 kg et dont le GMQ est égal à 3,5%, pèsera 14 kg après 7 jours, ce qui correspond à un gain de 428 g/jour.

Table 3. Linear models of the relationship between two zootechnical parameters and several independent variables in weaned pigs.

Variable	Mass-adjusted average daily gain		Feed conversion ratio	
	Coefficient	Significance ^a	Coefficient	Significance
DIET	-0.0056	**	0.21	*
ROOM	0.0017		-0.072	
MEAL INTERRUPTIONS	0.0024		-0.04	
MEAL COMPLETION	-0.0022	*	0.0077	
INFECTION	0.0036		-0.22	

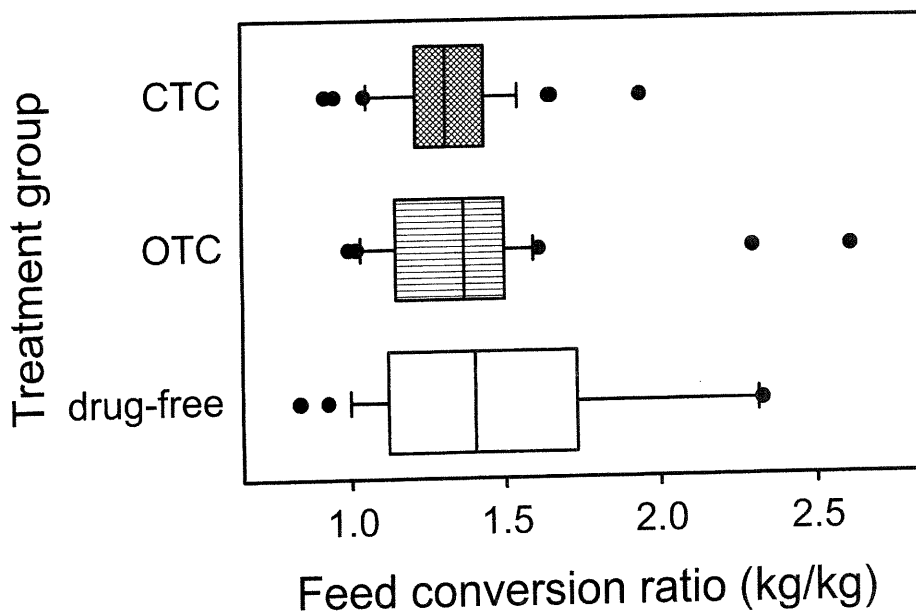
^a From the linear mixed-effect model for repeated measures: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; variables without symbols P>0.05.

Figure 4. Average (s.e.) individual differences between morning and evening meals in the proportion of feed left (left panel), meal duration (middle panel) and feeding rate (right panel) as a function of experimental days.



The average FCR was 1.5 ± 1.3 kg/kg. Examination of the distribution revealed one outlier (conversion = 14.4 kg/kg). When the outlier was excluded, FCR was 1.4 ± 0.4 kg/kg. For the remaining pigs, only DIET significantly influenced the mean FCR (Table 3). When compared with diet B, an extra 210 g of diet A was necessary to produce a 1000 g increase in body mass. FCR was 1.33 ± 0.21 kg/kg in CTC pigs, 1.38 ± 0.33 kg/kg in OTC pigs, and 1.47 ± 0.54 kg/kg in control pigs, excluding the outlier. While no significant differences were found for these mean values, variances were significantly different across TREATMENT groups (Figure 5). Variance of feed conversion ratio in the control group differed from that in each medicated group ($P < 0.01$). In addition, variance in the CTC group differed significantly from that in the OTC group ($P < 0.01$).

Figure 5. Distribution of feed conversion ratio in pigs given chlortetracycline- or oxytetracycline-supplemented feeds (supplementation levels merged), or drug-free feeds (Note: two drug-free pigs with FCR=3.63 and 14.4 kg/kg are hidden).



Legend: Box: 25th and 75th percentiles; vertical bar: 50th percentile; whiskers: 10th and 90th percentiles; round symbols: pigs with values outside the 10-90 percentile range.

5.3.6. Discussion

We aimed to describe the effect on feeding behaviour and growth of two in-feed tetracyclines in weaned pigs when used in the current extra-label prescription range. Feed is considered a reliable vehicle for administration of antibiotics but environmental or feed-related constraints prevalent under commercial situations may not allow pigs to meet their desired feed intake (Kyriazakis and Emmans, 1998). Feed intake of pigs has already been shown to be decreased by a variety of factors including disease (Pijpers *et al.*, 1991), the physical (Black *et al.*, 1998) and social environments (Nielsen *et al.*, 1995; Hyun *et al.*, 1998), as well as physiological status (Bigelow and Houpt, 1988; Kanis and Koops, 1990). Taste of the chosen antibiotic may also be a cause of decreased feed intake but this factor has received considerably less attention. The tetracyclines have been reported to be distasteful in other animals (Magnasco and Magnasco, 1985; Toften *et al.*, 1995; Maze *et al.*, 1996; Toften and Jobling, 1997) but, to our knowledge, no study has focused on their effects in pigs.

In this study, the feeding behaviour of pigs medicated with CTC or OTC was not significantly different from that of control pigs, as measured by meal duration, feeding rate and the proportion of feed taken. It could be hypothesised that the desired feed intake of pigs was not fulfilled with the daily amount of feed offered in this study. Alternatively, in-feed concentrations of the tested drugs used would be below the thresholds for taste detection or recognition (Pfaffmann *et al.*, 1971), which depend on lipid solubility (Belitz *et al.*, 1983). With respect to the first hypothesis, hunger can overcome the unpleasant taste of a feed deterrent to the extent that the concentration needed to decrease significantly feed intake in a long-term, no-choice study may be 10 times higher than that required in a choice situation (Kare, 1971). However, a significant short-term effect of the deterrent may be recorded if the follow-up is terminated shortly after animals adapt to the feed, before compensatory intake takes place, or with a repeated-measures protocol (Toften and Jobling, 1997).

Even if pigs in this study were in a no-choice situation, we focused on the short-term effect of the tested drugs with an amount of feed corresponding to the expected daily intake needed to ensure optimal growth in a commercial setting. We used a repeated-measures protocol to increase the probability of detecting a difference between control and medicated pigs. Meal size corresponded to maximum intake when feed is distributed in three servings, as determined in a pilot study using pigs and feeds from the same sources. Moreover, pigs were kept in a thermoneutral environment without competition for food. The excellent daily gain (e.g. 428 g/day for a 11 kg pig kept 7 days in this environment) and feed conversion ratio, which compare well to published ideal values (Straw *et al.*, 1999) suggest that deprivation levels were mild at most. Therefore, support for the first hypothesis is weak.

With respect to feed supplementation levels of CTC and OTC, detection and recognition thresholds for the tetracyclines have not been determined to our knowledge but their values might be higher: the highest supplementation level used in this study was only 10% of that required to decrease feed intake in Atlantic salmon (Toften and Jobling, 1997). It should be pointed out that species differences in taste thresholds exist: denatonium benzoate, one of the most bitter substances for humans, elicit small nerve responses in pigs, i.e. responses of similar magnitude to those recorded for caffeine (Hellekant and Danilova, 1999), and produces no significant decrease of feed intake in long term studies with pigs (Blair and FitzSimons, 1970). As this protocol detected small sources of variation in feeding behaviour, the tested formulations of CTC and OTC appear to be insignificant feed deterrents in growing pigs at the doses used. Practically, the two antibiotic formulations should not significantly decrease the expected feed intake of pigs, even at a supplementation level of 2200 mg/kg.

Differences in growth parameters of pigs given diets A and B likely are the result of differences in dietary lysine. The role of this amino acid in the growth

of swine has been extensively reviewed (National Research Council, 1988) and need not be detailed here. The only significant effect of the tested drugs on zootechnical parameters found in this study was on variance of feed conversion ratio (Figure 5). Growth promoting effect of feed-administered antimicrobials has been known for more than 50 years, but their mode of action is still unclear. Animal responses to the use of dietary antibiotics have been reviewed elsewhere (Thomke and Elwinger, 1998). With dietary antibiotics, nutrient usage is more directed to protein accretion, and energy and protein losses are decreased. The magnitude of the effect of antibiotic growth promoters on average daily gain and feed conversion ratio negatively correlate with health status of the animals, and in axenic animals their effect is null (Thomke and Elwinger, 1998). Hence, our finding was not surprising because periodic checks for over 2 years before the onset of study revealed that the source herd apparently was free of most specific swine pathogens. Sample distributions of this parameter were symmetrical in the CTC group, moderately left-skewed in the OTC group, and largely left-skewed in the drug free group. The maximum feed efficiency (i.e. the minimum FCR) that the animal-feed-environment unit used here could achieve was close to 0.8 kg/kg. Individual microbial pressure was the major constraint in achieving this objective. In this case, dietary CTC and OTC favoured the growth of more bacterially loaded pigs. Nonetheless, these results do not legitimate the use of antibiotics for growth promotion, as their long-term use at low doses increases the risk of antibiotic resistance development in bacteria (Levy, 1992).

We recorded four non-antibiotic sources of variation in various aspects of feeding behaviour: 1) the occurrence of meal interruptions, 2) the occurrence of infection, 3) body mass (i.e. FEED OFFERED) and 4) meal presentation time (i.e. AM or PM). From a practical point of view, all these sources of variation could be taken into account in a therapeutic plan since these factors can influence feed intake and thus drug input in the body.

Pigs showing meal interruptions finished fewer meals and showed a slower feed intake rate, thus suggesting a lower motivation to feed. The reason for interruptions is unclear as individuals were usually resting between feeding bouts. This is even more surprising given that during interruptions pigs could see nearby mates feeding. Synchronisation of feeding activities in pigs has been reported (Hsia and Wood-Gush, 1984) but in the present study allelomimetism failed to stimulate the lowly motivated piglets. The effect of interruptions could not be detected in terms of average daily feed intake and feed conversion unless meals were not completely finished. Higher variance in compound zootechnical parameters and the low occurrence in the population of individuals showing interruptions during meals probably made detection of differences between groups more difficult. The pig with outlying FCR showed interrupted feeding and voluntarily left 45% of feed served during the two first days of the regimen, and was the only pig to lose body mass after the onset of the regimen. This pig never shown signs of disease during the study, and adapted to the facilities just as its roommates.

Infection status also increased the number of unfinished meals and reduced feed intake rate. Depressed feeding following infection has also been observed in experimentally infected pigs (Pijpers *et al.*, 1991). In the present study, infection was probably a result of bacterial contamination of the catheter associated with serial blood sampling for the pharmacokinetic study.

Behavioural changes associated with disease appeared in pigs with normal feeding behaviour days after the blood sampling protocol associated with the pharmacokinetic study (Figure 3). Arthritic pigs could eat meals in a single bout but needed to modify posture to relief some pressure on the infected joint. Several factors such as pain and postural changes might have been implicated in decreasing the feed intake rate of arthritic pigs. Excessive pain would be the most likely reason for uneaten feed in the case of arthritis. Pneumonic pigs were dull and showed less interest in feed.

Reduction in meal duration as pigs grow older is well documented and probably reflects allometric changes in body dimensions that allow a faster rate of feed intake (Illius and Gordon, 1987). Meal duration decreased in one evening meal allowing an increase in feed intake rate. We could not establish whether the difference would be maintained in older pigs. Variation in feeding parameters has been documented between nighttime and daytime meals (Labroue *et al.*, 1999) but few studies have focused on changes in feeding behaviour during the same day. As piglets became older and more active during the day, the need to recoup energy losses probably became greater. If energy losses due to activity increased proportionally faster than the increase in body mass, the allocation of feed as a fixed proportion of body mass may have been insufficient to recoup losses thus inducing a greater motivation to feed at the end of the day. If the hypothesis were true, then experiments with *ad libitum* feed would probably reduce differences in feed intake rate between morning and evening meals.

5.3.7. Conclusion

We failed to document adverse effects of supplementation of tetracyclines on feed intake pattern in growing pigs, but more studies are needed to examine the potential influence of other drugs on feeding behaviour. Taste perception can be quantified and taken into account in feeding behaviour studies. In addition, more emphasis should be placed on patterns of variation in feed intake. Unravelling sources of variation will be helpful to understand the proximate determinants of feeding behaviour and will prove useful to elaborate more efficient antimicrobial prophylactic strategies.

5.3.8. Acknowledgements

We wish to thank Ms. Mélanie Boileau, and Mr. Hugo Brunet-Joly, veterinary students, and Jorge Castillo, veterinary graduate student, for their excellent technical assistance, and Mr. Michel Vignola, Agr., for kindly answering to our

first queries about the sense of taste in pigs. We are also grateful to Dr. Denis Du Tremblay, Dr. Marie-Christine Meunier-Salaün and Dr. Suzanne Robert for their insightful comments in the preparation of the manuscript. This project was funded by Roche Vitamins Inc.

5.3.9. References

- Baetjer, A. M.** (1983). Water deprivation and food restriction on toxicity of parathion and paraoxon. *Archives of Environmental Health*, **38**: 168-171.
- Becker, R.** (1993). *Untersuchungen über faktoren, welche die aufnahme von fütterungsarzneimitteln beim schwein beeinflussen [Thesis]*. M.Sc. Thesis, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, 1-186 pp.
- Belitz, H. D., Chen, W., Jugel, H., Stempfl, H., Treleano, R., Wieser, H.** (1983). QSAR of bitter tasting compounds. *Chemistry and Industry*, 23-26.
- Bigelow, J. A., Houpt, T. R.** (1988). Feeding and drinking patterns in young pigs. *Physiology and Behavior*, **43**: 99-109.
- Black, J. L., Bray, H. J., Giles, L. R.** (1998). The thermal and infectious environment. **Ch. 4**, pp. 71-97. *A quantitative biology of the pig* (I. Kyriazakis, Ed.). Wallingford, Oxon, U.K., CABI Publishers
- Blair, R., FitzSimons, J.** (1970). A note on the voluntary feed intake and growth of pigs given diets containing an extremely bitter compound. *Animal Production*, **12**: 529-530.
- Campbell, B. A., Richardson, R.** (1988). Effect of chronic undernutrition on susceptibility to cold stress in young adult and aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, **44**: 193-202.

- Colaizzi, J. L., Klink, P. R.** (1969). pH-Partition behavior of tetracyclines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **58**: 1184-1189.
- FEDESA** (1998). *The use of antibiotics in animals* [internet communication]. Available at: <http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/ABKit/abkit.htm>.
- Garcia, J., Hankins, W. G.** (1975). The evolution of bitter and the acquisition of toxiphobia. pp. 39-45. *Olfaction and taste V: proceedings of the 5th international symposium* (D. A. Denton, J. P. Coghlan, Eds.). New York, USA, Academic Press, Inc.
- Gardner, R. J.** (1978). Lipophilicity and bitter taste. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **30**: 531-532.
- Glendinning, J. I.** (1994). Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiology and Behavior*, **56**: 1217-1227.
- Harris, D. L., Alexander, T. J. L.** (1999). Methods of disease control. **Ch. 72**, pp. 1077-1110. *Disease of Swine - 8th edition* (B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, Eds.). Ames, Ia, U.S.A., Iowa State University Press
- Hellekant, G., Danilova, V.** (1999). Taste in domestic pig, *Sus scrofa*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **82**: 8-24.
- Hosmer, D. W., Lemeshow, S.** (1989). *Applied logistic regression* New York, NY, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Hsia, L. C., Wood-Gush, D. G. M.** (1984). The temporal patterns of food intake and allelomimetic feeding by pigs of different ages. *Applied Animal Ethology*, **11**: 271-282.

- Hyun, Y., Ellis, M., Johnson, R. W.** (1998). Effects of feeder type, space allowance, and mixing on the growth performance and feed intake pattern of growing pigs. *Journal of Animal Science*, **76**: 2771-2778.
- Illius, A. W., Gordon, I. J.** (1987). The allometry of food intake in grazing ruminants. *Journal of Animal Ecology*, **56**: 989-1000.
- Kanis, E., Koops, W. J.** (1990). Daily gain, food intake and food efficiency in pigs during the growing periods. *Animal Production*, **50**: 353-364.
- Kare, M.** (1971). Comparative study of taste. **Ch. 13**, pp. 278-292. *Taste* (L. M. Beidler, Ed.). Berlin, Germany, Springer-Verlag
- Koritz, G. D., Bevill, R. F.** (1991). Role of pharmacokinetics in the outcome of treatment of infections. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **Suppl. 87**: 18-27.
- Kremer, W. D., Noordhuizen-Stassen, E. N., Grommers, F. J., Schukken, Y. H., Heeringa, R., Brand, A., Burvenich, C.** (1993). Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **76**: 3428-3436.
- Kubo, I.** (1994). Structural basis for bitterness based on Rabdosia diterpenes. *Physiology and Behavior*, **56**: 1203-1207.
- Kurihara, K., Katsuragi, Y., Matsuoka, I., Kashiwayanagi, M., Kumazawa, T., Shoji, T.** (1994). Receptor mechanisms of bitter substances. *Physiology and Behavior*, **56**: 1125-1132.
- Kyriazakis, I., Emmans, G. C.** (1998). Voluntary feed intake and diet selection. **Ch. 10**, pp. 229-248. *A quantitative biology of the pig* (I. Kyriazakis, Ed.). Wallingford, U.K., CABI Publishing

- Labroue, F., Guéblez, R., Meunier-Salaün, M. C., Sellier, P.** (1999). Feed intake behaviour of group-housed Pietrain and Large White growing pigs. *Annales de Zootechnie*, **48**: 247-261.
- Larrabee, W. L.** (1983). Formulation of drugs for administration via feed or drinking water. **Ch. 4**, pp. 175-204. *Formulation of veterinary dosage forms* (J. Blodinger, Ed.). New York, NY, USA, Marcel Dekker Inc.
- Levy, S. B.** (1992). *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle* New York, U.S.A., Plenum Press.
- Littell, R. C., Henry, P. R., Ammerman, C. B.** (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, **76**: 1216-1231.
- Magnasco, L. D., Magnasco, A. J.** (1985). Metallic taste associated with tetracycline therapy. *Clinical Pharmacy*, **4**: 455-456.
- Maze, G. I., Reinhardt, R. A., Payne, J. B., Maze, C., Baker, R. A., Bouwsma, O. J., Damani, N. C., Fitzgerald, J., Hamlin, J. C., Gerlach, R. W.** (1996). Gingival fluid tetracycline release from bioerodible gels. *Journal of Clinical Periodontology*, **23**: 1133-1136.
- Mood, A. M., Graybill, F. A., Boes, D. C.** (1974). Continuous distributions. **Ch. 3**, pp. 105-124. *Introduction to the theory of statistics - 3th edition* New York, NY, U.S.A., McGraw-Hill
- Nakamura, M., Nagamine, N., Takahashi, T., Norimatsu, M., Suzuki, S., Sato, S.** (1995). Intratracheal infection of chickens with *Salmonella* enteritidis and the effect of feed and water deprivation. *Avian Diseases*, **39**: 853-858.

- National Research Council** (1988). *Nutrient requirements of swine - 9th edition*. Washington D.C., U.S.A., National Academy Press.
- Nielsen, B. L., Lawrence, A. B., Whittemore, C. T.** (1995). Effect of group size on feeding behaviour, social behaviour, and performance of growing pigs using single-space feeders. *Livestock Production Science*, **44**: 73-85.
- Olfert, E. D. Olfert, E. D., Cross, B. M., McWilliam, A. A.**, Eds. (1993). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation - 2th edition*. Ottawa, Canada, Conseil Canadien de Protection des Animaux.
- Pfaffmann, C., Bartoshuk, L. M., McBurney, D. H.** (1971). Taste psychophysics. **Ch. 5**, pp. 75-101. *Taste* (L. M. Beidler, Ed.). Berlin, Germany, Springer-Verlag
- Pijpers, A., Schoevers, E. J., van Gogh, H., van Leengoed, L. A. M. G., Visser, I. J. R., van Miert, A. S. J. P. A. M., Verheijden, J. H. M.** (1991). The influence of disease on feed and water consumption and on pharmacokinetics of orally administered oxytetracycline in pigs. *Journal of Animal Science*, **69**: 2947-2954.
- Schentag, J. J.** (1999). Antimicrobial action and pharmacokinetics/pharmacodynamics: the use of AUC to improve efficacy and avoid resistance. *Journal of Chemotherapy*, **11**: 426-439.
- Shallenberger, R. S., Acree, T. E.** (1971). Chemical structure of compounds and their sweet and bitter taste. **Ch. 12**, pp. 221-277. *Taste* (L. M. Beidler, Ed.). Berlin, Germany, Springer-Verlag
- Straw, B. E., Meuten, D. J., Thacker, B. J.** (1999). Physical examination. **Ch. 1**, pp. 3-18. *Disease of Swine - 8th edition* (B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L.

Mengeling, D. J. Taylor, Eds.). Ames, IA, U.S.A., Iowa State University Press.

- Thomas, J. K., Forrest, A., Bhavnani, S. M., Hyatt, J. M., Cheng, A., Ballow, C. H., Schentag, J. J.** (1998). Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 521-527.
- Thomke, S., Elwinger, K.** (1998). Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Mode of action of antibiotic growth promotants. *Annales de Zootechnie*, **47**: 153-167.
- Toften, H., Jobling, M.** (1997). Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract. *Aquaculture Nutrition*, **3**: 145-151.
- Toften, H., Jorgensen, E. H., Jobling, M.** (1995). The study of feeding preferences using radiography: oxytetracycline as a feeding deterrent and squid extract as a stimulant in diets for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition*, **1**: 145-149.
- Vogelman, B., Gudmundsson, S., Leggett, J., Turnidge, J., Ebert, S., Craig, W. A.** (1988). Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 831-847.
- Wray, C., Furniss, S., Benham, C. L.** (1990). Feeding antibiotic-contaminated waste milk to calves - effects on physical performance and antibiotic sensitivity of gut flora. *British Veterinary Journal*, **146**: 80-87.

6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Le but principal de ce travail est de documenter et de comparer les relations dose-effet prophylactiques de la CTC et de l'OTC, les deux seules tétracyclines disponibles au Canada pour les thérapies de masse via l'aliment chez le porc. D'habitude, ces traitements antibiotiques sont institués quand l'antibiogramme le justifie, mais il n'est pas rare que l'on ait recours à ces thérapies de masse sans avoir identifié les agents responsables du cadre pathologique et sans que leur sensibilité aux tétracyclines ne soit connue. Quoiqu'il en soit, plusieurs aspects de l'utilisation des aliments médicamenteux (entre autres, la dose à prescrire, le schéma posologique à instituer et sa durée) sont encore extrêmement empiriques et leurs efficacités cliniques en condition de champ ne peuvent être prédites de façon satisfaisante même pour des bactéries sensibles à l'antibiogramme.

Pour tenter de comprendre la divergence existant entre les prédictions *in vitro* et les résultats *in vivo*, il était nécessaire de réaliser une étude prospective où l'on mesure, à différentes doses, l'effet prophylactique de la CTC et de l'OTC face à un agent pathogène dont la sensibilité est connue. Le choix de la bactérie à utiliser lors des infections expérimentales et des doses à administrer aux animaux devait être fait de façon à obtenir chez ces derniers un large éventail de concentrations d'antibiotique et des effets qui allaient d'une protection nulle jusqu'à une protection maximale contre la maladie. Aussi, il fallait que suffisamment de données soient présentes dans le segment de transition entre ces deux extrêmes pour que la relation dose-effet prophylactique soit déterminée avec précision (Mattie, 2000).

L'utilisation d'une bactérie dont la sensibilité est identique pour les deux tétracyclines à l'étude a permis d'évaluer et de comparer leurs effets respectifs à des doses identiques afin de pouvoir vérifier s'il sont vraiment des équivalents thérapeutiques. Cependant, il était crucial de ne pas utiliser une bactérie trop sensible ou trop résistante aux tétracyclines pour les infections expérimentales : chez la bactérie très sensible l'effet prophylactique saturerait même aux doses d'antibiotique les plus faibles, tandis que chez la bactérie résistante le segment de transition ne serait pas suffisamment

documenté même aux doses les plus élevées que l'animal peut tolérer. Dans les deux cas, les antibiotiques à l'étude donneraient, à tort, l'impression d'être aussi efficaces (ou aussi inefficaces) l'un que l'autre. Cette constatation nous amène à spéculer qu'à l'aube de l'ère des antibiotiques les tétracyclines naturelles pouvaient vraiment sembler équivalentes du point de vue thérapeutique, car à cette époque la prévalence de bactéries résistantes était faible (Datta et Hughes, 1983) et la PK/PD inexistante (Holford et Sheiner, 1981). Ce n'est que suite à des années d'utilisation massive en clinique et aux progrès dans l'élucidation de la corrélation structure-activité que l'équivalence thérapeutique des tétracyclines en médecine humaine a commencé à être remise en question (Kunin et Finland, 1961). Toutefois, sa vérification expérimentale n'a jamais eu lieu, probablement en raison de la perte de popularité de ces antibiotiques durant les années 1970 (Finland, 1974).

Le choix des doses d'antibiotique doit prendre en considération la variabilité inter-individuelle associée à la relation dose-concentration : elles doivent être suffisamment espacées pour que la corrélation concentration-effet s'y dégage, même avec des effectifs réduits. Dans ce cas, la formulation des pré-mélanges médicamenteux de CTC et d'OTC, où la biomasse déshydratée est le véhicule du principe actif, est une source additionnelle de variabilité qui pourrait nuire à la réussite de cet objectif. D'une part, la drêche contient les sels de Ca^{++} et de Mg^{++} qui avaient été ajoutés au brassin pour stabiliser le pH et préserver les cellules de *Streptomyces* spp. des effets toxiques des substances qu'elles produisent durant la fermentation (voir l'Annexe I). D'autre part, plusieurs excipients employés pour stabiliser le pré-mélange et favoriser son homogénéisation dans l'aliment sont des sources de cations divalents (voir la Section 3.2.6). Par conséquent, la libération dans l'estomac de la CTC et de l'OTC à partir de l'aliment médicamenté sera entravée par l'aliment et par la présence de Ca^{++} et de Mg^{++} , ce qui aura pour effet de réduire leurs fractions biodisponibles respectives, car seules les molécules de tétracycline qui se solubilisent durant le séjour dans l'estomac peuvent être résorbées (Rowland et Tozer, 1994). Dans ce cas, le pH des sécrétions digestives de l'individu, leur volume, l'intensité des mouvements péristaltiques et la

durée de séjour dans l'estomac auront des effets sur la biodisponibilité de ces antibiotiques et cet effet se répercutera sur leurs concentrations plasmatiques.

6.1. ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE *IN SILICO*

Des données quantitatives de la relation dose-concentration de la CTC et de l'OTC et de la variabilité inter-individuelle qui y est associée sont des prémisses essentielles à la vérification de nos hypothèses de recherche. Ces antibiotiques ont fait l'objet de quelques études de pharmacocinétique orale chez le porc, mais il était risqué d'établir les doses à employer dans l'étude PK/PD sur la base de ces travaux car ils ont été réalisées avec peu d'individus et leurs résultats sont parfois divergents, en particulier ceux en rapport avec la biodisponibilité de la CTC. Aussi, la fiabilité de ces résultats pouvait être mise en doute car les estimés de biodisponibilité orale chez le porc vont à l'encontre des résultats obtenus avec d'autres animaux monogastriques incluant l'homme : chez le porc, la biodisponibilité orale des tétracyclines à l'étude est faible, en particulier l'OTC (60% chez l'homme mais 5% chez le porc), et la biodisponibilité de la CTC chez le porc est au moins deux fois plus élevée que celle de l'OTC, alors que le contraire a été rapporté chez l'homme. Par conséquent, il était nécessaire de débiter ce travail par une vérification de la cohérence des données disponibles chez le porc en réalisant une méta-analyse des études de pharmacocinétique orale (del Castillo et coll., 1998).

Le processus de sélection des études indépendantes a permis d'éviter l'introduction de biais qui invalideraient les résultats. Les préalables (implicites) pour qu'une étude donnée soit considérée dans la méta-analyse étaient que les concentrations sériques ou plasmatiques d'antibiotique fassent l'objet d'une modélisation pharmacocinétique et que les résultats soient publiés dans une revue scientifique avec comité de lecture. Deux études portant sur ces antibiotiques ne satisfaisaient pas à ces critères d'inclusion : dans les deux cas, la fréquence d'ingestion et la quantité ingérée par repas n'étaient pas spécifiées et les temps de prélèvement d'échantillons sanguins n'étaient pas situés en rapport aux prises d'antibiotique.

Le contenu des articles conservés après cette première étape a été examiné en rapport à une série de critères d'exclusion : des facteurs tels que le taux d'humidité de l'aliment, l'ajout d'acide citrique dans l'aliment et l'infection expérimentale des animaux, qui modifient la biodisponibilité ou le devenir des antibiotiques chez l'animal. La teneur en cations divalents a joué le rôle de co-variable et les résultats de biodisponibilité obtenus avec des aliments dont les teneurs en calcium dépassaient les normes américaines et européennes ont été pondérés négativement sans pour autant les exclure de la méta-analyse. En effet, si cette variable avait été utilisée comme facteur d'exclusion, les estimés de biodisponibilité de la CTC et de l'OTC auraient pu être inférés à certains cas où des ingrédients plus riches en calcium (des farines de poisson, entre autres) sont utilisés dans la préparation des aliments pour porcelets.

Une caractéristique qui n'a pas été retenue pour pondérer la qualité des études est la méthode de détermination des concentrations plasmatiques de CTC et d'OTC. Des études suggèrent que les méthodes microbiologiques de détermination des concentrations de CTC seraient peu fiables (Ray et Newton, 1991), mais 3 des 4 études considérées ont fait usage de cette technique d'analyse, que plusieurs considèrent valide. Par conséquent, ce critère risquait d'être trop restrictif (quoique les résultats présentés à la Section 5.2 de cette thèse soulignent sa pertinence). Cette omission est passée inaperçue lors du processus de validation externe, probablement en raison de la grande variabilité inter-individuelle des concentrations plasmatiques de CTC.

Les estimés de méta-analyse prédisaient de façon satisfaisante les résultats des études employées dans le processus de validation externe, quels que soient l'âge des porcs et leur ingéré quotidien. Par conséquent, les critères d'exclusion ne semblent pas omettre des sources de biais qui invalident les estimés de méta-analyse. Il demeure que ces résultats sont assujettis à certaines limites :

- Les estimés ne servent qu'à prédire le comportement moyen du groupe de porcs. Leur valeur prédictive pour l'individu est donc faible;

- Les paramètres pharmacocinétiques de la CTC et l'OTC sont indépendants de la dose administrée via l'aliment et de la durée du traitement;
- Le véhicule d'administration de ces antibiotiques est un aliment complet à haute teneur en matière sèche;
- Ces aliments médicamenteux sont offerts dans un but de prophylaxie-métaphylaxie à des animaux cliniquement normaux, chez qui les tétracyclines à l'étude ont des comportements cinétiques compatibles aux données de la littérature;
- L'ingéré volontaire quotidien des porcs est conforme à ce qui a été rapporté dans la littérature scientifique et il n'est pas diminué par la dose d'antibiotique. Ce dernier point doit toutefois être vérifié dans le cadre de notre étude *in vivo*.

Dans ces conditions, la biodisponibilité de la CTC serait environ trois fois plus élevée que celle de l'OTC, ce qui est compatible avec les résultats de Nielsen et Gyrd-Hansen (1996), qui n'étaient pas disponibles lorsque la méta-analyse a été réalisée. Aussi, le volume de distribution de la CTC serait environ 25% plus grand que celui de l'OTC. Ces résultats sont conformes à leurs propriétés physico-chimiques respectives, qui ont été discutées à la Section 3.3.2. En effet, même si les deux congénères possèdent les mêmes systèmes ionisants, le log-P de la CTC dans le domaine physiologique des valeurs de pH est environ 5 fois plus élevé que celui de l'OTC (Colaizzi et Klink, 1969). La présence d'un groupe hydroxyl sur le carbone 5 du noyau tétracycline (Figure 8) semble conférer à l'OTC une plus grande polarité, qui entraverait sa diffusion dans la phase lipide, ce qui devrait se répercuter significativement sur sa facilité à pénétrer à travers des membranes biologiques. L'absorption intestinale et la diffusion extra-vasculaire des molécules de CTC en solution seraient alors plus aisées par rapport à l'OTC. D'autre part, la clairance et la constante d'élimination de la CTC seraient plus élevées que celles de l'OTC. Chez la volaille, un modèle cinétique physiologique a montré que la sécrétion biliaire et la dégradation chimique sont

responsables de 46% et 4% de la clairance systémique de la CTC, respectivement (Pollet et coll., 1985) et il est raisonnable de croire que ces voies d'élimination sont aussi présentes chez le porc. Toutefois, leur importance relative chez ce mammifère reste à être déterminée. En définitive, la méta-analyse prédit que les concentrations plasmatiques totales de CTC seraient environ 2 fois plus élevées que celles d'OTC, indépendamment de la dose administrée via l'aliment. Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse que la CTC et l'OTC ne devraient pas avoir des relations dose-effet prophylactiques équivalentes.¹

Cette hypothèse tirée des résultats de méta-analyse est à contre-courant de ce qui est généralement admis chez les microbiologistes oeuvrant dans les laboratoires de diagnostic vétérinaires et n'a jamais été perçue dans le cadre de la pratique vétérinaire. Cependant, plusieurs microbiologistes ont noté que les CMI de CTC pour des bactéries du tractus respiratoire porcine sont souvent 2—3 rangs de dilution plus basses que celles d'OTC et de tétracycline (Messier S., 1997 – communication personnelle),^m mais peu d'entre eux y ont porté attention (Wu et Wolff, 2000). Si l'effet est fonction de la durée d'exposition de l'agent pathogène à des concentrations supra-CMI (AliAbadi et Lees, 2000) et que, à l'instar des organismes normatifs (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990), on néglige leurs différences d'effets antibiotiques, la dose requise pour protéger l'animal sera plus petite avec la CTC, car sa plus grande biodisponibilité par rapport à l'OTC compense largement pour sa clairance plus élevée (voir Section 5.1.5.1.). Ceci a déjà été observé dans le cas de la doxycycline et de la minocycline (Pijpers, 1990), dont la biodisponibilité orale et le temps de séjour moyen permettent d'atteindre des concentrations efficaces à de plus petites doses que l'OTC (Aronson, 1980).

¹ Un doute peut toutefois subsister lorsque l'on considère leurs concentrations libres respectives, car celle-ci est souvent un bien meilleur indicateur de l'activité pharmacologique d'un médicament que ne l'est la concentration totale (Rowland et Tozer, 1994). Si la fraction libre $f_u = C_u/C$ (où C_u et C sont respectivement les concentrations libre et totale de médicament) est indépendante de C pour les deux antibiotiques à l'étude et que f_u est d'environ 30-50% pour la CTC et 75-80% pour l'OTC, d'après leurs taux de liaison protéines plasmatiques (Reichert, 1988), la différence de concentrations totales en faveur de la CTC disparaîtrait si on considère leurs concentrations libres respectives.

^m La CMI d'une bactérie est déterminée par l'incubation dans une série de milieux de culture (liquides ou solides) où la concentration d'antibiotique diminue de moitié d'un réceptacle à l'autre. Dans ce cas, une bactérie dont la CMI d'OTC est égale à 2 mg/L aurait une CMI de CTC égale à 0,5 ou 0,25 mg/L.

6.2. ÉTUDE PK/PD *IN VIVO*

D'après les simulations de profils cinétiques à l'état d'équilibre réalisés avec les estimés de méta-analyse et leurs coefficients de variation respectifs (voir Section 5.1), nous avons jugé nécessaire de réaliser les infections expérimentales avec une souche d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* dont la CMI serait de 1 ou 2 mg/L. Dans leurs expériences avec la doxycycline et l'OTC, Pijpers et coll. (1991) avaient choisi de travailler aussi avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* dont la CMI était de 1mg/L. Par conséquent, nos animaux d'expériences ont été inoculés avec la souche d'*A. pleuropneumoniae* FMV 92-8172, chez laquelle les deux antibiotiques ont des CMI de 2 mg/L, ce qui la classe dans la catégorie « sensible » aux tétracyclines d'après les directives du N.C.C.L.S.

Quand deux formulations orales sont mises à l'épreuve dans un protocole de titration de l'effet antibiotique, où il est nécessaire d'obtenir une plage de concentrations sub-optimales au site d'infection, celui qui procure la concentration la plus élevée pour une dose donnée doit servir de référence pour déterminer les doses à administrer. La concentration plasmatique de CTC semble être un bon indicateur de sa concentration dans le poumon (l'organe cible pour *A. pleuropneumoniae*), car des études de distribution tissulaire de l'OTC indiquent que le rapport des concentrations pulmonaires et plasmatiques chez le porc est environ égal à 1 (Mercer et coll., 1978; Black et Gentry, 1984). En raison de sa clairance plus élevée, il est raisonnable de croire que le rapport de concentration poumon:plasma pour la CTC doit être proche de celui pour l'OTC. Par conséquent, des doses de CTC via l'aliment correspondant à 22, 44, 66 et 88 mg/kg/jour devraient nous procurer, d'après les simulations, des concentrations plasmatiques moyennes approximativement égales à 25%, 50%, 75% et 100% de la CMI de la bactérie test, ce qui devrait être suffisant pour documenter la relation concentration-effet prophylactique.

Si ces doses de CTC via l'aliment devaient réussir à documenter adéquatement le segment des concentrations où aurait lieu la transition de l'effet clinique nul à l'effet maximal, en revanche les résultats individuels seront difficiles à expliquer. En effet,

les CV associés aux estimés de biodisponibilité, de clairance et de la pente terminale d'élimination issus de méta-analyse sont tous voisins de 50%, ce qui nous permet de dire que la concentration plasmatique des antibiotiques étudiés sera très variable pour une même dose. Il était donc nécessaire de débiter notre expérimentation *in vivo* par l'administration une dose intraveineuse de CTC ou d'OTC pour obtenir des estimations précises de leurs clairances et leurs volumes de distribution chez chaque individu, et pour pouvoir calculer leurs biodisponibilités lors d'administration orale.

Nos résultats indiquent que la clairance de la CTC est significativement plus élevée que celle de l'OTC, quelle que soit la voie d'administration, ce qui est conforme aux résultats de la méta-analyse. Tel que discuté plus tôt, cette différence pourrait être associée à une plus grande élimination biliaire ainsi qu'au phénomène de dégradation spontané de la CTC dans les milieux neutre ou alcalins (Stephens et coll., 1954; Kennedy et coll., 1998). Aussi, la clairance de la CTC était sujette à une plus grande variabilité inter-individuelle que celle de l'OTC. Cette différence pourrait être reliée à une contribution variable, d'un individu à l'autre, des processus d'élimination non-rénaux de la CTC. En raison de sa plus grande stabilité et de son hydrosolubilité, les processus d'élimination non-rénaux seraient marginaux chez l'OTC, ce qui se traduit par une variance plus petite.

Le volume de distribution à l'état d'équilibre de la CTC est plus grand que celui de l'OTC, ce qui concorde avec ce qui avait été prédit par méta-analyse et qui est conforme à leurs différences de liposolubilité respectives. Cependant, les différences de volume de distribution observées lors des expériences de cinétique orale n'étaient pas significatives du point de vue statistique. A l'instar de la clairance, la variabilité inter-individuelle associée au volume de distribution de la CTC était plus grande que celle de l'OTC, ce qui pourrait encore être le reflet des différences entre leurs log-P respectifs (Colaizzi et Klink, 1969). D'une part, il est rapporté que le schéma de distribution des tétracyclines se caractérise par une boucle de recirculation entre le compartiment vasculaire et la vessie (Milroy et coll., 1974; Wood et Leonard, 1983). L'antibiotique qui s'accumule dans la vessie diffuse à travers sa paroi, à la faveur du gradient de concentration, et retourne à la circulation sanguine via les canaux

lymphatiques. En général, cette diffusion serait facilitée par la liposolubilité de l'antibiotique, mais le pH de l'urine, sa teneur en cations divalents et la fréquence des mictions agiraient comme facteurs de variation entre les individus. Cette différence dans la variabilité inter-individuelle associée au volume de distribution pourrait aussi être expliquée en partie par des différences de composition corporelle, ce qui peut encore être le reflet des différences de log-P de ces deux antibiotiques. Même si nous avons exigé du fournisseur que des porcs ayant des âges et des poids uniformes nous soient livrés et que ceux-ci aient été distribués aléatoirement à l'intérieur des groupes de traitement (voir Section 5.2.5.), il est possible que les teneurs relatives en muscle, gras, eau et os soient variables d'un individu à l'autre. Pour des raisons de faisabilité, il était difficile d'ajouter un critère plus spécifique (par exemple l'adiposité) aux deux critères de sélection des animaux déjà existants, ou encore de déterminer la composition corporelle des animaux durant les expériences afin d'introduire cette co-variable lors de l'analyse statistique. Toutefois, l'influence des différences de la composition corporelle des individus sur la distribution sera encore fonction de la liposolubilité de l'antibiotique (Rowland et Tozer, 1994). En définitive, il était logique d'anticiper que le volume de distribution soit plus variable chez la CTC en raison de son caractère plus lipophile (Colaizzi et Klink, 1969).

L'administration, 24 h après la dose intraveineuse, d'un repas médicamenté a permis d'établir la biodisponibilité de la CTC et de l'OTC lors d'usage des pré-mélanges commerciaux à la dose approuvée et à diverses doses hors-normes, qui correspondent aux habitudes de prescription en médecine vétérinaire porcine. Tel qu'attendu, la biodisponibilité orale de la CTC est largement supérieure à celle de l'OTC, mais leurs valeurs sont quand même plus faibles que chez d'autres animaux monogastriques. L'estimé de biodisponibilité pour l'OTC est conforme à ce qui a été rapporté dans les études précédentes, mais celui pour la CTC est supérieur à tous les estimés antérieurs (voir Section 5.1.5.1.). Cette différence ne peut pas avoir été causée par un biais dans l'estimation de l'AUC de la voie de référence, car le protocole d'échantillonnage est le même pour les deux médicaments et, tel que dit précédemment, la biodisponibilité de l'OTC n'a pas été surestimée. L'aliment qui a été employé dans cette étude est

conforme aux recommandations nutritionnelles pour la teneur en cations divalents (voir Annexe 4), ce qui était aussi le cas pour les études antérieures sauf lorsque le but était d'étudier l'effet du Ca^{++} sur la biodisponibilité (voir Section 5.1.4.1.).

Le choix de la méthode de détermination des concentrations plasmatiques pourrait expliquer la plus grande partie des différences entre l'estimé de biodisponibilité de la CTC de cette étude et les estimés des études précédentes. En effet, la majorité de ces dernières ont employé une technique de dosage microbiologique, où le diamètre d'inhibition de croissance d'une bactérie standard après 24 h d'incubation indique, par rapport à la courbe d'étalonnage, la concentration d'antibiotique dans l'échantillon à mesurer. Cependant, la CTC est instable en présence de matière organique et au pH neutre, de telle sorte qu'une étude rapporte que lorsque cet antibiotique a été ajouté dans deux milieux de culture courants, il ne reste que 25% et moins de 1% de la dose initiale après 24 h d'incubation à 37°C (Ray et Newton, 1991). Des observations similaires sur l'instabilité de la CTC dans les milieux biologiques ont déjà été rapportées durant les années 1950 (Lepper, 1956). Dans une autre étude de cinétique des tétracyclines chez le porc, des chercheurs ont employé une méthode de chromatographie liquide qui ne fait pas usage d'un étalon interne (Nielsen et Gyrd-Hansen, 1996). Cependant, il a été démontré que la précision de cette technique de détermination des tétracyclines est insatisfaisante à moins qu'un étalon interne ne soit ajouté (Limpoka, 1979).

La discordance entre l'estimé de biodisponibilité de notre étude par rapport aux études précédentes pourrait aussi être associée à la taille de l'échantillonnage étudié. En effet, il est raisonnable de croire que, en raison de sa distribution log-normale, la moyenne d'un paramètre pharmacocinétique risque d'être sous-estimée avec des échantillonnages de petite taille, car la densité de probabilité est plus élevée à gauche de la moyenne qu'à droite. Ainsi, la seule équipe qui, comme nous, a employé une méthode de chromatographie liquide avec étalon interne (Kilroy et coll., 1990) rapporte l'estimé de biodisponibilité orale de la CTC qui se rapproche le plus de celui que nous avons obtenu dans nos expériences. Cependant, l'estimé obtenu par ces chercheurs avec 5 porcs ($17,9 \pm 5,3\%$) est inférieur à notre estimé de $27,2 \pm 9,5\%$ obtenu

avec 34 porcs, ce qui soulignerait la nécessité de travailler avec un échantillonnage de taille suffisante.

Bien que des études antérieures rapportent que la CTC et l'OTC auraient des pharmacocinétiques stationnaires par rapport à la dose administrée (Kilroy et coll., 1990; Pijpers et coll., 1991), cette vérification était indispensable afin de s'assurer que nos paramètres issus de l'analyse cinétique non-compartmentale sont valides à des fins d'inférence à la population (Dunne, 1993). L'administration via l'aliment de différentes doses de CTC et d'OTC a permis de vérifier que la cinétique de ces antibiotiques est indépendante de la dose administrée, tel que vérifié de façon générale par l'augmentation linéaire de l'AUC et de C_{max} en fonction de la dose, ainsi que par la stationnarité de t_{max} . L'indépendance des paramètres pharmacocinétiques par rapport à la dose a aussi fait l'objet de vérification : les résidusⁿ de régression linéaire des estimés de paramètres cinétiques associés à la voie orale en fonction de ceux issus de la dose intraveineuse n'ont pu être expliqués par la dose administrée via l'aliment. Par conséquent, les estimés de CL, V et F sont valides et les profils pharmacocinétiques obtenus dans cette étude peuvent faire l'objet d'inférences à la population.

Accessoirement, la vérification de la stationnarité des paramètres pharmacocinétiques par rapport à la dose a permis de mettre en évidence que le devenir du médicament chez l'individu change d'une prise d'antibiotique à l'autre. Les phénomènes liés à ces changements sont inconnus, mais il est possible de supposer que ces observations soient en relation avec l'effet de promotion de croissance des tétracyclines. Des études montrent que les porcelets qui consomment des d'aliments contenant de la CTC ont des concentrations sériques de facteur de croissance insulino-mimétique de type I (IGF-I) plus élevées (Hathaway et coll., 1999), ce qui induit la prolifération des cellules musculaires et osseuses ainsi que l'accumulation d'eau tissulaire. Ces changements auraient pour effet d'augmenter le volume de distribution ou de diminuer la clairance des tétracyclines, ce qui est compatible avec nos résultats. Une hypothèse alternative réside dans les différences de composition des formulations de CTC et d'OTC utilisées

ⁿ NB : Le résidu est égal à la valeur observée du paramètre cinétique après administration orale moins la valeur prédite avec l'équation de régression.

pour l'administration intraveineuse et via l'aliment. En effet, du chlorhydrate de CTC et d'OTC d'une grande pureté ont été administrés par voie intraveineuse, tandis que 88% de la masse des pré-mélanges pour l'aliment est constituée d'excipients et leur contenu en sels de Ca^{++} et de Mg^{++} est élevé.^o Par conséquent, il est raisonnable de supposer que la calcémie et la magnésémie puissent avoir augmenté chez les porcelets suite à l'ingestion d'aliments médicamenteux, ce qui aurait pour effet d'augmenter la formation de complexes avec la fraction plasmatique libre des tétracyclines et leur entreposage dans le tissu osseux en croissance. Par conséquent, les clairances des antibiotiques non-liés aux protéines plasmatiques diminueraient et leurs volumes de distribution apparents augmenteraient. Une troisième hypothèse découle d'une synchronisation du comportement des porcelets avec l'horaire d'expériences. Dans ce cas, ils demeureraient plus actifs durant le jour et à dormiraient durant la nuit, ce qui changerait la fréquence de miction et favoriserait la réabsorption des tétracyclines à partir de la vessie (Milroy et coll., 1974; Wood et Leonard, 1983).

Les différences de biodisponibilité, de clairance et de volume de distribution notées font que la concentration plasmatique de CTC à l'état d'équilibre soit environ 4 fois plus élevée que celle d'OTC (voir Section 5.2.5.3.). Ce résultat est deux fois plus élevé que ce que nos simulations avaient prédit, mais la plage de concentrations obtenue s'étend entre 0,12 et 3,45 mg/L (respectivement la plus petite C_{moy} d'OTC et la plus grande C_{moy} de CTC), ce qui correspond à 6% et 173% de la CMI de la souche d'*A. pleuropneumoniae* utilisée lors de l'infection expérimentale. Les concentrations de CTC et d'OTC dans le plasma avant l'inoculation de la bactérie étaient comparables à leurs C_{moy} respectives.

La maladie était évidente dès le premier examen clinique, mais son intensité variait passablement entre les individus. Les médianes des cotes cliniques chez les groupes CTC, OTC et contrôle étaient de 1,00, 10,25 et 9,50, respectivement, tandis que celles de l'étendue des lésions à la nécropsie étaient respectivement de 1,3%, 12,7% et 21,3%. Dans les deux cas, le groupe CTC était significativement différent des deux

^o NB : Le pré-mélange fournit une quantité de principe actif équivalente à 220 g/kg de chlorhydrate d'antibiotique

autres groupes de traitement, chez qui les résultats étaient comparables. Le rapport de concentration poumon:plasma au moment de la nécropsie étaient égaux à 1 pour les deux antibiotiques. Par conséquent, la différence de C_{moy} d'un facteur 4 en faveur de la CTC ne s'est pas estompée, comme sa fraction libre le suggérait. Plutôt, elle s'est traduit par un avantage d'un facteur 10 en faveur de la CTC même si la CMI était identique pour les deux antibiotiques.

En examinant les résultats individuels de cette étude, on peut constater que les deux indicateurs de la gravité de la maladie (la cote clinique et l'étendue des lésions pulmonaires) et leurs variabilités inter-individuelles respectives sont inversement proportionnels à C_{moy} , mais en suivant une relation non-linéaire. Cette géométrie est suggestive du modèle de Hill pour effets inhibiteurs, où les bornes du segment de transition se situent environ à 0,25 et 1 mg/L (voir Section 5.2.4.5.). La variabilité inter-individuelle observée n'est pas surprenante car, même avec un modèle d'infection standardisé, il est difficile de prévoir la réponse de l'animal à l'infection. En effet, d'une part la souche d'*A. pleuropneumoniae* doit s'attacher à l'épithélium respiratoire, proliférer et produire ses facteurs de virulence, ce qui sera affecté par l'efficacité de l'appareil muco-ciliaire de l'animal. D'autre part, l'exposition aux toxines ApxI et ApxII de la bactérie déclenchera chez les pneumocytes, les macrophages et les cellules de l'endothélium une réponse inflammatoire et une libération de cytokines variables, de même que l'intensité de la migration de neutrophiles activés. Dans ce cas, l'effet de l'antibiotique qui s'est accumulé au site d'infection sera fonction de sa concentration, mais aussi de l'efficacité de la bactérie à proliférer dans l'arbre respiratoire et à exprimer ses facteurs de virulence, ainsi que de l'intensité de la réponse inflammatoire et de la sécrétion de cytokines chez l'hôte. Par conséquent, il est logique que de faibles quantités d'antibiotiques puissent être suffisantes pour prévenir la maladie clinique chez une minorité d'animaux tandis que d'autres sujets réagissent si violemment à la présence de la bactérie que même une concentration élevée d'antibiotique ne réussit pas à prévenir complètement le cadre clinique. En définitive, dans un cadre de thérapie de masse via l'aliment, où l'infection doit être maîtrisée chez le plus grand nombre d'animaux possible et qu'il faut une

concentration d'au moins 1 mg/L pour prévenir adéquatement la maladie, le choix logique est de prescrire de la CTC à une dose d'au moins 66 mg/kg de poids vif.

6.3. EFFET DE LA CTC ET DE L'OTC SUR LA PRISE ALIMENTAIRE ET LA CROISSANCE

Si la dose requise pour maîtriser adéquatement l'infection dans un cadre de thérapie de masse via l'aliment a été bien établie, il est crucial toutefois que son application n'induisse pas une diminution de l'ingéré volontaire chez la population-cible. Dans cette situation, la dose consommée serait sub-optimale chez une proportion de sujets, ce qui augmenterait le risque d'échecs thérapeutiques, diminuerait la résistance des animaux aux stress microbiologiques, physiques et chimiques, et favoriserait la propagation d'antibiorésistance. De plus, une diminution non-rapportée de l'ingéré volontaire dans notre étude se traduirait par des biais dans l'estimation des paramètres pharmacocinétiques (clairance, biodisponibilité et volume de distribution) de l'antibiotique du pré-mélange. Par conséquent, il était justifié d'examiner et de comparer le comportement alimentaire de chaque sujet durant les jours où celui-ci n'était pas entravé par la réalisation des expériences cinétiques.

Même si la CTC et l'OTC possèdent les caractéristiques physiques et chimiques requises pour donner un goût amer à l'aliment (ce qui pourrait causer une diminution de consommation), la durée du repas, la quantité ingérée et la vitesse d'ingestion chez les porcs des trois groupes étaient comparables. Ces paramètres étaient très variables d'un individu à l'autre, mais leur évolution chez l'individu était relativement constante et était affectée par la masse initiale et l'âge.

Le suivi individuel du comportement alimentaire nous a permis d'identifier une sous-population (10% des sujets de l'étude) d'animaux dont l'intérêt pour l'aliment était moindre. Cette observation n'est pas banale du point de vue épidémiologique : tel que mentionné ci-dessus, l'aliment est le véhicule de l'antibiotique prescrit dans un cadre de prophylaxie des maladies infectieuses, mais aussi la source d'énergie et de protéines qui assure le maintien des fonctions métaboliques. En plus de leur croissance,

l'intégrité du système immunitaire et des voies de détoxification de l'organisme des animaux peu motivés pourraient être compromise, de même que le remplacement des cellules mortes (par exemple, les entérocytes). En conséquence, ces animaux auront plus de chances d'agir comme multiplicateurs des agents pathogènes, ce qui aura pour effet d'augmenter la pression d'infection et de favoriser la propagation de la maladie. Les causes de cette moins grande motivation demeurent toutefois obscures : ces sujets n'ont pas démontré des signes de maladie, ils n'ont pas eu de problèmes d'adaptation aux conditions de captivité, ils étaient distribués équitablement entre les 3 groupes de traitement et l'activité d'ingestion de leurs voisins de cage n'a pas été une source de motivation lors des repas. Une seule caractéristique physiologique a pu être associée à ce comportement aberrant : le poids de l'animal au début de l'étude, ce qui pourrait nous laisser croire que ce comportement était déjà présent avant leur arrivée dans les locaux d'expériences.

En rapport aux paramètres de croissance des porcs du groupe contrôle et des groupes traités, il est à signaler que leurs taux de conversion alimentaire (FCR)^p moyens étaient comparables, mais leurs variances respectives étaient significativement différentes. Dans ce cas, les groupes de traitement peuvent être classés en ordre croissant de variabilité inter-individuelle : CTC > OTC > Contrôle. Cet effet de promotion de croissance est bien connu depuis les débuts de l'âge des antibiotiques (Jukes, 1977), mais le mécanisme exact reste à être élucidé. On a proposé qu'en limitant la taille de l'écosystème bactérien intestinal, les antibiotiques diminueraient les dépenses d'énergie et de protéines relatives à l'activité des systèmes immunitaire et endocrinien, au métabolisme de détoxification et à la prolifération des entérocytes essentielle à l'intégrité de l'intestin (Thomke et Elwinger, 1998). Cependant, d'autres chercheurs prétendent que les tétracyclines agiraient comme facteur de libération d'hormones, qui interviennent dans l'anabolisme en général, par des mécanismes autres que l'effet antibiotique (Hathaway et coll., 1999). Quel que soit le mécanisme, l'effet de promotion de croissance observé dans cette étude n'a pu être profitable que chez une minorité des individus de chaque groupe, car leur statut sanitaire général est

^p Taux de conversion alimentaire : quantité ingérée ÷ gain de poids durant la période d'étude.

très élevé (voir Section 4). Par conséquent, l'usage de ces antibiotiques en tant que promoteurs de croissance est déraisonnable, car l'amélioration des conditions de captivité, de l'hygiène et des mesures de biosécurité peut réussir à améliorer la croissance des porcelets au même point que les antibiotiques. Cette alternative à l'usage ergotrope des tétracyclines est d'autant plus intéressante que leur usage prolongé dans des traitements de masse à de faibles doses contribuerait au développement et à la propagation de bactéries résistantes dans l'écosystème (Levy, 1992).

7. CONCLUSIONS

- L'ensemble des résultats de cette étude confirme nos hypothèses de recherche : si les différences structurelles entre la CTC et l'OTC ont un impact aussi marqué sur une caractéristique physico-chimique fondamentale telle que le coefficient de partage octanol:eau, cette différence doit aussi se refléter chez le patient. Plus précisément, leurs diffusions respectives à travers des membranes biologiques seront fonction de leurs valeurs de log-P, qui est 5 fois plus grande pour la CTC que pour l'OTC. Il était donc possible de prédire que le volume de distribution et la biodisponibilité de la CTC lors d'administration via l'aliment seraient plus élevés que ceux de l'OTC. Par conséquent, des doses identiques de ces deux antibiotiques via l'aliment produiront des concentrations plasmatiques de CTC plus grandes. Conjointement, ces paramètres cinétiques font que la concentration plasmatique moyenne de CTC à l'état d'équilibre soit 4 fois plus élevée que celle d'OTC lors du traitement via l'aliment.
- Une deuxième hypothèse qui a été vérifiée est que la corrélation concentration-effet pour les tétracyclines n'est pas nulle, c'est-à-dire, que l'intensité de l'effet varie en fonction des variations de concentrations, tel que démontré lors de l'infection expérimentale avec une bactérie dont la CMI était identique pour la CTC et l'OTC. Si cette hypothèse était fautive, les différences d'efficacité entre ces deux antibiotiques ne correspondraient pas aux différences notées dans leurs relations dose-concentration. Dans cette étude, la sévérité de la maladie chez le groupe CTC était 10 fois moindre que ce qui a été observé chez le groupe OTC et chez les témoins. Accessoirement, les concentrations plasmatiques totales de CTC et d'OTC donnent un bon estimé de leurs concentrations pulmonaires respectives, et elles prédisent l'effet antibiotique de façon satisfaisante.
- Si la sévérité de la maladie chez le groupe CTC était 10 fois moindre que chez le groupe OTC, ceci ne veut pas dire que la CTC est 10 fois plus active que

l'OTC. Il faudrait plutôt s'interroger à propos de la capacité du pré-mélange d'OTC à produire des concentrations efficaces aux doses administrées via l'aliment quand sa biodisponibilité est de 5%. En effet, trop peu de sujets auraient au niveau du site d'infection des concentrations d'OTC plus grandes que la borne inférieure du segment de transition pour que l'effet général de l'antibiotique soit significativement différent par rapport au groupe contrôle. Ceci souligne l'importance de prescrire les antibiotiques à des doses suffisamment élevées pour maîtriser le pathogène visé. Tout motif, politique ou économique, de réduire la dose requise du point de vue PK/PD aura des conséquences néfastes sur les chances de circonscrire l'agent infectieux, d'abrèger la maladie chez la population malade et de préserver l'efficacité de l'antibiotique.

- Seul l'usage du pré-mélange à une dose qui procure au moins 66 mg de chlorhydrate de CTC par kg de poids vif a réussi à protéger le groupe entier de porcs de la maladie expérimentale causée par une bactérie dont la CMI est égale à 2 mg/L. Selon les directives du N.C.C.L.S., la bactérie pour qui ce résultat d'antibiogramme est obtenu doit être considéré « sensible. » Cette dose via l'aliment est 3 fois plus élevée que la dose approuvée en Amérique du Nord. Cette constatation soulève un problème de fond : les pré-mélanges de tétracycline n'ont pas été optimisés du point de vue biopharmaceutique. En effet, la teneur en cations divalents des pré-mélanges nuit à la libération du principe actif et à son absorption, ce qui expose la flore bactérienne à des quantités superflues d'antibiotique. Dans le contexte d'émergence d'antibiorésistance, il devient impératif d'élucider les causes biopharmaceutiques et pharmacocinétiques de la faible biodisponibilité des pré-mélanges actuels et de mettre au point de nouvelles formulations optimisées.
- Une autre conclusion de cette étude concerne la validité de l'antibiogramme et de la CMI comme indicateurs de la concentration efficace *in vivo*. Dans cette

étude, les infections expérimentales ont été réalisées avec une souche d'*A. pleuropneumoniae* dont la CMI déterminée dans des conditions *in vitro* est environ deux fois plus élevée que la concentration minimale qui sature l'effet *in vivo*. À des concentrations plus élevées, il n'y a pas eu d'amélioration significative de l'efficacité prophylactique. Cela nous permet de penser que soit la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques est plus élevée *in vivo* qu'*in vitro*, soit l'antibiotique produit d'autres effets bénéfiques que celui qu'il exerce sur la taille nette de la population bactérienne. Dans cette dernière avenue, nous pouvons retrouver l'inhibition de l'expression des facteurs d'attachement de la bactérie au niveau du lipopolysaccharide, l'inhibition de la synthèse des toxines Apx ou de facteurs antiphagocytaires. De plus, il est possible que cette divergence entre la CMI et la concentration minimale qui sature l'effet *in vivo* puisse être associée à la chélation du Zn^{++} par les tétracyclines, ce qui inactive les métalloprotéinases et empêche l'exacerbation de la réaction inflammatoire. Cette dernière avenue est particulièrement intéressante, car elle permettrait à de nouvelles molécules d'être utilisées pour moduler l'intensité de la réponse à l'infection dans certains cadres particuliers, tel que la pleuropneumonie porcine.

8. RÉFÉRENCES

- Agriculture Canada** (1998). *Compendium of Mediating Ingredient Brochures - 8ème édition*. Hull, Canada, Canada Communications Group Inc.
- Albert, A.** (1953). Avidity of Terramycin and Aureomycin for metallic cations. *Nature*, **172**: 201.
- Albert, A., Rees, C. W.** (1956). Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. *Nature*, **177**: 433-434.
- AliAbadi, F. S., Lees, P.** (2000). Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **14**: 307-313.
- Apley, M. D., Brown, S. A., Fedorka-Cray, P. J., Ferenc, S., House, J. K., Riviere, J. E., Rice, L. B., Thornsberry, C., Waddell, J.** (1998). Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: animal and public health perspectives. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **212**: 1209-1213.
- Aronson, A. L.** (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **176**: 1061-1068.
- Baggot, J. D., Brown, S. A.** (1998). Basis for selection of the dosage form. **Ch. 2**, pp. 145-229. *Development and formulation of veterinary dosage forms - 2ème édition* (G. E. Hardee, J. D. Baggot, Éds.). New York, U.S.A., Marcel Dekker
- Barza, M., Brown, R. B., Shanks, C., Gamble, C., Weinstein, L.** (1975). Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **8**: 713-720.

- Becker, R.** (1993). *Untersuchungen über Faktoren, welche die aufnahme von Futterungsarzneimitteln beim Schwein beeinflussen*. Thèse de M.Sc., Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, 186 pp.
- Behal, V., Hunter, I. S.** (1995). Tetracyclines. *Biotechnology*, **28**: 359-384.
- Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A., Wachter, V. J.** (1999). Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **62**: 25-31.
- Bergogne-Bérézin, E., Brogard, J. M.,** Éds. (1999). *Bases biologiques de l'antibiothérapie*. Paris, France, Masson Éditeur.
- Black, W. D., Gentry, W. D.** (1984). The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. *Canadian Veterinary Journal*, **25**: 158-161.
- Blackwood, R. K., English, A. R.** (1977). Structure-activity relationships in the tetracycline series. **Ch. 7**, pp. 397-426. *Structure-activity relationships among the semisynthetic antibiotics* (D. Perlman, Ed.). New York, U.S.A., Academic Press Inc.
- Buck, M. A., Cooperman, B. S.** (1990). Single protein omission reconstitution studies of tetracycline binding to the 30S subunit of *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry*, **29**: 5374-5379.
- Carney, D. E., Lutz, C. J., Picone, A. L., Gatto, L. A., Ramamurthy, N. S., Golub, L. M., Simon, S. R., Searles, B., Paskanik, A., Snyder, K., Finck, C., Schiller, H. J., Nieman, G. F.** (1999). Matrix metalloproteinase inhibitor prevents acute lung injury after cardiopulmonary bypass [see comments]. *Circulation*, **100**: 400-406.

- del Castillo, J. R. E., Elsener, J., Martineau, G. P.** (1998). Pharmacokinetic modeling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. *Swine Health and Production*, **6**: 189-202.
- Chopra, I., Ball, P.** (1982). Transport of antibiotics into bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, **23**: 183-240.
- Chopra, I., Hawkey, P. M., Hinton, M.** (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **29**: 245-277.
- Christensen, G., Sørensen, V., Mousing, J.** (1999). Diseases of the respiratory system. **Ch. 61**, pp. 913-940. *Disease of Swine - 8ème édition* (B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, Eds.). Ames, U.S.A., Iowa State University Press
- Colaizzi, J. L., Klink, P. R.** (1969). pH-Partition behavior of tetracyclines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **58**: 1184-1189.
- Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois, J. P., Goldstein, F., Éd.** (1990). *Bactéricidie. Aspects théoriques et pratiques* Paris, France, Éditions Maloine.
- Craig, W. A., Suh, B.** (1978). Theory and practical impact of binding of antimicrobials to serum proteins and tissue. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplementum*, 92-99.
- Datta, N., Hughes, V. M.** (1983). Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*, **306**: 616-617.
- Davies, J.** (1999). In praise of antibiotics. *ASM News*, **65**: 304-310.

- Dee, S. A., Carlson, A. R., Winkelman, N. L., Corey, M. M.** (1993). Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **203**: 295-299.
- Den Hollander, J. G., Fuursted, K., Verbrugh, H. A., Mouton, J. W.** (1998). Duration and clinical relevance of postantibiotic effect in relation to the dosing interval. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 749-754.
- Dickersin, K., Berlin, J. A.** (1992). Meta-analysis: state-of-the-science. *Epidemiological Reviews*, **14**: 154-176.
- Duggar, B. M.** (1948). Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **51**: 177-181.
- Dunne, A.** (1993). Statistical moments in pharmacokinetics: models and assumptions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **45**: 871-875.
- Evans, R. C., Éd.** (1968). *The technology of the tetracyclines* New York, U.S.A., Quadrangle Press.
- FEDESA** (1998). *The use of antibiotics in animals* [document sur internet]. Disponible sur le site: <http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/ABKit/abkit.htm>.
- Finland, M.** (1974). Twenty-fifth anniversary of the discovery of Aureomycin: the place of the tetracyclines in antimicrobial therapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **15**: 3-8.
- Finlay, A. C., Hobby, G. L., P'an, S. Y., Regna, P. P., Routien, J. B., Seeley, D. B., Shull, G. M., Sobin, B. A., Solomons, I. A., Vinson, J. W., Kane, J. H.** (1950). Terramycin, a new antibiotic. *Science*, **111**: 85.

- Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. F., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., Jansen, R., Kamp, E. M., Macdonald, J., MacInnes, J. I., Mittal, K. R., Nicolet, J., Rycroft, A. N., Segers, R. P. A. M., Smits, M. A., Stenbaek, E., Struck, D. K., van den Bosch, J. F., Willson, P. J., Young, R.** (1993). *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology*, **139** (Pt 8): 1723-1728.
- Gale, E. F.** (1972). Antibiotic inhibitors of ribosome function. **Ch. 6**, pp. 278-547. *The molecular basis of antibiotic action* (E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, M. J. Waring, Éds.). London, U.K., John Wiley & Sons
- Gerber, A. U., Craig, W. A.** (1982). Experimentelle Studien zur frage des optimalen Dosisintervalls in der Antibiotikatherapie. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, **112**: 42-45.
- Gillespie, W. R.** (1991). Noncompartmental versus compartmental modelling in clinical pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, **20**: 253-262.
- Golub, L. M., Ramamurthy, N. S., McNamara, T. F., Greenwald, R. A., Rifkin, B. R.** (1991). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **2**: 297-321.
- Goodfellow, M., Williams, S. T.** (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, **37**: 189-216.
- Haesebrouck, F., Chiers, K., van Overbeke, I., Ducatelle, R.** (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology*, **58**: 239-249.

- Hathaway, M. R., Dayton, W. R., White, M. E., Henderson, T. L., Young, D. A., Doan, T. N.** (1999). Effect of feed intake on antimicrobially induced increases in porcine serum insulin-like growth factor I. *Journal of Animal Science*, **77**: 3208-3214.
- Henry, S. C., Apley, M.** (1999). Therapeutics. **Ch. 75**, pp. 1155-1162. *Disease of Swine - 8ème édition* (B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, Eds.). Ames, U.S.A., Iowa State University Press
- Higgins, R., Gottschalk, M., Mittal, K. R., Beaudoin, M.** (1990). *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **54**: 170-173.
- Hochstein, F. A., Stephens, C. R., Conover, L. H., Regna, P. P., Pasternack, R., Gordon, P. N., Pilgrim, F. J., Brunings, K. J., Woodward, R. B.** (1953). The structure of Terramycin. *Journal of the American Chemical Society*, **75**: 5455-5475.
- Holford, N. H., Sheiner, L. B.** (1981). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling in vivo. *CRC Critical Reviews in Bioengineering*, **5**: 273-322.
- Jukes, T. H.** (1977). The history of the "antibiotic growth effect". *Federation Proceedings*, **36**: 2514-2518.
- Kamp, E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., van Leengoed, L. A., Smits, M. A.** (1997). Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity*, **65**: 4350-4354.
- Kavallaris, M., Madafiglio, J., Norris, M. D., Haber, M.** (1993). Resistance to tetracycline, a hydrophilic antibiotic, is mediated by P-glycoprotein in human multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **190**: 79-85.

- Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Carey, M. P., Blanchflower, W. J., Hewitt, S. A.** (1998). Iso- and epi-iso-chlortetracycline and the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg. *Journal of Chromatography, Series A*, **812**: 327-337.
- Kilroy, C. R., Hall, W. F., Bane, D. P., Bevill, R. F., Koritz, G. D.** (1990). Chlortetracycline in swine--bioavailability and pharmacokinetics in fasted and fed pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **13**: 49-58.
- Klink, P. R., Ferguson, T. H., Magruder, J. A.** (1998). Formulation of veterinary dosage forms. **Ch. 2**, pp. 145-229. - 2ème édition (G. E. Hardee, J. D. Baggot, Eds.). New York, U.S.A., Marcel Dekker
- Klothen, I.** (1984). Process for the preparation of medicated animal feed supplement. Patent # 4,447,421: United States Patent and Trademark Office.
- Kunin, C. M., Finland, M.** (1961). Clinical pharmacology of the tetracycline antibiotics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2**: 51-69.
- Larrabee, W. L.** (1983). Formulation of drugs for administration via feed or drinking water. **Ch. 4**, pp. 175-204. *Formulation of veterinary dosage forms* (J. Blodinger, Ed.). New York, NY, USA, Marcel Dekker Inc.
- Lepper, M. H.** (1956). *Aureomycin (chlortetracycline)* New York, U.S.A., Medical Encyclopedia, Inc.
- Levy, S. B.** (1992). *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle* New York, U.S.A., Plenum Press.

- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I., Taylor, D. E.** (1999). Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 1523-1524.
- Leyden, J. J.** (1985). Absorption of minocycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride. Effect of food, milk, and iron. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **12**: 308-312.
- Li, R. C., Lee, S. W., Kong, C. H.** (1997). Correlation between bactericidal activity and postantibiotic effect for five antibiotics with different mechanisms of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **40**: 39-45.
- Limpoka, M.** (1979). *Disposition of oxytetracycline in cattle, sheep and swine*. University of Illinois at Urbana-Champaign, 1-137 pp.
- Littell, R. C., Henry, P. R., Ammerman, C. B.** (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, **76**: 1216-1231.
- Locci, R.** (1984). *Streptomyces* and related genera. **Ch. 29**, *Bergey's manual of systematic bacteriology* (S. T. Williams, M. E. Sharpe, Eds.). Baltimore, U.S.A., Williams & Wilkins
- Lorian, V., Éd.** (1996). *Antibiotics in laboratory medicine - 4ème édition*. Baltimore, MD, U.S.A., Lippincott, Williams & Wilkins.
- Martin-Jimenez, T., Riviere, J. E.** (1998). Population pharmacokinetics in veterinary medicine: potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**: 167-189.

- Mattie, H.** (2000). Antibiotic efficacy in vivo predicted by in vitro activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **14**: 91-98.
- McCormick, J. R. D.** (1965). Biosynthesis of the tetracyclines. **Ch. 8**, pp. 73-91. *Biogenesis of antibiotic substances* (Z. Vanek, Z. Hostalek, Eds.). New York, NY, U.S.A., Academic Press
- Mercer, H. D., Teske, R. H., Long, P. E., Showalter, D. H.** (1978). Drug residues in food animals II. Plasma and tissue kinetics of oxytetracycline in young cross-bred swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **1**: 119-128.
- Michalets, E. L.** (1998). Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions [see comments]. *Pharmacotherapy*, **18**: 84-112.
- Milroy, E. J., Cockett, A. T., Roberts, A. P.** (1974). The bladder lymphatics. A study of drug transport. *Investigative Urology*, **12**: 69-73.
- Mood, A. M., Graybill, F. A., Boes, D. C.** (1974). Continuous distributions. **Ch. 3**, pp. 105-124. *Introduction to the theory of statistics - 3ème édition* New York, NY, U.S.A., McGraw-Hill Inc.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards** (1990). *Performance standards for antimicrobial susceptibility tests [NCCLS Document M2-A4] – 4th (approved) edition*. Villanova, PA, U.S.A., National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards** (1999). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard [NCCLS Document M31-A]* Villanova, PA, U.S.A., National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Nelson, M. L., Levy, S. B.** (1999). Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 1719-1724.
- Neuvonen, P. J.** (1976). Interactions with the absorption of tetracyclines. *Drugs*, **11** : 45-54.
- Nielsen, P., Gyrd-Hansen, N.** (1996). Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**: 305-311.
- Nikaido, H.** (1998). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infectious Diseases*, **27 Supplement 1**: S32-S41.
- Okami, Y., Hotta, K.** (1988). Search and discovery of new antibiotics. **Ch. 2**, pp. 33-68. *Actinomycetes in biotechnology* (M. Goodfellow, S. T. Williams, M. Mordarski, Eds.). London, U.K., Academic Press Inc.
- Olfert, E. D., Cross, B. M., McWilliam, A. A.,** Eds. (1993). *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation - 2ème édition*. Ottawa, Canada, Conseil Canadien de Protection des Animaux.
- Pijpers, A., van Klingeren, B., Schoevers, E. J., Verheijden, J. H. M., van Miert, A. S. J. P. A. M.** (1989). In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **12**: 267-276.
- Pijpers, A.** (1990). *Feed Medication with Tetracyclines in Pigs: a Critical Evaluation*. Thèse de Ph.D., Université d'Utrecht, Pays-Bas, 189 pp.

- Pijpers, A., Schoevers, E. J., Haagsma, N., Verheijden, J. H. M.** (1991). Plasma levels of oxytetracycline, doxycycline, and minocycline in pigs after oral administration in feed. *Journal of Animal Science*, **69**: 4512-4522.
- Pollet, R. A., Glatz, C. E., Dyer, D. C.** (1985). The pharmacokinetics of chlortetracycline orally administered to turkeys: influence of citric acid and *Pasteurella multocida* infection. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **13**: 243-264.
- Prescott, J. F.** (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food? *Canadian Veterinary Journal*, **38**: 763-766.
- Ray, A., Newton, V.** (1991). Use of high-performance liquid chromatography to monitor stability of tetracycline and chlortetracycline in susceptibility determinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 1264-1266.
- Regna, P. P.** (1959). The chemistry of antibiotics. **Ch. 2**, pp. 58-173. *Antibiotics. Their chemistry and non-medical uses* (H. S. Goldberg, Ed.). Princeton, U.S.A., D. Van Nostrand Company, Inc.
- Reichert, J.** (1988). *Blutspiegel von Chlor- und Oxytetracyclin beim Ferkel nach Futter- oder Wasser-medikation bei unterschiedlicher Fütterungstechnik*. These de M.Sc. Dissertation, University of Zurich, Switzerland., 51 pp.
- Riviere, J. E., Webb, A. I., Craigmill, A. L.** (1998). Primer on estimating withdrawal times after extralabel drug use [published erratum appears in J Am Vet Med Assoc 1999 Jul 1;215(1):32]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **213**: 966-968.
- Roberts, M. C.** (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, **19**: 1-24.

- Rowland, M., Tozer, T. N.** (1994). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications - 3ème édition*. Media, PA, U.S.A., Williams & Wilkins.
- Sanders, P.** (1998). Effet post-antibiotique: implication en antibiothérapie vétérinaire. *Médecin Vétérinaire du Québec*, **28**: 167-169.
- Schnappinger, D., Hillen, W.** (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, **165**: 359-369.
- Schwartzman, G., Wayland, L., Alexander, T., Furnkranz, K., Selzer, G., USASRG** (1979). Chlortetracycline hydrochloride. **Ch. 4**, pp. 101-137. *Analytical profiles of drug substances* (K. Florey, Ed.). New York, U.S.A., Academic Press, Inc.
- Shapira, L., Soskolne, W. A., Houri, Y., Barak, V., Halabi, A., Stabholz, A.** (1996). Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infection and Immunity*, **64**: 825-828.
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., Salyers, A. A.** (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, **5** : 387-399.
- Spivey, J. M.** (1992). The postantibiotic effect [see comments]. *Clinical Pharmacy*, **11**: 865-875.
- Stärk, K. D.** (2000). Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine--a literature review. *Veterinary Journal*, **159**: 37-56.

- Stephens, C. R., Conover, L. H., Hochstein, F. A., Regna, P. P., Pilgrim, F. J., Brunings, K. J., Woodward, R. B.** (1952). Terramycin. VIII. Structure of Aureomycin and Terramycin. *Journal of the American Chemical Society*, **74**: 4976-4977.
- Stephens, C. R., Conover, L. H., Pasternack, R., Hochstein, F. A., Moreland, W. T., Regna, P. P., Pilgrim, F. J., Brunings, K. J., Woodward, R. B.** (1954). The structure of Aureomycin. *Journal of the American Chemical Society*, **76**: 3568-3575.
- Straw, B. E., Bäckström, L., Leman, A. D.** (1986). Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **8**: S106-S112.
- Sum, P. E., Sum, F. W., Projan, S. J.** (1998). Recent developments in tetracycline antibiotics. *Current Pharmaceutical Design*, **4**: 119-132.
- Taylor, D. E., Chau, A.** (1996). Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**: 1-5.
- Taylor, D. J.** (1999). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Ch. 26**, *Disease of Swine - 8ème édition* (B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, Eds.). Ames, U.S.A., Iowa State University Press
- Thomas, J. K., Forrest, A., Bhavnani, S. M., Hyatt, J. M., Cheng, A., Ballow, C. H., Schentag, J. J.** (1998). Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 521-527.
- Thomke, S., Elwinger, K.** (1998). Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Mode of action of antibiotic growth promotants. *Annales de Zootechnie*, **47**: 153-167.

- Tritton, T. R.** (1977). Ribosome-tetracycline interactions. *Biochemistry*, **16**: 4133-4138.
- Vogelman, B., Craig, W. A.** (1986). Kinetics of antimicrobial activity. *Journal of Pediatrics*, **108**: 835-840.
- Vogelman, B., Gudmundsson, S., Leggett, J., Turnidge, J., Ebert, S., Craig, W. A.** (1988). Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 831-847.
- Waddell, J., AASP Pharmaceutical Issues Committee.** (2000). American Association of Swine Practitioners basic guidelines of judicious therapeutic use of antimicrobials in pork production. *Swine Health and Production*, **8**: 90-93.
- Waksman, S. A.** (1967). *The actinomycetes: a summary of current knowledge*. New York, U.S.A., Ronald Press Co.
- Walter, D., Holck, T., Sornsen, S., Hagen, C., Turney Harris, I.** (2000). The effect of a metaphylactic pulse dosing in-feed antimicrobial strategy on finishing pig health and performance. *Swine Health and Production*, **8**: 65-71.
- Weinberg, E. D.** (1957). The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations. *Bacteriological Reviews*, **21**: 46-68.
- Williams, S. T., Sharpe, M. E.,** Éds. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology* Baltimore, U.S.A., Williams & Wilkins.
- Wood, J. H., Leonard, T. W.** (1983). Kinetic implications of drug resorption from the bladder. *Drug Metabolism Reviews*, **14**: 407-423.

- Wu, C., Wolff, T.** (2000). Comparison of MIC values for chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline vs. swine field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *International Pig Veterinary Society Congress*, **14**.
- Wyatt, R. D., Miller, B. L.** (1985). Effect of mixed organic acid administration on blood levels of chlortetracycline in broiler chicks. *Poultry Science*, **64**: 59-64.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T.** (1978). Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **6**: 547-558.

9. ANNEXES

Annexe I : Étapes de la production industrielle des tétracyclines.

Annexe II : Le ribosome bactérien : structure et fonction.

Annexe III : Antibiothérapie et antibiorésistance.

Annexe IV : Teneur nutritive des aliments employés dans l'étude de PK/PD.

9.1. ANNEXE I. ÉTAPES DE LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DES TÉTRACYCLINES

9.1.1. Isolement de l'organisme

Les procédures d'isolement de *S. aureofaciens* à partir du sol sont décrites dans le brevet de Duggar (U.S. Pat. # 2.482.055, 1949). En bref, une suspension aqueuse de sol est chauffée pour éliminer les organismes indésirables. Ensuite, la suspension sert à inoculer une gélose qui sera incubée à la température optimale pour la croissance des streptomycètes, soit 26-28°C. Les colonies ayant les caractéristiques recherchées sont repiquées et ré-ensemencées.

Le brevet de Sobin et coll. (U.S. Pat. #2.516.080, 1950) décrit la souche de *Streptomyces rimosus* découverte par les laboratoires PFIZER ainsi que les techniques de production de mutants à l'aide, entre autres, de gaz moutarde, de rayons X ou de rayons UV. Dans les laboratoires MERCK, SHARP & DOHME, Stoudt et coll. produisent de l'OTC à partir d'une souche de *Streptomyces* apparemment différente de *S. rimosus* et de *S. platensis* (U.S. Pat. # 3.113.077, 1963), avec laquelle ils obtiennent des mutants par les méthodes énumérées ci-dessus.

9.1.2. Production de l'inoculum

Pour produire une quantité suffisante de bactéries pour ensemençer le milieu de fermentation, *S. aureofaciens* est ensemençé sur un milieu liquide contenant des sources d'azote organique ou inorganique, des sources d'énergie et divers éléments-trace favorisant leur croissance (entre autres, K, Mg, Mn, Cu, Zn). Le milieu de culture est agité durant les 24 à 36 h d'incubation. La composition exacte du milieu de culture dépend de la souche employée, tel qu'indiqué dans le brevet de Niedercorn (U.S. Pat. # 2.609.329, 1952).

Sobin et coll. (U.S. Pat. #2.516.080, 1950) produisent l'inoculum de *S. rimosus* avec des pentes d'agar (bœuf et lactose ou milieu d'Emerson) ou des bouillons de culture à base de caséine hydrolysée, de dextrose et d'extrait de levure, auxquels ils ajoutent du NaCl et du CaCO₃. Après ajustement du pH à 6.7 et stérilisation, le bouillon est ensemencé et incubé avec aération et agitation pendant 25 h.

9.1.3. Fermentation

Duggar (1949) indique dans son brevet de production de CTC que le milieu de fermentation contient des sources de carbone, des sources d'azote, des sels minéraux et des traces de différents métaux. L'infusion de maïs est un ingrédient aux propriétés intéressantes : il fournit une bonne partie du carbone et de l'azote requis, ainsi que la plupart des éléments-trace, ce qui simplifie la recette. Le brevet de Pidacks et Starbird (U.S. Pat. # 2.586.766, 1952) précise la composition du milieu de fermentation : 1% d'infusion de maïs (contenant 50% de matière sèche), 1% de saccharose, 0.2% de (NH₄)₂HPO₄, 0.2% de KH₂PO₄, 0.025% de MgSO₄·7H₂O, 0.1% CaCO₃, 0.00033% de MnCl₂·4H₂O et de CuSO₄·5H₂O, et 0.005% de ZnSO₄·7H₂O. Niedercorn (U.S. Pat. # 2.609.329, 1952) élargit la liste des ingrédients du milieu de fermentation et en modifie leurs proportions respectives. Pour accélérer la production d'antibiotique, le volume d'inoculum à préparer devrait être d'environ 1 et 5% du volume du milieu de fermentation. Le milieu ensemencé est incubé à la température d'usage dans une cuve de fermentation, où il est aéré et agité continuellement, ce qui requiert l'usage d'agents anti-moussants (par exemple, l'huile de lard). La récolte maximale d'antibiotique se produit après 30-40 h de fermentation.

Niedercorn (1952) remarque que la production de CTC augmente quand le pH est maintenu entre 6,4 et 7 durant toute la durée de fermentation et que l'on ajoute des cations divalents pour séquestrer les métabolites toxiques pour *S. aureofaciens* (probablement la CTC). Les précipités de CaCO₃ et de

$Mg_3(PO_4)_2$ s'avèrent des tampons efficaces qui libèrent graduellement les cations requis. Petty (U.S. Pat. # 2.709.672, 1955) montre que les milieux où la croissance de *S. aureofaciens* est maximale n'optimisent pas nécessairement la production de CTC. Il signale que, dans un milieu de fermentation riche en chlorures, certaines souches mutantes de *S. aureofaciens* produisent beaucoup plus de CTC. Ces souches mutantes produiront aussi beaucoup plus de cobalamines si du cobalt est disponible (par exemple, sous forme de $CoCl_2$). Il est à signaler qu'à cette époque, les cobalamines étaient suspectées d'agir comme facteurs de croissance chez le porc et la volaille, tel qu'indiqué dans le brevet de Jukes (U.S. Pat. # 2.619.420, 1952).

Vers la fin des années 1950, on réussit à augmenter le rendement de fermentation en CTC par l'usage d'adjuvants, qui favorisent la production de CTC au détriment de leurs contreparties non-halogénées ou qui agissent comme précurseurs des tétracyclines halogénées. Dans la première voie, Szumski (U.S. Pat. # 2.871.167, 1959) fait mention des ions fluorure, Goodman (U.S. Pat. # 3.050.446, 1962) propose le cuivre ou encore la d-méthionine et le 5-fluorouracile (U.S. Pat. # 3.145.154, 1964). Dans la deuxième voie, le brevet de McCormick et coll. (U.S. Pat. # 2.970.947, 1961a) rapporte que l'ajout de co-facteur synthétique 1, produit par une souche mutante de *S. aureofaciens*, aux milieux de fermentation décuple la quantité de CTC produite par d'autres souches. Des résultats similaires sont décrits par Miller et coll. (U.S. Pat. # 2.987.449, 1961) avec de la riboflavine ou d'autres molécules portant le groupement oxime. McCormick et coll. (U.S. Pat. # 2.998.352, 1961b) rapportent qu'une deuxième souche de *Streptomyces* (*S. aureofaciens* ou autre) qui ne peut synthétiser d'antibiotique peut être ajoutée au milieu 24 à 48 h après le début de fermentation avec la souche productrice de CTC. Les deux souches agiraient alors en synergie. Enfin, Szumski rapporte que l'urée augmenterait aussi le rendement de fermentation en CTC (U.S. Pat. # 3.121.670, 1964).

Pour produire l'OTC, Sobin et coll. (U.S. Pat. #2.516.080, 1950) emploient un milieu de fermentation de composition similaire à ceux décrits précédemment : une source de glucides (sucres, amidons, glycérol), une source d'azote organique (farine de soja, gluten de blé, farine de coton, lactalbumine, caséine hydrolysée, peptone trypsique), des adjuvants (drèche de distillerie, extrait de levure, NaCl, K₃PO₄, MgSO₄, NaNO₃), des tampons (CaCO₃) et de l'huile végétale. L'incubation est faite à 24-30°C. Goodman (U.S. Pat. # 2.871.166, 1959) élargit la liste d'ingrédients du milieu de fermentation et rapporte que l'ajout d'ion fluorure augmente le rendement en OTC de 70%. Chez les laboratoires LEDERLE, McCormick et coll. observent que la technique de fermentation en co-culture est synergique aussi pour la production d'OTC (U.S. Pat. # 2.998.352, 1961).

9.1.4. Récupération du principe actif

Diverses méthodes de récupération de la CTC à partir du brassin ont fait l'objet de brevets. Au préalable, la biomasse doit être retirée par filtration. Par la suite, Pidacks et Starbird (U.S. Pat. # 2.586.766, 1952) proposent d'adsorber la CTC du filtrat avec un milieu adsorbant tel que la terre de diatomées. L'antibiotique est récupéré en lavant la colonne adsorbante avec une solution acide d'alcool. Dans un deuxième brevet (U.S. Pat. # 2.655.535, 1953), Pidacks et Starbird récupèrent la CTC par extraction avec un solvant apolaire après avoir acidifié le filtrat. Harms (U.S. Pat. # 2.658.077, 1953) ajoute un solvant apolaire pour cristalliser la CTC présente dans une solution aqueuse et acide à laquelle on ajoute du chlorure de sodium. Cette méthode peut aussi servir pour récupérer l'antibiotique à partir de la biomasse retirée par filtration. Winterbottom et coll. (U.S. Pat. # 2.671.806, 1954) proposent une méthode où la CTC cristallise suite à l'ajout d'amines qui alcalinisent le filtrat. Les bases azotées sont préférées parce que l'alcalinisation du filtrat est plus facile à contrôler et que la CTC se dégrade à des pH trop élevés. D'autres méthodes de récupération de la CTC à partir de la biomasse ont été proposées par Starbird et Pidacks (U.S. Pat.

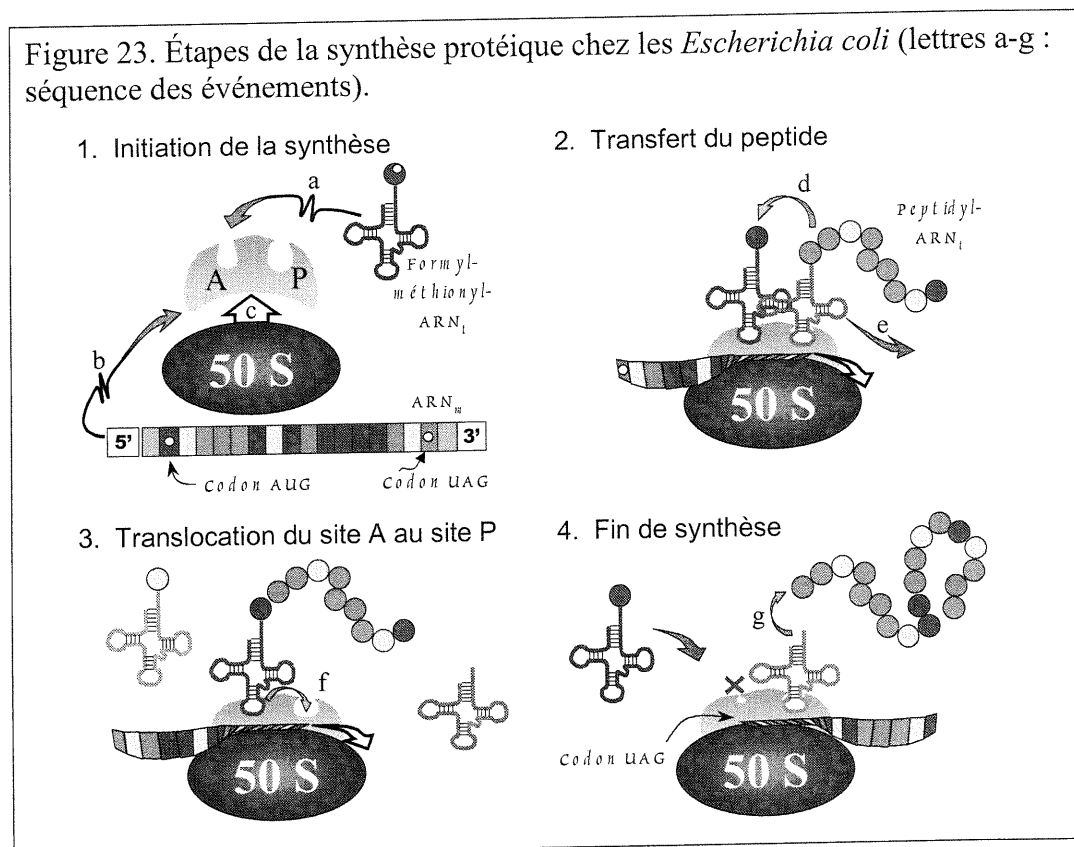
2.740.816, 1956a; U.S. Pat. # 2.763.681, 1956b) et Fox et coll. (U.S. Pat. # 2.875.247, 1959).

Pour récupérer l'OTC du brassin acidifié et filtré, Sobin et coll. ont développé diverses techniques (U.S. Pat. #2.516.080, 1950). La première consiste à adsorber l'antibiotique sur du charbon activé, lequel subira des lavages avec une solution acide d'alcool pour dissoudre l'OTC. Divers traitements du liquide de lavage permettent de récupérer l'antibiotique. L'OTC présente dans le brassin peut aussi être adsorbée avec certains solvants organiques, lesquels sont choisis en fonction du type d'ajustement du pH du brassin. La deuxième technique est d'extraire l'OTC à partir du filtrat à l'aide du butanol. Le principe actif est ensuite extrait du butanol par précipitation en milieu acide ou par d'autres méthodes. Pour récupérer l'OTC à partir du brassin filtré, Regna et coll. le font précipiter en ajoutant des colorants acides aryl-azo-sulphoniques et de sels ioniques au filtrat (U.S. Pat. #2.649.480, 1953). Ensuite, le précipité est traité pour en tirer le principe actif. Buckley et coll. proposent de cristalliser l'OTC en un sel non-hygroscopique qui a l'avantage d'être plus stable et dont l'activité par unité de poids est plus facile à prédire (U.S. Pat. # 2.867.661, 1959). Ceci est accompli à l'aide de substances organiques oxygénées, inertes envers l'antibiotique et liquides à la température recherchée. Enfin, Blase décrit une méthode de purification (U.S. Pat. # 2.873.276, 1959).

9.2. ANNEXE II. LE RIBOSOME BACTÉRIEN : STRUCTURE ET FONCTION

Les ribosomes sont le siège de la synthèse des protéines (Figure 23). Chez les organismes procaryotes, ces organelles ont un coefficient de sédimentation de 70S. Le ribosome bactérien est formé de deux sous-unités, 30S et 50S, qui sont respectivement composées de 21 et 34 protéines différentes. De plus, la sous-unité 30S possède le brin 16S d'ARN ribosomal (ARN_r) tandis que la 50S est pourvue de deux brins d' ARN_r , l'un de 23S et l'autre de 5S. L'association entre les deux sous-unités du ribosome est dépendante de la présence d'ions Mg^{++} (Gale et coll., 1972).

Les protéines sont un assemblage d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés. Ces molécules sont convoyées vers le ribosome par les ARN de transfert (ARN_t) sous la forme d'un complexe aminoacyl- ARN_t . Chez *Escherichia coli*, la synthèse protéique débute lorsque l'extrémité 5' de l'ARN messager (ARN_m) à transcrire se fixe sur la sous-unité 30S du ribosome. Le codon initiateur de la synthèse protéique de l' ARN_m



est le triplet adenine-uracile-guanidine (AUG), qui encode pour un complexe méthionine et d'ARN_t particulier où l'acide aminé reçoit un groupe formyl grâce à l'action de la transformylase. Le complexe formylméthionyl-ARN_t se lie au site A (« aminoacyl ») du 30S porteur de l'ARN_m. La sous-unité 50S, qui contient l'enzyme de formation du lien peptidique, vient finalement compléter le ribosome (Figure 23 : étape 1).

Lors de la phase d'élongation, le ribosome avance d'un codon en direction 3' et le complexe formylméthionyl-ARN_t perd le résidu formyl et se déplace vers le site P (« peptidyl ») de la sous-unité 30S. Un complexe aminoacyl-ARN_t correspondant au nouveau codon vient alors occuper le site A, et la peptidyl-transférase de la sous-unité 50S procède au transfert de la chaîne peptidique (longue d'un acide aminé à ce stade-ci) du site P et à son attachement à l'acide aminé du site A (Figure 23 : étape 2).

L'ARN_t dépourvu du peptide est alors dégagé du site P pour que le peptidyl-ARN_t puisse prendre sa place (Figure 23 : étape 3). Ce processus d'élongation se poursuit jusqu'à ce qu'un codon UAG, UAA ou UGA, qui signalent la fin de synthèse, ne soit rencontré (Figure 20 : étape 4). Le peptide complet est alors libéré.

9.3. ANNEXE III : ANTIBIOTHÉRAPIE ET ANTIBIORÉSISTANCE

Durant les années 1960, on envisageait avec optimisme un avenir où les maladies infectieuses seraient éradiquées de la planète ou, du moins, qu'elles deviendraient un problème de santé mineur. En effet, de nombreuses familles d'antibiotiques avaient été découvertes, surtout entre 1940 et 1960, et leur efficacité clinique était si remarquable qu'il semblait presque impossible qu'une infection bactérienne puisse être mortelle si le malade se rendait à temps à l'hôpital (Burnet, 1962). Aujourd'hui, l'antibiorésistance est en progression partout dans le monde (O'Brien, 1997) et des patients meurent des suites d'infections à bactéries résistantes envers tous les antibiotiques disponibles. *A posteriori*, l'optimisme de jadis peut paraître naïf quand on considère la grande flexibilité génétique qui permet aux bactéries de s'adapter aux situations auxquelles elles sont confrontées (Davies, 1997). L'Organisation Mondiale de la Santé considère que le problème actuel d'antibiorésistance est un enjeu prioritaire à l'échelle globale (Brundtland, 2000) et exhorte tous les intervenants à déployer des efforts massifs pour corriger la situation avant qu'elle ne devienne irrémédiable.

9.3.1. Le problème d'antibiorésistance chez l'homme

L'antibiorésistance est apparue tôt après la commercialisation de la majorité des antibiotiques (Levy, 1997). Quoique couramment observé à partir des années 1950, ce phénomène n'était pas perçu comme un véritable problème car le spectre de résistance des bactéries était étroit et les alternatives thérapeutiques nombreuses. De plus, les bactéries résistantes étaient confinées au milieu hospitalier et certaines épidémies de bactéries résistantes pouvaient même être auto-limitantes (Phillips, 1998). Par exemple, la pénicilline mise au point durant la Deuxième Guerre Mondiale a permis d'enrayer l'épidémie de maladies à streptocoques résistants chez les marins, chez qui un traitement prophylactique de masse aux sulfamides était institué dès l'embarquement. L'épidémie de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) du

début des années 1960 s'est tue soudainement, sans que l'on puisse déterminer les raisons naturelles ou iatrogènes de leur déclin.

Les bactéries impliquées dans le problème actuel ont un spectre d'antibiorésistance beaucoup plus large que leurs prédécesseurs et peuvent aussi développer plus rapidement des résistances envers les antibiotiques prescrits. De plus, l'antibiorésistance déborde l'hôpital et se retrouve dans le milieu communautaire. Les entérocoques résistants à la vancomycine, les MRSA, qui menacent aussi de devenir résistants à la vancomycine (Rubin et coll., 1999), et divers bâtonnets Gram-négatifs, entre autres *Pseudomonas aeruginosa* (Quinn, 1998), sont associés à des infections nosocomiales extrêmement difficiles à contrôler, surtout chez les patients aux soins intensifs et les patients immunodéprimés (Huovinen, 1999). Certaines souches sont résistantes à tous les antibiotiques de la pharmacopée actuelle. À l'extérieur de l'hôpital, l'incidence d'infections à *Streptococcus pneumoniae* antibiorésistants augmente, de même que la tuberculose, la gonorrhée, les infections à *Haemophilus influenzae*, ainsi que les diarrhées à *Escherichia coli*, aux salmonelles et à *Campylobacter* spp. Les dysenteries à *Shigella* antibiorésistantes sont aussi un problème majeur dans le Tiers-Monde (Cohen, 1997). Ces bactéries portent plusieurs gènes et sont résistantes aux pénicillines et céphalosporines, aux aminosides, macrolides, fluoroquinolones, tétracyclines et à la combinaison triméthoprime-sulfamides.

Les autorités américaines ont identifié une série de facteurs qui favorisent l'émergence de maladies à bactéries antibiorésistantes (Cohen, 1997) :

- (1) LES CHANGEMENTS DÉMOGRAPHIQUES ET COMPORTEMENTAUX DE LA SOCIÉTÉ. Le vieillissement de la population, le SIDA, les maladies chroniques (cancer, diabète) qui affaiblissent l'immunité, les thérapies immunosuppressives et la malnutrition augmentent le risque de développement de maladies infectieuses et d'antibiorésistance. Les garderies favorisent la propagation de pathogènes et l'usage

d'antibiotiques chez les enfants est souvent abusif. Les voyages transcontinentaux sont plus fréquents, ce qui augmente le risque de propagation de bactéries antibiorésistantes. La promiscuité sexuelle et la dépendance aux drogues favorisent aussi le développement et la propagation d'antibiorésistance.

- (2) **LES PROGRÈS TECHNOLOGIQUES.** La durée de séjour à l'hôpital a augmenté en raison de la plus grande maîtrise thérapeutique des maladies chroniques. En contrepartie, l'exposition aux bactéries antibiorésistantes du milieu hospitalier en est prolongée. De la même façon que les garderies, l'élevage intensif d'animaux de consommation favorise la propagation de pathogènes et l'antibiothérapie de masse favorise le développement de résistances. Les réseaux de distribution commerciale, de plus en plus vastes et rapides, permettent aux maladies d'origine alimentaire de se propager de façon épidémique.
- (3) **L'EXODE VERS LES GRANDES VILLES.** La densité de population des villes augmente, ce qui détériore les conditions d'hygiène et favorise la propagation de maladies et de bactéries porteuses de gènes de résistance.
- (4) **LES ÉCHANGES INTERNATIONAUX.** Tel que mentionné plus haut, les voyages sont plus fréquents et les distances parcourues plus longues. Ceci favorise la propagation de bactéries antibiorésistantes via des vecteurs humains ou des animaux, par des plantes ou encore via les denrées alimentaires.
- (5) **LA CAPACITÉ D'ADAPTATION BACTÉRIENNE.** Ce point sera discuté plus loin.
- (6) **LE DÉSENGAGEMENT DES GOUVERNEMENTS DANS LES SOINS DE SANTÉ.** Les contraintes budgétaires des hôpitaux incitent à faire augmenter la

population de patients. Il s'en suit que le ratio patients:personnel soignant est trop élevé, ce qui favorise la transmission de bactéries, rend difficile le maintien des conditions d'hygiène et le suivi des patients. De plus, les budgets alloués au dépistage de l'antibiorésistance sont insuffisants pour une détection précoce et un suivi efficace (Hughes et Tenover, 1997).

L'émergence d'antibiorésistance se produit dans un contexte de léthargie de la recherche sur les antibiotiques. Le rang de priorité de ce secteur de recherche a diminué avec les changements démographiques de la société et du grand nombre de préparations antibiotiques disponibles sur le marché. Le vieillissement de la population a rendu certains médicaments plus lucratifs, par exemple les agents anticancéreux et les médicaments pour les maladies cardiovasculaires, pour l'impuissance ou pour l'obésité. Pour s'attaquer à l'antibiorésistance, on a mis au point en premier lieu des antibiotiques appartenant à des familles délaissées depuis longtemps. Certaines d'entre elles étaient par contre employées comme promoteurs de croissance : c'est le cas de la vancomycine (glycopeptide) et de la combinaison quinupristine-dalfopristine, deux streptogramines apparentées à la virginiamycine. En parallèle on explore de nouvelles avenues de recherche : produire de nouvelles molécules qui esquivent des mécanismes de résistance connus à partir des noyaux antibiotiques existants, produire des molécules inhibitrices des mécanismes de résistance et synthétiser de nouveaux noyaux antibiotiques (Kessler, 1997). Jusqu'à présent, les résultats sont mitigés, et la synthèse de nouveaux noyaux antibiotiques est plus ardue que l'on avait anticipé, même avec l'élucidation du génome bactérien. Souvent, les nouvelles molécules n'ont même pas les caractéristiques requises pour l'usage *in vivo* et même *in vitro* (Kessler, 1997). En définitive, il est peu réaliste d'espérer que de nouvelles molécules soient disponibles dans un proche avenir.

9.3.2. Rôle de l'agriculture dans l'antibiorésistance

Le corps médical considère que l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire favorise significativement le développement et la propagation d'antibiorésistance, ce qui constituerait un risque pour la santé publique. Si leur usage ergotropique⁹ chez les animaux de consommation est principalement mis en cause (Pidcock, 1996; Witte, 1997; Khachatourians, 1998; Witte, 1998; Aarestrup, 1999; van den Bogaard et Stobberingh, 1999), l'usage thérapeutique des antibiotiques vétérinaires commence aussi à être surveillé plus étroitement même chez les animaux de compagnie (Devriese et coll., 1996; Helmuth et Protz, 1997; Malorny et coll., 1999; Sternberg, 1999). Au cours des 40 dernières années, des dizaines de réunions scientifiques ont examiné la relation entre l'usage d'antibiotiques en médecine vétérinaire et l'antibiorésistance des pathogènes humains. Aucune conclusion n'a pu être portée jusqu'aux années 1990 quant à l'existence ou l'absence de ce lien. Quoique l'on connaisse le transfert plasmidique des gènes de résistance depuis les années 1960, cette controverse ne pouvait être élucidée en raison du manque de données et de la nature multi-factorielle du problème (Radostits, 1999). Par contre, il était bien établi dès les années 1960 que la prévalence d'antibiorésistance était en progression chez la microflore des animaux de consommation et le risque que cette résistance soit transmise à la flore de l'homme via les denrées alimentaires ne pouvait être négligé. Dans cette optique, la commission Swann recommandait d'interdire l'usage ergotropique des antibiotiques utilisés chez l'homme (Radostits, 1999). Faute de preuves satisfaisantes, les États-Unis et le Canada avaient rejeté ces recommandations (Prescott, 1997) et poursuivi l'usage ergotropique de la pénicilline G et des tétracyclines, auxquelles s'est ensuite ajoutée la tylosine. Cependant, la biologie moléculaire nous fournit maintenant des preuves plus solides que les gènes de résistance que les bactéries (animales et humaines) développent lors d'exposition aux

⁹ du grec ERGON = travail et TROPOS = direction; qui est destiné à la promotion de croissance ou des performances zootechniques.

antibiotiques (vétérinaires ou humains) transitent entre les écosystèmes animal, agricole, humain et ailleurs dans la biosphère. De plus, les bactéries possèdent divers mécanismes qui facilitent le développement et la diffusion des gènes d'antibiorésistance dont la performance augmente de génération en génération.

L'Europe exige à présent que l'on évalue le potentiel de développement d'antibiorésistance des promoteurs de croissance pour qu'ils conservent leur homologation, mais rien n'est fait à propos des antibiotiques utilisés en prophylaxie et thérapie vétérinaires (Helmuth et Protz, 1997). Certains se demandaient périodiquement si cette omission serait à l'origine de l'émergence d'antibiorésistance en Europe malgré l'application des recommandations du comité Swann (Anonyme, 1980; Linton, 1981).

9.3.3. Mécanismes de résistance

Les bactéries peuvent être naturellement résistantes à certaines classes d'antibiotiques. Cette résistance intrinsèque est souvent expliquée par la nature de l'antibiotique. Par exemple, les pénicillines et céphalosporines visent les enzymes responsables de la formation et l'entretien de la paroi bactérienne, qui est absente chez les mycoplasmes (Taylor-Robinson et Bebear, 1997).

L'environnement physico-chimique des bactéries peut aussi induire l'antibiorésistance : les bactéries anaérobiques sont résistantes aux aminosides, qui dépendent de la présence d'oxygène pour être absorbés par les bactéries (Rasmussen et coll., 1997). De plus, les bactéries ont diverses façons d'échapper à l'action des antibiotiques (Figure 24). On peut regrouper en deux catégories les divers mécanismes :

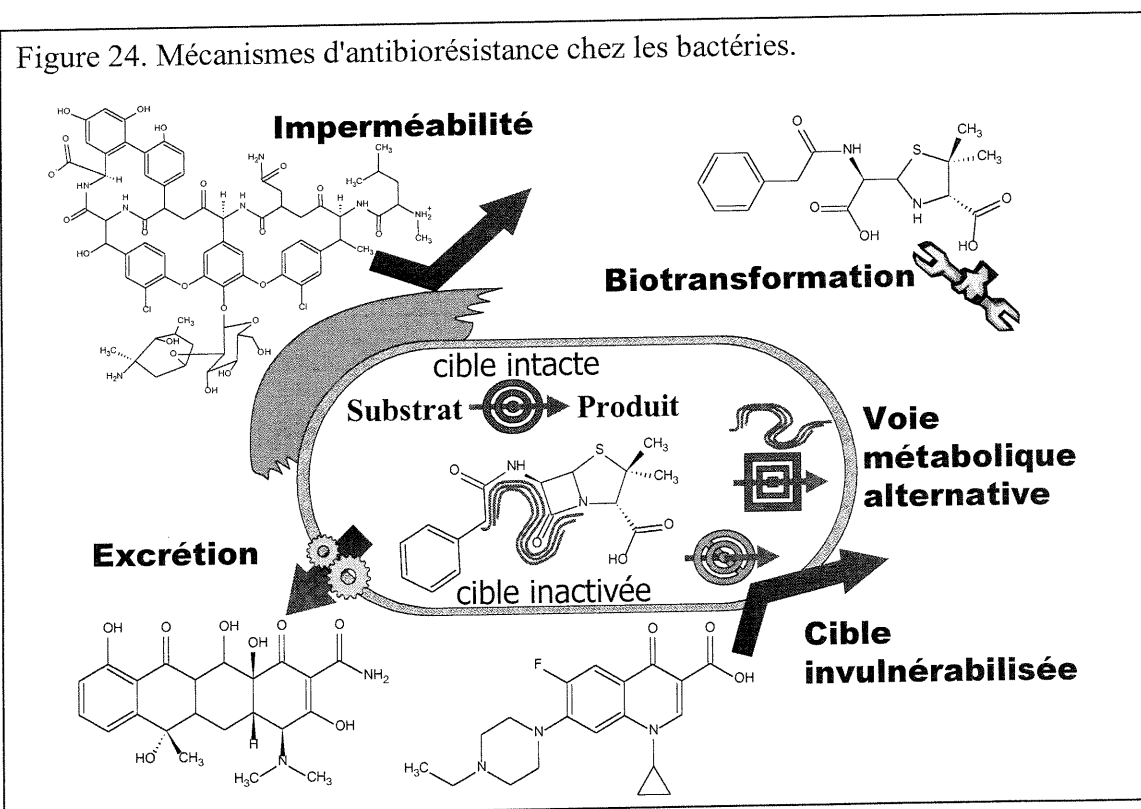
- MÉCANISMES PHARMACOCINÉTIQUES : les bactéries tentent avec ce type de mécanismes d'éviter que le principe actif ne s'accumule au site d'action. La paroi Gram-négative de certains bâtonnets est relativement imperméable et l'absorption des antibiotiques est entravée. Cette IMPERMÉABILITÉ peut être le résultat de la structure du

lipopolysaccharide, qui empêche la diffusion de la vancomycine et autres molécules de grande taille (Figure 24), ou de la nature des mécanismes de transport membranaires, qui diminuent l'absorption des antibiotiques sans diminuer celle des nutriments. L'imperméabilité explique certaines résistances aux glycopeptides, aux aminosides, à la colistine et aux β -lactamines (Hancock, 1998). Un autre mécanisme est l'usage de protéines de transport qui augmentent l'EXCRÉTION des antibiotiques. Certaines pompes d'efflux ont une certaine spécificité de substrat, les tétracyclines par exemple (Roberts, 1996), mais d'autres pompes sont beaucoup moins spécifiques et peuvent excréter diverses classes d'antibiotiques non-apparentées, de désinfectants, de détergents, de métaux lourds et de substances toxiques pour les bactéries tel que des sels biliaires (Nikaido, 1998). La BIOTRANSFORMATION reste cependant le mécanisme le plus connu : une enzyme modifie chimiquement le principe actif pour l'inactiver. C'est le cas entre autres des β -lactamines (Figure 24), des aminosides et du chloramphénicol.

- MÉCANISMES PHARMACODYNAMIQUES : cette catégorie de mécanismes de résistance vise à diminuer l'effet du principe actif qui s'accumule au site d'action. Certaines bactéries développent des VOIES MÉTABOLIQUES ALTERNATIVES : ces organismes ont des enzymes d'urgence non-visées par l'antibiotique, qui prennent la relève en cas d'exposition à ce dernier. La résistance au triméthoprim et celle aux pénicillines chez les streptocoques est associée à ce type de mécanisme. Aussi, les cibles bactériennes peuvent être rendues INVULNÉRABLES à l'action des antibiotiques. Ceci peut se produire via des protéines qui protègent la cible (tétracyclines) ou par des enzymes qui modifient le site d'attachement de l'antibiotique sur la cible (macrolides). Aussi, des mutations du gène de l'ADN-gyrase altèrent la polarité de cet enzyme et causent la résistance aux fluoroquinolones (Gootz et Brighty, 1996).

9.3.4. Génétique de l'antibiorésistance

Les mécanismes d'antibiorésistance sont encodés dans des gènes qui peuvent avoir été mis au point à partir du propre génome de la bactérie (origine endogène), ou bien avoir été acquis de l'extérieur (origine exogène) (Courvalin, 1996). Les gènes d'origine endogène sont obtenus essentiellement par mutation. C'est le cas des β -lactamases, qui étaient autrefois des enzymes d'entretien de la paroi bactérienne (Massova et Mobashery, 1998), des pompes d'efflux des tétracyclines qui avaient pour rôle premier le maintien du potentiel de membrane ou du pH homéostatique de la bactérie (Cheng et coll., 1996). Les pompes d'efflux impliquées dans le phénotype de multi-résistance proviendraient des protéines permettant aux bactéries de survivre à la présence de produits toxiques tels que les métaux lourds et les sels biliaries. Ces mutations se produisent de façon sporadique dans la population bactérienne, même en absence d'antibiotique, et ne cherchent pas à produire spécifiquement un mécanisme de résistance (Courvalin, 1996). Cependant, l'incidence



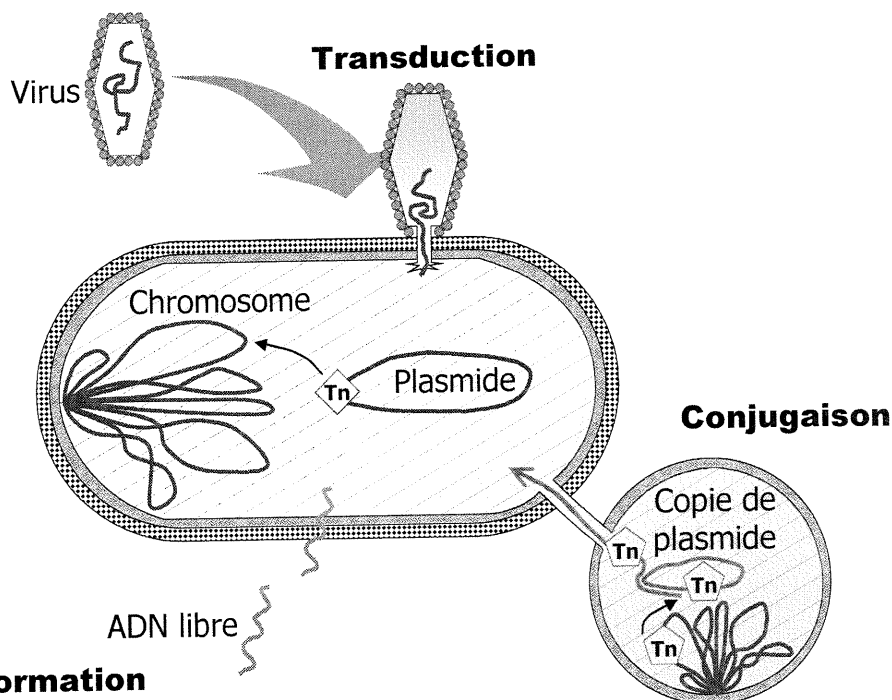
d'antibiorésistance augmente chez les bactéries soumises à des stress non-létaux d'origine thermique, antibiotique ou de toute autre nature et leur issue est souvent bénéfique (Baquero et coll., 1998; Hall, 1998).

Les gènes d'antibiorésistance d'origine exogène peuvent être acquis de trois façons (Figure 25). Les bactéries peuvent capter des brins d'ADN libres qui sont présents dans le biotope, ce qui est connu comme la TRANSFORMATION. Les gènes assimilés sont incorporés au génome de la bactérie réceptrice s'ils proviennent d'une bactérie apparentée. L'ADN exogène proviendrait de bactéries mortes, mais on craint que celui qui se trouve parmi les impuretés des préparations antibiotiques commerciales produites par fermentation puisse avoir un lien avec l'émergence d'antibiorésistance (Webb et Davies, 1993). Le deuxième mode est la TRANSDUCTION, où un virus sert de vecteur pour la transmission du gène. C'est aussi un mécanisme relativement exclusif car les virus sont spécifiques d'hôte. Au laboratoire, la transformation est couramment utilisée dans les études sur l'antibiorésistance mais sa prévalence dans la nature est inconnue (Olsen, 1999). Par contre, on sait que des bactéries se transforment génétiquement dans les biotopes naturels et dans les denrées alimentaires, même aux températures de réfrigération (Baur et coll., 1996; Bauer et coll., 1999). La transduction jouerait un rôle important dans la propagation d'antibiorésistance chez *S. aureus* et chez les *Pseudomonas* (Olsen, 1999).

Le mode d'acquisition de gènes exogènes d'antibiorésistance le plus important est, sans doute, la CONJUGAISON (Figure 25). Contrairement aux deux autres modes d'acquisition de gènes, la proximité phylogénique des bactéries n'est pas un pré-requis à la conjugaison (Salyers et Amabile-Cuevas, 1997) : il suffit que les bactéries puissent entrer en contact étroit pour s'échanger du matériel génétique. Les deux bactéries peuvent être des résidents du même biotope ou bien être en transit à partir de biotopes différents. Classiquement, la bactérie donneuse porte un plasmide, dont une copie sera produite et ensuite transférée à la bactérie accepteuse. Plusieurs plasmides sont autonomes : ils portent les gènes requis pour assurer leur propre duplication ainsi que pour réaliser la

conjugaison. On a récemment découvert que les transposons jouaient un rôle majeur dans la propagation d'antibiorésistance en raison de leur capacité à se propager par conjugaison (Figure 25). Les transposons sont des portions de chromosome ayant la faculté de s'extraire de ce dernier et ainsi passer au plasmide et vice-versa (Olsen, 1999), ce qui est connu sous le nom de TRANSPOSITION. Certains transposons sont capables aussi de prendre la forme d'un « mini-plasmide » le temps de la conjugaison pour s'intégrer ensuite au chromosome de la bactérie accepteuse (Salysers et Amabile-Cuevas, 1997). Les bactéries multi-résistantes portent souvent sur leurs plasmides ou transposons un système d'acquisition et de gestion de matériel génétique : les intégrons (Hall, 1997). Ces structures ont la faculté de collectionner et d'exprimer des gènes-cassette, dont la taille ne permet que l'encodage d'un seul mécanisme de résistance ou autre.

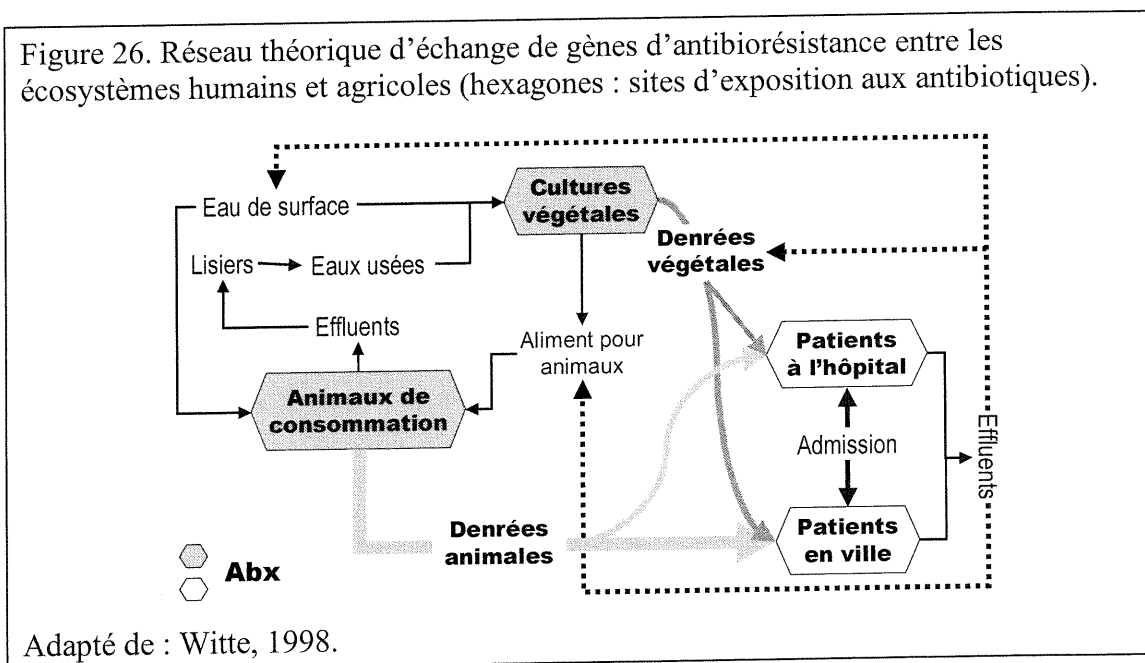
Figure 25. Principaux modes d'acquisition de gènes d'antibiorésistance par les bactéries.



N.B. : les chromosomes bactériens et les plasmides s'échangent des transposons (Tn) par transposition

Une fois acquis, les gènes de résistance persistent longtemps dans l'écosystème (Levy, 1997). Il ne faut pas oublier que les gènes de résistance sont souvent des modifications des gènes d'entretien de la bactérie : dans ce cas, même l'élimination complète de tous les antibiotiques ne réussira pas à faire disparaître les gènes de résistance car ils seront maintenus en vie par leurs rôles physiologiques d'origine (Salyers et Amabile-Cuevas, 1997). Aussi, l'intégron favorise grandement la persistance des gènes de résistance. La présence dans le biotope d'un des antibiotiques dont la cassette est présente dans l'intégron permettra à l'intégron entier d'être maintenu ou diminuera son taux de perte dans la population bactérienne.

Des études réalisées sur des collections de bactéries recueillies avant et durant le début de l'âge des antibiotiques ont montré que les gènes de résistance étaient très rares mais les plasmides conjugables étaient présents chez une proportion non-négligeable de bactéries (Datta et Hughes, 1983). Ces résultats suggèrent que le développement et la propagation d'antibiorésistance sont liés à la présence d'antibiotiques. Les gènes de résistance sont un des indices les plus solides de l'interconnexion des biotopes humains, animaux, agricole et autres (Figure 26) : les bactéries laissent des traces de leur passage à travers des



biotopes étrangers lorsqu'elles échangent des transposons et plasmides avec d'autres bactéries par conjugaison (Willems et coll., 1999). Par conséquent, les gènes peuvent être utilisés comme marqueurs pour identifier les chaînes de propagation de l'antibiorésistance et évaluer l'impact des tactiques d'utilisation des antibiotiques qui seront éventuellement mis en marché.

9.3.5. L'antibiorésistance : un problème écologique

Les bactéries pathogènes constituent une minorité de la microflore. Quelle que soit l'étendue de leur spectre, les antibiotiques agissent sur un grand nombre d'espèces bactériennes, sans égard à leurs virulences respectives. L'apparition d'antibiotiques dans le biotope bactérien constitue un bouleversement important de l'écosystème et conduit à la sélection des sujets ayant une plus grande aptitude à survivre (Levy, 1997). Initialement, l'obtention d'un mécanisme de résistance entraîne des dépenses supplémentaires pour la bactérie, ce qui se traduit par une diminution de la longévité, de la capacité à se reproduire, de l'aptitude à se propager dans le biotope et de s'évader aux moyens de défense de l'hôte (Andersson et Levin, 1999). Par conséquent, le clone résistant est écrasé par la majorité de bactéries sensibles qui repeuplent le biotope après la disparition de l'antibiotique d'autant plus vite que le coût de l'antibiorésistance est élevé (Lenski, 1997). Ainsi, certains chercheurs pensent que la majorité de bactéries sensibles serait un élément-clé dans le développement d'une stratégie de contrôle de l'antibiorésistance (Baquero et coll., 1997; Lenski, 1997; Levin et coll., 1997; Levy, 1997). Toutefois, il est essentiel que la majorité de bactéries sensibles demeure fortement majoritaire pour repeupler le biotope après la disparition de l'antibiotique. Le spectre, la durée et l'étendue de l'exposition à l'antibiotique sont des facteurs qui contribuent sérieusement à diminuer la taille de cette sous-population (Levy, 1997). Par conséquent, une thérapie de masse qui s'éternise où l'on utilise un antibiotique à large spectre dont la demi-vie d'élimination est lente réunirait

tous les ingrédients pour éradiquer la population sensible et laisser le champ libre au clone résistant.

Les bactéries sont en constante évolution et le clone résistant diminuera le coût de sa résistance après quelques dizaines ou centaines de générations, parfois si efficacement qu'il devient plus compétitif qu'avant l'exposition aux antibiotiques (Lenski, 1997). Lorsque l'exposition à l'antibiotique est maintenue et que le clone réussit à minimiser le coût de son antibiorésistance, il se propagera dans son biotope et ailleurs dans l'environnement et n'aura peut-être plus besoin de la présence d'antibiotique pour maintenir sa dominance (Marshall et coll., 1990). Par conséquent, la probabilité qu'un clone résistant émerge et domine est corrélée positivement à la durée de l'exposition à l'antibiotique. Il est à noter que l'antibiotique ne favorise l'émergence d'antibiorésistance que si la concentration dans le biotope est suffisante pour inhiber la population normale mais insuffisante pour inhiber les clones résistants (Baquero et coll., 1997). Il s'en déduit que si la concentration est suffisamment élevée ou suffisamment basse pour ne pas discriminer entre la majorité de cellules sensibles et les clones résistants, c'est la majorité sensible qui repeuplera le biotope après l'arrêt du traitement. Ce constat est d'une part rassurant, car il suggère que les résidus médicamenteux présents dans les denrées alimentaires ne seraient pas sélectifs, de même que l'usage thérapeutique d'antibiotiques à fortes doses et à court terme. D'autre part, cette notion de plage de concentrations sélectives nous incite à se méfier de l'usage ergotrope des antibiotiques, où l'administration à long terme de faibles doses d'antibiotiques auraient pour effet d'éliminer les clones plus sensibles.

Les bactéries sont en perpétuelle compétition dans leur biotope mais elles cherchent aussi à maintenir l'équilibre de leur écosystème. En effet, les événements catastrophiques pousseraient les bactéries à améliorer leur capacité de survie et, paradoxalement, à partager leurs trouvailles aux autres membres de la microflore. Lors d'un stress non-létal causé par l'exposition aux antibiotiques, le transfert de gènes de résistance entre bactéries augmente

significativement (Stevens et coll., 1993). Par contre, l'application d'une dose létale d'antibiotique minimise ce phénomène.

9.3.6. Conclusions

À ce stade, toute recommandation spécifique au sujet de l'usage des antibiotiques est hâtive. Nos connaissances en antibiothérapie et en antibiorésistance sont encore fragmentaires et les facteurs de risque ne sont pas caractérisés avec assez de précision. Mais plus on attend, moins on aura de chances de contrôler la progression de l'antibiorésistance, car les organismes moins sensibles que l'on sélectionne avec nos traditions thérapeutiques actuelles après plusieurs générations font des mutations qui leur permettent de diminuer le coût de garder des gènes de résistance et d'augmenter le niveau de résistance. Malgré le peu de données disponibles sur la dynamique de l'antibiorésistance dans la biosphère, il est évident que ce problème ne peut être abordé sans que toutes les parties intervenantes n'arrivent à une stratégie globale. L'antibiorésistance profite de nos distensions pour consolider ses positions et même gagner du terrain.

Plus concrètement, le développement d'un système de surveillance de l'évolution temporelle et spatiale de l'antibiorésistance est crucial. La relation dose antibiotique-développement de résistance est présentement impossible à établir même à l'échelle locale, ce qui implique que les rôles respectifs des différents secteurs d'utilisation d'antibiotiques ne peuvent être départagés et, surtout, que les facteurs de risque ne peuvent être identifiés. Pour ce faire, il faut avoir des données quantitatives et qualitatives de l'usage des différents antibiotiques à l'hôpital, dans le milieu communautaire, à la ferme et partout ailleurs. Du côté de la recherche, il est impératif de connaître les relations dose-effet des antibiotiques sur l'efficacité thérapeutique et sur l'antibiorésistance pour optimiser leur usage thérapeutique. Dans cette même optique, les modificateurs nutritionnels, hygiéniques, zootechniques, etc. de ces relations et la détermination des nouveaux temps de retrait en fonction des doses doivent

être caractérisés. Il est aussi nécessaire de réduire l'exposition des bactéries aux antibiotiques entre autres en définissant les motifs valides d'usage de ces derniers. La variabilité clonale des bactéries pathogènes ET commensales en ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques, ainsi que leurs réactions d'adaptation à la présence d'antibiotiques doivent être mesurés. En définitive, la complexité de l'antibiothérapie et de ses impacts écologiques a été gravement sous-estimée par l'ensemble des utilisateurs, aussi bien en médecine humaine et vétérinaire qu'en agriculture. L'émergence d'antibiorésistance est une conséquence directe de cette négligence. Si nous tenons à conserver l'efficacité de l'arsenal antibiotique, nous devons désormais considérer d'autres éléments que l'état de santé du patient avant d'instituer un régime thérapeutique.

9.3.7. Références

- Aarestrup, F. M.** (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **12**: 279-285.
- Andersson, D. I., Levin, B. R.** (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, **2**: 489-493.
- Anonyme.** (1980). Why has Swann failed? [editorial]. *British Medical Journal*, **280**: 1195-1196.
- Baquero, F., Negri, M. C., Morosini, M. I., Blazquez, J.** (1997). The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 93-105.
- Baquero, F., Negri, M. C., Morosini, M. I., Blazquez, J.** (1998). Antibiotic-selective environments. *Clinical Infectious Diseases*, **27 Suppl 1**: S5-11.

- Bauer, F., Hertel, C., Hammes, W. P.** (1999). Transformation of *Escherichia coli* in foodstuffs. *Systematic and Applied Microbiology*, **22**: 161-168.
- Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W., Jenni, B.** (1996). Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 3673-3678.
- Brundtland, G. H.** (2000). Overcoming antimicrobial resistance - world health report on infectious diseases.
- Burnet, F. M.** (1962). *Natural history of infectious disease - 3ème édition*. Cambridge, UK, University Press.
- Cheng, J., Baldwin, K., Guffanti, A. A., Krulwich, T. A.** (1996). Na⁺/H⁺ antiport activity conferred by *Bacillus subtilis* tetA(L), a 5' truncation product of tetA(L), and related plasmid genes upon *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **40**: 852-857.
- Cohen, M. L.** (1997). Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 223-231.
- Courvalin, P.** (1996). The Garrod Lecture. Evasion of antibiotic action by bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **37**: 855-869.
- Datta, N., Hughes, V. M.** (1983). Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*, **306**: 616-617.
- Davies, J. E.** (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 15-27.

- Devriese, L. A., Ieven, M., Goossens, H., Vandamme, P., Pot, B., Hommez, J., Haesebrouck, F.** (1996). Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **40**: 2285-2287.
- Gootz, T. D., Brighty, K. E.** (1996). Fluoroquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Medicinal Research Reviews*, **16**: 433-486.
- Hall, B. G.** (1998). Adaptive mutagenesis: a process that generates almost exclusively beneficial mutations. *Genetica*, **102-103**: 109-125.
- Hall, R. M.** (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 192-202.
- Hancock, R. E.** (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, **27 Suppl 1**: S93-S99.
- Helmuth, R., Protz, D.** (1997). How to modify conditions limiting resistance in bacteria in animals and other reservoirs. *Clinical Infectious Diseases*, **24 Suppl 1**: S136-S138.
- Hughes, J. M., Tenover, F. C.** (1997). Approaches to limiting emergence of antimicrobial resistance in bacteria in human populations. *Clinical Infectious Diseases*, **24 Suppl 1**: S131-S135.
- Huovinen, P.** (1999). Bacterial resistance; an emerging health problem. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, **92**: 7-13.

- Kessler, R. E.** (1997). Perspectives on chemotherapeutic approaches to antibiotic-resistant bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, **24 Suppl 1**: S146-S147.
- Khachatourians, G. G.** (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria [see comments]. *Canadian Medical Association Journal*, **159**: 1129-1136.
- Lenski, R. E.** (1997). The cost of antibiotic resistance--from the perspective of a bacterium. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 131-140.
- Levin, B. R., Lipsitch, M., Perrot, V., Schrag, S., Antia, R., Simonsen, L., Walker, N. M., Stewart, F. M.** (1997). The population genetics of antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases*, **24 Suppl 1**: S9-16.
- Levy, S. B.** (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 1-9.
- Linton, A. H.** (1981). Has Swann failed? *Veterinary Record*, **108**: 328-331.
- Malorny, B., Schroeter, A., Helmuth, R.** (1999). Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary Salmonella isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 2278-2282.
- Marshall, B., Petrowski, D., Levy, S. B.** (1990). Inter- and intraspecies spread of Escherichia coli in a farm environment in the absence of antibiotic usage. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **87**: 6609-6613.
- Massova, I., Mobashery, S.** (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 1-17.

- Nikaido, H.** (1998). Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infectious Diseases*, **27 Suppl 1**: S32-S41.
- O'Brien, T. F.** (1997). The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clinical Infectious Diseases*, **24 Suppl 1**: S2-S8.
- Olsen, J. E.** (1999). Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, **92**: 15-22.
- Phillips, I.** (1998). Lessons from the past: a personal view. *Clinical Infectious Diseases*, **27 Suppl 1**: S2-S4.
- Piddock, L. J.** (1996). Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? [see comments]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **38**: 1-3.
- Prescott, J. F.** (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food? *Canadian Veterinary Journal*, **38**: 763-766.
- Quinn, J. P.** (1998). Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, **27 Suppl 1**: S117-S124.
- Radostits, O. M.** (1999). The use of antimicrobials in beef cattle health management and production and the development of antimicrobial resistant pathogens and their transfer to humans causing disease which is difficult to treat. *Proceedings, American Association of Bovine Practitioners Conference*, **32**: 75-110.

- Rasmussen, B. A., Bush, K., Tally, F. P.** (1997). Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clinical Infectious Diseases*, **24 Suppl 1**: S110-S120.
- Roberts, M. C.** (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, **19**: 1-24.
- Rubin, R. J., Harrington, C. A., Poon, A., Dietrich, K., Greene, J. A., Moiduddin, A.** (1999). The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 9-17.
- Salyers, A. A., Amabile-Cuevas, C. F.** (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 2321-2325.
- Sternberg, S.** (1999). Antimicrobial resistance in bacteria from pets and horses. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, **92**: 37-50.
- Stevens, A. M., Shoemaker, N. B., Li, L. Y., Salyers, A. A.** (1993). Tetracycline regulation of genes on *Bacteroides* conjugative transposons. *Journal of Bacteriology*, **175**: 6134-6141.
- Taylor-Robinson, D., Bebear, C.** (1997). Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **40**: 622-630.
- van den Bogaard, A. E., Stobberingh, E. E.** (1999). Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, **58**: 589-607.

Webb, V., Davies, J. (1993). Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 2379-2384.

Willems, R. J., Top, J., van den, B. N., van Belkum, A., Mevius, D. J., Hendriks, G., Santen-Verheuvell, M., van Embden, J. D. (1999). Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 483-491.

Witte, W. (1997). Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. *Ciba Foundation Symposium*, **207**: 61-71.

Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, **279**: 996-997.

9.4. TENEUR NUTRITIVE DES ALIMENTS EMPLOYÉS DANS L'ÉTUDE PK/PD.

Nutriment	Formule		Différence
	A	B	
Protéines brutes (%)	18.59	18.71	0.65%
Matières grasses (%)	2.98	3.06	2.68%
Fibres (%)	2.75	2.82	2.55%
Énergie métabolisable (kCal/kg)	3050.02	3040.65	-0.31%
Énergie digestible (kCal/kg)	3278.44	3267.42	-0.34%
Calcium (%)	1.03	0.81	-21.36%
Phosphore (%)	0.73	0.63	-13.70%
Phosphore Assimilable Vol (%)	0.52	0.42	-19.23%
Sel (%)	0.32	0.49	53.12%
Sodium (%)	0.16	0.30	87.50%
Chlore (%)	0.19	0.30	57.89%
Magnésium (%)	0.18	0.18	0.00%
Potassium(%)	0.71	0.71	0.00%
Soufre (%)	0.21	0.21	0.00%
Zinc (mg/kg)	1003.85	1003.67	-0.02%
Fer (mg/kg)	260.60	261.22	0.24%
Manganèse (mg/kg)	84.59	83.31	-1.51%
Cuivre (mg/kg)	163.02	161.20	-1.12%
Iode (mg/kg)	4.00	3.98	-0.50%
Cobalt (mg/kg)	0.50	0.50	0.00%
Sélénium (mg/kg)	0.50	0.50	0.00%

(suite)

Nutriment	Formule		Différence
	A	B	
Vitamine A (IU/kg)	20000.00	20000.00	0.00%
Vitamine D (IU/kg)	2500.00	2500.00	0.00%
Vitamine E (IU/kg)	100.00	100.00	0.00%
Vitamine K (mg/kg)	4.00	3.96	-1.00%
Thiamine (mg/kg)	5.40	5.42	0.37%
Riboflavine (mg/kg)	8.01	7.99	-0.25%
Acide pantoténique (mg/kg)	33.04	33.01	-0.09%
Niacine (mg/kg)	54.84	55.03	0.35%
Pyridoxine (mg/kg)	8.06	8.06	0.00%
Acide folique (mg/kg)	0.95	0.94	-1.05%
Biotine (µg/kg)	404.80	405.12	0.08%
Vitamine B ₁₂ (µg/kg)	50.00	50.20	0.40%
Vitamine C (mg/kg)	0.00	0.00	-
Choline (mg/kg)	1762.40	1243.03	-29.47%
Lysine (%)	1.15	1.31	13.91%
Méthionine (%)	0.40	0.42	5.00%
Méthionine + Cystéine (%)	0.72	0.75	4.17%
Tryptophane (%)	0.21	0.22	4.76%
Thréonine (%)	0.71	0.83	16.90%
Acide Linoléique (%)	1.61	1.60	-0.62%