

Université de Montréal

ÉTUDE ET MODÉLISATION DE LA CINÉTIQUE ORALE DE  
L'AMOXICILLINE CHEZ LE PORCELET SEVRÉ

par

Dave Bernier

Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre 2008

© Dave Bernier, 2008

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

ÉTUDE ET MODÉLISATION DE LA CINÉTIQUE ORALE DE  
L'AMOXICILLINE CHEZ LE PORCELET SEVRÉ

présenté par

Dave Bernier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Sylvie D'Allaire, présidente du jury

Jérôme del Castillo, directeur de recherche

Francis Beaudry, codirecteur

Louis M. Huneault, codirecteur

Christian Klopfenstein, membre du jury

## Résumé

Il est rapporté que la biodisponibilité orale de l'amoxicilline chez le porc est environ trois fois moindre que chez l'homme. Pour élucider les raisons de cette différence, la pharmacocinétique artérielle, veineuse porte et urinaire de cet antibiotique a été caractérisée à des doses intragastriques de 4 à 30 mg/kg et différents modèles compartimentaux physiologiques ont été conçus pour l'analyse des données. La biodisponibilité orale de l'amoxicilline est maximale à 4 mg/kg, avec une valeur moyenne de 52%. Les différences porto-systémiques de concentrations plasmatiques d'amoxicilline et la clairance urinaire ont permis de démontrer une augmentation de la clairance hépatique jusqu'à la dose de 30 mg/kg. Un modèle compartimental comprenant deux voies parallèles d'absorption (de type Michaelis-Menten d'accessibilité limitée dans le temps et d'ordre 1), deux compartiments de distribution (central et périphérique) deux voies d'élimination (excrétions urinaire et biliaire) est celui qui prédit le mieux les données observées. Ces résultats mettent en évidence le rôle prépondérant du transporteur saturable PepT1 dans l'absorption orale de l'amoxicilline administrée à faible dose, ainsi que l'importance croissante de l'absorption passive lors d'administration à forte dose.

**Mots clés :** Porc; Amoxicilline; Pharmacocinétique; Modélisation compartimentale; Biodisponibilité; Transporteur PepT1.

## Abstract

It was reported that the oral bioavailability of amoxicillin in swine is about three times lower than in human beings. To elucidate the reasons for this difference, arterial, portal venous and urinary pharmacokinetics was documented at intragastric dose amounts ranging between 4 and 30 mg/kg, and several physiologic compartmental models were developed for data analysis. The maximum oral bioavailability of amoxicillin was recorded at 4mg/kg with a mean value of 52%. The portal-systemic plasma concentration differences of amoxicillin and its urinary clearance revealed an increase in hepatic clearance up to the 30 mg/kg dose. A compartmental model with two parallel absorption route (time-constrained Michaelis-Menten and first-order processes), two distribution compartments (central and peripheral) two elimination pathways (urinary and biliary excretions) best fitted the experimental data. These results highlight the paramount role of the PepT1 carrier-mediated, saturable absorption at low oral amoxicillin doses, as well as the increasing role of passive absorption at high doses.

**Keywords:** Swine; Amoxicillin; Pharmacokinetics; Compartmental modeling; Bioavailability; PepT1 transporter.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et des abréviations.....	xiv
Remerciements .....	xix
Introduction .....	xxi
Recension de la littérature .....	1
1.1 Découverte des $\beta$ -lactamines et développement de l'amoxicilline .....	1
1.2 Structure et propriétés physico-chimiques .....	3
1.2.1 Structure et biosynthèse.....	3
1.2.2 Ionisation.....	5
1.2.3 Hydrosolubilité et liposolubilité.....	7
1.2.4 Stabilité en milieu acide .....	8
1.3 Propriétés biologiques de l'amoxicilline.....	8
1.3.1 Mode d'action.....	8
1.3.2 Pharmacodynamie .....	12
1.3.3 Pharmacocinétique de l'amoxicilline .....	14
1.3.3.1 Absorption orale .....	14
1.3.3.2 Mise à disposition.....	25
1.3.4 Accumulation du médicament au site d'action et facteurs de variabilité.....	34
1.4 Analyse pharmacocinétique de l'amoxicilline .....	35
1.4.1 Analyse compartimentale des données.....	36
1.4.2 Analyse par moments statistiques des données.....	44
1.4.3 Facteurs de variabilité .....	48

1.4.3.1	Effet de la protéine .....	48
1.4.3.2	Effet de la fibre alimentaire.....	48
1.4.3.3	Effet du pH .....	49
2	Hypothèses et objectifs.....	50
2.1	Hypothèse.....	51
2.2	Objectifs .....	51
3	Matériel et méthodes .....	52
3.1	Plan expérimental.....	52
3.2	Phase animale.....	52
3.2.1	Antibiotique et autres produits chimiques.....	52
3.2.2	Animaux d'expérience .....	53
3.2.3	Logement.....	53
3.2.4	Alimentation.....	54
3.2.5	Procédure chirurgicale.....	54
3.2.6	Protocole pharmacocinétique .....	56
3.2.7	Traitement et entreposage des échantillons.....	57
3.3	Description de la méthode analytique .....	58
3.3.1	Préparation des échantillons de plasma.....	58
3.3.2	Préparation des échantillons d'urine .....	59
3.3.3	Méthode instrumentale .....	59
3.3.3.1	Conditions chromatographiques.....	59
3.3.3.2	Conditions de la spectrométrie de masse .....	60
3.3.4	Analyse des données .....	60
3.3.5	Modélisation pharmacocinétique et estimation des paramètres .....	63
3.3.6	Analyse statistique des données .....	66
4	Résultats .....	67
4.1	Exactitude et précision de la méthode d'analyse des échantillons.....	67
4.2	Évolution temporelle des concentrations plasmatiques artérielles et veineuses d'amoxicilline.....	67

4.3	Différences de concentrations porto-systémiques.....	71
4.4	Excrétion urinaire.....	72
4.5	Clairances hépatique, rénale et totale de l'amoxicilline.....	73
4.6	Biodisponibilité orale de l'amoxicilline.....	75
4.7	Choix du modèle pharmacocinétique compartimental.....	76
5	Discussion.....	80
5.1	Critique de la méthodologie en fonction de l'hypothèse et des objectifs.....	80
5.2	Caractérisation de la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline.....	85
5.2.1	Absorption.....	85
5.2.1.1	Biodisponibilité de l'amoxicilline selon la dose orale ...	88
5.2.1.2	Détermination de la capacité maximale d'absorption ...	89
5.2.2	Élimination de l'amoxicilline par le foie.....	89
5.2.3	Élimination de l'amoxicilline par les voies rénales.....	92
5.3	Modèle pharmacocinétique de l'absorption orale de l'amoxicilline.....	92
5.4	Critique et pertinence du projet.....	95
6	Conclusion.....	96
7	Bibliographie.....	97
	Annexes.....	xxv
	Annexe 1 : Certificat d'analyse de l'amoxicilline utilisée au cours de l'étude.....	xxv
	Annexe 2 : Composition des aliments utilisés avec ou sans protéine.....	xxvi
	Annexe 3 : Équations différentielles associées aux modèles compartimentaux utilisés pour caractériser la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline chez des porcelets sevrés.....	xxvii
	Annexe 4 : Profils des concentrations observées et prédites par les différents modèles pour les différents porcs.....	xxix
	Annexe 5 : Distribution des résidus.....	xli
	Annexe 6 : Résidus des différents modèles selon la dose administrée.....	xlii

Annexe 7 : Communication scientifique. Actes de conférences du 20ème congrès de l'International Pig Veterinary Society, Durban (Afrique du Sud), du 22 au 26 juin 2008, volume 1, page 246. ....xliv

## Liste des tableaux

Tableau I : Valeurs de biodisponibilité orale absolue de l'amoxicilline d'études publiées dans des études avec comité de lecture. ....	25
Tableau II : Formules du calcul du volume de distribution et leurs principales caractéristiques. ....	27
Tableau III : Valeurs du volume de distribution de l'amoxicilline à l'état d'équilibre tiré de différentes études effectuées chez le porc .....	30
Tableau IV : Valeurs de clairance totale ( $CL_T$ ) de l'amoxicilline tiré de différentes études effectuées chez le porc et estimation du coefficient d'extraction (E) associé à chacun. ....	34
Tableau V : Temps de prélèvement des échantillons sanguins et des volumes totaux d'urine .....	57
Tableau VI : Hypothèses et modèles compartimentaux employés pour caractériser la pharmacocinétique de l'amoxicilline orale chez le porcelet sevré. ....	64
Tableau VII : Étendue des concentrations, exactitude et précision de la méthode d'analyse des échantillons plasmatiques et sanguins .....	67

Tableau VIII: Valeurs des clairances normalisées par le poids corporel chez des porcelets suite à l'administration orale d'une dose de 4, 12, 20 out 30 mg/kg d'amoxicilline. ....	75
--	----

## Liste des figures

Figure 1 : Structure semi-développée de l'amoxicilline identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau $\beta$ -lactamine .....	3
Figure 2 : Schéma de la synthèse des pénicillines.....	5
Figure 3 : Structure du peptidoglycane.....	9
Figure 4 : Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine .....	10
Figure 5 : Réaction de polymérisation du peptidoglycane et inhibition par l'action des pénicillines .....	11
Figure 6 : Profils de la vitesse de bactéricidie en fonction de la concentration pour des antibiotiques concentration-dépendants et temps-dépendants.....	13
Figure 7 : Modèle hypothétique de l'absorption de l'amoxicilline par les entérocytes de l'intestin grêle .....	15
Figure 8 : Phases du profil pharmacocinétique associées aux différentes estimations du volume de distribution.....	26

Figure 9 : Schéma physiologique de la pharmacocinétique de l'amoxicilline chez le porc.....	32
Figure 10 : Exemple de schématisation d'un système compartimental avec les équations différentielles associées à chaque compartiment .....	37
Figure 11 : Vitesse de transport d'un substrat en fonction de sa concentration, qui caractérise une cinétique de transfert de type Michaelis-Menten .....	40
Figure 12 : Modèle pharmacocinétique de l'absorption orale de l'amoxicilline chez l'homme.....	43
Figure 13 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques (moyenne et écart type) d'amoxicilline chez des porcelets sevrés.....	69
Figure 14 : Variation des valeurs de $t_{max}$ en fonction de la dose intragastrique d'amoxicilline.....	71
Figure 15 : Valeurs de $CL_H/CL_T$ en fonction de la dose d'amoxicilline administrée par voie orale chez le porc.....	72
Figure 16 : Quantité moyenne cumulée d'amoxicilline excrétée aux doses de 4, 12, 20 et 30 mg/kg en fonction du temps de vidange urinaire (N.B. les temps ont	

été majorés de 0,2 heures par dose pour une meilleure appréciation des barres d'erreur .....73

Figure 17 : Clairances rénale et hépatique d'amoxicilline (moyenne, écarts types) chez des porcelets, en fonction de la dose administrée. ....74

Figure 18 : Biodisponibilité orale de l'amoxicilline chez des porcelets sevrés suite à son administration orale. ....76

Figure 19 : Résidus ( $C_p$  prédite moins  $C_p$  mesurée) des concentrations plasmatiques d'amoxicilline prédites par chaque modèle en fonction du temps de prélèvement sanguin. ....78

Figure 20 : Résidus ( $C_p$  prédite moins  $C_p$  mesurée) des concentrations plasmatiques d'amoxicilline mesurées par chaque modèle en fonction de la concentration d'amoxicilline mesurée. ....79

## Liste des sigles et des abréviations

- AIC : Critère d'Akaike.
- ARN<sub>m</sub> : Acide ribonucléique messenger.
- ATP : Adénosine triphosphate.
- AUC : Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps.
- AUC<sub>A</sub> : Aire sous la courbe du profil plasmatique artériel des concentrations plasmatiques en fonction du temps.
- AUC<sub>V</sub> : Aire sous la courbe du profil plasmatique veineux des concentrations plasmatiques en fonction du temps.
- AUC<sub>0→t</sub> : Aire sous la courbe entre le temps 0 et le temps t des concentrations plasmatiques en fonction du temps.
- AUC<sub>0→∞</sub> : Aire sous la courbe entre le temps 0 et l'infini des concentrations plasmatiques en fonction du temps.

AUMC : Aire moyenne sous la courbe du premier moment statistique.

°C : Degré Celsius.

$C_0$  : Concentration plasmatique au temps  $t=0$ .

$C_{max}$  : Concentration plasmatique maximale.

$C_{lum}$  : Concentration dans la lumière intestinale

$C_p$  : Concentration plasmatique

CL : Clairance.

$CL_H$  : Clairance hépatique

$CL_R$  : Clairance rénale

$CL_T$  : Clairance totale

$CL_x$  : Clairance associée à un organe  $x$

CMB : Concentration minimale bactéricide d'un antibiotique

CMI :	Concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique
Dose <sub>iv</sub> :	Dose administrée par voie intraveineuse
E <sub>x</sub>	Coefficient d'extraction d'un médicament présent dans le sang artériel lors de son passage à travers l'organe émonctoire <i>x</i>
F :	Biodisponibilité
g :	Gramme
HEPA :	High Efficiency Particulate Absorbing Filter
K <sub>50</sub> :	Concentration plasmatique requise pour que sa vitesse de transfert soit égale à la moitié de sa valeur maximale.
kDa	Kilodalton
kg :	Kilogramme
log-P	Coefficient de partage octanol/eau, après transformation logarithmique.
MCT1 :	Protéine de transport 1 des acides monocarboxyliques

mL :	Millilitre
$\mu$ l :	Microlitre
mm :	Millimètre
MRT	Temps moyen de séjour d'un médicament dans le système pharmacocinétique
NAG :	Acide N-acétylglycosamique
NAM :	Acide N-acétylmuramique
P :	Coefficient de partage octanol/eau
pI	Point isoélectrique
PLP :	Transpeptidase bactérienne du glycosaminoglycan bactérien (Protéine liant les pénicillines)
$Q_x$	Débit sanguin artériel qui perfuse l'organe $x$
t :	Temps

$t_{MAX}$ :	Temps où la concentration plasmatique maximale est atteinte
U.I. :	Unité internationale
$V_{BACT}$	Vitesse de la bactéricidie
$V_{MAX}$	Vitesse maximale d'absorption
$V_C$	Volume de distribution au temps zéro
$V_{SS}$	Volume de distribution à l'état stationnaire
$V_Z$	Volume de distribution terminal, calculé à partir de la pente terminale des concentrations en fonction du temps

## Remerciements

Je remercie la Fédération des producteurs de porcs du Québec ainsi que le Conseil pour le développement de l'agriculture du Québec pour leur support financier qui a permis la réalisation de ce projet.

Je remercie l'entreprise F. Ménard inc. d'avoir fourni les animaux et l'aliment, ce qui a permis la réalisation du projet. Je remercie plus particulièrement M Michel Dupré qui a vu au bon déroulement des approvisionnements.

Merci au personnel du Laboratoire d'hygiène vétérinaire et des aliments de Saint-Hyacinthe pour leur support technique et le prêt des équipements.

Merci au D<sup>r</sup> Louis Huneault et au D<sup>r</sup> Romain Béraud qui ont rendu possible l'exécution du volet chirurgical du projet.

Merci au D<sup>r</sup> Francis Beaudry pour son implication dans l'analyse des échantillons et pour son support et son aide lors de l'analyse préliminaire des résultats.

Merci à Mme Marianne Turgeon-Plouffe, au D<sup>r</sup> Martin Guillot, à Mme Sonia Lafleur et aux MM Cheick Oumar Tidiane Sidibé, Jean-Philippe Doyon et Dominic Rivard pour leur support technique lors de la réalisation des expériences pharmacocinétiques.

Merci au D<sup>r</sup> Ann Letellier et Mme Hélène Bergeron, de même que le personnel du GREMIP pour leur support administratif.

Merci au D<sup>r</sup> Candido Pomar pour ses conseils sur le volet nutritionnel de ce projet.

Je remercie le D<sup>r</sup> Jérôme del Castillo, mon directeur de recherche, pour sa disponibilité et sa patience. Grâce à lui, j'ai pu cheminer dans le monde de la pharmacocinétique vétérinaire.

## Introduction

Les bactéries *Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis* sont des bactéries pathogènes très présentes dans les élevages porcins, partout à travers le monde (Higgins et Gottschalk, 2006, Rapp-Gabrielson *et al.*, 2006, Messier *et al.*, 2008). Ces dernières atteindraient la circulation sanguine surtout en période de stress et ensuite produiraient une variété de signes cliniques (Higgins et Gottschalk, 2006, Rapp-Gabrielson *et al.*, 2006). Ces infections ont un impact négatif sur la rentabilité de l'entreprise car elles causent des retards de croissance et dans certains cas, des mortalités subites pouvant aller jusqu'à 20% du troupeau atteint lorsqu'aucun traitement n'est mis en place. Le sevrage est la période critique pour l'éclosion de la maladie dont l'incidence maximale survient entre 5 et 10 semaines d'âge (Higgins et Gottschalk, 2006). Bien qu'elles puissent agir seules et causer la maladie, ces bactéries sont plus souvent des pathogènes opportunistes dans des élevages déjà aux prises avec des maladies virales, entre autres le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (Higgins et Gottschalk, 2006) et le syndrome de dépérissement post-sevrage (Gagnon *et al.*, 2008).

Dans les troupeaux atteints, le traitement de la maladie passe par une antibiothérapie par voie parentérale chez les individus qui présentent des signes cliniques, conjointement à un traitement collectif s'appliquant à l'ensemble des animaux exposés (MacInnes et Desrosiers, 1999). L'amoxicilline, une aminopénicilline semi-synthétique, est proposée comme l'antibiotique de choix dans

le traitement de ces infections (Higgins et Gottschalk, 2006). Cette dernière posséderait notamment une biodisponibilité plus élevée que la pénicilline G et une clairance systémique plus faible que les pénicillines G et V (del Castillo, 1996), les deux autres pénicillines utilisées chez l'espèce porcine.

Règle générale, l'antibiotique utilisé pour le traitement collectif est administré soit via l'aliment ou l'eau de boisson. Ces façons de procéder permettent de traiter simultanément un nombre important d'individus en leur imposant un minimum de stress comparativement à l'administration par injection (Jensen et al, 2006). L'incorporation de l'antibiotique à l'aliment représente un moyen permettant une importante économie de temps et d'argent mais où la quantité d'antibiotique ingérée est limitée par la consommation de l'aliment par l'animal (Barragry, 1994). De plus, l'instabilité de l'amoxicilline à une température supérieure à 37°C (Nichols, 2000) entraîne une diminution substantielle de son activité antibiotique lors du processus de fabrication d'aliments granulés, ainsi que lors de l'entreposage de l'aliment jusqu'au moment de sa consommation. Ainsi cette dégradation thermique de l'antibiotique peut limiter l'efficacité du traitement (Cooke, 1984, Derrieu *et al.*, 2000). L'utilisation de l'eau de boisson comme véhicule d'administration pour l'antibiotique permet d'éviter ce problème de dégradation thermique. La faible dégradation de l'amoxicilline en milieu aqueux à un pH avoisinant la neutralité ( $\text{pH} \approx 7$ ) ou même légèrement acide, soit entre 5,0 et 7,0 (Chadha, *et al.*, 2003), favorise aussi l'emploi de cette méthode. En comparaison avec l'utilisation d'aliment médicamenteux, l'eau

de boisson permet de mieux cibler les animaux à traiter car ceux-ci sont souvent hébergés dans les mêmes salles de traitement. Cette caractéristique fait que ce mode de distribution gagne en popularité dans les élevages porcins (Denicourt, communication personnelle).

L'efficacité du traitement métaphylactique, c'est-à-dire des animaux infectés par *Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis* mais ne présentant pas encore les signes cliniques n'est cependant pas assurée avec l'amoxicilline. Dans certains cas, il arrive que l'on observe une diminution de la mortalité dans le troupeau sans toutefois éradiquer la maladie (Carr, 2003), une réapparition des symptômes de la maladie suite à l'arrêt du traitement (Clifton-Hadley, 1986) ou tout simplement l'absence d'effet sur la prévalence d'animaux infectés (Camprodon Ylla, 2003). Jusqu'à présent, la cause de cette variabilité de l'effet des traitements métaphylactiques oraux impliquant l'amoxicilline n'a pas été démontrée, mais les propriétés pharmacocinétiques de l'amoxicilline telles sa biodisponibilité relativement faible et sa clairance systémique élevée pourraient être des pistes d'explication.

L'étude rapportée dans le présent mémoire a pour but d'amener une meilleure compréhension de la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline, qui permettrait d'améliorer l'efficacité des traitements et d'assurer le maintien de la rentabilité des entreprises aux prises avec les maladies infectieuses susceptibles à ce traitement.

## Recension de la littérature

### 1.1 **Découverte des $\beta$ -lactamines et développement de l'amoxicilline**

C'est à Alexander Flemming que l'on attribue la découverte des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines en 1928. Ce dernier fut le premier à rapporter l'activité antibactérienne de la moisissure *Penicillium* sur des colonies de staphylocoque. Il nomma la substance responsable de cette activité, pénicilline (Bud, 2007). Devant l'impossibilité de purifier cette molécule, l'intérêt la pénicilline comme agent antibactérien fut mitigé jusqu'en 1940, année où un groupe de recherche anglais dirigé par Florey et Chain observèrent l'efficacité de la pénicilline contre les infections à streptocoque chez les souris suite à une injection sous-cutanée de l'antibiotique (Chain *et al.*, 1940).

À cette époque, il était difficile de produire, à partir de la souche de *Penicillium notatum* initialement utilisée, des quantités suffisantes de pénicilline pour effectuer des essais cliniques. Les conditions de recherche étant difficiles à cause de la seconde guerre, Florey et Chain se rendirent aux États-Unis où le développement accéléré de l'antibiotique fut considéré comme une priorité stratégique. Grâce une meilleure sélection de la souche de moisissure et à des améliorations du milieu de culture, le rendement fut augmenté de 100 fois en seulement 2 ans (Demain et Elander, 1999). Durant cette période, il devint évident que différentes molécules

pouvaient être obtenues selon la composition du milieu de culture, la souche et les conditions de fermentation (Demain *et al.*, 1999, Geddes, *et al.*, 2007).

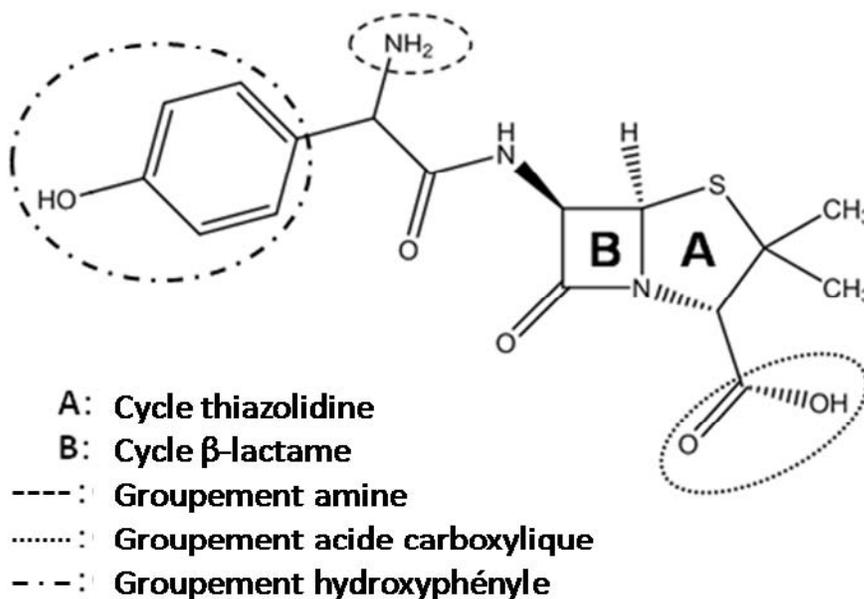
Vers la fin des années cinquante, Bachelor et son équipe démontrèrent que la structure fournissant à la pénicilline son activité antibactérienne était l'acide 6-aminopénicillamique (6-APA) et que ce dernier pouvait être obtenu par fermentation en l'absence de précurseurs de la chaîne latérale spécifique à la pénicilline G (Batchelor *et al.*, 1959). Cette découverte a ainsi ouvert la voie à la création de nouvelles  $\beta$ -lactamines de semi-synthèse, dont la chaîne latérale rattachée au 6-APA est modifiée (Rolinson, 1998). Cette découverte a permis d'élargir le spectre d'activité des pénicillines : d'une part, on développa des molécules résistantes aux  $\beta$ -lactamases comme la méthicilline et d'autre part on développa des  $\beta$ -lactamines à spectre élargi comme l'ampicilline, qui est active à la fois sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces premières molécules étaient toutefois peu propices à l'administration orale et c'est en 1970 fut que découverte l'amoxicilline ce qui remédia à ce problème. Outre un spectre d'activité très similaire à celui de l'ampicilline, l'amoxicilline a une biodisponibilité orale élevée ce qui permet d'obtenir des concentrations sanguines deux fois plus élevées suite à une administration *per os* (Geddes *et al.*, 2007).

## 1.2 Structure et propriétés physico-chimiques

### 1.2.1 Structure et biosynthèse

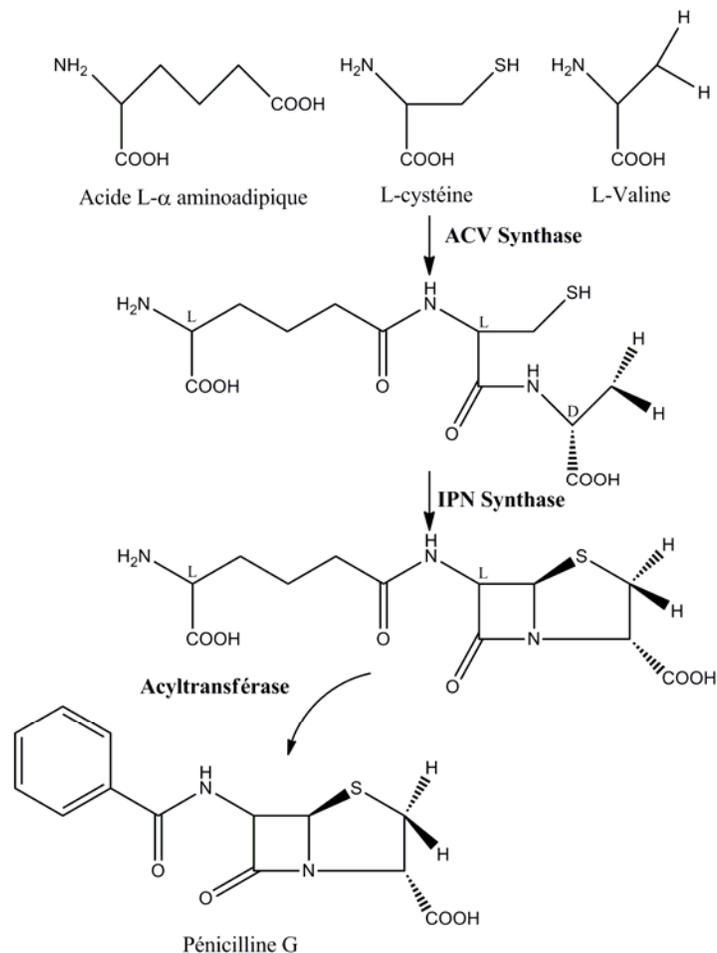
L'amoxicilline est une molécule dont la masse moléculaire est de 365,4 daltons. Tel qu'illustré à la figure 1 ci-dessous, elle possède trois groupements ionisables : le groupement acide carboxylique COOH sur le cycle thiazolidine, le groupement hydroxyle OH du cycle para-hydroxyphényle et le groupement amine primaire sur la chaîne latérale du cycle  $\beta$ -lactame.

**Figure 1 : Structure semi-développée de l'amoxicilline identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau  $\beta$ -lactamine**



Sa production passe par l'étape classique de la biosynthèse des pénicillines (Demain et Elander, 1999) qui s'effectue à partir de 3 acides aminés, soit l'acide L- $\alpha$ -aminoadipique, la L-cystéine et la L-Valine (Figure 2). La structure commune à toutes les pénicillines est le cycle  $\beta$ -lactame fusionné à un cycle thiazolidine (Figure 2). Le cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines porte une chaîne latérale qui est spécifique à chaque antibiotique et influence son action ainsi que son absorption systémique. Pour l'amoxicilline, cette chaîne comporte une amine primaire et un groupement para-hydroxyphényle.

**Figure 2 : Schéma de la synthèse des pénicillines**



Deux autres catégories de  $\beta$ -lactamines, les céphalosporines et les céphamycines peuvent aussi être générées en poursuivant ce schéma de synthèse par une série de réactions enzymatiques supplémentaires, qui transforment le noyau thiazolidine en un noyau dihydrothiazine (Petri, 2004). Aussi, le noyau  $\beta$ -lactame ne peut être fusionné à aucun noyau, ce qui donnera la structure de base des monobactames.

### 1.2.2 Ionisation

Un des préalables à l'activité biologique d'une molécule est qu'elle doit pouvoir traverser les membranes cytoplasmiques de différentes cellules qui s'interposent entre son site d'administration et son site d'action. Cette membrane est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont dispersés des hydrates de carbone et des protéines. Une propriété physico-chimique qui favorise ce passage transmembranaire est une charge ionique nulle.

L'amoxicilline est une molécule amphotère : les valeurs de pKa de ces groupes donneurs de protons respectivement (-COOH et -OH) et celui de son groupe receveur de protons (-NH<sub>2</sub>) sont respectivement de 2,4 et 7,4 et 9,6 (Oka *et al.*, 1995). Le point isoélectrique (pI) est la valeur de pH à laquelle la charge nette de la molécule est nulle : tel que calculé à l'aide de l'équation 1 ci-dessous (Nelson et Cox, 2005), sa valeur pour l'amoxicilline est égale à 6,0 car la valeur de pKa du groupement hydroxyle n'est pas prise en compte étant donné sa proximité avec la valeur du pH sanguin.

**Équation 1 : Formule de calcul du point isoélectrique et valeur obtenue pour l'amoxicilline**

$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) \rightarrow \frac{1}{2}(2,4 + 9,6) = 6,0$$

Cette valeur de pI indique qu'une grande proportion des molécules d'amoxicilline présentes dans le plasma et en proximité immédiate avec les microvillosités de l'intestin grêle posséderaient une charge ionique neutre, ce qui

favoriserait leur diffusion transmembranaire et, par conséquent, leur absorption intestinale et leur diffusion extravasculaire.

### 1.2.3 Hydrosolubilité et liposolubilité

Une deuxième propriété physico-chimique favorisant l'absorption est la capacité de la molécule à se solubiliser dans l'eau et les lipides. Il est établi que les molécules liposolubles traversent plus facilement la membrane cytoplasmique que les molécules polaires (Shargel *et al.*, 2004). Le coefficient de partage octanol/eau (P), qui est habituellement présenté après avoir été transformé logarithmiquement (log-P), est un indicateur du caractère lipophile d'une substance. Il est calculé à partir du rapport des concentrations d'antibiotique soluble dans l'octanol et dans l'eau (Équation 2). Il est à noter que la concentration d'antibiotique dans l'octanol n'est pas mesurée mais déduite à partir de la diminution de sa concentration dans l'eau, après l'ajout de la phase d'octanol.

**Équation 2 : Calcul de la valeur du log-P**

$$\log-P = \frac{\log[\text{octanol}]}{[\text{eau}]}$$

Plus sa valeur est négative, plus la molécule est hydrophile, alors qu'à l'inverse plus sa valeur est élevée et positive, plus la molécule est lipophile. Celle de l'amoxicilline est de 0,87 (Galichet *et al.*, 2004). Cette valeur supérieure à 0 indique que ce composé est légèrement plus soluble dans les lipides que dans l'eau, ce qui favorisera son passage transmembranaire.

### **1.2.4 Stabilité en milieu acide**

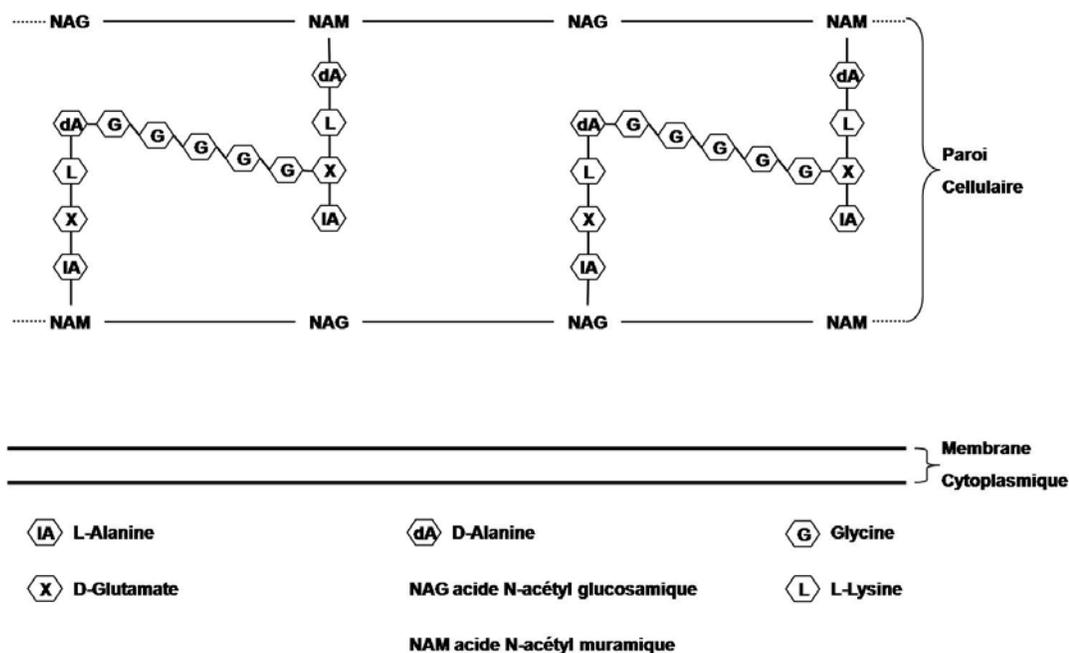
Une des propriétés physico-chimiques qui favorisent l'usage thérapeutique de l'amoxicilline est que sa structure permet de conférer une stabilité au noyau  $\beta$ -lactame en milieu acide, ce qui était un obstacle majeur à l'utilisation orale des pénicillines. Cette stabilité est obtenue grâce à la présence d'une chaîne latérale suffisamment longue pour que son noyau hydroxyphényl protège le lien amide du cycle  $\beta$ -lactame. Cette caractéristique favorise d'ailleurs son utilisation par rapport à celle de l'ampicilline, dont la biodisponibilité orale est moins élevée (Miller, 2002).

## **1.3 Propriétés biologiques de l'amoxicilline**

### **1.3.1 Mode d'action**

La paroi cellulaire bactérienne, composante essentielle au maintien de la forme et à la protection de celle-ci contre l'osmolyse, est composée en partie de peptidoglycane. La structure de ce polymère consiste en une série de chaînes où s'alternent l'acide *N*-acétylmuramique (NAM) et l'acide *N*-acétylglycosamique (NAG), sur lesquels est greffés une chaîne de polypeptides. Ces structures sont reliées entre elles par un pont inter-peptidique (Figure 3).

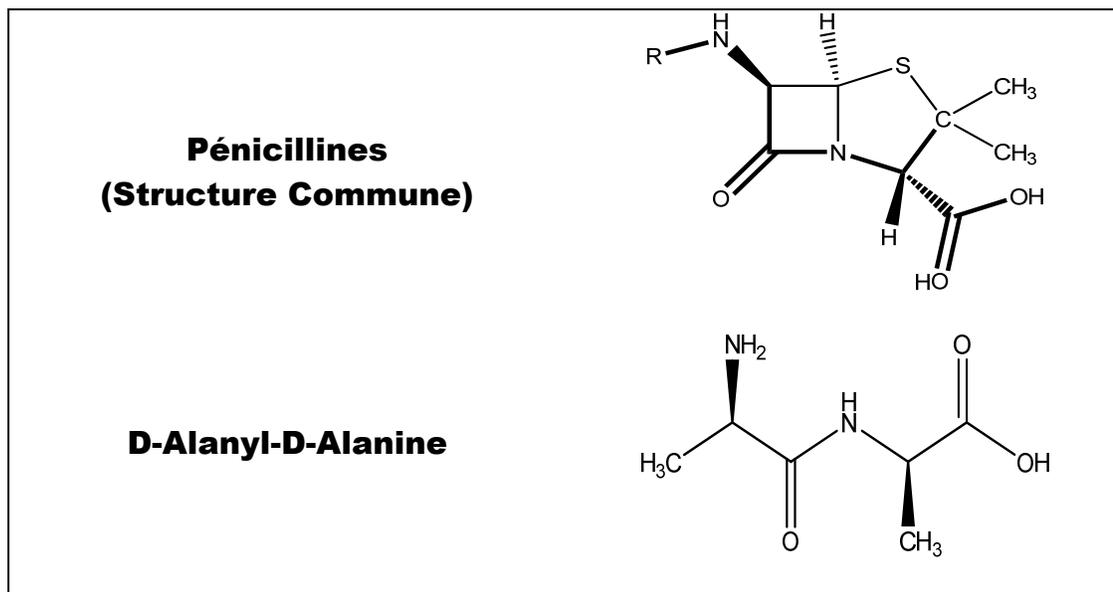
**Figure 3 : Structure du peptidoglycane**



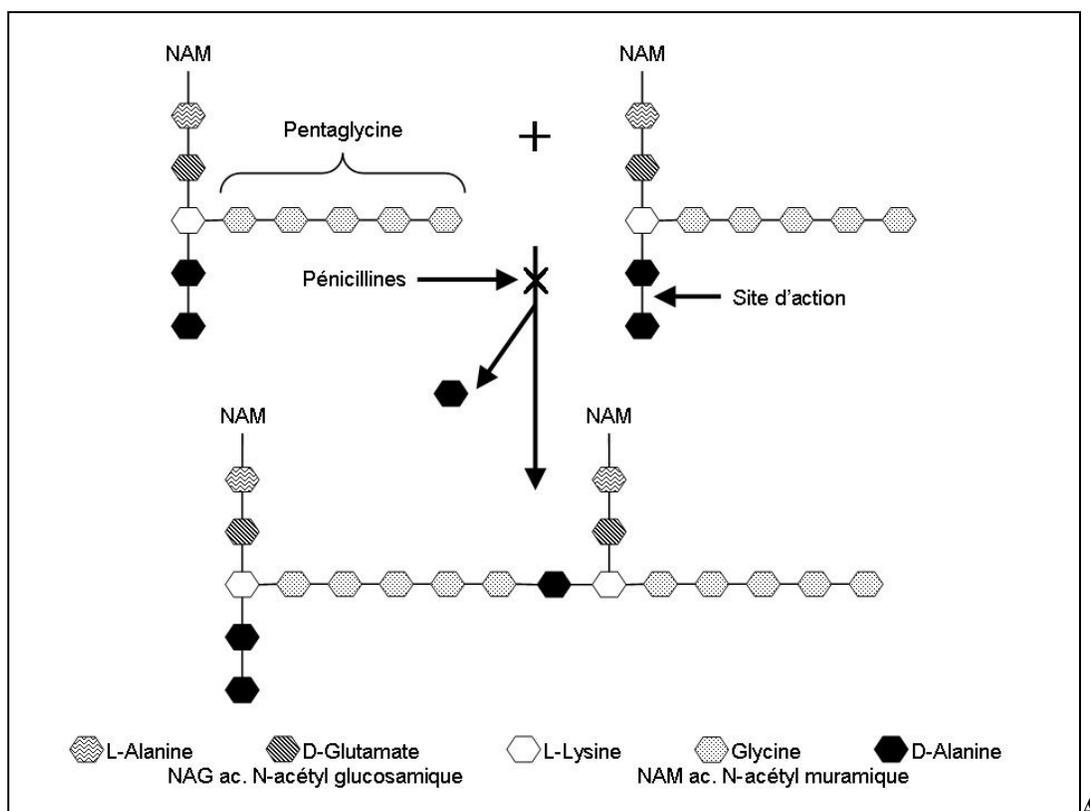
Adapté de : Petri Jr, 2004

Ces ponts inter-peptidiques sont établis grâce à l'action d'enzymes situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les transpeptidases ou PLP (Protéines Liant les Pénicillines), qui catalysent la réaction permettant la réticulation du peptidoglycane (Petri Jr, 2004). Au cours de cette réaction, une pentaglycine est ajoutée et la D-alanine du groupement D-alanyl-D-alanine de la chaîne peptidique subséquente est libérée. L'amoxicilline, comme les autres pénicillines, possède une conformation qui s'apparente à la D-alanyl-D-alanine du précurseur du peptidoglycane (Figure 4; Nelson et Cox, 2008). Cette similarité lui confère une affinité pour le site actif de la PLP. En réagissant avec la pénicilline, la PLP ouvre le noyau  $\beta$ -lactame qui ensuite forme une liaison covalente avec le site actif, ce qui empêche la PLP de poursuivre la synthèse du peptidoglycane (Figure 5), ce qui mène ultimement à l'autolyse de la bactérie.

Figure 4 : Structure des pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine



**Figure 5 : Réaction de polymérisation du peptidoglycane et inhibition par l'action des pénicillines**



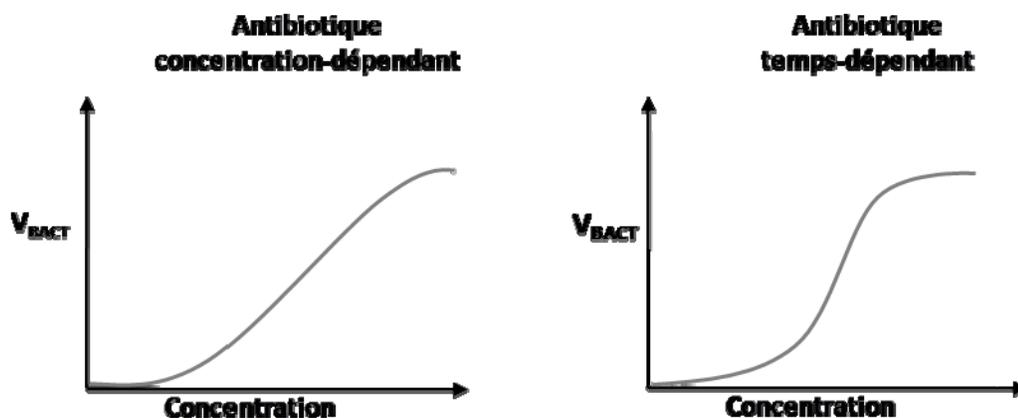
dapté de Petri Jr. 2004

Une autre hypothèse a été avancée pour expliquer l'action antibactérienne des pénicillines : une fois lié à la PLP, ce type d'antibiotiques activerait des protéines bactériennes, les holines, ayant pour effet de causer des lésions dans la membrane plasmique (Prescott *et al.*, 2003). Ces altérations causeraient des fuites du contenu cellulaire, entraînant des hydrolases qui briseraient le peptidoglycane et lyseraient la cellule (Prescott *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Pharmacodynamie

La connaissance de la relation entre la concentration d'un antibiotique et l'effet antibactérien obtenu est essentielle à l'obtention d'une antibiothérapie efficace. La concentration minimale inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne *in vitro* après une incubation d'une nuit. Elle sert à confirmer ou à surveiller la sensibilité bactérienne à un antibiotique donné. Au laboratoire de diagnostic, une bactérie est déclarée résistante lorsque sa CMI est supérieure à une valeur seuil définie en fonction des concentrations sanguines communément atteintes lors de l'usage thérapeutique de l'antibiotique testé (Jeffrey, 2008). Ces données ne fournissent cependant pas d'information sur l'évolution temporelle de la mortalité des bactéries associée à l'usage de l'antibiotique. En effet, l'activité bactéricide peut être quantifiée en fonction du temps et de la concentration, ce qui permet de déterminer si l'isolat bactérien est réellement éradiqué ou bien s'il recommence à proliférer au cours de l'exposition à l'antibiotique testé. Lorsque l'on rapporte ce phénomène sur un graphique, on constate que pour tous les antibiotiques, la vitesse de la bactéricidie  $V_{\text{BACT}}$  augmente de façon sigmoïde avec une augmentation de la dose et que cette vitesse atteint inévitablement une limite (Mattie, 2000). Il existe une classification arbitraire de cette relation. On parle alors d'antibiotiques « concentration-dépendants » ou « temps-dépendants » en fonction du profil obtenu (Figure 6).

**Figure 6 : Profils de la vitesse de bactéricidie en fonction de la concentration pour des antibiotiques concentration-dépendants et temps-dépendants**



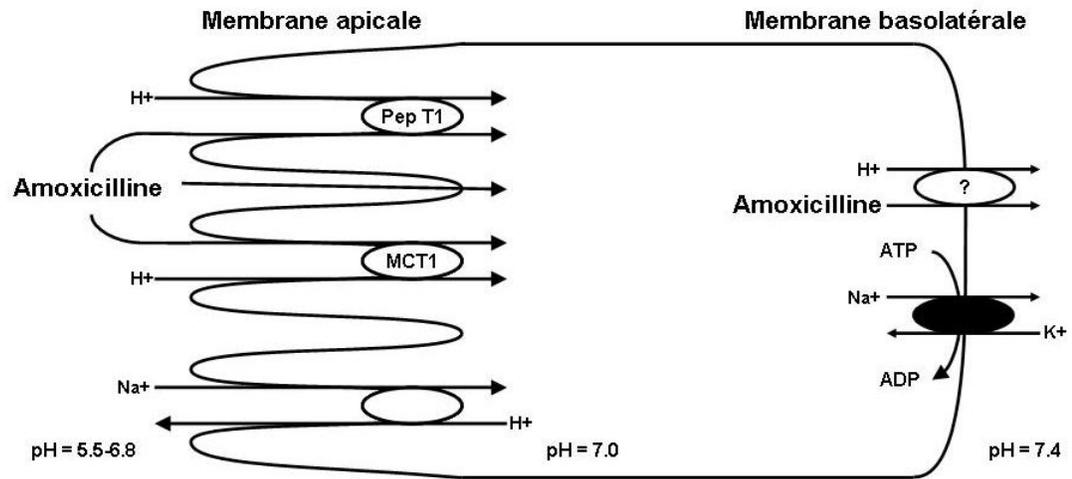
Le premier est caractérisé par une vitesse de bactéricide qui augmente progressivement à l'intérieur d'une vaste plage de concentrations (Craig, 1998). Le second, que l'on peut aussi qualifier de « concentration-indépendant », se caractérise par une vitesse de bactéricidie qui sature à de faibles multiples de la CMI, soit 4 ou 5 (Craig, 1998). Une fois cette saturation atteinte, une augmentation de la concentration n'aura qu'un effet marginal sur la vitesse et l'ampleur de l'élimination de la bactérie (Craig, 1998). Dans le cas de l'amoxicilline, certains auteurs rapportent une bactéricide de type « temps-dépendante » (Tanigawa et Sawada, 2003), tandis que d'autres rapportent une activité « concentration-dépendante » durant les 3 premières heures d'exposition suivie d'une phase de bactériopause chez un modèle murin d'infection à *Streptococcus pneumoniae* (Azoualy-Dupuis *et al.*, 1996).

### 1.3.3 Pharmacocinétique de l'amoxicilline

#### 1.3.3.1 Absorption orale

L'absorption orale d'un antibiotique peut s'effectuer sous l'action de différents mécanismes dont l'implication est dépendante de ses caractéristiques physico-chimiques (Lipinski *et al.*, 2001). Des études cliniques portant sur l'absorption orale de l'amoxicilline chez l'homme ont notamment permis d'observer que l'absorption de celle-ci dans le tube digestif se limitait au niveau du petit intestin selon l'ordre d'importance suivant : duodénum > jéjunum > iléon (Barr *et al.* 1994). L'implication d'une absorption par diffusion passive (Penzotti et Poole, 1974), par transport actif (Tsuji, 1995) ou la somme des deux modes de transport (Anfossi *et al.*, 2002) pour ce type d'antibiotique ne fait pas l'unanimité dans la littérature. Les conditions variables dans lesquelles ces études sont effectuées, de même que les espèces impliquées pourraient expliquer ce manque de consensus (Tsuji, 1995). La figure 7 illustre ci-dessous le modèle hypothétique de l'absorption de l'amoxicilline qui est décrit dans la présente section.

Figure 7: Modèle hypothétique de l'absorption de l'amoxicilline par les entérocytes de l'intestin grêle



Adapté de Tsuji (1995)

### ***1.3.3.1.1 Diffusion passive***

L'absorption orale d'un médicament par voie de transport passif se produit à la faveur d'un gradient de concentration, de la lumière intestinale vers le cytoplasme des cellules épithéliales, sans qu'aucune dépense d'énergie ne soit faite de la part de la cellule (Rowland et Tozer, 2006). Les substances lipophiles ayant un faible poids moléculaire traversent facilement les membranes lipidiques des cellules et sont donc absorbées plus efficacement. Lipinski *et al.* (2001) ont élaboré une règle prédictive d'une faible absorption systémique de molécules médicinales. Selon cette dernière, toute molécule ayant plus de 5 liens donneurs de protons  $H^+$ , plus de 10 liens H accepteurs d'électrons, une masse moléculaire supérieure à 500 g/mol, une valeur de log-P supérieure à 5 et n'étant pas un substrat d'un transporteur biologique franchirait difficilement les membranes biologiques. Il est à noter qu'une molécule avec une valeur de log-P élevée aura tendance à se concentrer dans les lipides de la membrane plutôt que de traverser cette dernière.

Tel que détaillé aux sections 1.2.1 à 1.2.3 du ce mémoire, la diffusion de l'amoxicilline ne devrait pas être entravée de façon majeure si la règle de Lipinski s'avère vraie (Lipinski, 2001). En effet, l'amoxicilline possède deux groupements donneurs de protons, un groupement receveur de protons et une masse moléculaire de 365,4 g/mol. De plus, le point isoélectrique de l'amoxicilline est dans l'intervalle de pH immédiat à la bordure apicale des entérocytes de l'intestin grêle (entre 5,5 et 6,8). Par conséquent, les molécules d'antibiotique se trouveront principalement sous sa

forme neutre, laquelle est plus liposoluble et susceptible de traverser les membranes cellulaires. Bien que l'implication de cette voie de transport lors de l'absorption orale de l'amoxicilline semble à première vue très probable, certains chercheurs suggèrent que son absorption active prédominerait sur la diffusion passive (Oh, 1992).

#### **1.3.3.1.2 Diffusion facilitée**

Un autre mécanisme de transport susceptible d'intervenir dans l'absorption de l'amoxicilline est l'absorption par diffusion facilitée. Comme pour la diffusion passive, le transfert de molécules s'effectue selon un gradient de concentration mais, à la différence de ce dernier, il emprunte des protéines de transport dont l'activité ne requiert aucune dépense d'énergie métabolique de la part de la cellule (Nelson et Cox, 2008). Ces protéines peuvent se présenter sous deux formes : des transporteurs et des canaux ioniques. Les premiers changent de conformation tridimensionnelle pour permettre le passage transmembranaire des molécules alors que les seconds demeurent inaltérés.

Le diffusion facilitée des  $\beta$ -lactamines s'effectue à la membrane basolatérale des entérocytes, ce qui a été mis en évidence par des expériences employant des cellules intestinales humaines (Inui, *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1994; Terada *et al.*, 1999). Parmi ces études, Terada *et al.* (1999) ont déduit le phénomène en examinant le transport de ces antibiotiques dans des conditions inhibitrices du transport actif et du transport proton dépendant de la membrane apicale, ce qui a été vérifié à l'aide du dipeptide témoin glycyl-sarcosine (voir section 1.3.3.1.3.1). Il a

notamment été observé que le transport des molécules à ce niveau était moins sensible au pH que celui à travers la paroi apicale (Terada *et al.*, 1999).

#### ***1.3.3.1.3 Transport actif***

Le transport actif de molécules se traduit par le déplacement de celles-ci à l'encontre d'un gradient, par exemple d'une région où la concentration est faible vers une autre région où la concentration est plus élevée et ce au prix d'une dépense énergétique cellulaire (Rowland et Tozer, 2006). L'implication d'un tel système de transport actif pour l'absorption orale des  $\beta$ -lactamines fut rapportée en premier par Quay (1972), ce qui pava la voie à d'autres recherches *in vitro* et *in vivo* qui ont confirmé ce phénomène. (Oh *et al.*, 1993; Tsuji, 1995). Des études de compétition entre différentes  $\beta$ -lactamines et des petits peptides, déjà reconnus pour être absorbés activement par le transporteur des oligopeptides (PepT1), ont permis d'observer des interférences mutuelles pour l'absorption orale, ce qui a permis de conclure qu'ils étaient absorbés par la même voie (Nakashima *et al.*, 1984; Sinko et Amidon, 1988; Sinko et Amidon, 1989). Similairement, les  $\beta$ -lactamines diminuent de façon significative l'absorption de l'acide acétique, qui est absorbé activement par le transporteur des acides monocarboxyliques (MCT1). Ce dernier est différent du transporteur des dipeptides et tripeptides (Tsuji *et al.*, 1993), dont il sera question à la section 1.2.2.1.3.2 de ce mémoire. Il apparaît donc évident que l'amoxicilline est

susceptible d'être absorbée à la fois par une voie active et une voie passive (Amidon et Lee, 1994, Tsuji, 1995).

#### **1.3.3.1.3.1 Transport apical des peptides**

Le transporteur PepT1 fait partie de la famille des transporteurs d'oligopeptides proton-dépendants. Identifié au début des années 1980, (Ganapathy, 1981; Ganapathy et Leibach, 1982), il est responsable de l'absorption intestinale des peptides d'origine alimentaire. L'importance de cette voie de transport dans l'absorption des protéines des aliments a depuis été largement démontrée (Leibach et Ganapathy, 1996), de même que dans l'absorption orale de divers médicaments peptidomimétiques, entre les  $\beta$ -lactamines (Brodin *et al.*, 2002; Luckner et Brandsch, 2005; Sala-Rabanal *et al.*, 2006).

La présence du transporteur PepT1 a été rapportée chez l'homme et plusieurs autres mammifères monogastriques (lapin, porc et rat), de même que chez des mammifères polygastrique comme la vache et le mouton (Freeman *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Ogihara *et al.*, 1999). Chez le porc, l'ARN messenger (ARNm) de PepT1 à été détecté dans les trois segments de l'intestin grêle mais pas dans le rein, le foie, l'estomac, le caecum le colon et le muscle strié (Chen *et al.* 1999). Par contre, on rapporte la présence du transporteur au niveau du segment S1 du tubule contourné proximal du néphron chez le rat (Shen *et al.*, 1999), ainsi que dans les cellules épithéliales du canal biliaire chez l'homme (Knütter *et al.*, 2002).

L'expression de l'ARNm de PepT1 mesurée au niveau du tube digestif est plus importante dans le jéjunum, suivi du duodénum et finalement de l'iléon (Boll *et al.*, 1994, Freeman *et al.*;1995, Klang *et al.*, 2005), ce qui concorde avec les vitesses d'absorption rapportées à la section 1.3.3.1. Au niveau cellulaire, PepT1 se situe sur la bordure en brosse à l'apex des entérocytes. Absents des cryptes, leur nombre augmente à mesure que l'on se dirige vers le sommet des vilosités (Ogihara *et al.*, 1996; Ogihara *et al.*, 1999; Groneberg *et al.*, 2001) et suivrait donc la migration des cellules vers le sommet.

L'expression de ce transporteur le long du tube digestif varie selon les conditions physiologiques et d'élevage de l'animal (Naruhashi *et al.*, 2002, Erickson *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 2005). Par exemple, une mise à jeun augmente significativement la quantité de PepT1 dans la partie proximale et médiale du petit intestin, ce qui pourrait améliorer l'absorption des oligopeptides en période de carence (Naruhashi *et al.*, 2002). Une augmentation de la teneur protéique de la diète aurait pour effet d'induire l'expression du transporteur (Erickson *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2005). D'autres facteurs tels le stade de développement de l'animal (Hussain *et al.*, 2002), le rythme circadien (Pan *et al.*, 2002) et certaines hormones telles l'insuline et la leptine (Terada et Inui, 2004) auraient eux aussi un effet sur la régulation de PepT1.

Tel qu'illustré à la figure 9, le transporteur PepT1 utilise le gradient d'ions  $H^+$  entre la lumière intestinale (où le pH se situe entre 5,5 et 6,0) et l'intérieur des

entérocytes (où le pH est plutôt de 7,0). Ce gradient est entretenu par l'échangeur proton-sodium situé à l'apex de l'entérocyte. La pompe sodium-potassium ATP-ase vient rétablir le gradient sodium intracellulaire (Tsuji, 1995).

Malgré une spécificité de ligand relativement faible, certains éléments structurels semblent toutefois jouer un rôle dans l'absorption par PepT1. Ainsi, en ce qui concerne la stéréo-isométrie, une plus forte affinité est observée pour les énantiomères avec orientation « *levo* » (Lister *et al.*, 1995, Wenzel *et al.*, 1995). En ce qui concerne le groupement terminal amine, certains auteurs rapportent une diminution de l'absorption causée par l'absence ou la modification de ce groupement (Matthews, 1992; Brandsch *et al.*, 2004), alors que d'autres n'ont trouvé aucun impact, (Oh *et al.*, 1993). Pour le groupement carboxylique, une substitution de celui-ci se traduit par une réduction de l'affinité mais dans une moindre mesure que pour le groupement amine terminal décrit ci haut (Hidalgo *et al.*, et al, 1995). L'équipe de Temple (1998) a pour sa part observé que le lien peptidique n'était pas nécessaire à l'absorption par PepT1; en effet, l'acide 4-aminophénylacétique est bien absorbée malgré l'absence de lien peptidique dans sa structure moléculaires qui s'apparente à celle du dipeptide D-Phe-L-Ala mais ne contient pas de lien peptidique. En ce qui concerne la taille du substrat, il semble maintenant établi que le poids moléculaire ne soit pas un facteur limitant, mais l'absorption se limite aux di-tripeptides (Brandsch *et al.*, 2004).

### 1.3.3.1.3.2 Transporteur apical des acides monocarboxyliques

Le transporteur des acides monocarboxyliques (Monocarboxylate transporter 1, MCT1) est responsable de l'absorption des acides par les segments proximaux de l'intestin, entre autres l'acide lactique et l'acide acétique ainsi que les acides gras volatiles issus de la fermentation bactérienne des hydrates de carbone du tube digestif. Plusieurs études ont toutefois démontré que les substrats de MCT1 pouvaient s'étendre au-delà des acides monocarboxyliques endogènes et que nombre d'antibiotiques dont des pénicillines (Kang *et al.*, 1990), des céphalosporines (Tsuji *et al.*, 1993) et d'autres  $\beta$ -lactamines (Tsuji, 1995, Tsuji *et al.*, 1996) pouvaient emprunter cette voie. Chez le porc, MCT1 est une protéine de 55 kDa comportant 12 domaines transmembranaires sur laquelle est greffée, entre les domaines 8 et 9, du côté extracellulaire, la protéine CD147 qui régule son expression et son fonctionnement (Enerson et Drewes, 2003).

Peu d'information est disponible en ce qui à trait aux facteurs pouvant affecter son expression le long du tube digestif. Cependant, on rapporte chez l'homme une diminution du nombre de transporteurs dans les tissus cancéreux comparativement à des tissus sains (Ritzhaupt *et al.*, 1998).

La présence de MCT1 est rapportée dans nombre d'organes chez les mammifères notamment au niveau des érythrocytes, du cœur, des poumons, du cerveau, des reins et du tube digestif. Chez le porc, MCT1 est présent sur toute la longueur de l'intestin (Sepponen *et al.*, 2007), mais son expression serait toutefois

supérieure dans sa partie distale où la synthèse bactérienne d'acides gras volatiles est plus importante. Des études immunohistochimiques ont permis de localiser le transporteur principalement sur la face basolatérale des entérocytes et plus rarement sur la bordure en brosse (Tamai, *et al.*, 1999). Sur la face apicale, leur nombre est plus élevé au niveau des cryptes et diminue à mesure que l'on se dirige vers l'extrémité des villosités.

MCT1 est un cotransporteur proton-dépendant qui tire son énergie du gradient d'ion  $H^+$  de chaque côté de la membrane. Tout d'abord l'ion hydrogène vient se lier au transporteur. Par la suite le substrat vient se lier au transporteur protoné et être relâché de l'autre côté de la membrane épithéliale vers le milieu intra cellulaire et par la suite vers la circulation sanguine après avoir franchi la membrane basolatérale (De Bruijne *et al.*, 1983).

Le transporteur MCT1 présente une plus grande affinité pour les énantiomères *levo* (L). La présence d'un groupement carboxylique est essentielle au substrat pour emprunter cette voie.

#### ***1.3.3.1.4 Biodisponibilité***

La biodisponibilité (F) quantifie la proportion d'un médicament qui est absorbée et atteint la circulation sanguine générale, et qui devient par conséquent disponible pour produire un effet systémique (Toutain et Bousquet-Mélou, 2004). Chez le porc, les valeurs de biodisponibilité orale de l'amoxicilline rapportées dans la

littérature sont très variables et ne dépassent généralement pas 40% (Tableau 1) alors que chez l'homme elles peuvent dépasser les 90% (Thummel, *et al.*, 2005). Il a été démontré que la présence d'aliment pouvait réduire de façon significative l'absorption de l'amoxicilline chez l'homme (Welling *et al.*, 1977) de même que chez le porc (del Castillo, 1996). Chez cette espèce, l'administration orale instantanée d'une dose de 15mg/kg d'amoxicilline, immédiatement après un repas se traduit par une diminution de 13% de F par rapport à la même dose servie chez des individus mis à jeun depuis la veille (del Castillo, *et al.*, 1998). Par contre, Agersø et Friis (1998) n'ont pas observé de variation de F suite à l'administration *per os* de 10mg/kg d'amoxicilline conjointement à un repas chez des porcs préalablement mis à jeun pendant 17h et d'autres nourris 30 minutes après avoir reçu la même dose. Cette divergence peut s'expliquer d'une part par l'intervalle entre le repas et l'administration de la dose, Watson *et al.* (1987) ont observé qu'une mise à jeun minimale d'une heure avant et après l'administration orale de pénicilline V était nécessaire afin de minimiser l'interaction de la pénicilline et de l'aliment. D'autre part le volume d'eau employé comme véhicule d'administration de l'antibiotique peut être en cause. Welling *et al.* (1977) ont observé chez des humains adultes que la réduction d'un facteur 10 du volume d'eau employé pour l'ingestion orale d'amoxicilline à jeun diminuait de 50% sa biodisponibilité orale. Or, del Castillo *et al.* (1998) ont administré l'amoxicilline dans 20 mL d'eau alors que Agersø et Friis l'ont administrée dans un volume de 50 mL d'eau. Le tableau I, illustre différentes valeurs de la biodisponibilité orale de l'amoxicilline rapportées chez le porc.

**Tableau I : Valeurs de biodisponibilité orale absolue de l'amoxicilline provenant d'études avec comité de lecture.**

Études	F (%)
Agersø <i>et al.</i> (1998)	28,0
Agersø et Friis (1998)	33,0
del Castillo <i>et al.</i> (1998)	35,7
Martínez Larrañaga <i>et al.</i> (2004)	42,0
Reyns <i>et al.</i> (2007)	22,8

### 1.3.3.2 Mise à disposition

#### 1.3.3.2.1 Distribution dans l'organisme

La distribution d'un antibiotique dans l'organisme est le processus de transfert réversible de ce dernier entre la circulation systémique et les tissus (Rowland et Tozer, 2006).

L'étendue de la distribution du médicament dans l'organisme est estimée par le volume de distribution. Ce volume est défini comme le ratio entre la quantité de médicament présente dans l'organisme à un temps donné et sa concentration plasmatique au même instant (Toutain et Bousquet-Mélou, 2004). On illustre souvent le volume de distribution comme étant celui dans lequel le médicament se dissout pour obtenir la concentration plasmatique mesurée, mais il est important de

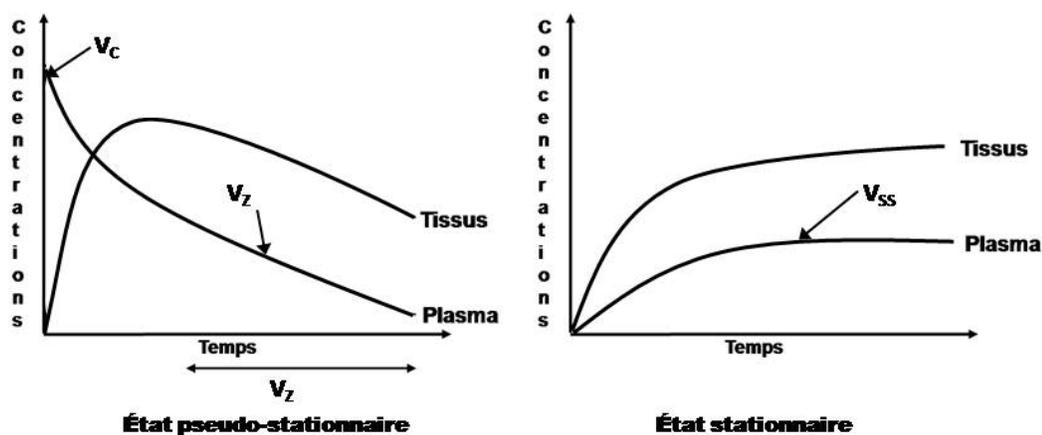
mentionner que ce volume n'a aucune correspondance physiologique réelle. Mathématiquement, ceci peut être représenté par l'équation 3.

### Équation 3 : Définition formelle du volume de distribution

$$V_d = \frac{\text{Qté de médicament dans l'organisme au temps } t}{\text{Concentration plasmatique du médicament au temps } t}$$

L'équation 3 démontre que le volume de distribution ( $V_d$ ) est une fonction du temps ( $t$ ). Ce dernier n'aura donc pas la même signification selon le moment auquel il est déterminé par rapport au temps d'administration de la molécule dans le système pharmacocinétique. De ce fait, trois différents volumes de distribution peuvent être calculés (Figure 8).

**Figure 8 : Phases du profil pharmacocinétique associées aux différentes estimations du volume de distribution.**



Source : Toutain et Bousquet-Mélou, 2004

Le volume de distribution initial ( $V_C$ ) est déterminé au temps  $t=0$  d'une administration intraveineuse, c'est-à-dire avant que les processus de distribution et d'élimination n'entrent en jeu et où le gradient de concentration est maximal entre le site d'administration et les espaces de distribution. Impossible à mesurer en pratique, il peut être obtenu à partir de la dose et de l'extrapolation de la concentration plasmatique au temps 0 (Tableau I).

**Tableau II : Formules du calcul du volume de distribution et leurs principales caractéristiques.**

Paramètre	Formule	Caractéristiques
$V_C$	$V_C = Dose / C_0$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesuré à partir du moment de l'administration de la dose</li> <li>• Volume du compartiment à partir duquel le médicament est éliminé</li> </ul>
$V_Z$	$V_Z = \frac{Dose}{AUC_{(0-\infty)}} \times \frac{1}{\lambda_z}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déterminé dans un état de pseudo-équilibre</li> <li>• La fraction de médicament qui atteint la circulation systémique est connue</li> <li>• Calculé à partir de la phase terminale du profil des concentrations plasmatiques</li> </ul>
$V_{SS}$	$V_{SS} = Dose_{v.} \times AUMC / (AUC)^2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indépendant du processus d'élimination</li> <li>• Permet le calcul de la dose de charge</li> </ul>

Dès le moment de son administration, le médicament subit simultanément des phénomènes de distribution et d'élimination. Le gradient de concentration entre le milieu intra-vasculaire et extravasculaire favorise le déplacement du médicament de l'espace d'administration vers le reste du système pharmacocinétique en comparaison

avec le processus d'élimination. Ceci se traduit par une chute rapide des concentrations plasmatiques du médicament, ce qui se nomme phase de distribution. Peu à peu, ce gradient de concentration s'annule et atteint un état de pseudo-équilibre. Ceci se traduit par un ralentissement de la chute des concentrations plasmatiques, segment connu sous le nom de phase d'élimination. Durant cette dernière phase, le volume de distribution est calculé par  $V_Z$  (Équation 4).

**Équation 4 : Définition mathématique du volume de distribution en phase de pseudo-équilibre**

$$V_Z = \frac{\text{Qté de médicament dans le corps en phase de pseudo - équilibre}}{\text{Concentration plasmatique en phase de pseudo - équilibre}}$$

Le troisième volume de distribution est dit à l'équilibre ( $V_{SS}$ ) et s'observe lors d'une perfusion intraveineuse du médicament. Il s'agit là d'un véritable état d'équilibre où le gradient de transfert entre les différents espaces du système pharmacocinétique est nul et la perte de médicament causée par le processus d'élimination est comblée par la perfusion à un débit constant. Ce volume de distribution à l'équilibre ( $V_{SS}$ ) est calculé avec l'équation 5 et il est le seul estimateur non biaisé de l'étendue de la distribution du médicament car contrairement à  $V_Z$  et  $V_c$  il n'est pas influencé par les processus d'absorption, de distribution et d'élimination.

**Équation 5 : Définition mathématique du volume de distribution à l'état d'équilibre**

$$V_{SS} = \frac{\text{Qté de médicament dans le corps à l'état d'équilibre}}{\text{Concentration plasmatique à l'état d'équilibre}}$$

On peut aussi estimer  $V_{SS}$  suite à l'administration intraveineuse instantanée du médicament en employant l'analyse pharmacocinétique par moments statistiques (section 1.4.2). Dans ce cas, il sera déduit à partir de l'équation 6 où  $MRT$  représente le temps moyen de séjour des molécules ayant atteint l'intérieur d'un organisme et  $Cl$  représente la clairance (Shargel *et al.*, 2004).

**Équation 6 : Calcul du volume de distribution à l'état d'équilibre selon la méthode d'analyse par moments statistiques des données**

$$MRT = \frac{V_{SS}}{Cl}$$

Chez le porc, les valeurs de  $V_{SS}$  observées pour l'amoxicilline sont relativement faibles (Tableau III), ce qui signifie que pour une même quantité présente dans l'organisme, la concentration plasmatique sera très élevée. Ces différents estimés de  $V_{SS}$  sont relativement similaires d'une étude à l'autre à l'exception des résultats de Martínez Larrañaga *et al.* (2004). Ces derniers auteurs n'ont pas expliqué les raisons de cette divergence.

**Tableau III : Valeurs du volume de distribution de l'amoxicilline à l'état d'équilibre tiré de différentes études effectuées chez le porc**

Études	Méthode d'analyse	$V_{SS}$ (L/kg)
Lashev (1986)	C	0,37
Agersø <i>et al.</i> (1998)	NC	0,63
Agersø et Friis (1998)	NC	0,55
del Castillo <i>et al.</i> (1998)	C	0,45
Martínez Larrañaga <i>et al.</i> (2004)	C	1,35
Reyns <i>et al.</i> (2007)	NC	0,34

NC : Analyse non compartimentale      C : Analyse compartimentale

### 1.3.3.2.2 Élimination de l'antibiotique

L'élimination est le processus de transfert irréversible du médicament du site de mesure, généralement le plasma, vers l'extérieur du système pharmacocinétique étudié (Rowland et Tozer, 2006). Elle peut s'effectuer de deux façons, soit par excrétion ou par métabolisme, qui peuvent se produire simultanément ou exclusivement. L'excrétion est l'élimination de la molécule sous la même forme à laquelle elle a été administrée (Shargel *et al.*, 2004). Le métabolisme est l'élimination par un processus enzymatique qui transformera chimiquement le médicament pour en faire une substance qui, dans la majorité des cas pourra être excrétée plus facilement (Riddick, 1998).

Les organes responsables de l'élimination d'un médicament sont qualifiés d'organes émonctoires, les plus importants étant les reins et le foie. La peau, les poumons et l'intestin sont d'autres voies possibles d'élimination des médicaments (Rowland et Tozer, 2006). La concentration sanguine du médicament sera donc plus élevée à

l'entrée de ces organes (concentration artérielle) qu'à leur sortie (concentration veineuse), preuve de la disparition de la molécule de la circulation sanguine. L'ampleur de cette disparition lors du passage à travers un organe émonctoire  $x$  est déterminée par son coefficient d'extraction ( $E_x$ ) et peut être calculée par une approche de conservation de la masse (Équation 7).

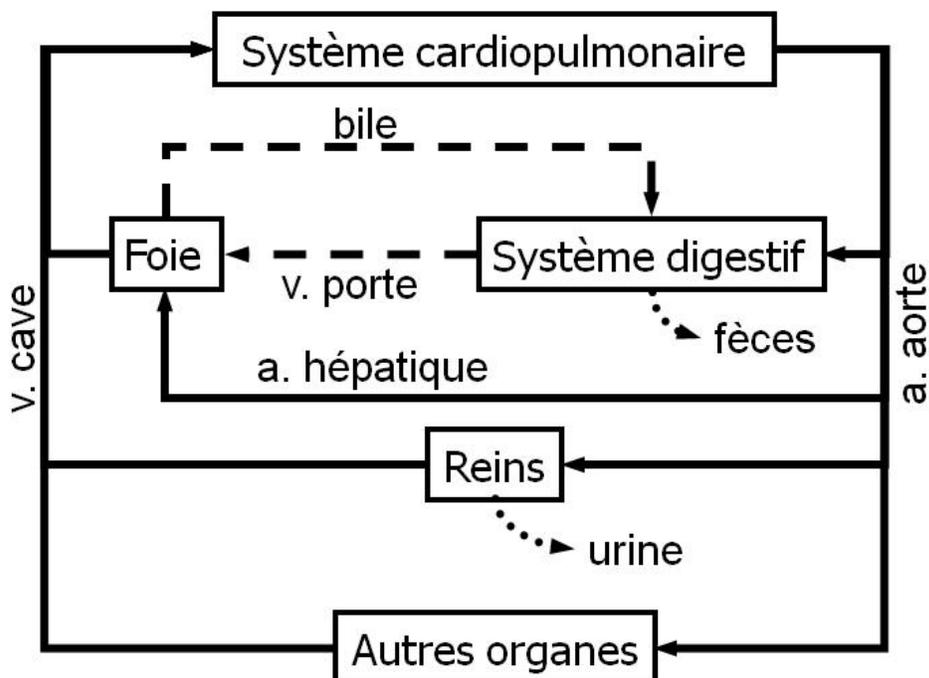
**Équation 7 : Calcul du coefficient d'extraction d'un organe  $x$**

$$E_x = \frac{\text{concentration artérielle} - \text{concentration veineuse}}{\text{concentration artérielle}}$$

L'amoxicilline est principalement excrétée au niveau du rein en empruntant les mécanismes de sécrétion tubulaire (Bryskier, 1999). Son excrétion dans la bile a aussi été démontrée chez l'homme et la souris (Mizen et al, 1995, Maugdal et Maxwell, 1982). Mizen et son équipe ont à ce sujet observé une augmentation de la clairance hépatique lors du passage de la concentration d'un perfusé de 100 µg d'amoxicilline à 500 µg/mL, pour par la suite voir la clairance plafonner jusqu'à la dose de 2000 µg/mL. Chez le porc, Martínez Larrañaga postule que l'amoxicilline est excrétée dans la bile, sans avoir de support expérimental pour le démontrer (Martínez Larrañaga *et al.*, 2004). À notre connaissance, on ne rapporte aucune autre voie d'élimination pour l'amoxicilline (CPS, 2007). Par ailleurs, on rapporte qu'il existe une dégradation pré-systémique de cet antibiotique lorsqu'il est administré par voie orale, qui résulterait de son hydrolyse par la flore bactérienne intestinale (Chesa-Jiménez *et al.*, 1994). La figure 9 schématise les différentes voies d'absorption, distribution et d'élimination de

l'amoxicilline chez le porc : il est à noter que l'élimination biliaire, fécale et urinaire y sont représentées.

**Figure 9 : Schéma physiologique de la pharmacocinétique de l'amoxicilline chez le porc**



..... Voies d'élimination      - - Recirculation entérohépatique

La clairance est le paramètre pharmacocinétique qui permet d'évaluer l'aptitude d'un organisme vivant à éliminer un médicament. Cette mesure correspond à la constante de proportionnalité qui relie la vitesse à laquelle la substance administrée est éliminée au site de mesure ( $dX/d_t$ ) à la concentration en circulation au même instant ( $C_p^{-1}$ ) (Équation 8; Toutain et Bousquet-Mélou, 2004).

**Équation 8 : Équation de la définition formelle de la clairance**

$$CL = dX / dt \times Cp^{-1}$$

Ce phénomène peut aussi être formalisé par l'équation 9 où la clairance d'un organe émonctoire  $x$  ( $CL_x$ ) est égale au produit du débit sanguin irrigant artériel qui perfuse cet organe ( $Q_x$ ) et du coefficient d'extraction de l'antibiotique par ce dernier ( $E_x$ ).

**Équation 9 : Formule de calcul de la clairance d'un organe émonctoire (x)**

$$CL_x = Q_x \cdot E_x$$

Dans tous les cas, la clairance totale d'une substance est le résultat de l'addition des clairances associées aux différentes voies d'élimination (Rowland et Tozer, 2006). Pour l'amoxicilline, elle serait le résultat de l'activité conjointe des reins et du foie (Équation 10). Il est important de spécifier que la clairance hépatique est le résultat de la somme des phénomènes de clairance métabolique ( $CL_M$ ) et biliaire ( $CL_B$ ) (Équation 11).

**Équation 10 : Principe d'additivité des clairances pour l'amoxicilline**

$$CL_T = CL_H + CL_R$$

**Équation 11 : Principe d'additivité des clairances au niveau hépatique**

$$CL_H = CL_M + CL_B$$

Le tableau IV présente les valeurs publiées de clairance totale de l'amoxicilline chez le porc qui varient entre 0,3 et 0,6 L/(h·kg). On peut déduire de ces valeurs que l'efficacité d'élimination de cet antibiotique chez cet animal est moyenne en comparaison à la somme des débits sanguins artériels perfusant ces organes émonctoires. (Toutain et Bousquet-Mélou, 2004). Il est possible d'arriver au même constat pour ce qui est de l'extraction de l'antibiotique par les organes émonctoires, en vertu des critères proposés par Toutain *et al.* (2004).

**Tableau IV : Valeurs de clairance totale (CL<sub>T</sub>) de l'amoxicilline tirées de différentes études effectuées chez le porc et estimation du coefficient d'extraction (E) associé à chacun.**

Études	CL <sub>T</sub> (L/(h·kg))	E (%)
Lashev (1986)	0,61	13,6
Agerso et Friis (1998a)	0,52	11,6
del Castillo <i>et al.</i> (1998)	0,55	12,3
Martínez Larrañaga <i>et al.</i> (2004)	0,30	6,7
Reyns, <i>et al.</i> (2007)	0,58	12,8

### **1.3.4 Accumulation du médicament au site d'action et facteurs de variabilité**

L'antibiotique doit atteindre le site d'action, s'y accumuler et y persister assez longtemps pour y produire les effets thérapeutiques désirés (Rowland et Tozer, 1996). Ce phénomène est modulé par les caractéristiques du schéma posologique mis en place, soit la dose, la voie d'administration, la fréquence et la durée de l'administration ainsi que les conditions d'administration du médicament.

Pour illustrer l'impact du schéma posologique chez le porc, les études d'Amass *et al.* (1996) et de del Castillo *et al.* (1998) peuvent être comparées. L'équipe d'Amass a tenté d'éliminer le portage de *Streptococcus suis* au niveau des amygdales, réservoir de la bactérie chez le porc, avec des injections d'ampicilline, une aminopénicilline dont l'activité bactéricide est pratiquement identique à celle de l'amoxicilline (Schwarz *et al.*, 2008). L'administration orale, intranasale, ou intramusculaire d'une dose de 5,68 mg/kg à 24 heures d'intervalle s'est avérée inefficace car ces schémas posologiques n'ont pas été ajustés à la clairance systémique, la biodisponibilité et à la CMI de l'antibiotique envers la bactérie ciblée. À l'opposé, l'équipe de del Castillo a produit des simulations mathématiques permettant de déduire qu'une diminution marquée des comptes viables de *Streptococcus suis* peut être obtenue suite à l'administration d'une dose quotidienne de 15 mg/kg distribuée sur une période de 5 h. Cependant, la même dose distribuée sur une période de 24 heures ne permettrait pas d'obtenir des concentrations suffisamment élevées pour obtenir un effet bactéricide.

#### 1.4 **Analyse pharmacocinétique de l'amoxicilline**

Depuis la découverte de l'amoxicilline, nombre d'études portant sur sa pharmacocinétique chez l'homme et chez différentes espèces animales ont été publiées. Ces études ont notamment employé deux approches analytiques distinctes, soit l'analyse compartimentale et l'analyse par moments statistiques.

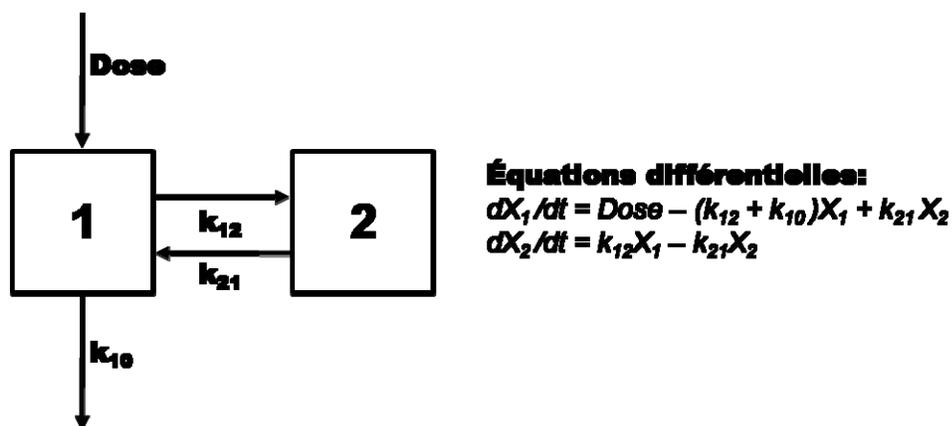
### 1.4.1 Analyse compartimentale des données

L'amoxicilline a fait l'objet d'analyses compartimentales par différents auteurs (Spyker *et al.*, 1977, Sjöval *et al.* 1978, Sjöval *et al.*, 1985, del Castillo *et al.*, 1998, Martínez Larrañaga *et al.*, 2004). Un système pharmacocinétique compartimental est composé d'un ensemble d'espaces que l'on nomme compartiments, qui correspond à un ensemble de molécules qui se comportent uniformément, c'est-à-dire qu'elles sont soumises aux mêmes fonctions de probabilités qui régissent leur transit identique vers les compartiments adjacents, et vers le système compartimental (Jacquez, 1996).

Il existe deux types de modèles compartimentaux, les modèles de données et les modèles de processus. Dans le premier cas, la structure du système compartimental ne prend aucunement en compte les mécanismes physiologiques impliqués et son but premier est de fournir la description la plus précise possible des concentrations chez les animaux à l'étude. À l'opposé, les modèles de processus sont élaborés à partir des mécanismes physiologiques susceptibles d'intervenir dans la mise à disposition du médicament chez l'animal à l'étude (Jacquez, 1996). Leur but est de prédire l'évolution temporelle des concentrations quelque soit le schéma posologique employé et d'identifier les sources de variabilité. L'avantage de cette méthode d'analyse réside dans son utilisation à la fois simple et claire et du fait qu'elle permet de déterminer à tout instant la concentration de la molécule étudiée dans un compartiment donné (Jacquez, 1996).

L'analyse compartimentale repose sur deux hypothèses : le médicament se distribue de façon homogène dans un compartiment, et les organes et ou les tissus ayant des caractéristiques cinétiques similaires peuvent être regroupés en un même compartiment. Un exemple de schématisation d'un système compartimental est illustré à la figure 10.

**Figure 10 : Exemple de schématisation d'un système compartimental avec les équations différentielles associées à chaque compartiment**



Dans cet exemple, le compartiment 1 est le compartiment qualifié de «central», c'est-à-dire qu'il reçoit la dose administrée et c'est à partir de lui que le médicament est éliminé. Il regroupe le sang et les tissus dont les concentrations de médicaments s'équilibrent rapidement avec la concentration sanguine de celui-ci. Le compartiment 2 ou «périphérique» représente pour sa part un compartiment d'échanges où les molécules de médicament transitent de façon différente au compartiment central. Il peut regrouper les organes moins vascularisés ou ceux qui retiennent de façon plus longue le médicament. Un système compartimental peut

inclure plusieurs compartiments périphériques qui peuvent être reliés uniquement au compartiment central (système mammillaire) ou reliés entre eux (système caténaire). Le transit des molécules entre les compartiments est décrit par des constantes  $k_{12}$  et  $k_{21}$  ou encore par des fonctions plus complexes. La constante  $k_{10}$  décrit l'élimination du médicament qui dans ce cas-ci se réalise à partir du compartiment central. Les équations différentielles décrivent les vitesses instantanées de transfert et d'élimination du médicament et leur relation avec la quantité de médicament présente dans chacun des compartiments.

Les vitesses de transfert des molécules sont souvent des processus d'ordre 1 où les molécules quittent le compartiment avec une vitesse proportionnelle à la quantité de molécules qui y sont présentes (Shargel *et al.*, 2004). D'autres processus de transfert peuvent être observés : le transfert d'ordre 0 se caractérise par une vitesse constante, quelque soit le nombre de molécules présent dans le compartiment. Quant au processus de transfert de type Michaelis-Menten, il se caractérise par une vitesse de transit qui est variable, qui dépend à la fois du nombre de molécules présentes dans le compartiment et des sites de transport disponibles pour effectuer ce transport. Lorsque le nombre de transporteurs est en excès par rapport au nombre de molécules présentes dans le compartiment, la vitesse de transfert est d'ordre 1 alors que lorsque le nombre de molécules est en excès par rapport au nombre de transporteurs, la vitesse est d'ordre 0. Au fur et à mesure que la concentration de médicament présent dans le compartiment augmente, la vitesse augmente progressivement et passe d'un ordre 1 à un ordre 0.

Les systèmes de transport impliqués dans des transferts de type Michaelis-Menten ont une capacité limitée de transfert. Ils se caractérisent par leur affinité envers leurs différents substrats et la capacité de transport qui est essentiellement une fonction du nombre de transporteurs.

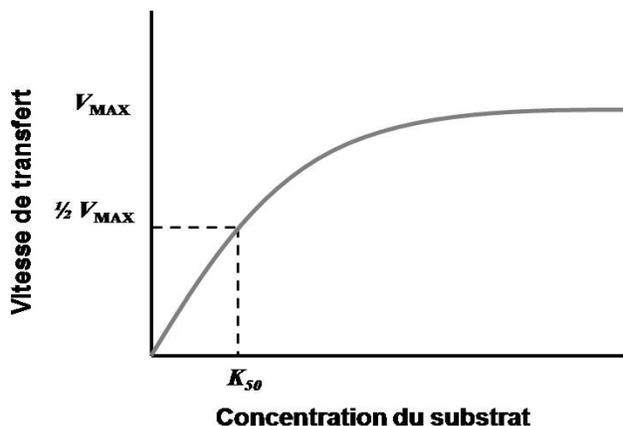
Deux paramètres servent à décrire ce phénomène :  $V_{MAX}$  est la vitesse maximale de transport du substrat et reflète la capacité du système, alors que  $K_{50}$ , qui est inversement proportionnelle à l'affinité du transporteur pour le substrat, est la concentration du substrat requise pour obtenir la moitié de cette vitesse maximale ( $V_{MAX}/2$ ). La vitesse d'absorption ( $V$ ) de molécules soumise à une telle absorption en fonction de leur concentration ( $[S]$ ) se traduit par l'équation 12.

**Équation 12 : Équation de la vitesse de transfert lors d'une cinétique d'absorption de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en substrat**

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_{50} + [S]}$$

L'évolution de cette vitesse en fonction de la concentration du substrat est illustrée à la figure 11. On y observe qu'en présence d'une faible concentration de substrat, la vitesse de transfert augmente de façon linéaire avec l'augmentation de la concentration, ce qui est typique d'une absorption d'ordre 1. À partir de  $K_{50}$ , cette augmentation n'est plus proportionnelle à l'augmentation de la dose et s'amenuise jusqu'à atteindre un plateau ( $V_{MAX}$ ) qui est synonyme d'une absorption d'ordre 0.

**Figure 11 : Vitesse de transport d'un substrat en fonction de sa concentration, qui caractérise une cinétique de transfert de type Michaelis-Menten**



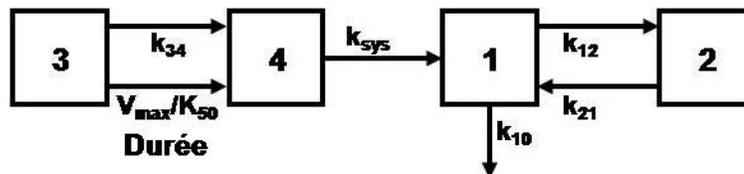
Chez les auteurs ayant opté pour une analyse compartimentale, l'utilisation de modèle à un (Sjövall, *et al.*, 1978, Torres-Molina *et al.*, 1992, del Castillo *et al.*, 1998) ou à deux compartiments de distribution (Spyker *et al.*, 1977, Piotrovskij, *et al.*, 1994, Martínez Larrañaga *et al.*, 2004) est rapportée pour caractériser la cinétique de l'antibiotique suite à son administration orale. Différents types d'absorption ont aussi été utilisés pour caractériser l'entrée de l'antibiotique dans le compartiment central. Dans de nombreux cas, les auteurs ont opté pour un processus d'absorption d'ordre 1 (Spyker *et al.*, 1977, del Castillo *et al.*, 1998, Martínez Larrañaga *et al.*, 2004). Par contre, Paintaud et son équipe (1992) rapportent que ni l'absorption d'ordre 1 ni celle d'ordre 0 permettent de prédire l'augmentation de la concentration plasmatique suite à une administration orale d'amoxicilline chez l'homme à des doses de 500 et 3000 mg.

Chez l'homme, Paintaud *et al.*, (1992), des doses de 500 et 3000 mg d'amoxicilline ont été administrées par voie orale chez 6 individus suite à une mise à jeun de 8 heures qui s'est poursuivie durant 3 heures suite à l'administration de l'antibiotique. Ces derniers ont pour leur part utilisé un modèle à un compartiment de distribution pour caractériser la pharmacocinétique orale. Ils ont aussi tenté de vérifier quel type cinétique (ordre 1 ou ordre 0) caractérisait le mieux la phase d'absorption orale aux doses administrées. À 500 mg, alors que l'absorption d'ordre 0 caractérisait le mieux la phase d'absorption chez la moitié des individus, l'absorption d'ordre 1 était mieux adaptée chez deux individus et aucune des deux n'était adaptée aux profils d'absorption du sixième individu. Cette incapacité à modéliser la phase d'absorption à l'aide d'une entrée d'ordre 0 ou 1 a été observée chez quatre des six mêmes individus lorsque ces derniers ont reçu une dose de 3000 mg. Bien que ces auteurs n'aient pas observé de saturation de la phase d'absorption aux doses administrées, l'implication simultanée de deux mécanismes d'absorption (système de transport spécialisé de type Michaelis-Menten et diffusion passive) dans l'absorption de l'amoxicilline est la plus plausible pour expliquer les résultats. Selon eux, à faible dose, l'absorption de type Michaelis-Menten serait prédominante alors qu'à une dose plus élevée, c'est plutôt l'absorption d'ordre 1 qui gagnerait en importance. Cette hypothèse est compatible avec les mécanismes d'absorption décrit plus haut. On ne rapporte aucun impact de la dose d'antibiotique sur l'élimination de ce dernier dans l'urine alors que la demi-vie d'élimination est demeurée inchangée.

D'autres auteurs ont réussi à caractériser l'absorption orale de l'amoxicilline à l'aide de modèles impliquant une somme d'absorptions d'ordre 1 et d'ordre 0. Par exemple, Torres-Molina *et al.* (1992) ont utilisé un modèle où l'absorption orale de l'amoxicilline chez le rat s'effectue selon un processus d'ordre 1 jusqu'à l'atteinte d'un temps « t » suivant l'administration, après lequel l'absorption devient d'ordre 0. Tsuji *et al.* (1977) ont pour leur part observé chez le rat, suite à l'administration d'amoxicilline *ex vivo* dans le petit intestin, que lorsque l'antibiotique était administré à forte concentration (2mg/mL), l'absorption s'effectuait selon une cinétique d'ordre 1 compatible avec la diffusion passive. Lorsque la concentration de la solution administrée était plus faible (20µg/mL), l'absorption s'effectuait suivant une cinétique de type Michaelis-Menten.

Piotrovskij *et al.* (1994) ont modélisé l'absorption orale de l'amoxicilline chez l'homme suite à l'administration d'une dose de 500 et 3000mg. Ces chercheurs qui ont émis l'hypothèse que l'absorption pouvait être facilitée par des mécanismes de transport saturables en plus de la voie passive, ont plutôt utilisé deux voies parallèles et un temps d'une durée d'accès pour expliquer l'entrée du médicament dans l'organisme (Figure 12).

**Figure 12 : Modèle pharmacocinétique de l'absorption orale de l'amoxicilline chez l'homme**



Tiré de Piotrovskij *et al.*, 1994.

Tel qu'illustré, le transfert s'effectue à partir du compartiment d'absorption (3) vers un compartiment d'interface (4) à la circulation systémique par deux processus simultanés, le premier d'ordre 1 ( $k_{34}$ ) et le deuxième de type Michaelis-Menten ( $V_{MAX}/K_{50}$ ). Dans ce modèle, l'absorption d'ordre 1 et par la voie saturable débute dès la fin d'une période de délai, mais le processus saturable n'est effectif que durant une période définie par « Durée ». Au-delà de ce temps, l'absorption par la voie saturable devient nulle. La présence d'un compartiment d'interface (4) entre le compartiment d'absorption (3) et le compartiment central (1) entre lesquels l'antibiotique transite selon un processus d'ordre 1 ( $k_{sys}$ ) joue le rôle de compartiment de rétention.

À partir de ce modèle, les auteurs ont démontré que l'absorption par voie passive ( $K_{34}$ ) serait négligeable chez l'homme aux doses de 500 et 3000 mg. Les données semblent de plus supporter la théorie d'une absorption saturable et restreinte dans le temps. Le temps médian durant lequel l'absorption saturable se produirait à été évalué à 1.72h et est expliqué par les auteurs par la durée du passage de l'antibiotique dans une fenêtre d'absorption, c'est-à-dire un segment de l'intestin où

se trouvent les transporteurs (Piotrovskij *et al.*, 1994). Les données justifient aussi l'utilisation d'un compartiment de rétention (4) ce qui selon les auteurs, traduit la capacité de la membrane à accumuler l'antibiotique et qui à été démontrée *in situ* (Nakashima *et al.*, 1984).

### 1.4.2 Analyse par moments statistiques des données

Plusieurs études de l'absorption orale de l'amoxicilline font aussi intervenir une analyse non compartimentale des données, aussi appelée analyse par moments statistiques (Agersø et Friis, 1998a, Sjöval *et al.*, 1985) . Ce type d'analyse est basé sur le temps moyen de séjour d'une molécule étudiée à l'intérieur de l'organisme (MRT). On peut déterminer ce paramètre par le quotient de la somation du temps de résidence de chaque molécule par le nombre total de molécules dans l'organisme (Équation 14).

#### Équation 13 : Calcul de la valeur de MRT

$$MRT = \frac{\text{Temps de séjour total pour toutes les molécules dans l'organisme}}{\text{Nombre total de molécules}}$$

Le principal avantage de la méthode d'analyse non compartimentale est qu'elle donne les propriétés générales du système pharmacocinétique (dimension en terme de séjour : MRT, volume de distribution, clairance). Comme la structure du système n'est d'aucun intérêt, le résultat de l'analyse connaît moins de variations d'un cynéticien à l'autre en comparaison avec l'analyse compartimentale. Aussi les

résultats sont interprétables physiologiquement. Si la prédiction des concentrations n'est d'aucun intérêt, mais que l'on veut déterminer les paramètres généraux, alors cette technique d'analyse est suffisante. Elle est aussi moins sujette à la variabilité dans le protocole et peut être effectuée sans avoir recours à des équations différentielles (DiStefano 3<sup>rd</sup>, 1982).

L'application de cette méthode d'analyse est cependant conditionnelle au respect de deux prémisses. Tout d'abord tout les phénomènes de transfert sont d'ordre 1 et l'élimination se fait à partir du compartiment de transfert (le sang), ce qui a pour conséquence l'additivité des clairances. Deuxièmement, le temps de séjour moyen à l'intérieur du système pharmacocinétique est indépendant de la voie d'administration.

L'élimination d'un antibiotique s'effectuant généralement via plus d'un organe, comme le rein, le foie, les poumons qui sont tous reliés par le système sanguin, la clairance totale d'un antibiotique doit donc être égale à la somme des clairances des différents organes (Voir la section 1.3.3.2.2). L'autre prémisses est que le temps moyen de séjour est indépendant de la route d'administration de l'antibiotique (Shargel *et al.*, 2004).

Cette analyse permet notamment de déterminer l'aire sous la des concentrations plasmatiques en fonction du temps depuis le moment de son

administration et l'infini ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ), qui est un indicateur de la quantité de médicament absorbé par l'organisme (Équation 14).

**Équation 14 : Calcul de l'aire sous la courbe à l'aide de la méthode d'analyse par moments statistiques**

$$AUC_0^{\infty} = \int_0^{\infty} C_p dt$$

La biodisponibilité (F) (équation 15) et le volume de distribution à l'état stationnaire ( $V_{ss}$ ) (équation 16) peuvent aussi être calculés à partir de ce type d'analyse

**Équation 15 : Formule du calcul de la biodisponibilité par la méthode d'analyse par moments statistiques**

$$F = \frac{AUC \cdot Dose}{Cl}$$

**Équation 16 : Formule du calcul du volume de distribution à l'état d'équilibre par la méthode d'analyse par moments statistiques**

$$V_{ss} = Cl \cdot MRT$$

Dans une étude portant sur l'absorption orale de l'amoxicilline chez l'humain, Sjöval *et al.* (1985) rapportent que l'augmentation de l'aire sous la courbe n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la dose lorsque cet antibiotique est administré à des doses de 375, 750, 1500 et 3000 mg. Ces derniers spéculent que ce phénomène à

l'implication d'un système de transport saturable et d'un système passif de diffusion. Ainsi pour ces derniers, la biodisponibilité orale de l'amoxicilline pourrait être déterminée à l'aide de l'équation 17.

**Équation 17 : Implication des différentes voies d'absorption dans le calcul de la biodisponibilité d'un antibiotique à une dose donnée.**

$$F = \left[ \frac{A_{\max}}{K_D + D} + k \right] \cdot D$$

où  $A_{\max}$  est la quantité maximale pouvant être absorbée à très forte dose,  $K_D$  la dose à laquelle la quantité absorbée est équivalente à la moitié de  $A_{\max}$ ,  $D$  est la dose et  $k$ , l'absorption par voie passive.

Selon Sjövall *et al.* (1985), l'absorption d'ordre 1 prendrait de l'ampleur avec une augmentation de la dose. Ce phénomène serait compatible avec les observations de Paintaud *et al.*, (1992) et est très probable du fait que les transporteurs présents au niveau apical des cellules de l'épithélium intestinal satureraient avec l'augmentation de la dose d'amoxicilline, ce qui augmenterait du même coup ses chances d'être absorbée par diffusion passive.

Toutefois, à la lumière des informations rapportées à la section 1.3.3.1 selon lesquelles l'amoxicilline est absorbée au niveau intestinal par un transporteur et que ce dernier est saturable, chaque molécule n'a donc pas la même chance que les autres d'être absorbée, ce qui va à l'encontre d'un des postulats de l'analyse par moments

statistiques. Cette raison invalide le traitement mathématique effectué par Sjöval *et al.*, (1985) pour tenter d'expliquer l'absorption orale de l'amoxicilline et que bien que les résultats semblent cohérents et vont dans le même sens que ceux de Paintaud *et al.* (1992), ces premiers sont critiquables.

### **1.4.3 Facteurs de variabilité**

#### **1.4.3.1 Effet de la protéine**

Il est généralement admis que l'amoxicilline est absorbée par le transporteur PepT1 (voir section 1.3.3.1.3.1), qui est responsable de l'absorption des dipeptides et tripeptides issus de la digestion des protéines alimentaires. Divers études d'absorption des  $\beta$ -lactamines ont permis d'observer que ces courtes chaînes d'acides aminés interfèrent avec l'absorption intestinale de ces antibiotiques (Bretschneider *et al.*, 1998). Par exemple, des tests de compétition pour l'absorption in vitro par des cellules intestinales Caco-2 ont permis d'observer une diminution significative de l'absorption du dipeptide Glycyl-Sarcosine lorsqu'il était administré conjointement avec différentes  $\beta$ -lactamines dont la pénicilline G et l'ampicilline (Bretschneider *et al.*, 1998).

#### **1.4.3.2 Effet de la fibre alimentaire**

La quantité de fibre alimentaire présente dans une ration varie selon la composition de celle-ci. Selon qu'elle est plus ou moins riche en fibres, la ration alimentaire peut influencer la biodisponibilité de l'amoxicilline administrée *per os*

(Lutz *et al.*, 1987). Dans cette étude, des hommes adultes ont reçu une dose de 200 mg d'amoxicilline à 24 h d'intervalle pendant 3 jours simultanément à un repas pauvre ou riche en fibres. L'analyse pharmacocinétique de ces deux périodes de traitement a révélé une diminution significative de 20% de la biodisponibilité de l'amoxicilline.

#### **1.4.3.3 Effet du pH**

Le transporteur PepT1 impliqué dans l'absorption des  $\beta$ -lactamines utilisant l'hydrogène comme molécule de co-transport, le pH du côté luminal de l'entérocyte influence donc l'efficacité de ce dernier dans le transport des substrats (Terada et Inui, 2004, Lafforgue *et al.*, 2008). Par exemple, une étude employant des solutions de différentes  $\beta$ -lactamines, seules ou conjointement à une suspension d'un polymère ayant un pouvoir tampon, a permis de démontrer que l'apport supplémentaire en ions  $H^+$  avait pour conséquence d'augmenter la vitesse et l'étendue de l'absorption des antibiotiques testés, tant *in vivo* chez le rat qu'*in vitro* avec un modèle d'intestin isolé de rat (Nozawa *et al.*, 2003).

## 2 Hypothèses et objectifs

Cette revue de littérature permet de constater que l'absorption orale de l'amoxicilline s'effectue de façon prépondérante à l'aide d'un système de transport actif et dans une moindre mesure par diffusion passive. Le transporteur impliqué dans l'absorption de l'antibiotique est aussi responsable de l'absorption de petits peptides. Chez le porc, la biodisponibilité orale de cet antibiotique n'est que le tiers de celle observée chez l'homme, ce qui pourrait expliquer les échecs thérapeutiques impliquant cette molécule administrée *per os*. Cette différence dans la fraction de l'antibiotique administrée oralement qui atteint la circulation systémique pourrait résulter d'un plus grand niveau de compétition entre les peptides alimentaires et l'antibiotique pour le transporteur. Aucune étude ne s'est toutefois attardée à la linéarité de l'absorption avec une augmentation de la dose de façon à mettre en évidence cette compétition. Différentes études portant sur la pharmacocinétique de l'amoxicilline ont eu recours à une analyse par moments statistiques, malgré le fait que son absorption par la voie active aille à l'encontre des prémisses de cette analyse. Aussi, ce type d'analyse ne permet que la détermination des propriétés générales du système pharmacocinétique et non pas des caractéristiques détaillées comme c'est le cas pour l'analyse compartimentale. Une étude impliquant l'administration de différentes doses d'amoxicilline et utilisant une analyse compartimentale des données est toute indiquée pour obtenir une meilleure compréhension de la pharmacocinétique orale de cet antibiotique chez le porc et ainsi améliorer son usage thérapeutique.

## 2.1 **Hypothèse**

La faible absorption orale de l'amoxicilline chez le porcelet sevré serait le résultat d'une saturation des transporteurs impliqués dans son prélèvement intestinal.

## 2.2 **Objectifs**

Caractériser chez le porcelet sevré la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline par des mesures de concentration plasmatique dans le sang porte aortique, porte et dans l'urine lors d'administration à des doses croissantes

Développer un modèle pharmacocinétique physiologiquement réaliste dans le but d'analyser les données.

Déterminer la capacité maximale d'absorption orale du porcelet pour cet antibiotique.

## **3 Matériel et méthodes**

### **3.1 *Plan expérimental***

Le protocole suivi au cours de cette étude a été approuvé par le comité de bioéthique de l'Université de Montréal de même que par le comité d'éthique d'agriculture et agroalimentaire Canada.

Cette étude a été réalisée selon un plan expérimental parallèle où les animaux sont distribués équitablement dans les divers groupes de doses d'antibiotique. Ce plan a été retenu à cause de la croissance rapide du porc et pour minimiser la durée de l'inconfort des animaux causé par les cathéters et les drains, qui aurait pu avoir des répercussions sur les résultats si plusieurs répétitions avaient été effectuées. L'attribution des doses à administrer aux porcs a été effectuée de façon aléatoire.

### **3.2 *Phase animale***

#### **3.2.1 Antibiotique et autres produits chimiques**

Le sel sodique d'amoxicilline utilisé au cours de ce projet, d'une pureté de 97,8%, fut acheté chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, É.-U.). Tous les autres produits chimiques utilisés étaient d'origine commerciale et de grade analytique. Le certificat d'analyse de l'antibiotique figure à l'Annexe 1 de ce mémoire.

### 3.2.2 Animaux d'expérience

Des porcs de race croisée, mâles castrés ou femelles, avec un poids moyen à l'entrée de 22 kg, ont été utilisés au cours de l'expérience. Les animaux livrés par groupes de six individus provenaient d'un élevage commercial<sup>1</sup>.

À leur arrivée, un examen clinique sommaire a été effectué afin de s'assurer de l'homogénéité des poids et de l'absence de signes de maladie chez les animaux. Par la suite, les porcs ont été logés dans un local de l'animalerie d'expérience<sup>2</sup>. Une période de domestication de 5 jours durant lesquels l'animal était en contact avec l'homme 10 minutes par jour a été appliquée. À la fin de l'expérience, les animaux ont reçu l'euthanasie par surdose intraveineuse de pentobarbital, administrée par voie intraveineuse.

### 3.2.3 Logement

Les animaux ont été gardés dans des cages individuelles en acier galvanisé de 0,74 m<sup>2</sup> aux parois latérales grillagées munies d'un plancher en lattes de plastique surélevé de 0,25 m. La température ambiante fut maintenue à 20 ± 2° C, l'air filtré avec un système HEPA et la période de luminosité par éclairage électrique fixée à 12 heures par jour.

---

<sup>1</sup> F. Ménard Inc. St-Ange-Gardien, Qc, Canada.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire. Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, St-Hyacinthe, Qc, Canada.

### **3.2.4 Alimentation**

Les animaux étaient nourris deux fois par jour, à 10 heures d'intervalle à l'exception des jours d'expérimentation, avec le même aliment qui fut servi aux animaux lors de leur séjour en élevage. Ce dernier comportait 19 g/kg de protéines brutes et était exempt d'antibiotique. Durant les jours d'expérience, les animaux reçurent un aliment à faible teneur en protéine pour minimiser le risque d'interférence sur le transporteur (section 1.3.3.1.3.1 et section 1.4.3.1). La composition centésimale de ces deux aliments figure à l'Annexe 2 de ce mémoire.

### **3.2.5 Procédure chirurgicale**

Douze heures avant la chirurgie, les animaux ont été mis à jeun, mais où l'eau est demeurée disponible à volonté. La sédation des animaux a été effectuée avec des injections intramusculaires instantanées (bolus) de 8 mg/kg de kétamine<sup>3</sup> et de 2 mg/kg d'azapérone<sup>4</sup>. L'induction et le maintien de l'anesthésie ont été réalisés par inhalation via un tube endotrachéal d'un mélange d'isoflurane et d'oxygène dans des proportions de 2% et 98% respectivement. Une fois placé en décubitus dorsal avec les membres antérieurs et postérieurs en extension, l'aspect ventral de l'abdomen et l'aspect médial de la cuisse gauche furent rasés et désinfectés par 3 passages alternés de compresses imbibées d'alcool isopropylique et de chlorhexidine.

---

<sup>3</sup> Vetalar, Bioniche animal health Canada inc., Belleville, ONT, Canada

<sup>4</sup> Stresnil. Merial Canada inc., Baie d'Urfé, QC, Canada

L'abdomen a été incisé sur la ligne blanche sur la ligne blanche sur une longueur d'environ 12 cm à partir de la pointe de l'appendice xiphoïde, afin d'exposer la cavité abdominale et d'isoler successivement la rate, l'estomac et la vessie. Un cathéter artisanal a été inséré dans la veine splénique et poussé jusqu'à ce que son extrémité atteigne la veine porte. Ensuite, l'estomac a été incisé sur un centimètre au niveau de la grande courbure pour y introduire un tube de gastrotomie<sup>5</sup> d'un diamètre externe de 6,0 mm, qui fut ensuite fixé à l'estomac avec une suture en blague à tabac, suivie d'un laçage chinois. Par la suite, une incision d'un centimètre fut pratiquée dans la paroi de la vessie afin d'y introduire un drain urinaire plat<sup>6</sup> de 7 mm de largeur, lui aussi fixé à la vessie grâce à une suture en blague à tabac suivie d'un laçage chinois. La peau de la face intérieure de la cuisse gauche a été incisée afin d'atteindre l'artère fémorale pour y placer un cathéter à trois voies d'un calibre de 16G raccordé à un tube d'extension artisanale. Le tube de gastrotomie, les cathéters et le drain urinaire ont été extériorisés au niveau du dos et la paroi abdominale et la surface médiale de la cuisse ont été suturées. À la fin de la chirurgie, les animaux furent revêtus d'une résille élastique fixée par un ruban adhésif élastique afin de protéger les cathéters et les plaies chirurgicales, puis une dose intramusculaire de kétoprofène leur fut administrée à des fins anti-inflammatoire et analgésique. Ce traitement a été répété aux 24 heures pendant deux jours.

---

<sup>5</sup> Tyco Healthcare/Kendall, Mansfield, MA, États-Unis

<sup>6</sup> Ethicon inc., Johnsons & Johnson Co., MA, Somerville, États-Unis

Le suivi de l'état de santé (changement de bandage, entretien des cathéters) était effectué quotidiennement jusqu'au moment de l'euthanasie.

### 3.2.6 Protocole pharmacocinétique

Tous les animaux instrumentés ont été mis à jeun d'aliment 12 heures avant l'administration de l'antibiotique. Le matin de l'expérience, chaque animal a été pesé afin de déterminer la quantité d'antibiotique à administrer et leur vessie vidée à la seringue via le cathéter urinaire. L'aliment à faible teneur en protéines était servi au moment de l'administration du traitement et demeura disponible durant toute la journée d'expérience. L'amoxicilline dissoute dans 20 mL d'eau a été administrée à une dose exacte de 4, 12, 20 ou 30 mg/kg via le tube de gastrotomie (Tableau IV).

**Tableau IV : Poids des porcs et doses d'amoxicilline administrées par voie intragastrique lors de l'expérimentation**

<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Porc</b>	<b>Poids (kg)</b>
<b>4</b>	17	18,4
	29	22,0
	35	20,4
<b>12</b>	21	20,8
	23	24,0
	37	22,3
<b>20</b>	22	25,3
	30	28,3
	38	19,3
<b>30</b>	19	21,7
	18	22,7
	46	18,3

À partir du moment où la dose d'amoxicilline fut administrée à l'animal, l'urine contenue dans la vessie fut aspirée toutes les heures à l'aide d'une seringue de 50 mL munie d'une aiguille de 16G raccordée au drain urinaire. Cette étape fut répétée sur une période 12 heures post administration (Tableau V).

Avant chaque prise d'échantillon sanguin, un volume de 3 mL était aspiré de chaque cathéter afin de s'assurer que la solution anticoagulante contenant 50 000 UI/mL d'héparine dans du dextrose 50%, qui assure la fonction du cathéter, ne dilue pas le sang de l'échantillon à prélever. Par la suite, 3 mL de sang furent prélevés simultanément à partir du cathéter artériel et du cathéter veineux aux temps préétablis (Tableau V). Une fois le prélèvement effectué, le mélange sang-solution de conservation était réinjecté dans les cathéters respectifs afin d'éviter que le porc ne devienne anémique, suivi de 1,5 mL de la solution de conservation.

**Tableau V : Temps de prélèvement des échantillons sanguins et des volumes totaux d'urine**

Échantillon	Temps de prélèvements (heures)														
	0	0,1	0,2	0,4	0,7	0,8	1,0	1,2	1,4	1,5	2	3	4	6	8
Sang															
Urine															

### 3.2.7 Traitement et entreposage des échantillons

Les échantillons de sang artériel et veineux furent placés dans des tubes stériles distincts, préalablement identifiés et contenant une solution d'EDTA·K<sub>3</sub> 7,5%, puis mis sur la glace pilée durant 10 minutes, en attendant d'être centrifugés à

2000  $\times$  g et 4° C. Par la suite, deux aliquotes de plasma d'environ 500  $\mu$ L chacun y ont été prélevés et placés à -70° C afin de prévenir la dégradation de l'amoxicilline jusqu'au moment de l'analyse. Le volume total d'urine produit par l'animal a été récolté et placé dans des tubes stériles de 50 mL en polypropylène préalablement identifiés selon l'intervalle de temps suivant le début de l'expérience. Ces derniers ont eux aussi placés à -70° C jusqu'au moment de l'analyse.

### 3.3 ***Description de la méthode analytique***

#### **3.3.1 Préparation des échantillons de plasma**

Une fois les échantillons décongelés, 50  $\mu$ L d'échantillons étaient prélevés et mélangés à 500  $\mu$ L d'acétonitrile fortifié avec 500 ng/mL de réserpine dans le but de précipiter les protéines de l'échantillon. Cette dernière substance agit comme étalon interne pour la détermination des concentrations d'amoxicilline. Le surnageant était placé dans des tubes à centrifugation de 1,5 mL. Chaque échantillon fut par la suite mélangé à l'aide d'un vortex puis laissé au repos à température ambiante pour une période de 10 minutes. Par la suite, une centrifugation à 12 000  $\times$  g pendant 10 minutes fut effectuée pour ensuite transférer 300  $\mu$ L de surnageant dans des fioles placées dans l'échantillonneur automatique du système de chromatographie liquide à haute performance.

### 3.3.2 Préparation des échantillons d'urine

Les volumes récoltés ont été regroupés de façon à obtenir pour un même porc, 4 lots d'urine regroupés selon l'heure de récolte aux intervalles suivants : 0-3, 3-6, 6-9, 9-12 heures après le traitement. Le volume issu de la nouvelle répartition de l'urine récoltée a par la suite été mesuré et un échantillon de 20  $\mu$ L prélevé pour chacun, mélangé avec 1 mL d'acétonitrile fortifié tous traités de façon identique aux échantillons de plasma.

### 3.3.3 Méthode instrumentale

Le système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) utilisé était composé d'un auto-échantillonneur<sup>7</sup> et d'une pompe binaire<sup>8</sup>. Le spectromètre de masse était un triple quadrupole de *PE Sciex API 3+* muni d'une source d'ionisation par électrospray<sup>9</sup>.

#### 3.3.3.1 Conditions chromatographiques

La chromatographie liquide a été effectuée dans des conditions isocratiques avec une phase mobile contenant de l'acétonitrile et de l'acide formique 0,5% (v/v) dans de l'eau et dans des proportions de 70:30. La colonne analytique était une *Keystone C18* d'une dimension de 50  $\times$  2 mm, contenant des particules d'une taille

---

<sup>7</sup> Perkin-Elmer Serie 200, Boston, MA, États-Unis

<sup>8</sup> Thermo Separation System P2000, San Jose, CA, États-Unis

<sup>9</sup> Applied Biosystem/MDS Sciex, Concord, ON, Canada

de 5 $\mu$ m. Le débit a été fixé à 0,4 mL/minute, qui éluait l'amoxicilline à 1,4 minutes et le standard interne à 2,2 minutes. Le flot sortant de la colonne ont été divisé dans des proportions de 1:10 avant l'introduction dans la source électrospray afin de favoriser la nébulisation de la phase mobile ainsi que le transport des ions vers l'entrée du spectre de masse. Dix  $\mu$ l du surnageant des échantillons extraits ont été injecté sur la colonne et le temps d'analyse total a été de 3,5 minutes.

### 3.3.3.2 Conditions de la spectrométrie de masse

L'éluât était ionisé avec une source électrospray opérant à 4000 V et nébulisé à l'aide d'azote à une pression de 40 livres par pouce carré. L'évaporation était assistée d'un débit d'azote (2 L/min) transversal chauffé à 400°C. Le potentiel de désagrégation des solvants fut réglé à 15 V et l'énergie de collision ( $E_{lab}$ ) à 20V. Le gaz de collision utilisé était l'argon à  $2,4 \times 10^{14}$  molécules/cm<sup>2</sup>. La transition du rapport de masse/charge (m/z) était 366  $\rightarrow$  114 pour amoxicilline et 609  $\rightarrow$  397 pour la reserpine. La détermination de la concentration était effectuée sur la base d'une courbe d'étalonnage et à l'aide d'une équation de régression linéaire pondérée avec la valeur réciproque du signal mesuré (c.à.d.,  $W = 1/x$ ). La réponse mesurée était normalisée en calculant le ratio de l'aire sous le pic chromatographique de la substance à analyser sur le standard interne.

### 3.3.4 Analyse des données

L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques artérielles et veineuses d'amoxicilline ( $AUC_A$  et  $AUC_V$  respectivement) ont été calculées avec le logiciel

WinNonlin version 5.2<sup>10</sup>. La valeur de l'AUC des concentrations mesurées entre 0 et 8 heures ( $AUC_{0 \rightarrow 8h}$ ) a été calculée en utilisant la méthode des trapèzes linéaires (Gibaldi et Perrier, 1982). La valeur de la pente terminale ( $\lambda_z$ ) a été estimée par régression linéaire en utilisant au moins le logarithme des 3 dernières concentrations mesurées en fonction du temps. L'aire sous la courbe totale ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ) a été calculée en utilisant l'équation  $AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow 8h} + C_{p_{8h}}/(\lambda_z)$  où le quotient  $C_{p_{8h}}/(\lambda_z)$  formé par  $C_{p_{8h}}$  (la concentration plasmatique mesurée au dernier temps de prélèvement, soit à 8 h) et  $\lambda_z$  (la pente terminale du profil de concentrations plasmatiques) correspond à l'aire sous la courbe extrapolée du dernier temps de prélèvement jusqu'à l'infini. La clairance rénale ( $CL_R$ ) a été calculée à l'aide de l'équation 18 :

**Équation 18 : Formule de détermination de la clairance rénale**

$$CL_R = \frac{Q_U}{AUC_A}$$

Dans cette équation,  $Q_U$  est la quantité d'amoxicilline excrétée dans l'urine, telle qu'estimée par  $Q_U = V_U \cdot C_U$  où  $V_U$  est le volume d'urine excrété et  $C_U$  la concentration d'amoxicilline dans l'urine, et  $AUC_A$  est l' $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  de ses concentrations artérielles en fonction du temps.

---

<sup>10</sup> Pharsight Corporation, Mountain View, CA, États-Unis

Tel que rapporté dans la section 1.3.3.2.2 du présent mémoire, le foie et le rein seraient les seules voies d'élimination connues pour l'amoxicilline. En tenant compte de cette prémisse, il est possible de déduire la clairance hépatique à partir des valeurs d'AUC artérielles et veineuses ainsi que la clairance rénale. La déduction de ce calcul est détaillée à l'équation 19.

**Équation 19 : Détermination de la clairance hépatique à partir des AUC et de la clairance rénale**

$$Y = \frac{AUC_V - AUC_A}{AUC_V} = \frac{\left(\frac{F \cdot D}{CL_T - CL_H}\right) - \left(\frac{F \cdot D}{CL_T}\right)}{\left(\frac{F \cdot D}{CL_T - CL_H}\right)} \text{ car } AUC = \frac{F \cdot D}{CL} \text{ (Équation 17)}$$

$$\frac{Y \cdot F \cdot D}{CL_T - CL_H} = \frac{F \cdot D}{CL_T - CL_H} - \frac{F \cdot D}{CL_T} \text{ multiplier par } \frac{1}{F \cdot D} \text{ des deux côtés de l'équation}$$

$$\frac{1}{F \cdot D} \cdot \frac{Y \cdot F \cdot D}{CL_T - CL_H} = \frac{1}{F \cdot D} \cdot \frac{F \cdot D}{CL_T - CL_H} - \frac{1}{F \cdot D} \cdot \frac{F \cdot D}{CL_T} \text{ ce qui élimine } F \cdot D \text{ partout}$$

$$\frac{Y}{CL_T - CL_H} = \frac{1}{CL_T - CL_H} - \frac{1}{CL_T} \text{ isoler les fractions avec le même dénominateur}$$

$$\frac{1}{CL_T} = \frac{1}{CL_T - CL_H} - \frac{Y}{CL_T - CL_H}$$

$$1 - \frac{CL_H}{CL_T} = 1 - Y \text{ expansion de la soustraction de fractions}$$

$$1 - \frac{CL_H}{CL_T} = 1 - Y \text{ simplifier l'équation}$$

$$Y = \frac{CL_H}{CL_T} \text{ or } CL_T = CL_H + CL_R \text{ et } CL_R \text{ est connu}$$

$$Y = \frac{CL_H}{CL_H + CL_R} \text{ on peut donc isoler } CL_H$$

$$CL_H = \frac{Y \cdot CL_R}{1 - Y}$$

$Y$  = paramètre inconnu qui après déduction est identifié comme la proportion de la clairance totale qui est effectuée par le foie

$F$  = biodisponibilité de l'antibiotique

$D$  = dose

$CL_T$  = clairance totale

La valeur de la clairance totale ( $CL_T$ ) pouvant être ainsi déduite par la somme de la clairance hépatique et de la clairance rénale, la biodisponibilité a pu être calculée à partir de l'équation 20.

**Équation 20 : Formule de détermination de la biodisponibilité orale de l'amoxicilline**

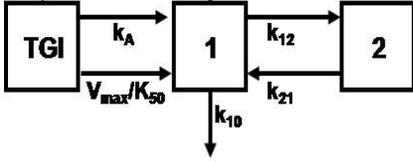
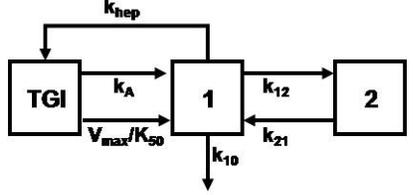
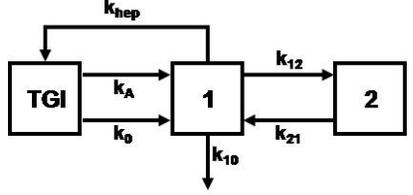
$$F = \frac{CL_T \cdot AUC_A}{Dose}$$

### **3.3.5 Modélisation pharmacocinétique et estimation des paramètres**

La modélisation des profils pharmacocinétiques suite à l'administration orale d'amoxicilline a été effectuée à l'aide du logiciel pharmacocinétique ADAPT II version 4 (D'Argenio et Schumitzky, 1997). Six modèles compartimentaux ont été élaborés en s'inspirant du schéma physiologique illustré à la figure 10 et qui tient compte des données biologiques publiées dans la littérature. Ces modèles sont illustrés au tableau VI alors que les équations différentielles qui y sont associées sont rapportées en annexe 2.

**Tableau VI : Hypothèses et modèles compartimentaux employés pour caractériser la pharmacocinétique de l'amoxicilline orale chez le porcelet sevré.**

Modèle	Illustrations	Hypothèses	Finalité du modèle
A		<p>Absorption passive Distribution hétérogène et recirculation entérohépatique Élimination via les reins et la bile</p>	Hypothèse nulle
B		<p>Absorption saturable (transporteur) limitée dans le temps Distribution : idem au modèle A Élimination : idem au modèle A</p>	Vérifie l'existence d'un transporteur saturable
C		<p>Absorption : idem au modèle B sauf que le transporteur est saturé à toutes les concentrations observables (<math>k_0 = V_{max}</math>) Distribution : idem au modèle A Élimination : idem au modèle A</p>	Vérifie que le transporteur peut sortir de l'état de saturation

D		<p>Absorption : somme des modèles A et B  Distribuition : idem au modèle A avec absence de recirculation entérohépatique  Élimination : uniquement via les reins</p>	<p>Vérifie la présence de 2 voies parallèles d'absorption et l'absence d'un recyclage entérohépatique</p>
E		<p>Absorption : idem au modèle D  Distribuition : idem au modèle A  Élimination : idem au modèle A</p>	<p>Modèle complet  Vérifie la présence conjointe d'un cycle entérohépatique et de 2 voies parallèles de d'absorption</p>
F		<p>Absorption : somme des modèles A et C  Distribuition : idem au modèle A  Élimination : idem au modèle A</p>	<p>Modèle réduit  Vérifie la présence d'un cycle entérohépatique et de 2 voies parallèles d'absorption, mais où le transporteur est toujours saturé</p>

### 3.3.6 Analyse statistique des données

Le choix du meilleur modèle fut basé sur une analyse des valeurs du critère d'Akaike (AIC) pour chaque modèle, qui est une mesure de la qualité de l'ajustement des données au modèle. Ce critère tient à la fois compte de la performance du modèle et de la complexité de ce dernier (Yamaoka *et al.*, 1978). Il est calculé à partir de l'équation 21 où  $N$  représente le nombre de données,  $R_e$ , la moyenne des carrés des écarts entre le modèle et les observations et  $p$ , le nombre de paramètres du modèle. Plus la valeur d'AIC obtenue est petite, meilleur est le modèle. Cette analyse des valeurs d'Akaike a été effectuée avec le test non paramétrique des signes et rangs de Wilcoxon. Une analyse des résidus a aussi été effectuée afin de s'assurer de l'absence hétéroscédasticité.

**Équation 21 : Équation pour le calcul critère d'Akaike**

$$AIC = N \cdot \ln R_e + 2p$$

## 4 Résultats

### 4.1 ***Exactitude et précision de la méthode d'analyse des échantillons***

L'exactitude et la précision de la méthode ont été déterminées par régression linéaire de la concentration. Ces valeurs sont présentées au tableau VII.

**Tableau VII : Étendue des concentrations, exactitude et précision de la méthode d'analyse des échantillons plasmatiques et sanguins**

Matrice	Étendue ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exactitude (%)	Précision (%)
Plasma	0,01 – 20	97,4 – 105,9	5,9 – 11,5
Urine	25 – 1400	86,4 – 111,7	4,6 – 10,9

### 4.2 ***Évolution temporelle des concentrations plasmatiques artérielles et veineuses d'amoxicilline***

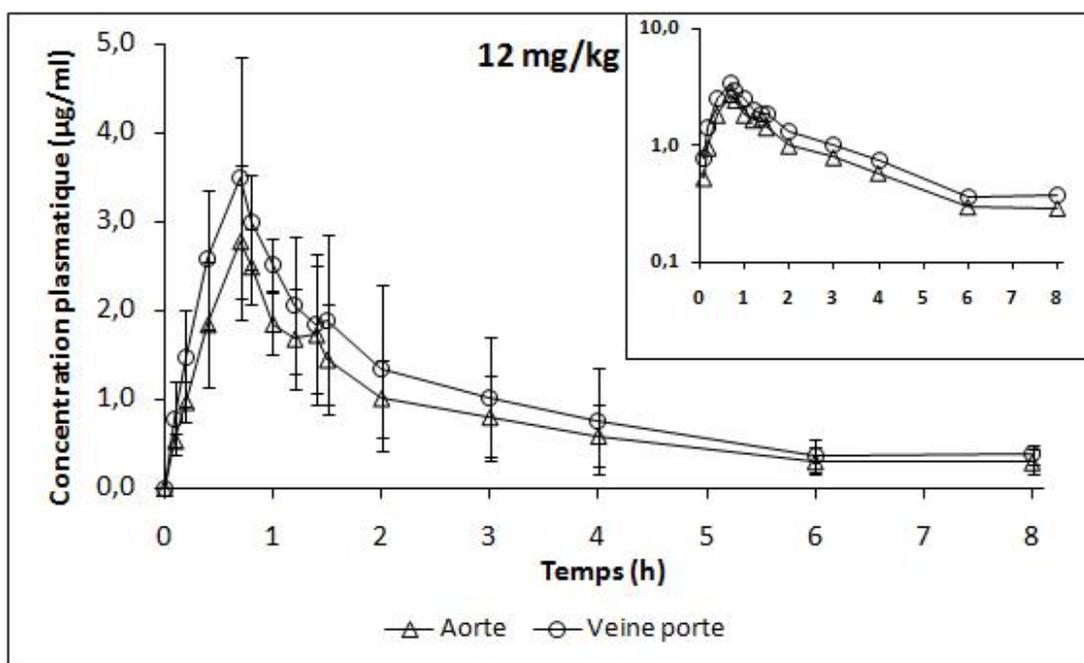
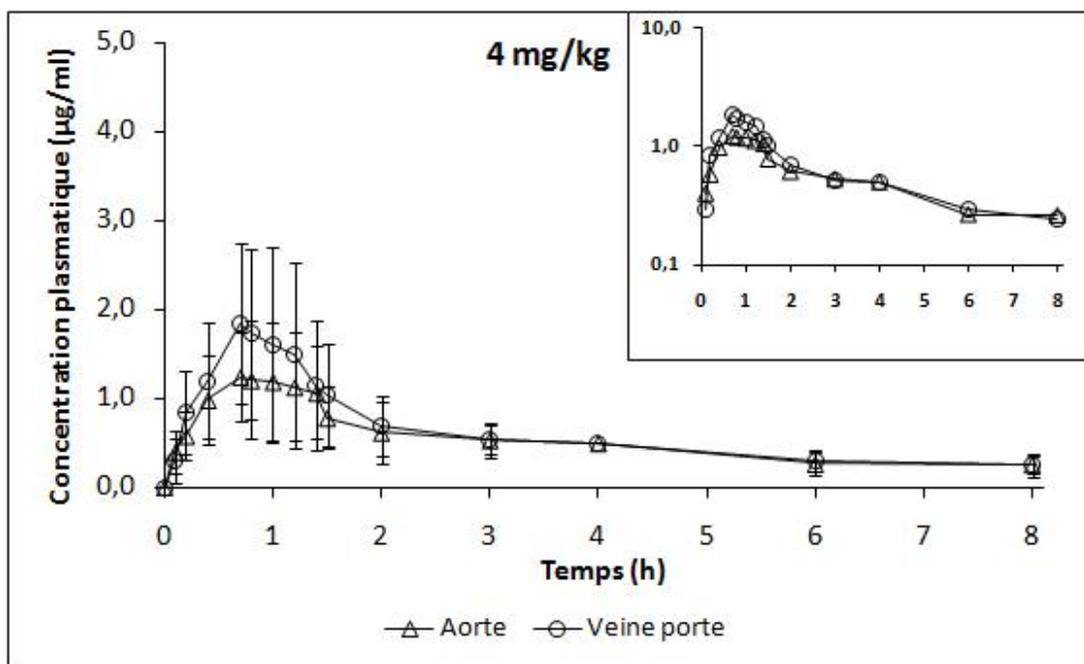
Les concentrations plasmatiques moyennes d'amoxicilline obtenues suite à l'administration instantanée de cet antibiotique à des doses de 4, 12, 20 et 30 mg/kg via le cathéter intra-gastrique sont illustrées à la figure 13. Dans tous les cas, les concentrations obtenues durant les 8 heures de prélèvements étaient supérieures à la limite inférieure de détection de la méthode de mesure.

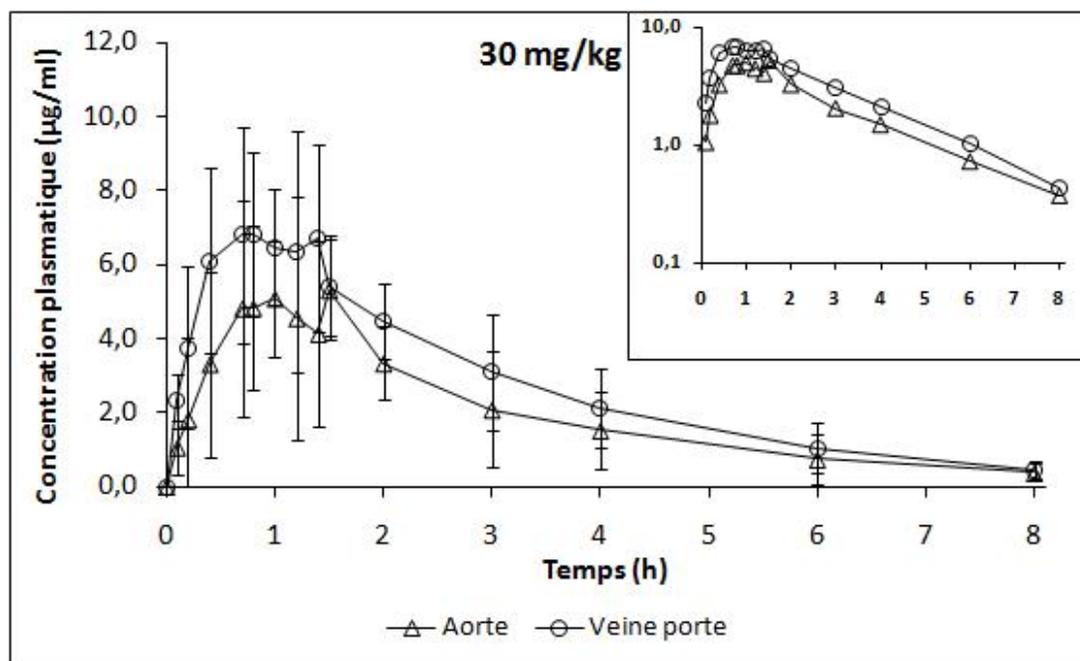
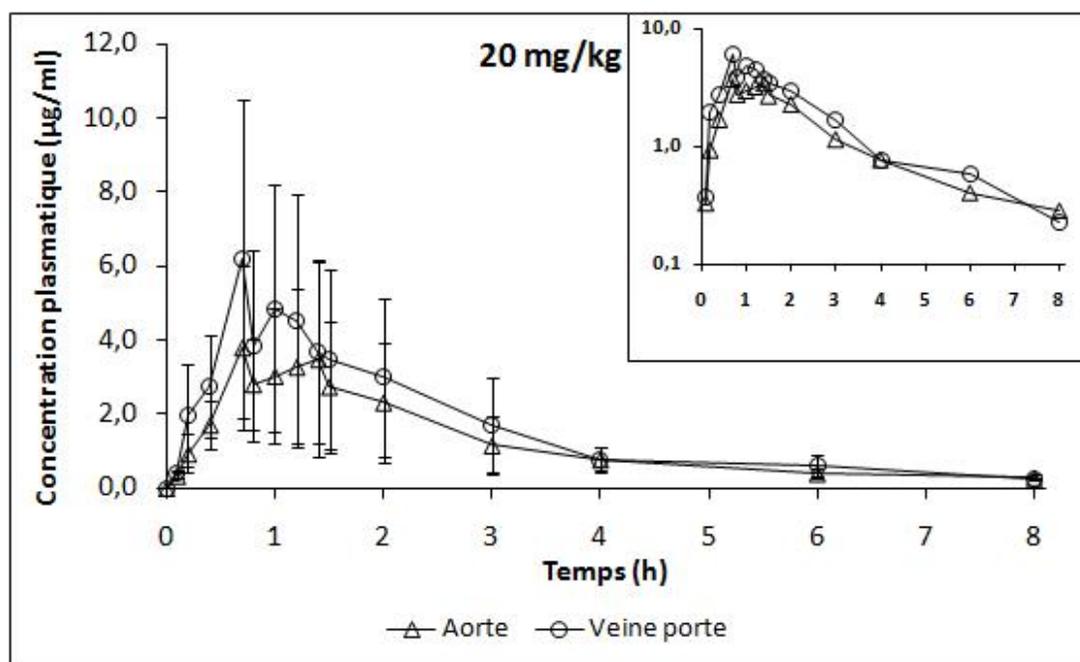
Bien que les écarts-types associés aux concentrations moyennes calculées soient importants, on observe que, pour presque tous les temps de prélèvements, la concentration plasmatique d'amoxicilline de la veine porte était plus élevée que celle

de l'aorte. C'est aux alentours de la concentration plasmatique maximale que l'écart entre la concentration artérielle et veineuse est la plus importante pour diminuer par la suite et devenir similaire 8 heures après l'administration du traitement.

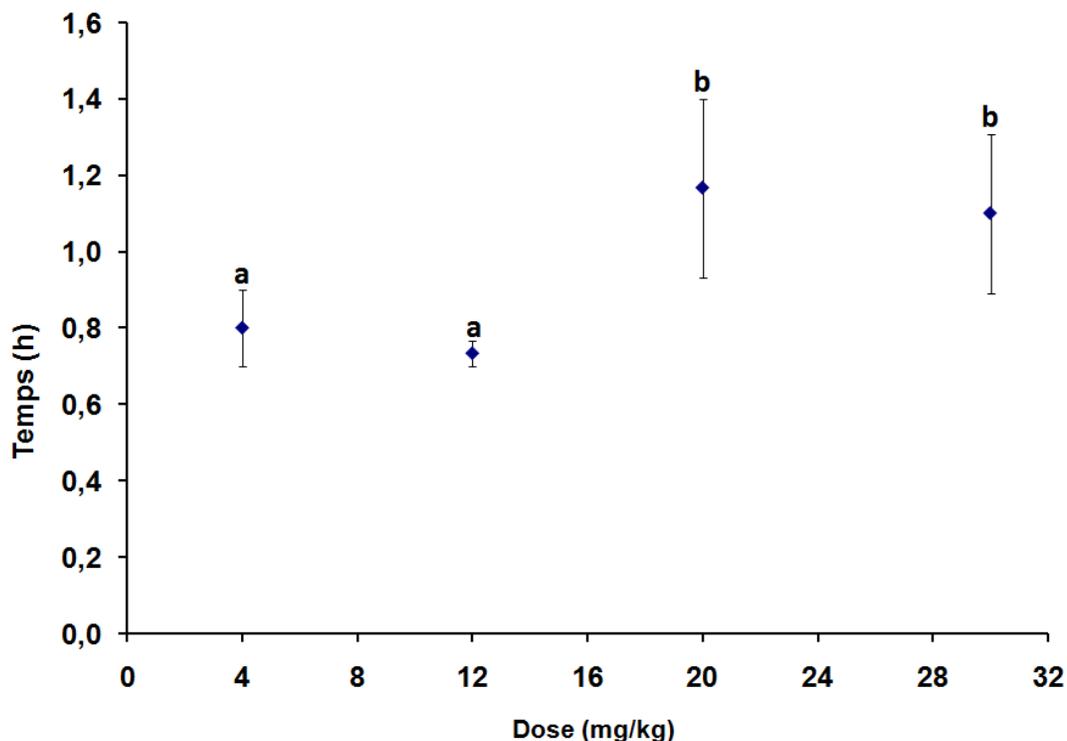
Les valeurs de temps auxquelles on observe la concentration plasmatique maximale ( $T_{\max}$ ) se situent entre 0,7 et 1.4 h, avec une augmentation significative ( $p = 0,008$ ) aux doses 20 et 30 mg/kg par rapport aux doses de 4 et 12 mg/kg (Figure 14). Les valeurs de concentration plasmatique maximale ( $C_{\max}$ ) porte et aortique augmentent avec la dose. Le profil des courbes varie aussi selon la dose administrée de sorte qu'aux doses de 4 et 12 mg/kg, on observe la présence d'un pic suivi d'une diminution plus prononcée des concentrations plasmatiques alors qu'à 20 et 30 mg/kg, les pics sont plus arrondis.

Figure 13 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques (moyenne et écart type) d'amoxicilline chez des porcelets sevrés





**Figure 14 : Variation des valeurs de t<sub>max</sub> en fonction de la dose intragastrique d'amoxicilline**

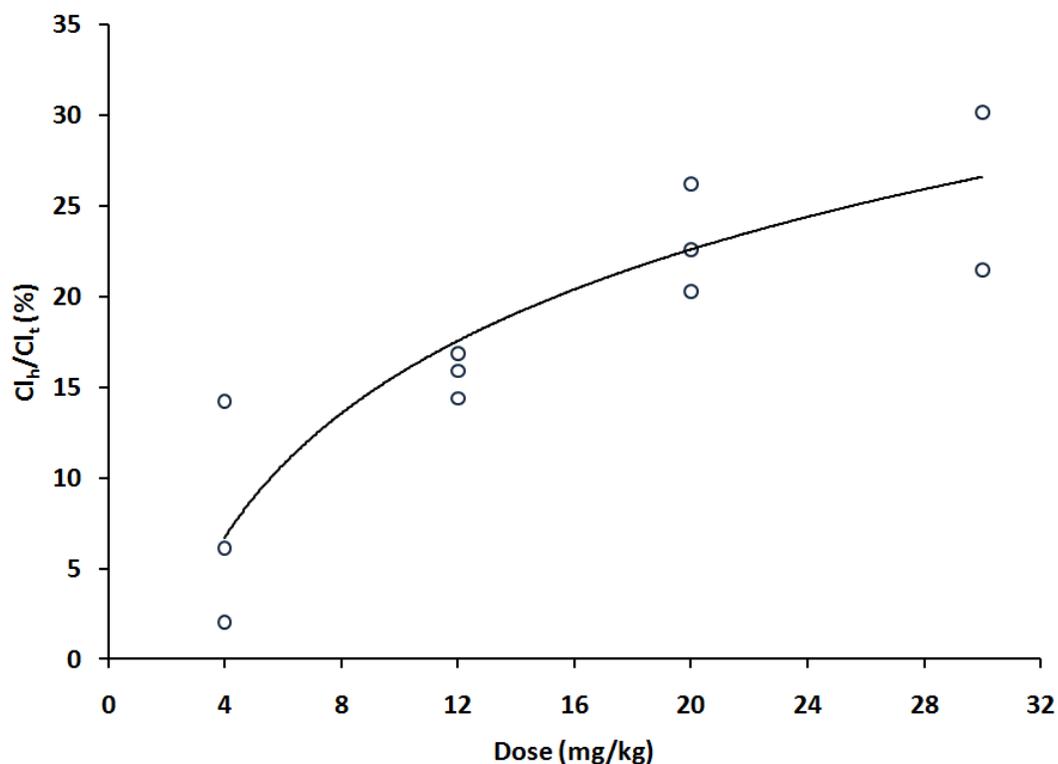


**N.B. :** Les valeurs de temps possédant le même indice ne sont pas significativement différentes entre elles.

#### 4.3 *Différences de concentrations porto-systémiques*

La figure 15 illustre les différentes valeurs du quotient des clairances hépatique et totale ( $CL_H/CL_T$ ) obtenues aux doses administrées. À 4 mg/kg, l'implication moyenne de la clairance hépatique est de  $7,47 \pm 6,21$  % et augmente de façon non linéaire jusqu'à la dose de 20 mg/kg, avec une valeur moyenne de  $23,02 \pm 2,99$  % qui est visiblement différente de celle observée à 4 mg/kg. L'implication moyenne de la clairance hépatique à 30 mg/kg tend vers un plateau avec une valeur de  $27,28 \pm 5,00$  % qui est comparable à celle de 20 mg/kg.

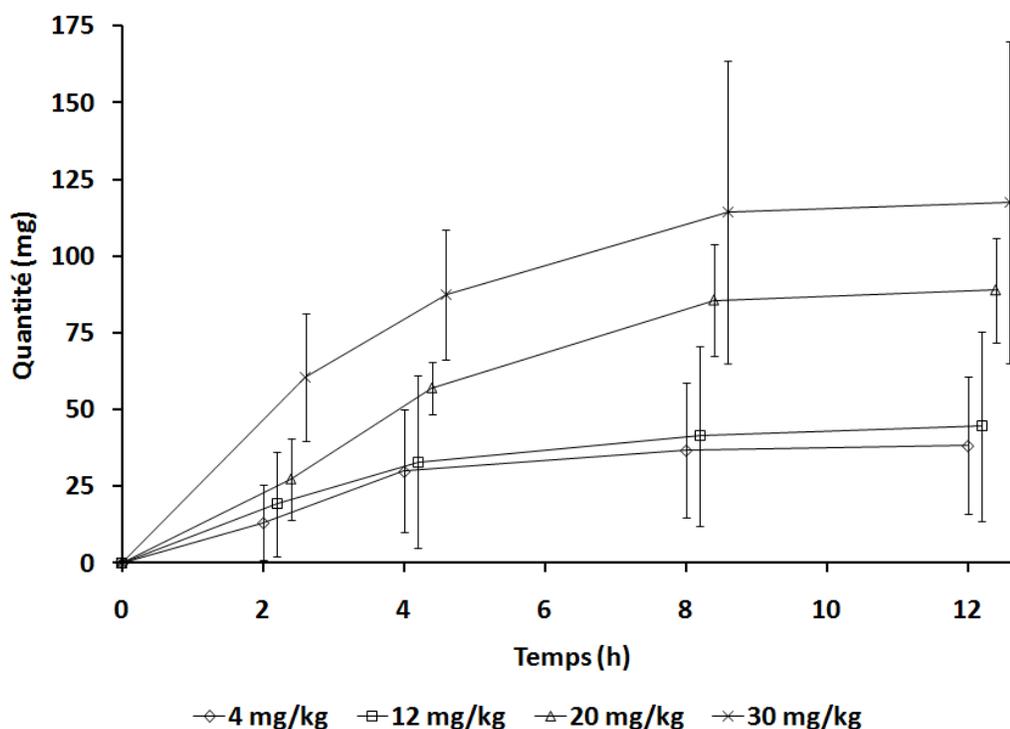
**Figure 15 : Valeurs de  $CL_H/CL_T$  en fonction de la dose d'amoxicilline administrée par voie orale chez le porc**



#### 4.4 **Excrétion urinaire**

La quantité moyenne cumulée d'amoxicilline excrétée dans l'urine en fonction du temps et de la dose administrée est illustrée à la figure 16. On observe que l'excrétion urinaire de l'amoxicilline s'effectue principalement durant les 9 premières heures suivant son administration orale. Par la suite, la quantité excrétée jusqu'à 12 heures post administration diminue de sorte que l'on observe l'atteinte d'un plateau dans les profils illustrés. Il est à noter que la quantité excrétée suite à l'administration de la dose de 4 mg/kg est très similaire à celle de 12 mg/kg.

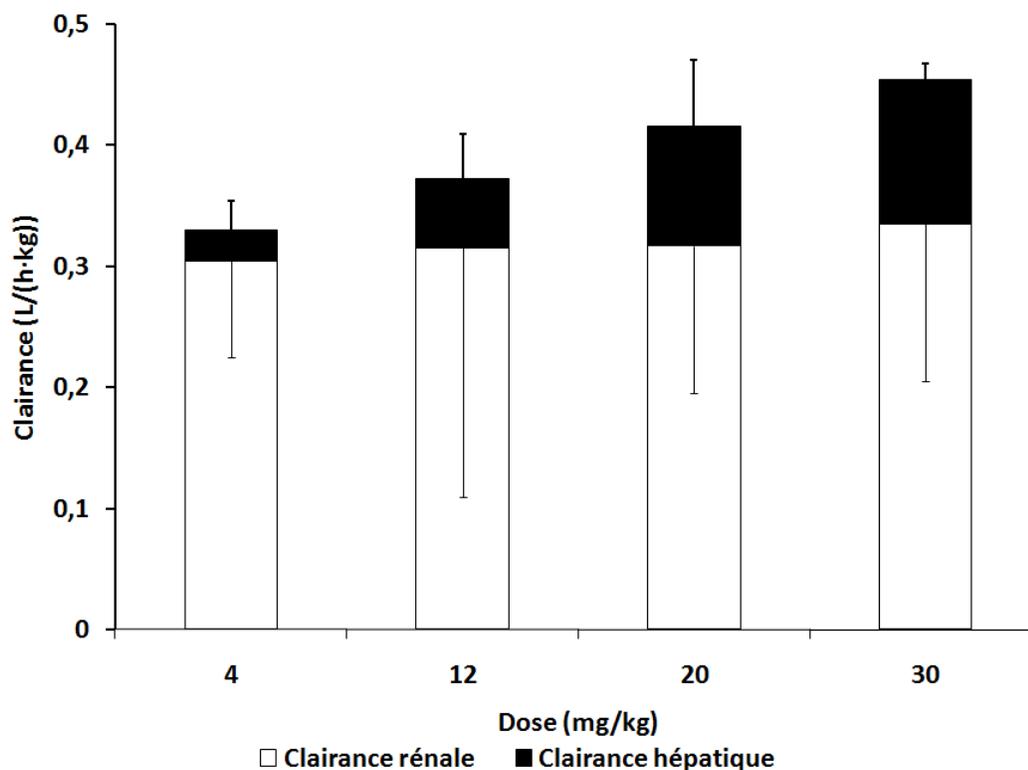
**Figure 16 : Quantité moyenne cumulée d'amoxicilline excrétée aux doses de 4, 12, 20 et 30 mg/kg en fonction du temps de vidange urinaire (N.B. les temps ont été majorés de 0,2 heures par dose pour une meilleure appréciation des barres d'erreur)**



#### 4.5 Clairances hépatique, rénale et totale de l'amoxicilline

Les valeurs de clairances moyennes rénales, hépatiques et totales aux différentes doses d'amoxicilline administrées ont été déterminées à partir des équations de la section 4.5.2.2 et sont illustrées à la figure 17 et rapportées au tableau VIII. L'écart type illustré au dessus de chaque colonne est celui de la clairance hépatique alors que celui du bas représente l'écart type de la clairance urinaire.

**Figure 17 : Clairances rénale et hépatique d'amoxicilline (moyenne, écarts types) chez des porcelets, en fonction de la dose administrée.**



**N.B.:** La clairance totale obtenue pour chaque dose est illustrée par addition des valeurs de clairance rénale et hépatique.

La clairance rénale, d'une valeur moyenne de 0,318 L/(h·kg), est stationnaire par rapport à la dose administrée ( $p = 0,72$ ). En présumant que les autres sources de clairance non-rénale sont négligeables, la clairance hépatique augmente significativement avec la dose ( $p = 0,0024$ ), passant de 0,025 L/(h·kg) à 4 mg/kg jusqu'à 0,119 L/(h·kg) à 30 mg/kg. La clairance totale tend pour sa part à augmenter mais pas de façon significative ( $p = 0,31$ ).

**Tableau VIII: Valeurs des clairances normalisées par le poids corporel chez des porcelets suite à l'administration orale d'une dose de 4, 12, 20 ou 30 mg/kg d'amoxicilline.**

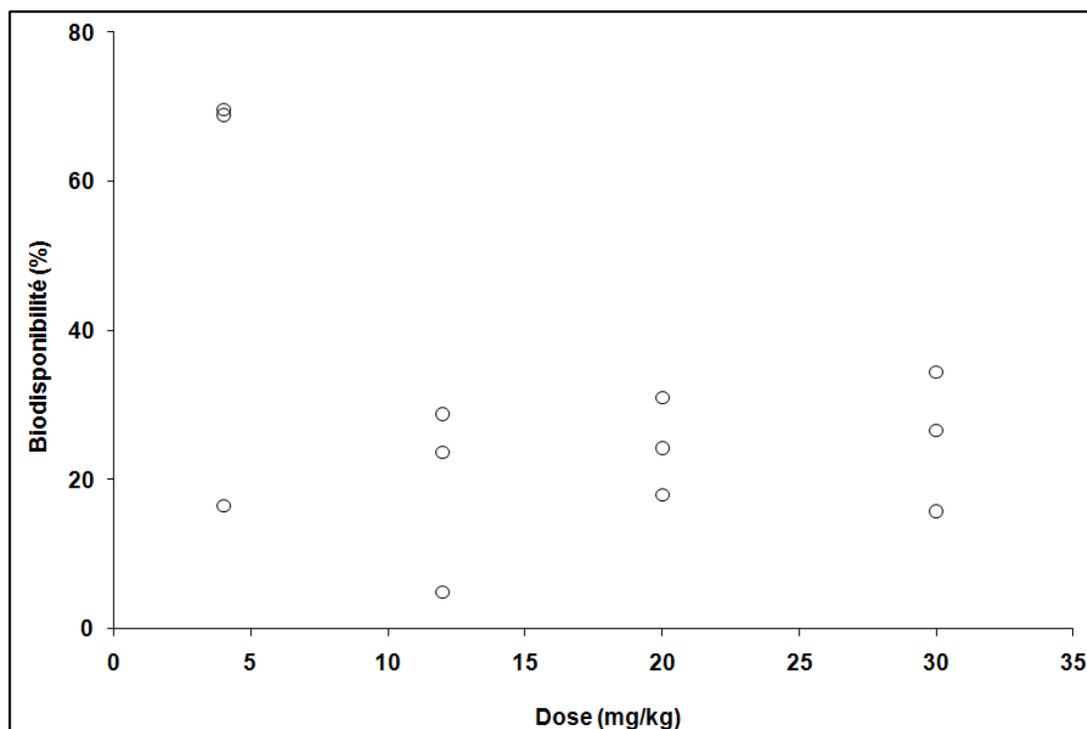
<b>Doses</b>	<b>Porcs</b>	<b>CL<sub>Rénale</sub> (L/(h·kg))</b>	<b>CL<sub>Hépatique</sub> (L/(kg·h))</b>	<b>CL<sub>Totale</sub> (L/kg·h)</b>
<b>4</b>	17	0,374	0,008	0,382
	29	0,322	0,054	0,376
	35	0,217	0,014	0,232
<b>12</b>	21	0,083	0,017	0,100
	23	0,474	0,090	0,564
	37	0,388	0,065	0,454
<b>20</b>	22	0,214	0,055	0,269
	30	0,285	0,083	0,368
	38	0,451	0,160	0,611
<b>30</b>	19	0,484	0,133	0,617
	28	0,246	0,106	0,352
	46	0,275	0,119	0,395

#### 4.6 **Biodisponibilité orale de l'amoxicilline**

La clairance totale de l'antibiotique ayant été déterminée, la dose et l'aire sous la courbe étant connues, il a été possible de déterminer les valeurs de la biodisponibilité (F) de l'amoxicilline aux différentes doses administrée à partir de l'équation 10 illustrée précédemment. Ces valeurs sont illustrées à la figure 18.

La biodisponibilité orale de l'amoxicilline diminue de façon significative ( $p = 0,364$ ) entre 4 mg/kg et 12 mg/kg pour atteindre un plateau et se maintenir entre 19,1 et 25,6%.

**Figure 18 : Biodisponibilité orale de l'amoxicilline chez des porcelets sevrés suite à son administration orale**



#### 4.7 **Choix du modèle pharmacocinétique compartimental**

La figure 19 illustre la différence entre les concentrations plasmatiques d'amoxicilline mesurées et prédites par chacun des modèles listés au tableau VI (cf p. 63) en fonction du temps, tandis que la figure 20 illustre ces mêmes différences en fonction de la concentration mesurée d'amoxicilline. Ces deux figures permettent de constater que le modèle A est celui qui fournit les prédictions les plus inexactes : d'une part, les différences entre les concentrations mesurées et prédites sont les plus grandes et, d'autre part, il surestime les concentrations observées dans l'intervalle 0-0,7 h et sous-estime celles de l'intervalle 0,7-1,5 h. Aussi, l'ampleur de la sous-estimation augmente avec la concentration mesurée. Les modèles B, C et D sont

d'une exactitude similaire, mais ils ont tendance à être imprécis dans l'intervalle de temps 0-1,5 h (figure 19) et sous-estiment les concentrations entre 2 et 5 mg/L (figure 20). Par contre les modèles E et F sont visiblement plus exacts dans l'ensemble de la période de prélèvements et pour toutes les concentrations mesurées (figures 19 et 20).

L'erreur de prédiction des modèles A (hypothèse nulle), B, C, D et F (modèles alternatifs réduits) a été évaluée par la comparaison des valeurs d'AIC de chaque modèle par rapport au modèle E (modèle alternatif complet), qui est élaboré à partir des caractéristiques pharmacologiques de l'amoxicilline contenues dans la littérature. Le test des signes et des rangs de Wilcoxon indique que le modèle E produit des prédictions significativement plus précises que les modèles A ( $p=0,0024$ ), B (0,0015), C (0,0425) et D (0,0005). Par contre, il la précision exactitude de ses prédictions n'est pas significativement différente de celles du modèle F (0,0522).

Les données individuelles de concentrations d'amoxicilline observées et prédites en fonction du temps par chaque modèle sont illustrées à l'annexe 4 du présent mémoire.

Figure 19 : Résidus ( $C_p$  prédite moins  $C_p$  mesurée) des concentrations plasmatiques d'amoxicilline prédites par chaque modèle en fonction du temps de prélèvement sanguin.

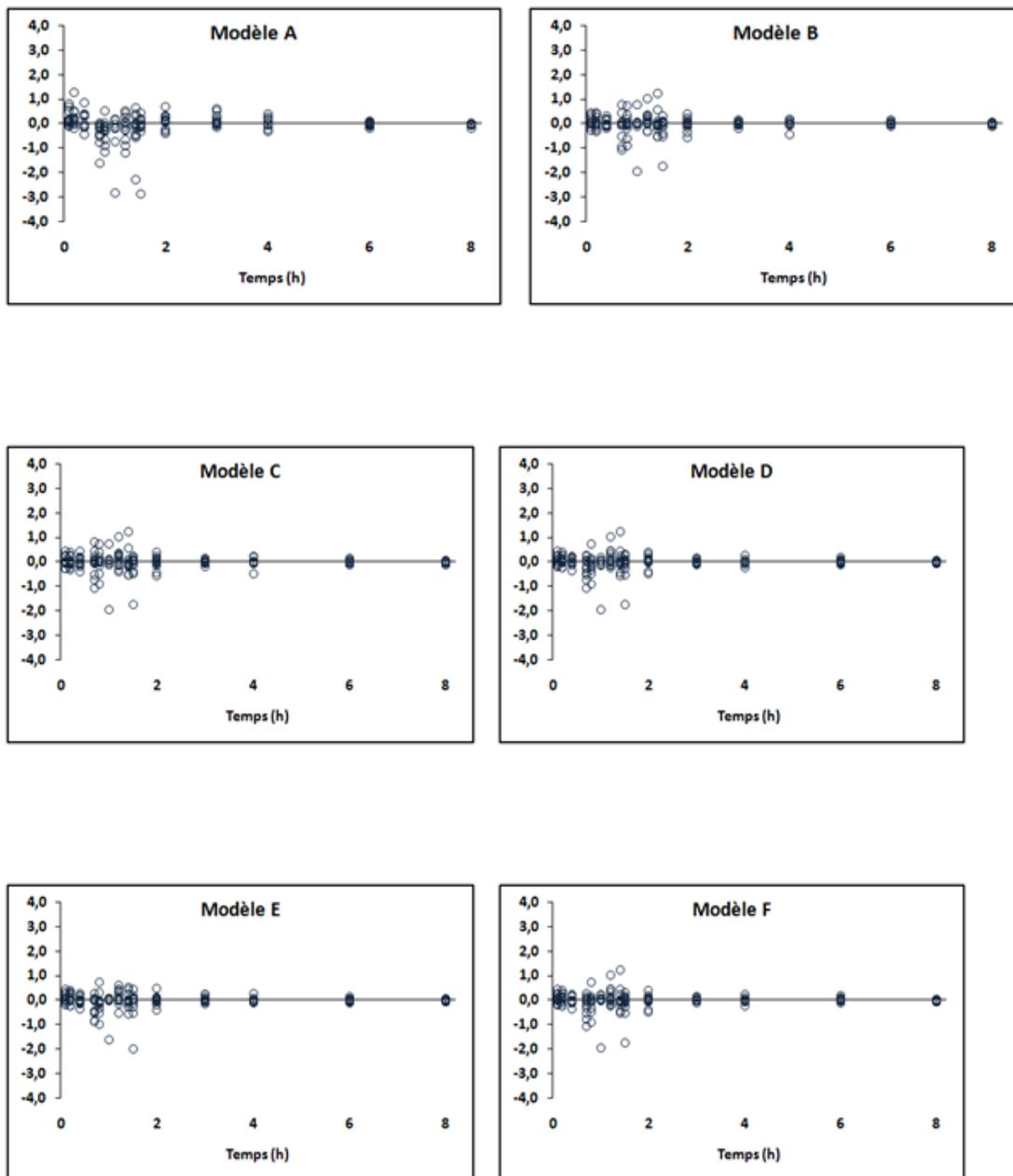
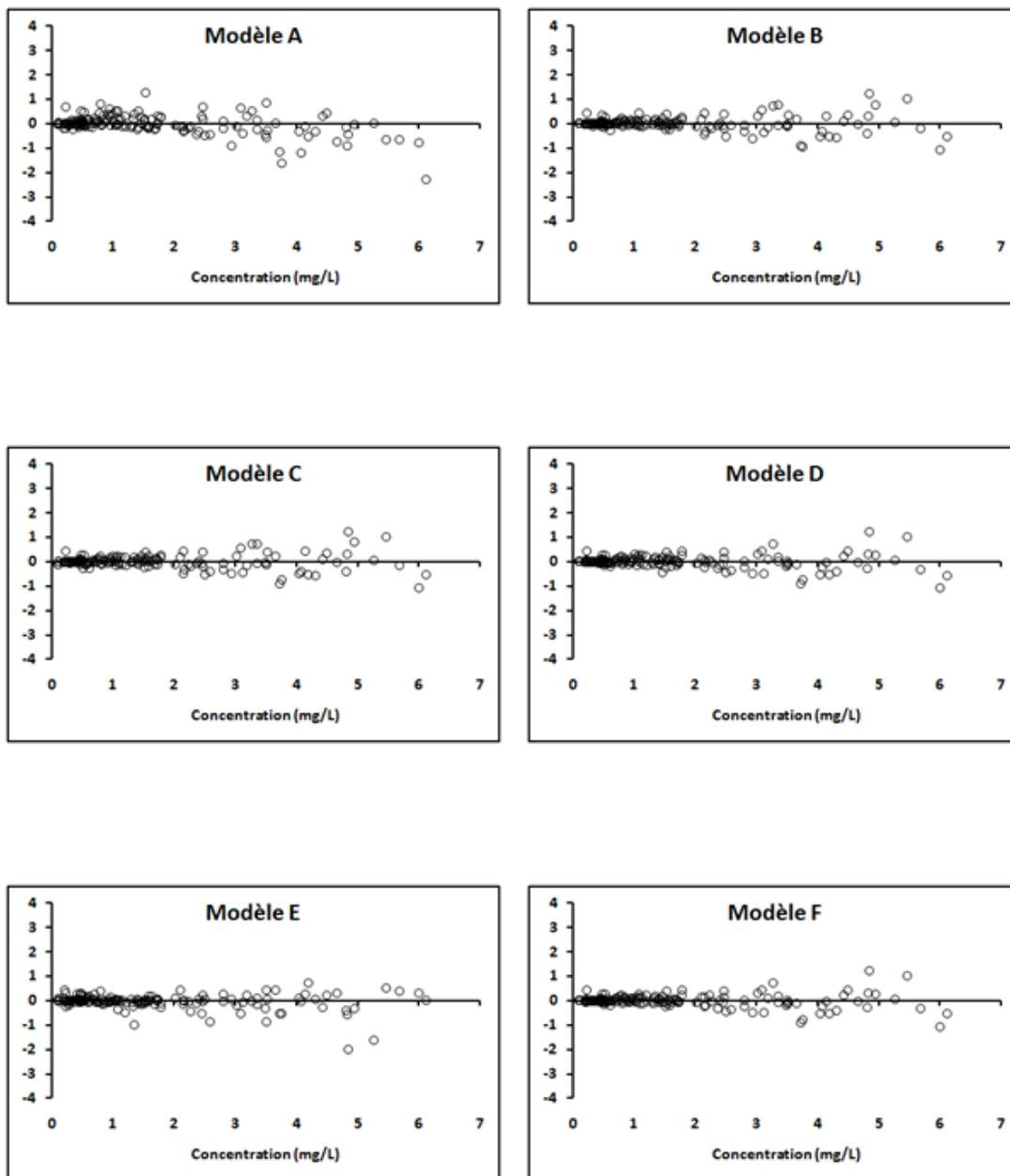


Figure 20 : Résidus ( $C_p$  prédite moins  $C_p$  mesurée) des concentrations plasmatiques d'amoxicilline mesurées par chaque modèle en fonction de la concentration d'amoxicilline mesurée.



## 5 Discussion

### 5.1 **Critique de la méthodologie en fonction de l'hypothèse et des objectifs**

Il a été démontré que le transporteur PepT1 est impliqué dans l'absorption orale des petits peptides mais aussi de molécules peptidomimétiques comme l'amoxicilline (Brodin *et al.*, 2002, Luckner et Brandsch, 2005, Sala-Rabanal *et al.*, 2006). La présence de ces transporteurs est décelée dans le tiers supérieur du petit intestin de plusieurs espèces dont le porc (Boll *et al.*, 1994, Freeman *et al.*, 1995, Klang *et al.*, 2005). Nous avons émis l'hypothèse que la faible biodisponibilité orale de l'amoxicilline s'expliquait par la saturation des transporteurs. Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs étaient de caractériser la pharmacocinétique orale de cet antibiotique à différentes doses, de développer un modèle pharmacocinétique spécifique et finalement de déterminer la capacité maximale d'absorption orale du porcelet sevré pour cet antibiotique.

L'élaboration du protocole expérimental a été effectuée en tenant compte de l'état actuel des connaissances des processus physiologiques impliqués dans la pharmacocinétique de l'amoxicilline, ce qui à notre connaissance, n'avait jamais été fait en médecine vétérinaire pour cet antibiotique jusqu'à maintenant (Figure 9). Afin de minimiser le contenu en peptides de l'intestin d'interférer avec l'absorption du médicament, les animaux ont été mis à jeun 12 heures avant le début du traitement et

ont été nourris le jour de l'expérience avec un aliment composé essentiellement d'amidon, qui ne contient que 0,3 % de protéines (NRC, 2001) De plus, dans le but de s'assurer de la quantité d'amoxicilline administrée, l'aliment a été administré de façon instantanée via un tube de gastrostomie. L'excrétion de l'amoxicilline s'effectuant principalement au niveau du rein via l'urine (Petri Jr., 2001, Plumb, 2002), l'emploi d'un cathéter urinaire pour le recueil du volume total d'urine produit durant la cinétique a permis de déterminer la quantité d'antibiotique excrétée par cette voie afin de pouvoir incorporer ce paramètre au modèle pharmacocinétique. Étant donné la possibilité qu'avait l'antibiotique de subir un phénomène de premier passage hépatique, des prélèvements sanguins simultanés ont été effectués au niveau de la veine porte et de l'artère aorte, soit respectivement en amont et en aval du foie. Les données ainsi recueillies ont permis de déduire la contribution du processus de clairance hépatique dans l'élimination de la molécule (Équation 11). Bien que la capacité du foie à concentrer l'amoxicilline dans la bile soit connue depuis longtemps (Maugdal *et al.*, 1982), le modèle pharmacocinétique compartimental élaboré dans la présente étude est à notre connaissance le premier à le considérer. La détermination de la quantité d'antibiotique éliminée grâce à la prise d'échantillons sanguins tant au niveau artériel que veineux et la récolte du volume d'urine a aussi permis de déterminer des valeurs de biodisponibilité. En examinant la variation de ce paramètre en fonction de la dose, nous avons pu déterminer la capacité maximale d'absorption de l'antibiotique chez le porcelet sevré, ce qui n'avait été réalisé jusqu'à maintenant chez aucune espèce animale ni chez l'homme.

D'autres techniques *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* auraient pu être utilisées pour investiguer l'absorption intestinale de l'amoxicilline mais n'ont pas été retenues. Les expériences sur tapis de cellules de l'épithélium intestinal auraient par exemple permis d'observer le phénomène de saturation du transporteur PepT1 et les paramètres qui s'y rattachent telles l'affinité du transporteur pour l'antibiotique et la vitesse maximale de transport. Cependant, cette technique fait abstraction des autres composants de l'organisme impliqués dans la mise à disposition du médicament (système circulatoire et organes émonctoires), et elle ne permet pas de déterminer ses principaux paramètres pharmacocinétiques telles la biodisponibilité et la clairance.

Des techniques faisant intervenir une anse intestinale auraient pu être utilisées : *in vivo*, cette technique permet de caractériser la saturation du transporteur et permet d'estimer la biodisponibilité. Cependant, la complexité chirurgicale qu'implique ce type d'expérimentation et son incapacité à tenir compte de la recirculation entérohépatique de l'antibiotique la rendent peu attrayante. *Ex vivo*, le segment intestinal n'étant plus relié au système circulatoire et aux différents organes, cette technique est sujette aux mêmes inconvénients que l'expérimentation sur tapis cellulaire.

Différentes modifications auraient pu être apportées à notre protocole pharmacocinétique *in vivo*. Par exemple, un cathéter jugulaire aurait pu être inséré pour administrer la dose par voie intraveineuse afin de déterminer la biodisponibilité orale et caractériser la distribution et l'élimination de l'antibiotique. Une cinétique

supplémentaire avait eu pour effet d'augmenter le nombre d'échantillons et de ce fait, les coûts d'analyse, d'allonger le temps d'utilisation des porcs pour permettre le remplacement des hématies perdues lors de l'échantillonnage, cette modification n'a donc pas été retenue.

Plusieurs études portant sur la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline aussi bien chez le porc que chez d'autres espèces font intervenir une analyse par moments statistiques des données (Agersø et Friis, 1998; Reyns *et al.*, 2007), dont l'une des prémisses stipule que les mouvements des molécules dans le système pharmacocinétique à l'étude sont indépendants des autres molécules (Shargel *et al.*, 2004). Or, il est rapporté que la cinétique est de type Michaelis-Menten, ce qui implique que le transfert des molécules dépend de l'état d'occupation du transporteur par les autres molécules administrées. Pour cette raison, les paramètres pharmacocinétiques obtenus par cette méthode d'analyse ne peuvent être généralisés. De plus, ce type d'analyse ne permet pas la prédiction de concentrations plasmatiques qui auraient permis la détection de l'absence de linéarité du processus d'absorption. Or dans le cas de l'amoxicilline, on rapporte que l'absorption orale ne s'effectue pas selon un processus d'ordre un (Paintaud *et al.*, 1992) ce qui a été confirmé dans la présente étude de même que par Piotrovskij *et al.* (1994) où l'implication d'un processus saturable prépondérant a été rapportée.

À notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à maintenant incorporé deux voies d'absorption parallèles, l'une d'ordre 1 et de type Michaelis-Menten est une

première dans l'analyse pharmacocinétique compartimentale de l'amoxicilline chez les animaux domestiques. Chez l'homme, l'hypothèse de ce type d'absorption avait été déduite par Paintaud *et al.* (1992) mais ce n'est que Piotrovskij *et al.* (1994) qui fut le premier à l'inclure (Figure 12; p.42). Le modèle élaboré dans notre étude s'inspire de ceux élaborés par ces chercheurs. Ainsi, une double voie d'absorption dont l'une traduit une absorption de type Michaelis-Menten qui est limitée dans le temps attribuable à PepT1 et une d'ordre un attribuable à l'absorption passive. Il possède aussi un compartiment de distribution (compartiment 2) et une seule voie d'élimination à partir du compartiment central. À la différence du modèle choisi, le modèle de Piotrovskij *et al.* (1994) ne comporte pas de constante attribuable à l'élimination hépatique

L'emploi d'un compartiment tampon et d'un transfert  $k_{SYS}$  par Piotrovskij *et al.*, (1994) est attribué par ces derniers à l'accumulation et au passage dans les entérocytes. Il aurait été plus adéquat, étant donné que ces derniers ont utilisé une suspension d'antibiotique, d'inverser les constantes de transfert des compartiments 3 et 4 de façon à ce que  $k_{SYS}$  traduisent la dissolution du médicament dans le tractus digestif pour ensuite être soumis à l'absorption. La voie d'accès à l'absorption de type Michaelis-Menten est limitée dans le temps à cause du transit et de la présence du transporteur dans la partie proximale.

Une limite du modèle élaboré par Piotrovskij et ses collaborateurs et de celui présenté dans cette étude est cependant qu'il n'est valide qu'avec l'administration

d'une dose unique car, c'est la valeur de  $C_{\max}$  qui détermine la durée de  $T_{\text{abs}}$ . Ainsi, l'administration d'une seconde dose aura pour effet d'incorporer une nouvelle quantité de molécules dans le compartiment d'absorption où la voie d'absorption par PepT1 est mathématiquement nulle, ce qui n'est physiologiquement pas réaliste.

## 5.2 **Caractérisation de la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline**

### 5.2.1 Absorption

Différents profils pharmacocinétiques peuvent être observés suite à l'administration orale d'une molécule. On pourra classer ces profils en fonction des caractéristiques de leur phase d'absorption. Ainsi, on qualifiera de typique un processus où le médicament est transféré soit par un processus d'ordre un, soit par un processus d'ordre zéro, ces processus demeurant invariables en fonction du temps et de la dose. Lorsque ces conditions ne sont pas respectées, on parlera d'une absorption atypique (Zhou, 2003) : entre autres, on peut retrouver des processus parallèles ou séquentiels d'ordre un et d'ordre zéro, des processus saturables ainsi que des processus limités dans le temps ou l'espace.

Dans notre étude avec l'amoxicilline, l'examen des profils de concentrations plasmatiques en fonction du temps pour les différentes doses administrées (Annexe 4) laisse présager une absorption atypique. D'une part, une majorité des profils démontrent une variation de la vitesse de transfert à partir du troisième ou quatrième

temps de prélèvement, qui se traduit par une augmentation soudaine de la pente de la phase d'absorption. D'autre part, la géométrie de la phase d'absorption change avec la dose : à la dose de 4 mg/kg, la transition entre la phase d'absorption et celle d'élimination est très brusque, alors qu'aux doses de 20 et surtout 30 mg/kg la transition entre ces deux phases est plus douce, ce qui donne à la courbe un aspect plus arrondi. D'autre part, la présence de deux pics dans les profils de concentrations est un indice supplémentaire qui laisse suspecter la présence d'une absorption atypique.

Les différents modèles testés dans l'étude ont permis de déterminer la présence de deux processus parallèles, l'un d'ordre un, l'autre de type Michaelis-Menten. En effet, les modèles A, B et C qui se caractérisent respectivement par des processus d'absorption d'ordre un, de type Michaelis-Menten et d'ordre zéro ne s'ajustaient pas adéquatement aux données expérimentales. Ce résultat implique le rejet de l'hypothèse nulle (modèle A) correspondant à une augmentation linéaire de la vitesse d'absorption avec la dose administrée ce qui sous-entend qu'il est faux de prétendre qu'une augmentation de la dose se traduit par une augmentation proportionnelle de l'exposition systémique. L'incapacité des modèles A et C à s'ajuster aux données expérimentales sont cohérents avec les résultats obtenus par Paintaud *et al.* (1992) et par conséquent, il semble nécessaire d'avoir recours à des modèles dotés de processus d'absorption parallèles. Le profil des courbes rappelant celui observé suite à une perfusion, particulièrement aux doses inférieures suggère que ces processus se produisent simultanément (Zhou, 2003). Initialement l'emploi

d'un temps de délais entre les deux processus n'a pas permis d'améliorer l'ajustement du modèle aux données et détériorait la précision des estimations des paramètres pharmacocinétiques, ce qui suggère que les processus se produisent simultanément.

Dans cette étude, les valeurs de temps auxquels on observe la concentration plasmatique maximale d'amoxicilline sont similaires à celles rapportées dans d'autres études de cinétique orale de cet antibiotique chez le porc (Agersø et Friis, 1998, del Castillo *et al.*, 1998, Reyns *et al.*, 2007). Il a cependant été observé que la valeur de  $t_{MAX}$  augmentait significativement à des doses d'amoxicilline supérieures ou égales à 20 mg/kg (Figure 14), ce qui complète les informations de la phase d'absorption. En effet, l'augmentation de la dose administrée d'amoxicilline aurait pour effet que le transporteur PepT1 se maintienne plus longtemps dans un état de saturation suite à son administration, ce qui permettrait l'absorption par voie passive d'une plus grande quantité d'antibiotique et entraînerait une prolongation de la phase d'absorption de la courbe des concentrations en fonction du temps ainsi que des signes visibles de la superposition des deux processus d'absorption. Ainsi aux doses de 4 et 12 mg/kg l'absorption par voie passive serait à peine détectable alors qu'aux doses de 20 et 30 mg/kg, ce phénomène serait plus facilement identifiable. En résumant, aux plus faibles doses, l'absorption de l'amoxicilline se fait dans le premier tiers de l'intestin grêle où se localise la majorité des transporteurs PepT1 alors qu'aux doses plus élevées, c'est tout l'intestin grêle qui participe à son absorption, ce qui explique l'apparition plus tardive du pic d'absorption.

Il est à noter que la valeur moyenne de  $t_{MAX}$  rapportée chez l'homme est plus tardive que chez le porc. La raison de cette différence s'explique par la vitesse de transit intestinal qui est plus rapide chez le porc que chez l'homme (Pond et Mersmann, 2001). Par conséquent, la présence de l'antibiotique dans la fenêtre d'absorption chez le porc devrait être plus courte chez le porc que chez l'homme ce qui aurait pour conséquences des valeurs de biodisponibilité orale plus faibles.

### **5.2.1.1 Biodisponibilité de l'amoxicilline selon la dose orale**

Une chute significative de la biodisponibilité de l'amoxicilline a été observée entre les doses de 4 et 12 mg/kg (Figure 18) soit de 52 à 23%. Par la suite la biodisponibilité demeure la même malgré une augmentation de la dose. Cette valeur de biodisponibilité bien que calculée en absence d'une administration intraveineuse est du même ordre que celles rapportées par différents auteurs (Agersø et Friis, 1998, Agersø *et al.*, 1998, del Castillo *et al.*, 1998, Reyns *et al.*, 2007). En effet l'intervalle de confiance de la biodisponibilité obtenu dans cette étude démontre un chevauchement considérable avec celles rapportées par ces auteurs. À l'heure actuelle, aucune étude impliquant autant de doses différentes d'amoxicilline administrées par voie orale ne semble avoir été publiée, toutefois, del Castillo *et al.* (1998) qui ont administré des doses de 3 et 15 mg/kg d'amoxicilline par voie orale à des porcs dans des conditions similaires ne rapportent pas d'augmentation significative de biodisponibilité avec la dose. À la lumière des résultats obtenus et sachant que la biodisponibilité dépend de la clairance totale (Équation 14) on peut tenter d'expliquer ce phénomène par l'augmentation de la clairance totale qui elle

s'explique par une augmentation de la clairance hépatique. Une autre cause possible d'une plus faible biodisponibilité est reliée aux mécanismes d'absorption intestinaux impliquées dans l'absorption

### **5.2.1.2 Détermination de la capacité maximale d'absorption**

La détermination de la capacité maximale d'absorption de l'amoxicilline chez le porcelet sevré a pu être vérifiée en mettant en relation la biodisponibilité orale de l'amoxicilline en fonction des doses administrées (Figure 12). La biodisponibilité orale de l'amoxicilline étant la fraction qui lorsqu'administrée par cette voie, atteint la circulation systémique, l'atteinte d'un plateau de F à  $23 \pm 5,8\%$  à partir de la dose de 12 mg/kg indique donc qu'au-delà de cette dose, la quantité en circulation n'augmente pas. Ce phénomène va toutefois à l'encontre des résultats prévisibles sur la base du fort degré d'homologie entre le transporteur PepT1 porcin et humain (Hagos *et al.*, 2002, Hagos *et al.*, 2005) et où la valeur maximale de biodisponibilité se situe à 90% (Piotrovskij *et al.*, 1994).

### **5.2.2 Élimination de l'amoxicilline par le foie**

La présence de deux pics dans les profils pharmacocinétiques oraux comme c'est le cas pour les doses de 12, 20 et 30 mg/kg (Annexe IV) est souvent un indice de la présence d'un cycle entérohépatique dans la pharmacocinétique de l'antibiotique (Roberts *et al.*, 2002, Zhou, 2003). Cependant, on peut aussi retrouver deux pics de concentrations plasmatiques en cas de vidange biphasique de l'estomac ou de changement de valeur de pH qui affecte la solubilisation du médicament dans le

tube gastro-intestinal (Roberts *et al.*, 2002). D'autres caractéristiques des profils pharmacocinétiques, entre autre, une diminution de la valeur de sa pente terminale, laissent aussi présager l'existence de ce phénomène (Marier *et al.*, 2002 ). Cette dernière caractéristique à été observée dans nos courbes de concentrations en fonction du temps, surtout aux doses de 4 et 12 mg/kg (Annexe 4).

Les concentrations plasmatiques aortiques d'amoxicilline sont inférieures à celles mesurées simultanément au niveau la veine porte (Figure 13). Si l'on accepte le postulat énonçant que l'extraction pulmonaire de cet antibiotique est nulle, cette variation indique que le foie est un organe d'élimination de l'amoxicilline chez le porc. Nos observations sont similaires à celles de Maudal *et al.* (1982) et Mizen *et al.* (1995) décrites à la section 1.3.3.2.2 de ce mémoire et les résultats de nos modélisations avec le modèle E fournissent la première confirmation explicite de l'existence de l'existence d'un cycle entérohépatique pour l'amoxicilline chez le porc. Martínez Larrañaga *et al.*, (2004) ont déjà spéculé sur l'existence de ce cycle pour l'amoxicilline, mais les raisons invoquées par ces auteurs ne permettaient pas d'arriver à une telle conclusion. En effet, leur affirmation repose sur l'observation de la pente terminale du profil pharmacocinétique oral, dont la valeur est de 22% inférieure à celle de la courbe des concentrations obtenues suite à l'administration intraveineuse. Ce ralentissement de la pente terminale peut aussi être aussi expliqué par une vitesse de dissolution et/ou d'absorption plus lente que celle à laquelle le médicament est éliminé de l'organisme. Ce ralentissement peut être causé par l'absorption des molécules d'antibiotique sur les particules alimentaires. Or,

Martínez Larrañaga *et al.*, (2004) ont omis de mettre à jeun les animaux avant l'administration orale d'amoxicilline.

Les résultats rapportés au tableau VIII et à la figure 17, qui concernent l'augmentation du niveau d'implication du foie dans le processus d'élimination de l'amoxicilline, sont compatibles avec les résultats publiés par Mizen *et al.*, (1995) chez le rat et celle de Maudal *et al.*, (1982) chez l'homme. Ces deux études ont été décrites à la section 1.3.3.2.2 de ce mémoire. L'excrétion de l'antibiotique dans la bile s'effectuant de façon active, ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation de la vitesse de transport jusqu'à la saturation (Roberts *et al.*, 2002). Ce phénomène aura des conséquences sur la fraction biodisponible à des doses plus élevées : en augmentant la dose, on obtient une diminution du coefficient d'extraction, ce qui aura pour effet d'augmenter la proportion de molécules qui atteignent la circulation systémique. On a noté que la biodisponibilité ne diminue pas jusqu'à devenir presque nulle, mais se maintient aux alentours de 20% malgré une augmentation de la dose administrée. Deux éléments contribuent à ce phénomène, l'absorption par voie passive expliquée précédemment et la saturation de la clairance hépatique. Étant donné la complexité du modèle employé, un processus d'élimination d'ordre un a été utilisé pour l'élimination et le retour hépatique, ce qui limite la capacité du modèle à illustrer cette situation. Toutefois, on observe que l'élimination se fait de façon linéaire aux doses de 4, 12 et 20 mg/kg et n'atteint pas la saturation à 30 mg/kg.

### 5.2.3 Élimination de l'amoxicilline par les voies rénales

L'excrétion rénale est la principale voie d'élimination de l'amoxicilline (Sjöval *et al.*, 1978, Meng, *et al.*, 2006). Tel que mentionné précédemment, on observe que la quantité d'amoxicilline excrétée dans l'urine augmente avec le temps jusqu'à environ 9 heures pour atteindre un plateau dans les profils illustrés (Figure 16). Ceci indique que la période de récolte de l'urine a été suffisamment longue pour récupérer l'antibiotique absorbé.

Nos résultats indiquent que la clairance rénale de l'amoxicilline est linéaire par rapport à la dose administrée (figure 17). Ce résultat est compatible avec ce qui a déjà été observé en employant différentes méthodes chez l'homme (Sjöval *et al.*, 1985). Il est connu que l'élimination de l'amoxicilline dans le rein s'effectue majoritairement par sécrétion tubulaire via des transporteurs d'anions organiques (Bryskier, 1999, Dresser, *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2006) plus précisément OAT1 et qu'il existe une homologie de 89% dans la séquence d'acides aminés codant pour cette protéine (Hagos *et al.*, 2002, Hagos *et al.*, 2005). Par conséquent nos résultats étaient anticipés et sont confirmés par les données de la littérature.

### 5.3 **Modèle pharmacocinétique de l'absorption orale de l'amoxicilline**

Le modèle pharmacocinétique élaboré dans cette étude à partir des connaissances actuelles des mécanismes d'absorption intestinale de l'amoxicilline.

Basé sur le modèle traduisant l'hypothèse nulle, voulant que l'absorption s'effectue uniquement selon un processus passif (modèle A) différents modèles ont été élaboré jusqu'à obtenir le modèle final (modèle E). La comparaison statistique des valeurs d'Akaike des modèles entre eux a permis de déterminer le caractère essentiel de chaque composante, lesquels sont associés à processus physiologiques.

Par exemple, la comparaison des valeurs d'Akaike du modèle A (tableau VI, p. 63) avec celles du modèle E (modèle complet) a permis de démontrer que le modèle complet permettait un ajustement significativement meilleur aux données ( $p < 0,05$ ), ce qui indique qu'une absorption mixte c'est-à-dire à la fois passive et de type Michaelis-Menten limitée dans le temps représentait de façon plus adéquate. La supériorité du modèle E par rapport au modèle B et C a respectivement permis de conclure que l'absorption de l'amoxicilline ne s'effectuait pas uniquement selon un processus de type Michaelis-Menten ou d'ordre zéro uniquement.

L'ajustement des données au modèle E étant significativement meilleur que celui du modèle D permet de conclure à la présence du phénomène recirculation entérohépatique de l'antibiotique. La comparaison entre le modèle complet et le modèle F caractérisé par une saturation en permanence de la voie d'absorption par les transporteurs intestinaux permet étant à la limite de du caractère significatif ( $p = 0,052$ ) et s'avérant inférieur au modèle complet que par la présence d'une plus forte hétérosédasticité.

Une limite de ce modèle est qu'il ne peut être appliqué en situation d'administrations répétées car la valeur de la durée d'accès au transporteur est établie à partir de la valeur de  $t_{MAX}$ . Au-delà de cette valeur, le modèle considère comme inaccessible la voie de transport actif, ne laissant comme processus d'absorption de la molécule, que la voie passive, ce qui est physiologiquement irréaliste dans ces conditions. Une seconde limite de ce modèle est sa difficulté d'emploi en raison de sa sensibilité aux données initiales. Cette sensibilité est attribuable à la présence d'une équation différentielle non linéaire liée à l'absorption de type Michaelis-Menten et requiert une expérience accrue de la part de l'utilisateur.

Certaines études de pharmacocinétique orale de l'amoxicilline ont fait le postulat d'une absorption uniquement de façon passive (Agersø et *al.*, 1998b). Or les données de cette étude et le résultat de notre démarche de modélisation prouvent le contraire : d'observer une saturation de l'absorption avec une augmentation de la dose. Par exemple, Agersø et son équipe (1998) ont décrit l'évolution temporelle de l'exposition systémique à l'amoxicilline administrée via l'eau de boisson en élevage porcin à l'aide d'une superposition d'un profil pharmacocinétique issu d'une étude antérieure, qui avait été analysé par la méthode des moments statistiques. L'une des prémisses à la base de leur analyse pharmacocinétique est que chaque dose d'antibiotique ingérée agit indépendamment de la précédente, ce qui devrait se traduire par une absorption et une clairance similaires d'une dose à l'autre. Or la présente étude démontre qu'une telle approche est erronée, le modèle A traduisant une absorption uniquement par voie passive ne permettant pas d'obtenir un

ajustement adéquat des données obtenues. De plus, les implications découlant de leur prémisses soit que la vitesse d'absorption et la clairance soient invariables sont incompatibles avec les résultats obtenus dans cette étude.

#### 5.4 **Critique et pertinence du projet**

Les  $\beta$ -lactamines ont toujours été considérées comme les antibiotiques de choix dans le traitement des infections causées par *Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis* chez le porc. Notre recension de la littérature a permis de conclure que la résistance de ces bactéries à cette famille d'antibiotiques ne permet pas d'expliquer les échecs thérapeutiques rapportés par les vétérinaires. Cependant, l'augmentation des doses administrées par voie orale n'a pas réussi à enrayer ces échecs, ce qui nous a incités à se questionner sur le processus d'absorption orale de ces antibiotiques. L'étude décrite dans ce mémoire a mis en évidence que l'amoxicilline est absorbée par un mécanisme qui atteint un taux de saturation même aux doses communément utilisées en pratique.

La détermination de la capacité maximale d'absorption orale de l'amoxicilline chez le porc est le point de départ d'une amélioration d'un axe de recherche visant à promouvoir un usage thérapeutique rationnel de cet antibiotique. Il est à noter que les résultats de cette étude ont été obtenus en état de carence en protéines alimentaires afin d'éviter un processus d'interférence entre l'amoxicilline et les protéines pour le transporteur. Les études subséquentes devraient entre autres caractériser l'ampleur de cette interférence et ainsi que trouver les moyens de l'éviter ou la minimiser.

## 6 Conclusion

Cette étude nous permet d'émettre les conclusions suivantes :

- La dose maximale d'amoxicilline qui peut être administrée sans entrave à sa biodisponibilité orale chez le porc, est inférieure à 12 mg/kg de poids vif. Cette donnée constitue une première en pharmacologie vétérinaire. Nos résultats confirment des études effectuées sur rongeurs et humains effectuées entre 1970 et 1990 avaient déjà mis en évidence ce phénomène de saturation.
- La dose maximale sans saturation obtenue chez le porc est inférieure à ce qui a été rapporté chez l'homme. Hormis les différences méthodologiques, associées à ces études, deux éléments pourraient expliquer cette différence. D'une part la physiologie du transporteur notamment en ce qui a trait à la capacité de transport et à l'affinité du complexe transporteur-substrat. D'autre part, la vitesse de transit intestinal qui est supérieure chez le porc par rapport à celle observée chez l'homme et qui contribuerait ainsi à expliquer la plus forte biodisponibilité de l'amoxicilline chez ce dernier. Des études sont envisagées pour caractériser l'importance de ces deux éléments.
- Enfin, la stratégie d'augmentation des doses dans le but d'améliorer la maîtrise des maladies à *Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis* s'est avérée inappropriée car elle accroît le risque de saturation du transporteur avec les conséquences qui lui sont connues. D'autres changements dans le schéma thérapeutique notamment, la fréquence et les conditions d'administration devraient être privilégiés.

## 7 Bibliographie

**Aarestrup, F.M., Jorsal, S.E., Jensen, N.E.** (1998). Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Veterinary microbiology*, **60**: 59-66.

**Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Angen, Ø.** (2004). Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattles in Denmark. *Veterinary microbiology*, **101**: 143-146.

**Agersø, H., Friis, C.** (1998a). Bioavailability of amoxicillin in pigs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **21**: 41-46.

**Agersø, H., Friis, C., Haugegaard J.** (1998). Water medication of a swine herd with amoxicillin. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **21**: 199-202.

**Amass, S.F., Wu, C.C., Clark, L.K.** (1996). Evaluation of antibiotics for the elimination of the tonsillar carrier state of *Streptococcus suis* in pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **8**: 64-67.

**Amidon, G.L., Lee, H.J.** (1994) Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology* **32**: 321-341.

**Anfossi, P., Zaghini, A., Grassigli, G., Menotta, S., Fedrizzi, G. (2002).** Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **25**: 329-334.

**Azoulay-Dupuis, E., Moine, P., Bedos, J.P., Rieux, V., Vallee, E. (1996)** Amoxicillin dose-effect relationship with *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model and roles of in vitro penicillin susceptibilities, autolysis and tolerance properties of the strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **40**: 941-946.

**Barr, W.H., Zola, E.M., Candler, E.L., Hwang, S.M., Tendolkar, A.V., Shamburek, R., Parker, B., Hilty, M.D. (1996).** Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **56**: 279-285.

**Barragry, T.H. (1994).** Mass medication and diseases of swine. *Veterinary drug therapy*. Barragry, T.H. (Ed), Malverne, É.U., Lippincott Williams & Wilkins: 565-596.

**Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H., Rolinson, G.N. (1959).** Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* **183**: 257-258

**Boll, M., Markovich, D., Weber, W.M., Korte, H., Daniel, H., Murer, H.** (1994). Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides,  $\beta$ -lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *European journal of physiology*, **429**: 146-149.

**Brandsch, M., Knütter, I., Leibach, F.H.** (2004). The intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *European journal of pharmaceutical sciences*, **21**: 53-60.

**Bretschneider, B., Brandsch, M., Neubert, R.** (1998). Intestinal transport of  $\beta$ -lactam antibiotics: Analysis of the affinity at the H<sup>+</sup>/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharmaceutical Research*, **16**: 55-61

**Brodin, B., Nielsen, C.U., Steffansen, B., Frokjaer, S.** (2002) Transport of Peptidomimetic Drugs by the Intestinal Di/tri-peptide Transporter, PepT1. *Pharmacology and Toxicology* **90**: 285-296.

**Bryskier, A.** (1999). Pénicillines. *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*. Paris, France, Éditions Éllipses : 157-224.

**Bud, R.** (2007) Penicillin: Triumph and tragedy. Norfolk, Angleterre, Oxford University Press. 340 p.

**Cain, D., Malouin, F., Darqis, M., Harel, J., Gottschalk, M.** (1995).

Alterations in penicillin-binding proteins in strains of *Streptococcus suis* possessing moderate and high levels of resistance to penicillin. *FEMS Microbiology letters*, **130**: 121-128.

**Camprodon Ylla, F.** (2003). Epizootic wave during post-weaning period in

Spain. *Focus on Haemophilus parasuis Why does Glasser disease occur? How to manage clinical cases*. G.P., Virbac Animal Health.

**Carr, J.** (2003) Enzootic/epizootic episode in gilts during acclimatisation in

UK. *Focus on Haemophilus parasuis Why does Glasser disease occur? How to manage clinical cases*. Martineau, G.P., Virbac Animal Health.

**Chadha, R., Kashid, N., Jain, D.V.** (2003). Kinetic studies of the

degradation of an aminopenicillin antibiotic (amoxicillin trihydrate) in aqueous solution using heat conduction microcalorimetry. *The journal of pharmacy and pharmacology*, **55**: 1495-1503.

**Chain, E, Florey, H.W., Gardner, A.D.** (1940). Penicillin as a

chemotherapeutic agent. *Lancet*, **236**: 226-228.

**Chambers, F.H.** (2005). General principles of antimicrobial therapy. **Ch. 42:**

pp1095-1110. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*.

Burton, L., Lazo, J., H., Parker, K.L. McGraw-Hill Professional.

**Chen, H., Wong, E.A., Webb, K.E. Jr.,** (1999). Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs, and chickens. *Journal of animal science*, **77**: 1277-1283.

**Chen, H., Pan, Y., Wong, E.A., Webb, K.E. Jr.** (2005). Dietary protein level and stage of development affect expression of an intestinal peptide transporter (cPepT1) in chickens. *The Journal of nutrition*, **135**: 193-198.

**Chesa-Jiménez, J., Peris, J.E., Torres-Molina, F., Granero, L.** (1994) Low Bioavailability of Amoxicillin in Rats as a consequence of Presystemic Degradation in the Intestine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **38**: 842-847.

**Clifton-Hadley, F.A.** (1986). *The epidemiology, diagnosis, treatment and control of Streptococcus suis type 2 infection. American association of swine practionners.* Minneapolis, MN, É.U.

**Cooke, B.C.** (1984). Instability of penicillin in feed. *Veterinary Record*, **115**: 447-448.

**Craig, W.A.** (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical infectious diseases*, **26**: 1-10.

**De Bruijne, A.W., Vreeburg, H., Van Steveninck, J.** (1983) Kinetic analysis of L-lactate transport in human erythrocytes via the monocarboxylate-specific carrier system. *Biochimica et biophysica acta*, **732** : 562-568.

**del Castillo, J.R.E.** (1996). Biodisponibilité orale et parentérale des pénicillines naturelles utilisées en prophylaxie de la streptococcie chez le porcelet sevré. Sciences cliniques vétérinaires, Saint-Hyacinthe, Université de Montréal.

**Mémoire de maîtrise : 100**

**del Castillo, J.R.E., Roy, J.J., Messier, S., Higgins, R., Besner, J.-G., Martineau, G.-P.** (1998). Métaphylaxie de *Streptococcus suis* chez le porcelet sevré avec l'amoxicilline orale. *Journées de la recherche porcine en France*, **30** : 411-416.

**Demain, A.L., Elander, R.P.,** (1999) The beta-lactam antibiotics: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **75**: 5-19.

**Derrieu, G., Raynier, B., Ascher, F., Gardey, L.** (2000). Intérêt de l'utilisation de l'amoxicilline stabilisée pour la fabrication d'aliment médicamenteux. *Revue de médecine vétérinaire*. **151** : 109-117.

**Doyle, F.P., Nayler, J.H.C.** (1964). Penicillins and related structures. *Advances in drug research*, **1**: 1-69.

**Dresser, M.J., Gray, A.T., Giacomini, K.M.** (2000) Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1).

*The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **292**: 1146-1152.

**Embrechts, E.** (1982). Procaine penicillin toxicity in pigs. *The Veterinary record*. **111**: 314-315.

**Enerson, B.E., Drewes, L.R.** (2003). Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, **92**: 1531-1544.

**Erickson, R.H., Gum, J.R. Jr, Lindstrom, M.M., McKean, D., Kim, Y.S.** (1995). Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, **216**: 249-257.

**Freeman, T.C., Bentsen, B.S., Thwaites, D.T., Simmons, N.L.** (1995). H<sup>+</sup>/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. *European journal of physiology*, **430**: 394-400.

**Galichet, L.Y., Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, D.** (2004) *Clarke's analysis of drugs and poisons 3<sup>rd</sup> edition*, Pharmaceutical Press, Londres, Angleterre, 2101 p.

**Gagnon, C.A., del Castillo, J.R.E., Music, N., Fontaine, G., Harel, J., Tremblay, D.** (2008). Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Porcine circovirus-2* genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **20**: 545-548.

**Ganapathy, V., Mendicino, J.F., Leibach, F.H.** (1981) Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit. *The Journal of biological chemistry* **256**: 118-124.

**Ganapathy, V., Leibach.** (1982) Peptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles. *Life sciences*. **30**: 2137-2146.

**Geddes, A.M., Klugman K.P., Rolinson, G.N.** (2007) Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **30**: Supp 2. 109-112.

**Gibaldi, M., Perrier, D.** (1982). Multicompartment Models. *Pharmacokinetics 2<sup>nd</sup> edition*. New York, NY, États-Unis, Marcel Dekker inc.

**Groneberg, D.A., Döring, F., Evnott, P.R., Fischer, A., Daniel, H.** (2001). Intestinal peptide transport: ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **281**: G697-G704.

**Hagos, Y., Bahn, A., Asif, A.R., Krick, W., Sendler, M., Burckhardt, G.** (2002) Cloning of the renal organic anion transporter 1 (pOAT1). *Biochimie* **84**: 1221-4.

**Hagos Y., Braun, I.M., Krick, W., Bruchardt, G., Bahn, A.** (2005) Functional expression of pig renal organic anion transporter 3 (pOAT3). *Biochimie* **87**: 421-4.

**Heijenoort, J.V.** (1991) Mécanismes moléculaires de la bactéricidie :  $\beta$ -lactamines. *Bactéricidie : aspects théoriques et thérapeutiques*. Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois, J.-P., Goldstein, F. (Eds.). Paris, France, Éditions Maloinés.

**Hidalgo, I.J., Bhatnagar, P., Lee, C.P., Miller, J., Cucullino, G., Smith, P.L.** (1995). Structural requirements for interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells. *Pharmaceutical research*, **12**: 317-319.

**Higgins, R., Gottschalk, M.** (2006). Streptococcal Diseases. *Diseases of swine*. Straw, B.E., Zimmermand, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J., (Eds), **Ch. 47**: pp.769-784., Ames IO, É.-U., Blackwell Publishing.

**Hussain, I. Kellett, L., Affleck, J., Shepherd, J., Boyd, R.** (2002). Expression and cellular distribution during development of the peptide transporter (PepT1) in the small intestinal epithelium of the rat. *Cell and tissue research*. **307**: 139-142.

**Inui, K., Yamamoto, M., Saito, H.** (1992). Transepithelial transport of oral cephalosporine by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **261**: 195-201.

**Jacquez, J.A.**, (1996) *Compartmental Analysis in Biology and Medicine*, Ann Arbor, États-Unis.

**Jeffrey, L.W.** (2008) *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals: Approved Standard 3<sup>rd</sup> Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 116p.

**Jensen, G.M., Lykkesfeldt, J., Frydendahl, K., Moller, K., Svendsen, O.** (2006). Pharmacokinetics of amoxicillin administered in drinking water to recently weaned 3- to 4-week-old pigs with diarrhea experimentally induced by *Escherichia coli* O149:F4. *American journal of veterinary research* **67**: 648-653.

**Kang, Y.S., Terasaki, T., Tsuji, A.** (1990). Acidic drug transport in vivo through the blood-brain barrier. A role of the transport carrier for monocarboxylic acids. *Journal of pharmacobio-dynamics*, **13**: 158-163.

**Klang, J.E., Burnworth, L.A., Pan, Y.X., Webb, K.E. Jr, Wong, E.A.** (2005). Functional characterization of a cloned pig intestinal peptide transporter (pPepT1). *Journal of animal science*, **83**: 172-181.

**Knütter, I., Rubio-Aliaga, I., Boll, M., Hause, G., Daniel, H., Neubert, K., Brandsch, M.** (2002). H<sup>+</sup>-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **283**: G222-G229.

**Lambert-Zechovsky, N.** (1999). Antimicrobiogramme, méthodes standard et automatiques, lecture impératives. *Bases biologiques de l'antibiothérapie*. Bergogne-Bérézine, E., Brogard, J.-M., Paris, France, Masson.

**Lashev, L.** (1986). Comparative pharmacokinetic research on amoxicillin in agricultural animals *Veterinarno-meditsinski nauki*, **23**: 76-82.

**Leibach, F.H., Ganapathy, V.** (1996). Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annual review of nutrition*, **16**: 99-119.

**Li, M., Anderson, G.D., Phillips, B.R., Kong, W., Shen, D.D., Wang, J.** (2006), Interactions of amoxicillin and cefaclor with human renal organic anion and peptide transporters. *Drug metabolism and disposition* **34**: 547-555.

**Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J.** (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, **46** : 3-26.

**Lister, N., Sykes, A.P., Bailey, P.D., Boyd, C.A., Bronk, J.R.** (1995).

Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: effects of stereospecificity. *The Journal of physiology*, **484**: 173-182.

**Luckner, P., Brandsch, M.** (2005). Interaction of 31 beta-lactam antibiotics with the H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. **59**: 17-24.

**Lutz, M., Espinoza, J., Arancibia, A., Araya, M., Pacheco, I., Brunser, O.** (1987). Effect of structured dietary fiber on bioavailability of amoxicillin. *Clinical pharmacology and therapeutics*. **42**: 220-224.

**MacInnes, J.I., Desrosiers, R.** (1999). "Agents of the « suis-ide diseases » of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*." *Canadian journal of veterinary research*, **62**: 83-89.

**Marrier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.P., Ducharme, M.P.** (2002) Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **302**: 369-373.

**Martínez-Larrañaga, M.R., Anadón, A., Martínez, M.A., Díaz, M.J., Frejo, M.T., Castellano, V.J., Isea, G., De la Cruz, C.O.** (2004). Pharmacokinetics of amoxicillin and the rate of depletion of its residues in pigs. *The Veterinary record*, **154**: 627-632.

**Matsumoto, S., Saito, H., Inui, K.** (1994) Transcellular transport of oral cephalosporins in human intestinal epithelial cells, Caco-2: interaction with dipeptide transport systems in apical and basolateral membranes. *The journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, **270** : 498-504.

**Matthews, D.M.** (1992). *Protein Absorption: Development and Present State of the Subject*. New York, NY, É.-U., Wiley-Liss, 119-146.

**Mattie, H.** (2000). Antibiotics efficacy in vivo predicted by in vitro activity. *International journal of antimicrobial agents*, **14**: 91-98.

**Maudgal, D.P., Maxwell, J.D.** (1982) Biliary excretion of amoxicillin and ceftriaxone after intravenous administration in man. *British journal of clinical pharmacology*. **14**: 213-217.

**Messier, S., Lacouture, S., Gottschalk, M., Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine.** (2008). Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. *The Canadian veterinary journal*. **49**: 461-462.

**Miller, E. L.** (2002). The penicillins: a review and update. *Midwifery and Women's Health*. **47**: 426-434.

**Mizen, L., Berry, V., Woodnutt, G.** (1995). The influence of uptake from the gastrointestinal tract and first-pass effect on oral bioavailability of (Z)-alkoxyimino penicillins. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. **47**: 725-730.

**Nakashima, E., Tsuji, A., Mizuo, H., Yamana, T.** (1984). Kinetics and mechanism of in vitro uptake of amino- $\beta$ -lactam antibiotics by rat small intestine and relation to the intact-peptide transport system. *Biochemical pharmacology*, **33**: 3345-3355.

**Naruhashi, K., Sai, Y., Tamai, I., Suzuki, N., Tsuji, A.** (2002). PepT1 mRNA expression is induced by starvation and its level correlates with absorptive transport of cefadroxil longitudinally in the rat intestine. *Pharmaceutical research*, **19**: 1417-1423.

**National Research Council** (1998) *Nutrient Requirements of Swine 10<sup>th</sup> revised edition* Washington, DC, États-Unis, National Academy Press

**Nelson, D.L., Cox, M.M.** (2005). Amino acids, peptides, and proteins *Lehninger Principles of biochemistry 4<sup>th</sup> edition*. **Ch.3: pp.** 75-115. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Company.

**Nelson, D.L., Cox, M.M.** (2008). Enzymes *Lehninger Principles of biochemistry 5<sup>th</sup> edition*. **Ch.4:pp.** 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.

**Nichols, W.K.** (2000). Anti-Infectives. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. Limmer, D. (Ed) Ch. 87: pp. 1507-1561. Philadelphie, PA, É.U. Lippincott Williams & Wilkins.

**Ogihara, H., Saito, H., Shin, B.C., Terado, T., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Inui, K., Takata, K.** (1996). Immuno-localization of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochemical and biophysical research communications*, **220**: 848-852.

**Ogihara, H., Suzuki, T., Nagamachi, Y., Inui, K., Takata, K.** (1999). Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *The Histochemical journal*, **31**: 169-174.

**Oh, D.M., Sinko, P.J., Amidon, G.L.**, (1993). Characterization of the oral absorption of some  $\beta$ -lactams: effect of the alpha-amino side chain group. *Journal of pharmaceutical sciences* **82**: 897-900.

**Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K.-I., MacNeil, J.D.** (1995). *Chemical Analysis of Antibiotics Used in Agriculture*. AOAC International, 452p.

**Paintaud, G., Alván, G., Dahl, M.L., Grahnén, A., Sjövall, J., Svensson, J.O.** (1992). Nonlinearity of amoxicillin absorption kinetics in human. *European journal of clinical pharmacology*, **43**: 283-288.

**Pan, X., Terada, T., Irie, M., Saito, H., Inui, K.** (2002). Diurnal rhythm of H<sup>+</sup>-peptide cotransporter in rat small intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **283**: G57-G64.

**Penzotti, S.C. Jr., Poole, J.W.** (1974). Transport mechanisms of  $\beta$ -lactam antibiotics across everted rat gut. *Journal of pharmaceutical sciences*. **63**: 1803-1806.

**Petri Jr., W.** (2004) Antimicrobial agents: Penicillins, Cephalosporins and other  $\beta$ -lactam Antibiotics. **Ch.47**: pp. 1189-1218. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Hardmand, J.G., Limbird, L.E., H., Goodman Gilman, A. (Eds). McGraw-Hill Professional.

**Piotrovskij, V.K., Paintaud, G., Alván, G., Trnovec, T.** (1994). Modeling of the saturable time-constrained amoxicillin absorption in humans. *Pharmaceutical research*, **11**: 1346-1351.

**Plumb, D.C.** (2002) *Veterinary Drug Handbook*. St-Paul, MN, É.-U., Blackwell Publishing.

**Pond, W.G.Mersmann H.J.** (2001) Cornell University Press. 745p.

**Pratt, W.B.** (1990) *Principle of drug action: The basis of pharmacology*. (Pratt, W.B., Taylor, T. Eds.). Churchill Livingstone inc.

**Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, Klein, D.** (2003). *Microbiologie*. Paris, France, Édition de Boek.

**Prescott, J.-F.** (2006) B-lactam Antibiotics: Penam Penicillins. **Ch. 7:** pp. 121-137. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Giguère, S., Prescott, J.-F., Desmond Baggot, J., Walker, R.D., Dowling, P.M., (Eds). Ames, IO, É.-U., Wiley-Blackwell.

**Prescott, J.-F.** (2006). Other B-lactam antibiotics : B-lactamase inhibitors carbapenems and monobactams. **Ch. 9:** pp. 159-170. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Giguère, S., Prescott, J.-F., Desmond Baggot, J., Walker, R.D., Dowling, P.M., (Eds). Ames, IO, É.-U., Wiley-Blackwell.

**Quay, J.F.** (1972) Transport interaction of glycine and cephalaxine in rat jejunum. *The physiologist*, **15:** 241.

**Rapp-Gabrielson, V.J., Oliveira, S.R., Pijoan, C.** (2006) Haemophilus parasuis. *Diseases of swine*. Straw, B.E., Zimmermand, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J., (Eds), **Ch. 40:** pp.681-690., Ames IO, É.-U., Blackwell Publishing.

**Reyns, T., De Boever, S., Baert, K., Croubels, S., Schauvliege, S., Gasthuys, F., De Backer, P.** (2007). Disposition and oral bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid in pigs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **30:** 550-555.

**Riddick, D.S.**, (1998). Drug Biotransformation. **Ch.4:** pp. 38-54. *Principle of Medical Pharmacology 6<sup>th</sup> edition*. Kalant, H., Roschlau, W.H.E. (Eds) New York, NY, É.-U., Oxford University Press.

**Ritzhaupt, A., Wood, I.S., Ellis, A., Hosie, K.B., Shirazi,-Beechey, S.P.** (1998). Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *The Journal of physiology*, **513:** 719-732.

**Roberts, M.S., Magnusson, B.M., Burczynski, F.J., Weiss, M.** (2002) Enterohepatic circulation. Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clinical pharamcokinetics* **41:** 751-790.

**Rolinson, G.N.** (1998) Forty years of beta-lactam research. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. **41:** 589-603.

**Rouveix, B.** (1999) Effets indésirables des agents anti-infectueux et leurs mécanismes. *Bases biologiques de l'antibiothérapie* Bergogne-Bérézine, E., Brogard, J.-M. (Eds.). Paris, France, Masson: 355-363.

**Rowland, M., Tozer, T.N.** (1995). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications 3<sup>rd</sup> edition*. Media, PA, É.-U., Williams & Wilkins.

**Rowland, M., Tozer, T.N.** (2006) *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Quantitative Basis of Drug Therapy*. Baltimore, MD, É.-U., Lippincott Williams & Wilkins.

**Sala-Rabanal, M., Loo, D.F.D., Hirayama, B.A., Turk, E., Wright, E.M.** (2006). Molecular interactions between dipeptides, drug and the human intestinal H<sup>+</sup>-oligopeptide cotransporter hPEPT1. *The Journal of physiology*. **574**: 149-166.

**Sanford, S.E.** (1991). Ontario. Procaine penicillin toxicity in pigs. *The Canadian veterinary journal*, **32**: 438.

**Schwarz, S., Bottner, A., Goosens, L., Hätz, H.M., Hartmann, K., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Luhofer, G., Richter, A., Schulz, B., Sigge, C., Waldmann, K.H., Wallmann, J., Werckenthin, C.** (2008). A proposal of clinical breakpoints for amoxicillin applicable to porcine respiratory tract pathogens. *Veterinary Microbiology*, **126**: 178-188.

**Sepponen, K., Ruusunen, M., Pakkanen, J.A., Pösö, A.R. (2007)**

Expression of CD147 and monocarboxylate transporters MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine small intestine and colon. *Veterinary journal*. **174** : 122-28

**Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2004)** *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics 5<sup>th</sup> edition*. États-Unis, McGraw-Hill Medical.

**Shen, H., Smith, D.E., Yang, T., Huang, Y.G., Schnermann, J.B., Brosius, G.C. 3<sup>rd</sup>.** (1999) Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *The American journal of physiology*. **276** : F658-65.

**Shimizu, R., Sukegawa, T., Tsuda, Y., Itoh, T. (2008)** Quantitative prediction of oral absorption of PEPT1 substrates based on in vitro uptake into Caco-2 cells. *International journal of pharmaceutics*. **354**: 104-110.

**Sepponen, K., Ruusunen, M., Pakkanen, J.A., Pösö, A.R. (2006).** Expression of CD147 and monocarboxylate transporters MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine small intestine and colon. *Veterinary journal*, **174**: 122-128.**Shen, H., Smith, D.E., Yang, T., Huang, Y.G., Schnermann, J.B., Brosius, F.C., 3<sup>rd</sup>.** (1999). Localization of PEPT1 and PEPT2 proton-coupled oligopeptide transporter mRNA and protein in rat kidney. *The American journal of physiology*, **276**: F658-F665.

**Sinko, P.J., Amidon, G.L.** (1988). Characterization of the oral absorption of  $\beta$ -lactam antibiotics II: Competitive absorption and peptide carrier specificity. *Journal of pharmaceutical sciences*. **78**: 723-727.

**Sinko, P.J., Amidon, G.L.**, (1989). Characterization of the oral absorption of beta-lactam antibiotics. II. Competitive absorption and peptide carrier specificity. *Journal of pharmaceutical sciences*. **78**: 723-727.

**Sjövall, J., Magni, L., Bergan, T.** (1978). Pharmacokinetics of bacampicillin compared with those of ampicillin, pivampicillin, and amoxycillin *Antimicrobial agents and chemotherapy* **13**: 90-96.

**Sjövall, J., Alván, G., Westerlund, D.** (1985). Dose-dependent absorption of amoxycillin and bacampicillin. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **38**: 241-250.

**Spyker, D.A., Rugloski, R.J., Vann, R.L., O'Brien, W.** (1977). Pharmacokinetics of amoxicillin : Dose dependence after intravenous, oral and intramuscular administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **11**: 132-141.

**Tamai, I., Sai, Y., Ono, A., Kido, Y., Yabuuchi, H., Takanaga, H., Satoh, E., Ogihara, T., Amano, O., Iseki, S., Tsuji, A.** (1999). Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic

acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **51**: 1113-1121.

**Tanigawa M., Sawada, T.**, (2003) Exposure time-dependent bactericidal activities of amoxicillin against *Actinobacillus pleuropneumoniae*; an in vitro and In vivo pharmacodynamic model. *Journal of veterinary medicine, B*, **27 suppl. 2**: 45-57

**Temple, C.S., Stewart, A.K., Meredith, D., Lister, N.A., Morgan, K.M., Collier, I.D., Vaughan-Jones, R.D., Boyd, C.A., Bailey, P.D., Bronk, J.R.** (1998). Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *The Journal of biological chemistry*, **273**: 20-22.

**Terada, T., Inui, K.** (2004). Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery. *Current drug metabolism*, **5**: 85-94.

**Thummel, K.E., Shen, D.D.** (2005). Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetics data. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Burton, L., Lazo, J., H., Parker, K.L. McGraw-Hill Professional: 1798.

**Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A.** (2004). Bioavailability and its assessment. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **27**: 455-466.

**Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A.** (2004). Plasma Clearance. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **27**: 415-425.

**Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A.** (2004). Volumes of distribution. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **27**: 441-453.

**Tsuji, A., Nakashima, E., Yamana, T.** (1979). Physicochemical Properties of Amphoteric  $\beta$ -Lactam Antibiotics II: Solubility and Dissolution Behavior of Aminocephalosporins as a Function of pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **68**: 308-311.

**Tsuji, A., Tamai, I., Nakanishi, M., Terasaki, T., Hamano, S.** (1993). Intestinal brush-border transport of the oral cephalosporin antibiotic, cefdinir, mediated by dipeptide and monocarboxylic acid transport systems in rabbits. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **45**: 996-998.

**Tsuji, A.** (1995). Intestinal Absorption of Beta-Lactam Antibiotics. *Peptide-Based Drug Design*. Amidon, G.L. et Taylor, M.D. (Eds.). Washington DC É.U., American Chemical Society: 101-134.

**Tsuji, A., Tamai, I.** (1996). Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharmaceutical research*, **13**: 963-977.

**Turgeon, P.L., Higgins, R., Beaudoin, M.** (1994). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates. *The British veterinary journal*, **150**: 263-269.

**Walker, D., Thwaites, D.T., Simmons, N.L., Gilbert, H.J., Hirst, B.H.** (1998). Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *The Journal of physiology*, **507**: 697-706.

**Watson, A.D., Emslie, D.R., Martin, I.C.** (1987). Effect of different intervals between dosing and feeding on systemic availability of penicillin V in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **10**: 90-95.

**Welling, P.G., Huang, H., Koch, P.A., Craig, W.A., Madsen, P.O.** (1977). Bioavailability of ampicillin and amoxicillin in fasted and nonfasted subjects. *Journal of pharmaceutical sciences*, **66**: 549-552.

**Wenzel, U., Thwaites, D.T., Daniel, H.** (1995). Stereoselective uptake of  $\beta$ -lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter. *British journal of pharmacology*. **116**: 3021-3027.

**Wisselink, H.J., Veldman, K.T., Van den Eede, C., Salmon, S.A., Mevius, D.J.** (2006). Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from

diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, **113**: 73-82.

**Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T.**, (1978). Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equations. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, **6**: 165-175.

**Zhou, H.**, (2003). Pharmacokinetics strategies in deciphering atypical drug absorption profiles. *Journal of clinical pharmacology*, **43**: 211-227.

## Annexes

## Annexe 1 : Certificat d'analyse de l'amoxicilline utilisée au cours de l'étude

 <b>SIGMA-ALDRICH</b>		 <b>Fluka</b>	
Sigma-Aldrich Production GmbH CH-9471 Buchs/Schweiz www.sigma-aldrich.com		Telefon ++41 81 755 2511 Telefax ++41 81 756 5449 Email: fluka@sigma.com	
<b>Certificate of Analysis</b>			
<b>PRODUCT BRAND</b>	<b>Fluka</b>		
PRODUCT-NO.	10039		
PRODUCT	AMOXICILLIN		
FORMULA	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S		
MOLECULAR MASS	365.41		
CAS-NUMBER	26787-78-0		
LOT	1230241		
<b>Test</b>	<b>Specification</b>	<b>Result</b>	
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO FAINTLY BEIGE	WHITE	
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER	
TITRATION (NT) HClO <sub>4</sub> 0.1N	≥ 97.0 %	97.8 %	
REMARKS ON TITRATION	-	CALC. ON DRY SUBSTANCE	
WATER	12 - 18 %	13.1 %	
INFRARED SPECTRUM	CORRESPONDS TO STANDARD SPECTRUM	CORRESPONDS	
POTENCY	-	984 MICROGRAMS/MG (ANHYDROUS BASIS)	
DATE OF QC-RELEASE	20/SEP/05		

**Annexe 2 : Composition des aliments utilisés avec ou sans protéine.**

<b>MOULÉE EN CUBE PRÉ-ENGRAIS</b>		
<b>ANALYSE GARANTIE</b>		
Protéine Brute	(min)	19.00%
Matière grasse brute	(min)	5.00%
Fibre brute	(max)	3.00%
Calcium (Ca)	(réel)	0.70%
Phosphore (P)	(réel)	0.55%
Sodium	(réel)	0.20%
Zinc	(réel)	150 mg/kg
Cuivre	(réel)	125 mg/kg
Vitamine A	(min)	10 000 U.I./kg
Vitamine D	(min)	1 200 U.I./kg
Vitamine E	(min)	60 U.I./kg

<b>MOULÉE SANS PROTÉINE</b>	
<b>ANALYSE GARANTIE</b>	
Amidon de maïs	78,78%
Cellulose	3,00%
Sucrose	10,00%
Gras animal	2,76%
Sel	0,38%
Pierre à chaux	0,99%
Phosphate dicalcique	3,49%
Prémix vitaminique	0,50%
Prémix minéral	0,10%

**Annexe 3 : Équations différentielles associées aux modèles compartimentaux utilisés pour caractériser la pharmacocinétique orale de l'amoxicilline chez des porcelets sevrés.**

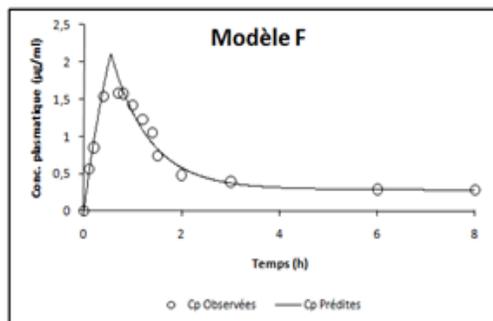
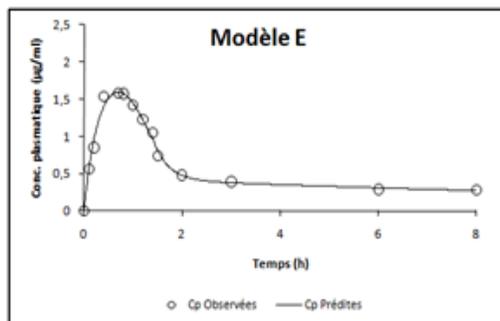
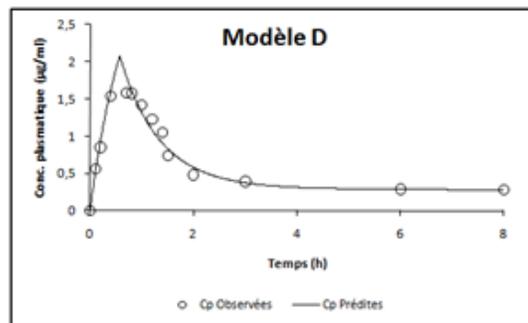
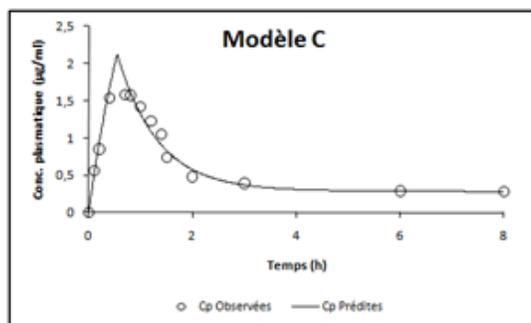
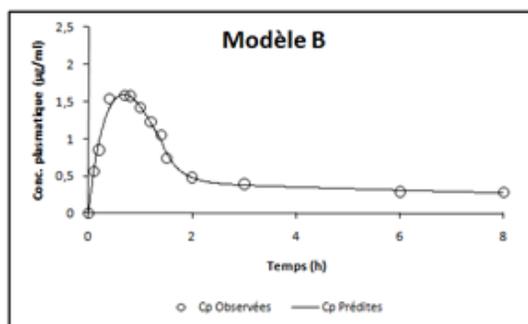
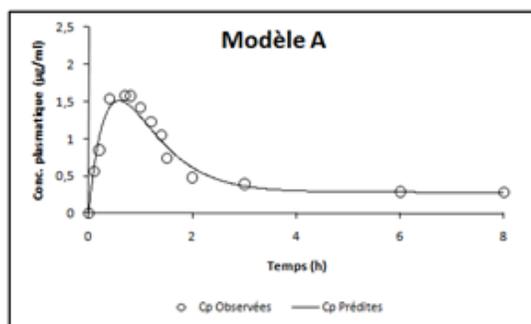
<b>Modèles</b>	<b>Compartiments</b>	<b>Équations différentielles</b>
<b>A</b>	<b>1</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12} + k_{hep})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (k_a + rate)TGI(t)$
	<b>2</b>	$\frac{dx_2(t)}{dt} = -(k_{21})x_2(t) + (k_{12})x_1(t)$
	<b>TGI</b>	$\frac{dTGI(t)}{dt} = -(k_A + rate)TGI(t) + (k_{hep})x_1(t)$
<b>B</b>	<b>1</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12} + k_{hep})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (k_a)TGI(t)$
	<b>2</b>	$\frac{dx_2(t)}{dt} = -(k_{21})x_2(t) + (k_{12})x_1(t)$
	<b>TGI</b>	$\frac{dTGI(t)}{dt} = -(k_A)TGI(t) + (k_{hep})x_1(t)$
<b>C</b>	<b>1</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (k_a + rate)TGI(t)$
	<b>2</b>	$\frac{dx_2(t)}{dt} = -(k_{21})x_2(t) + (k_{12})x_1(t)$
	<b>TGI</b>	$\frac{dTGI(t)}{dt} = -(k_A + rate)TGI(t)$

$$Rate = V_{max} / k_{50} + t(x_2)$$

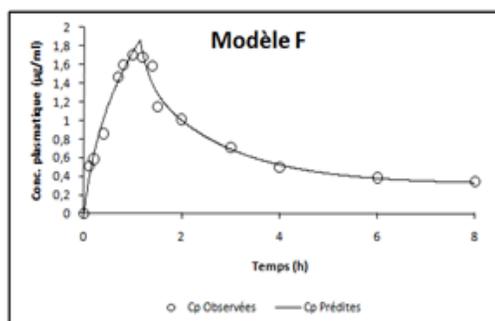
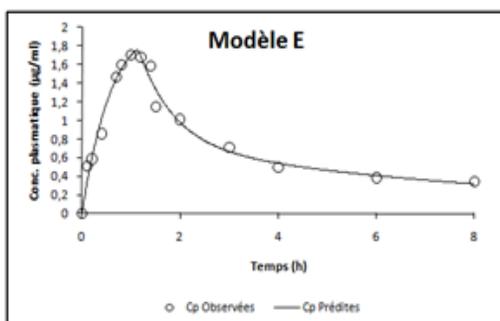
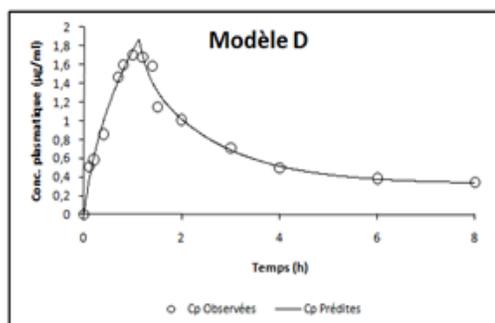
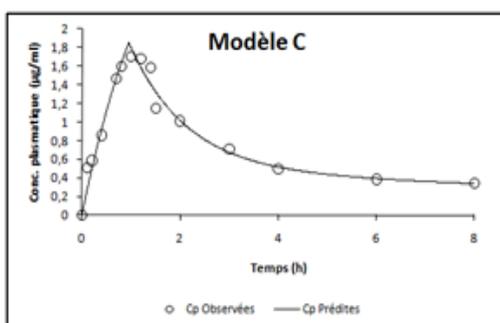
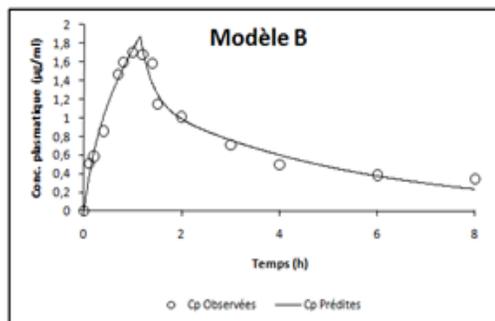
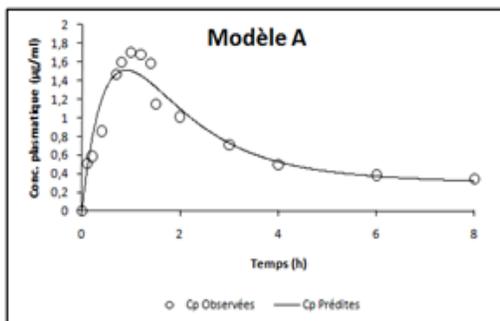
<b>Modèles</b>	<b>Compartiments</b>	<b>Équations différentielles</b>
<b>D</b>	<b>1</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12} + k_{hep})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (rate)TGI(t)$
	<b>2</b>	$\frac{dx_2(t)}{dt} = -(k_{21})x_2(t) + (k_{12})x_1(t)$
	<b>TGI</b>	$\frac{dxTGI(t)}{dt} = -(k_{50})TGI(t) + (k_{hep})x_1(t)$
<b>E</b>	<b>1</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12} + k_{hep})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (k_0)TGI(t)$
	<b>2</b>	$\frac{dx_2(t)}{dt} = -(k_{21})x_2(t) + (k_{12})x_1(t)$
	<b>TGI</b>	$\frac{dxTGI(t)}{dt} = -(k_0)TGI(t) + (k_{hep})x_1(t)$
<b>F</b>	<b>1</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12} + k_{hep})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (k_a + k_0)TGI(t)$
	<b>2</b>	$\frac{dx_2(t)}{dt} = -(k_{21})x_2(t) + (k_{12})x_1(t)$
	<b>TGI</b>	$\frac{dx_1(t)}{dt} = -(k_{10} + k_{12} + k_{hep})x_1(t) + (k_{21})x_2(t) + (k_a + k_0)TGI(t)$

**Annexe 4 : Profils des concentrations observées et prédites par les différents modèles pour les différents porcs**

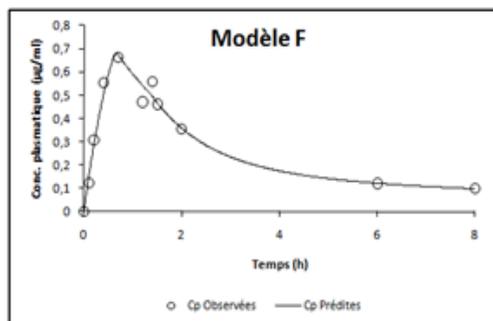
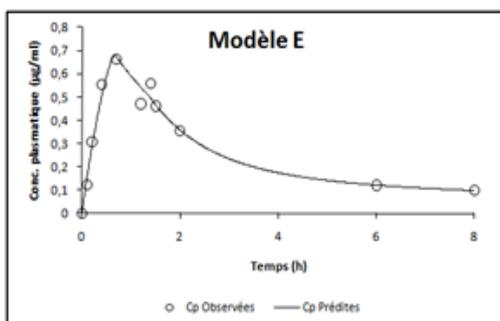
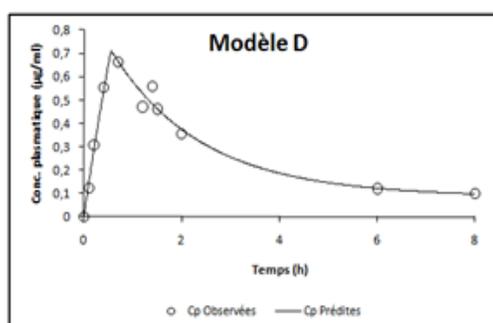
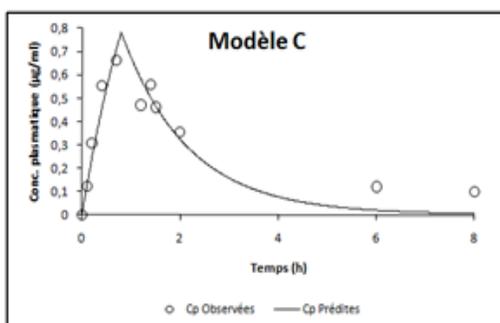
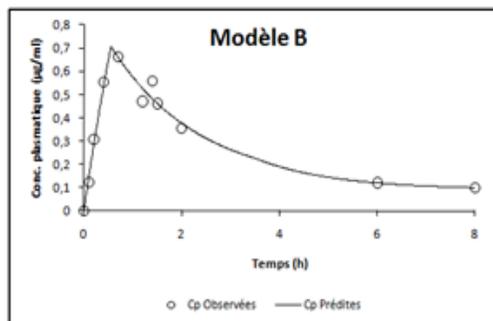
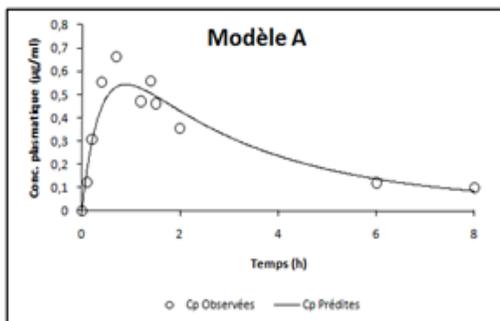
**Porc : 17      Dose : 4 mg/kg**



Porc : 29      Dose : 4 mg/kg

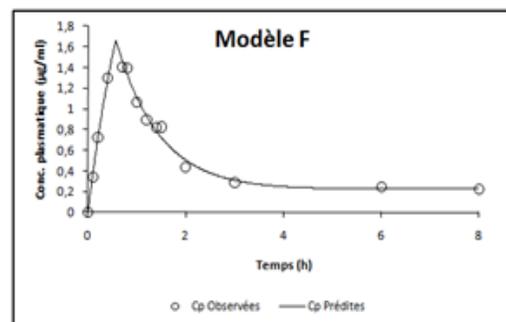
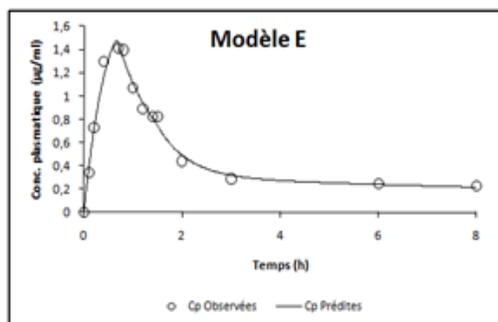
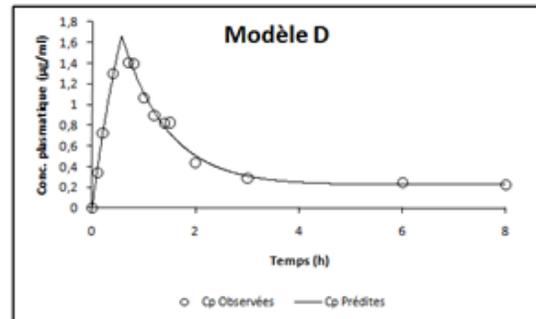
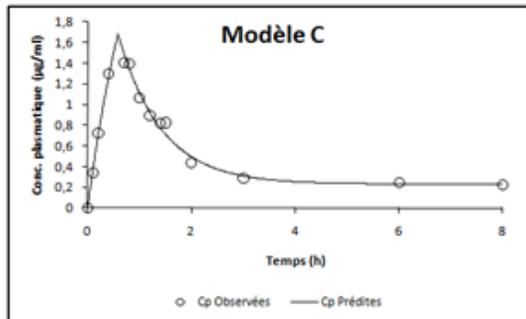
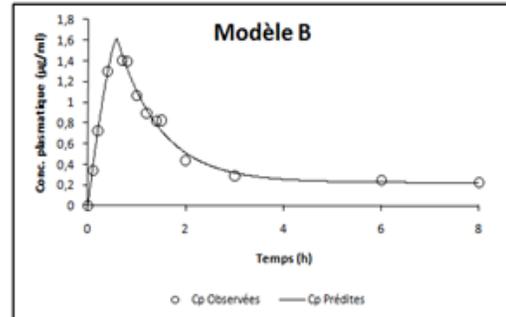
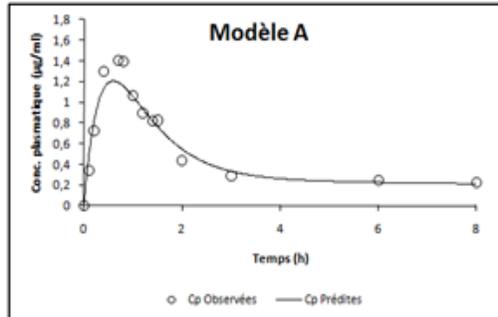


Porc : 35 Dose : 4 mg/kg

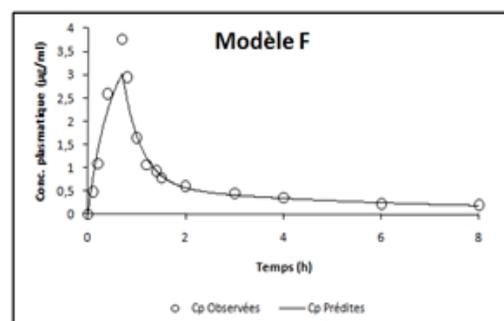
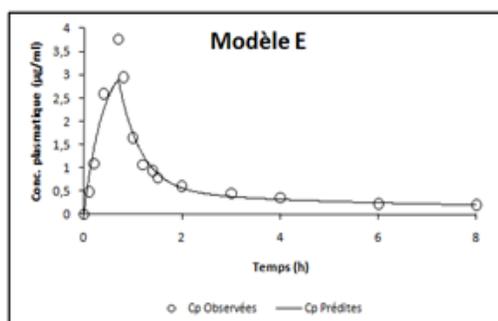
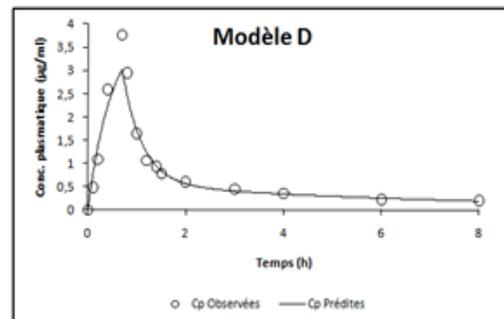
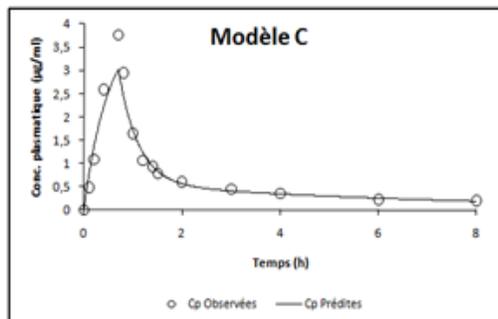
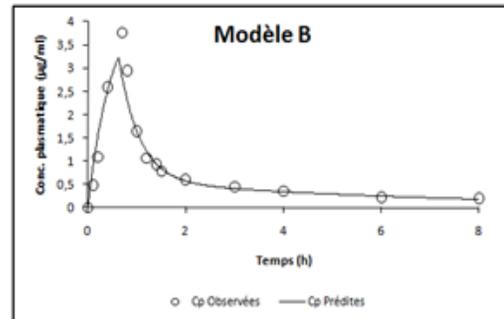
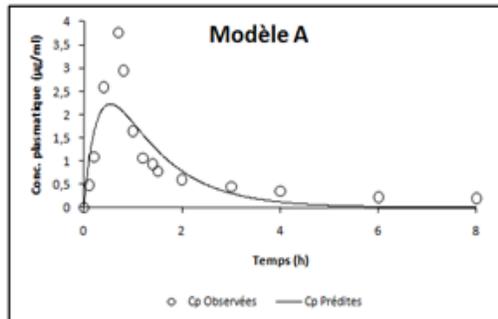


Porc : 21

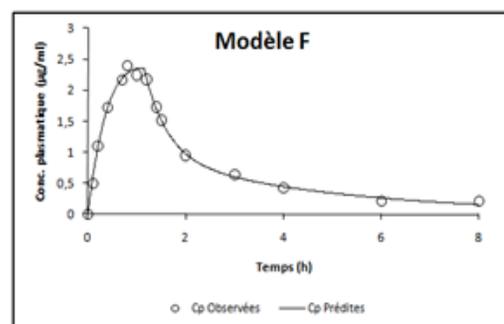
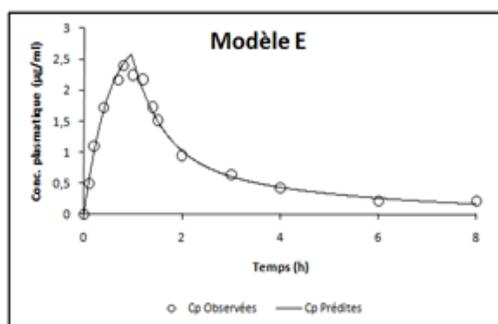
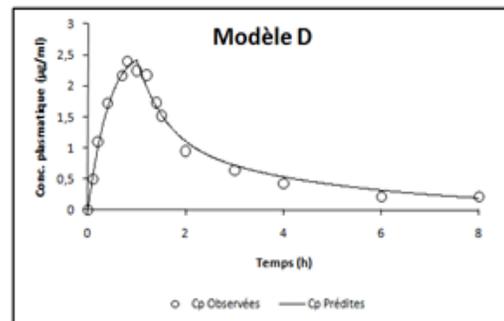
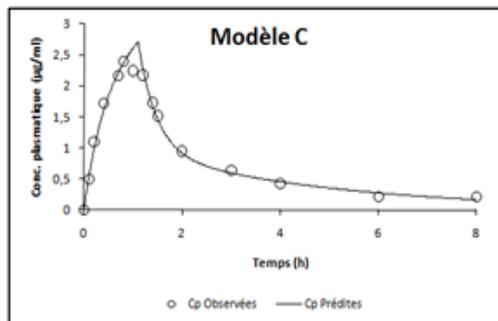
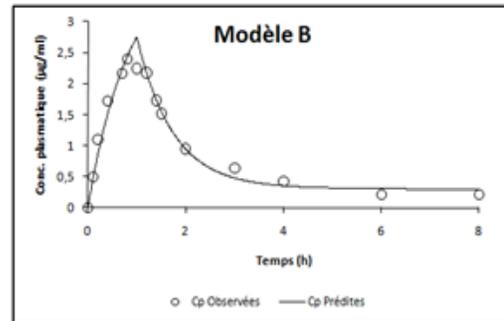
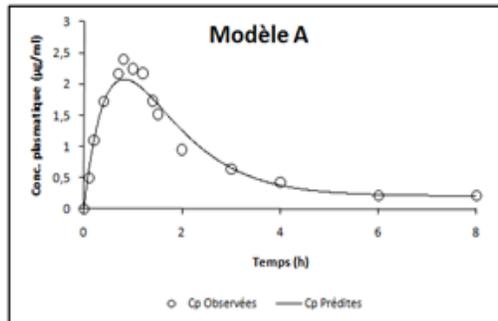
Dose : 12 mg/kg



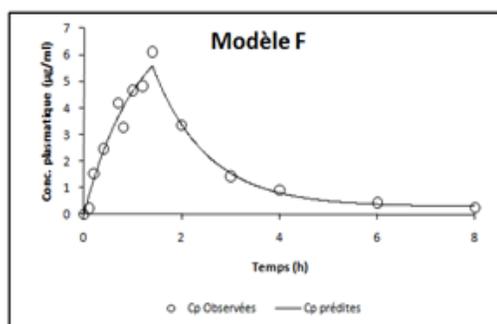
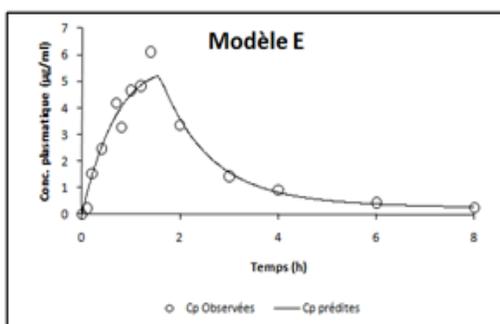
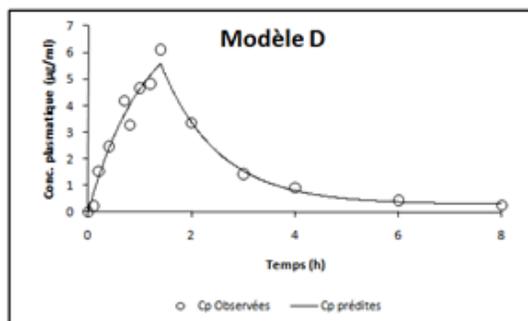
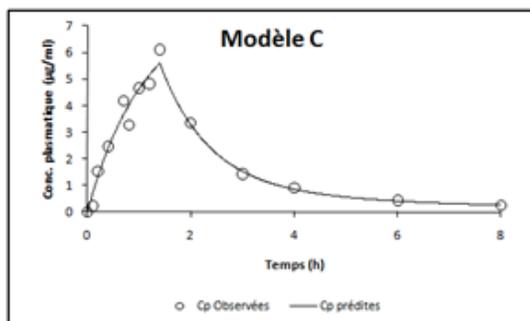
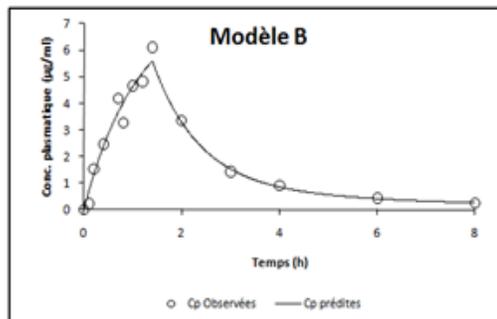
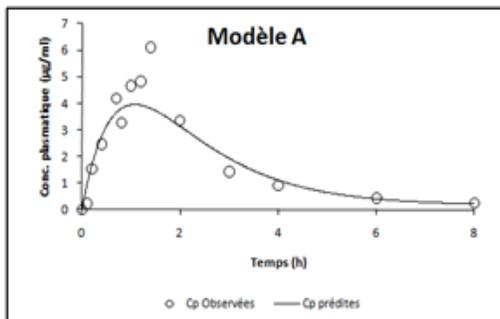
Porc : 23      Dose : 12 mg/kg



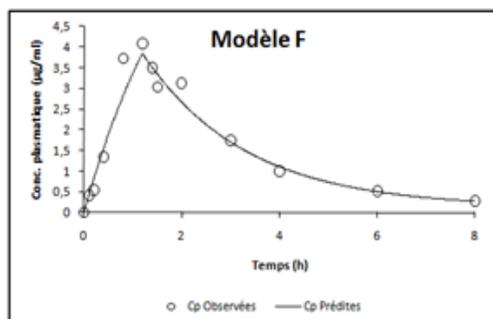
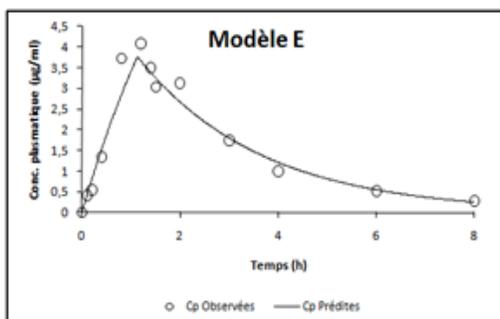
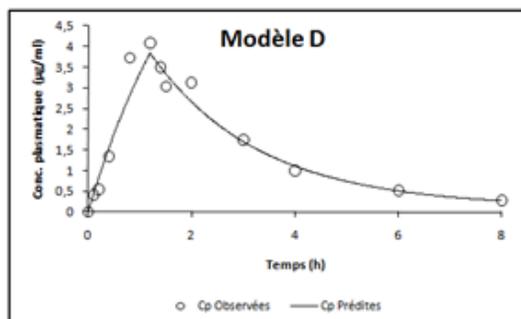
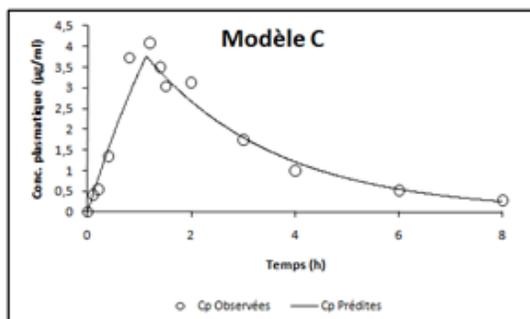
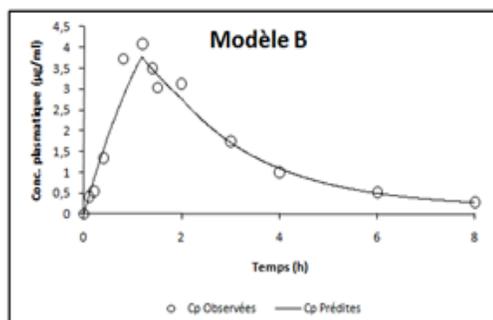
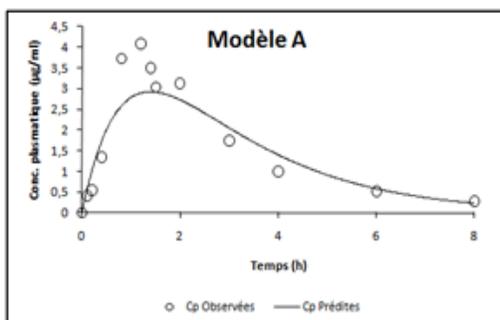
Porc : 37      Dose : 12 mg/kg



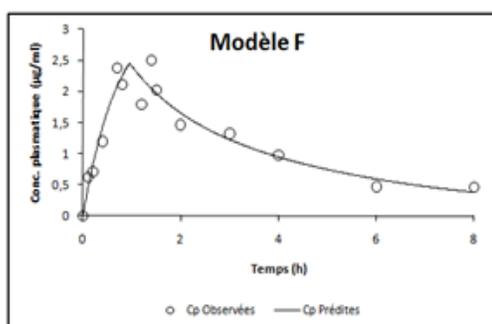
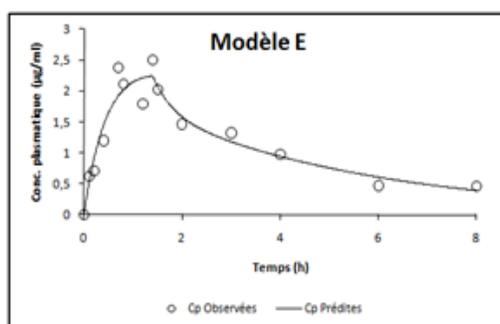
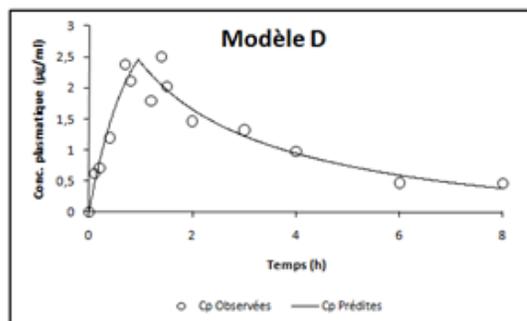
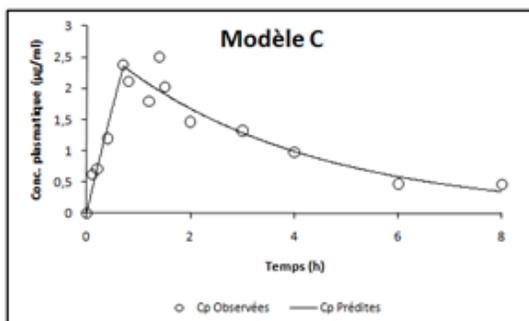
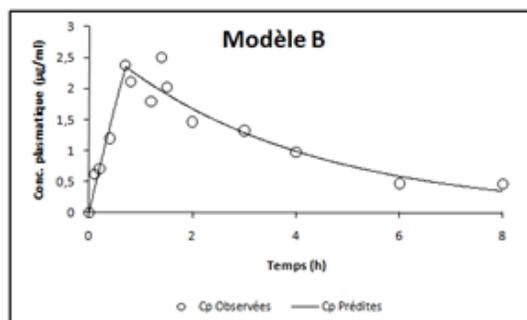
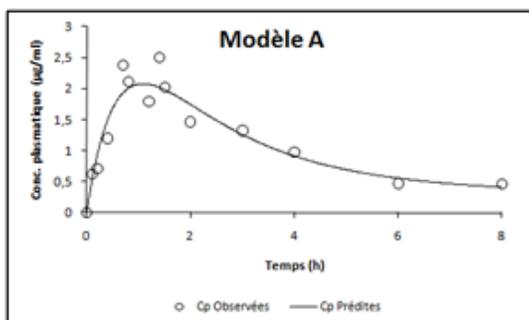
Porc : 22 Dose : 20 mg/kg



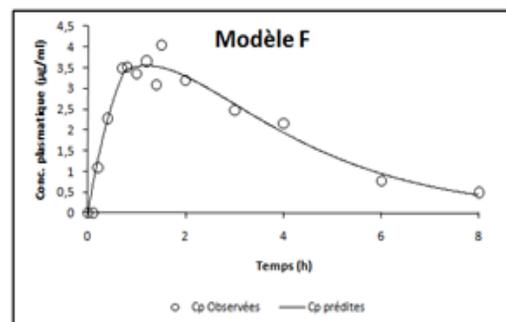
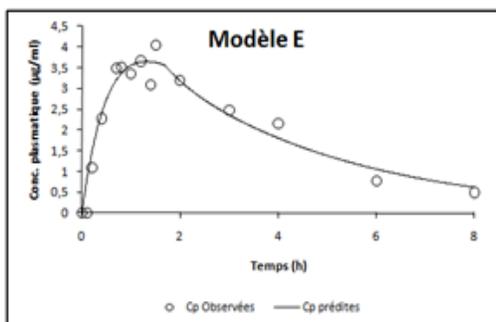
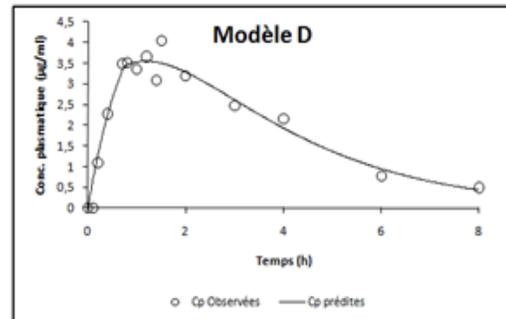
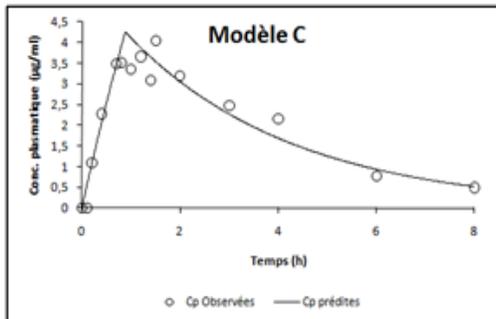
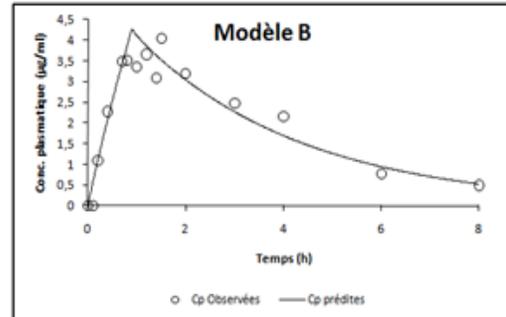
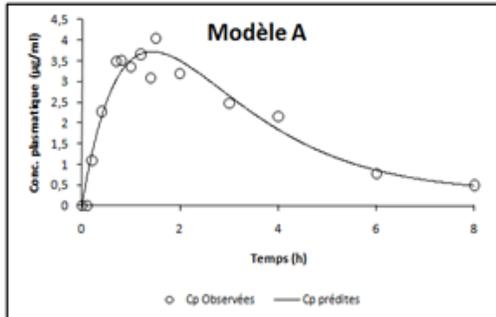
Porc : 30      Dose : 20 mg/kg



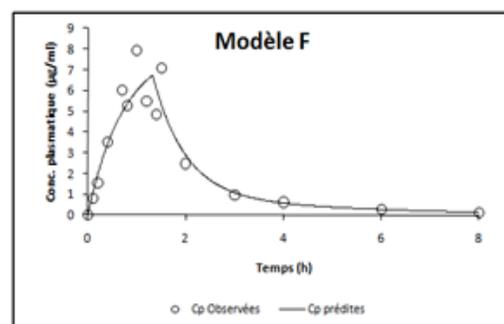
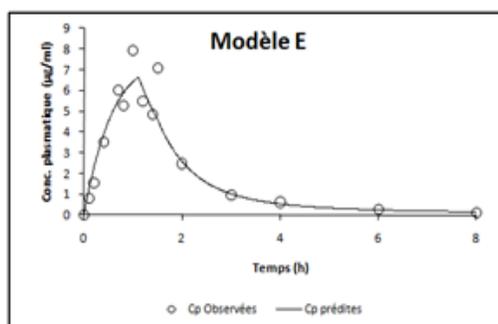
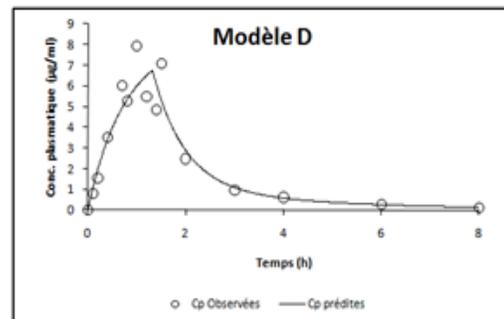
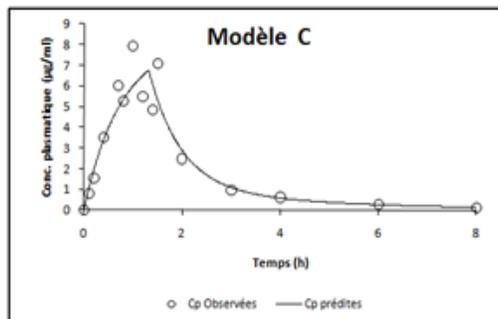
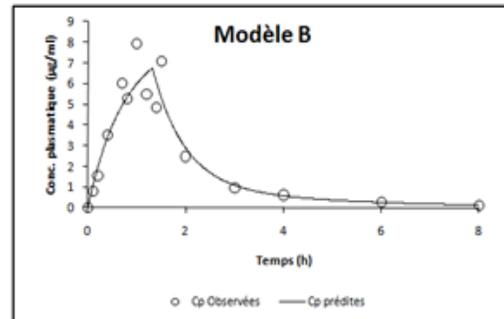
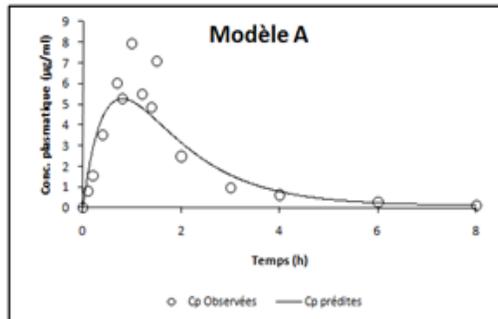
Porc : 38      Dose : 20 mg/kg



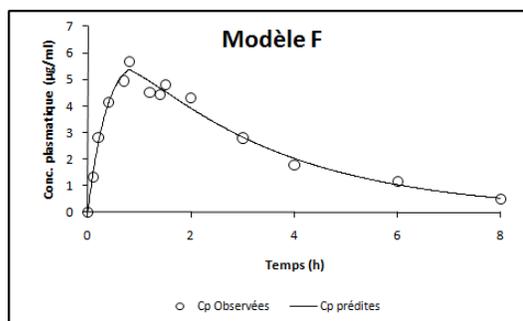
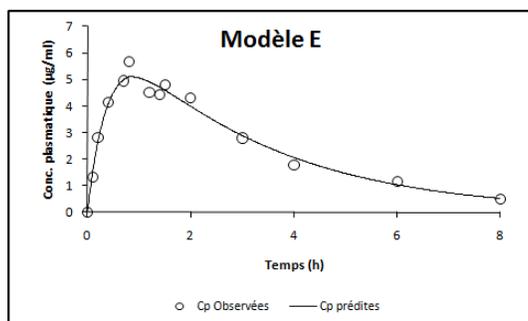
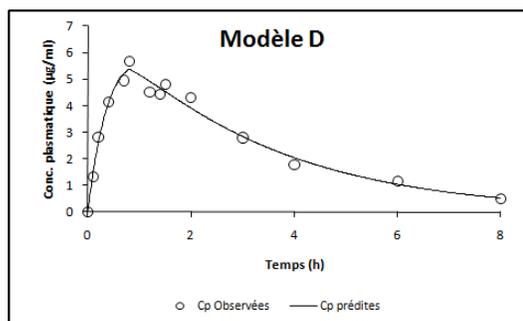
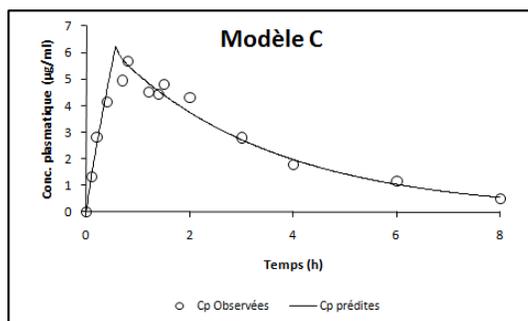
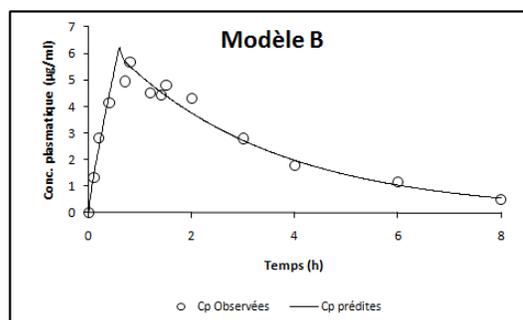
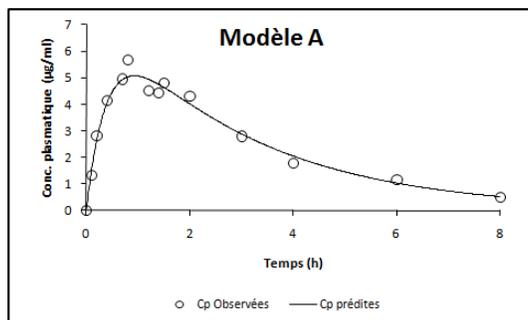
Porc : 19      Dose : 30 mg/kg

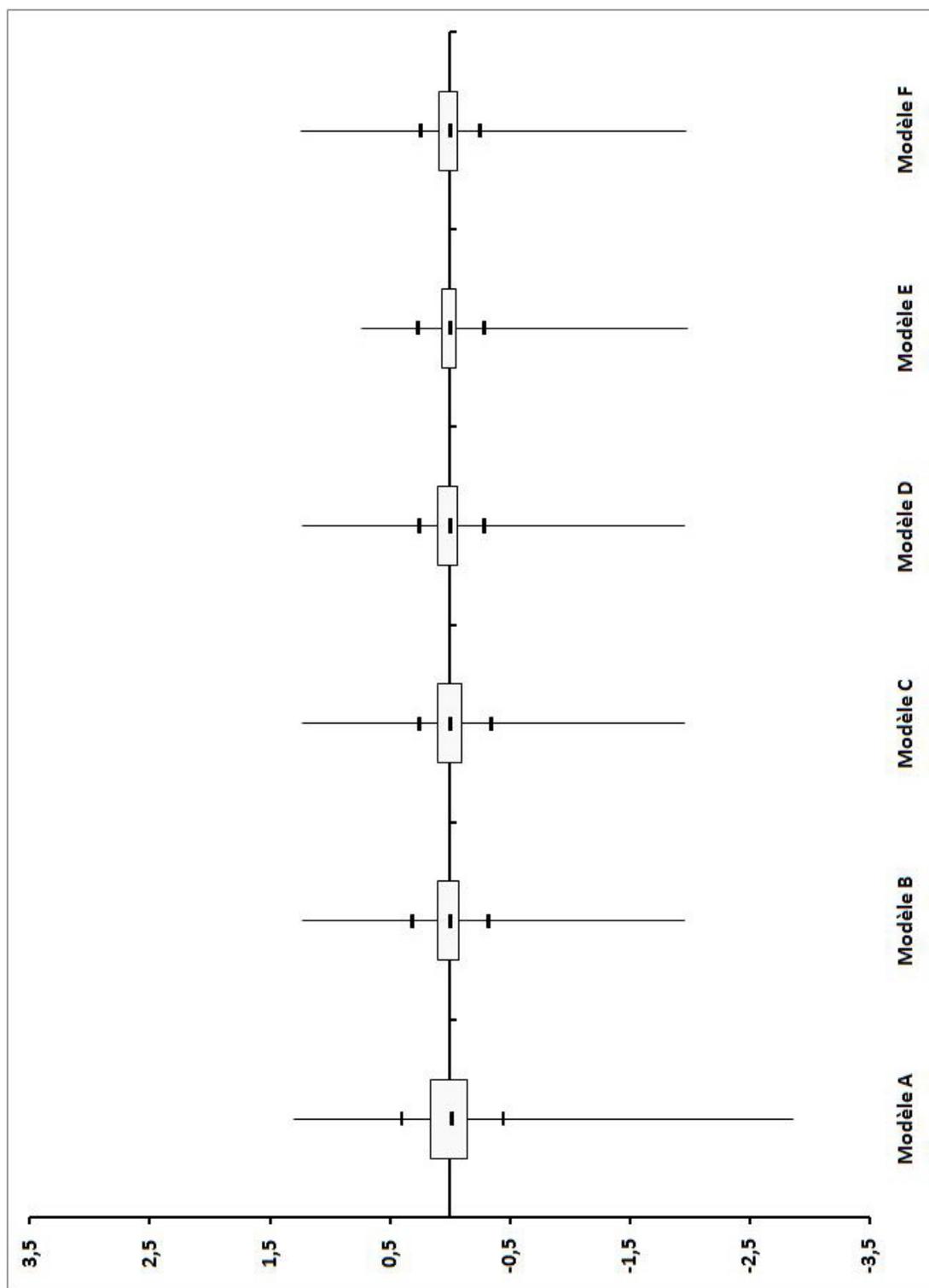


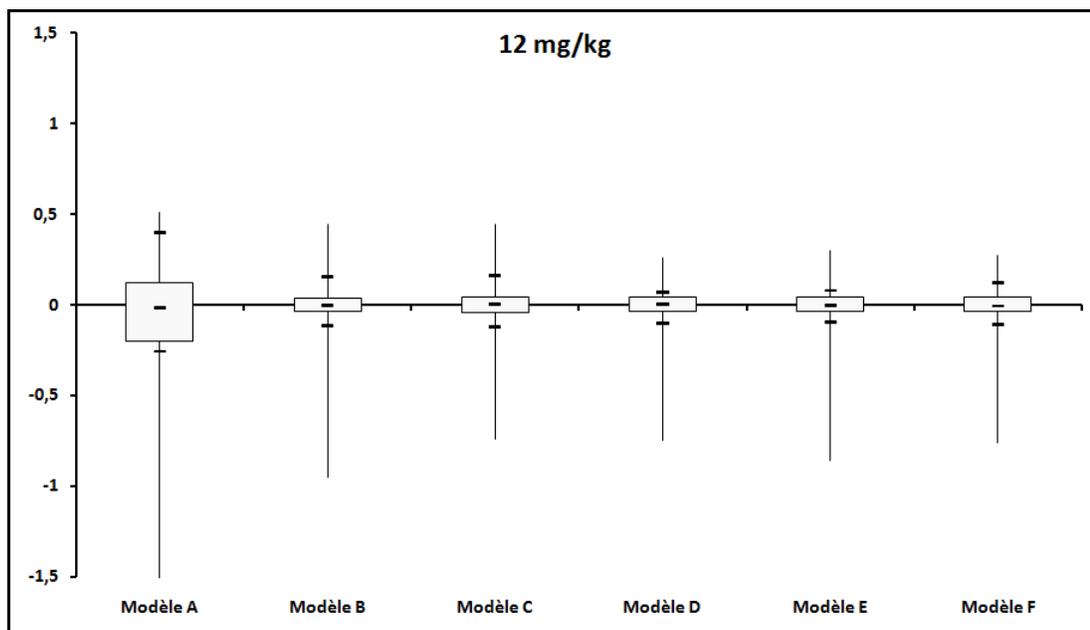
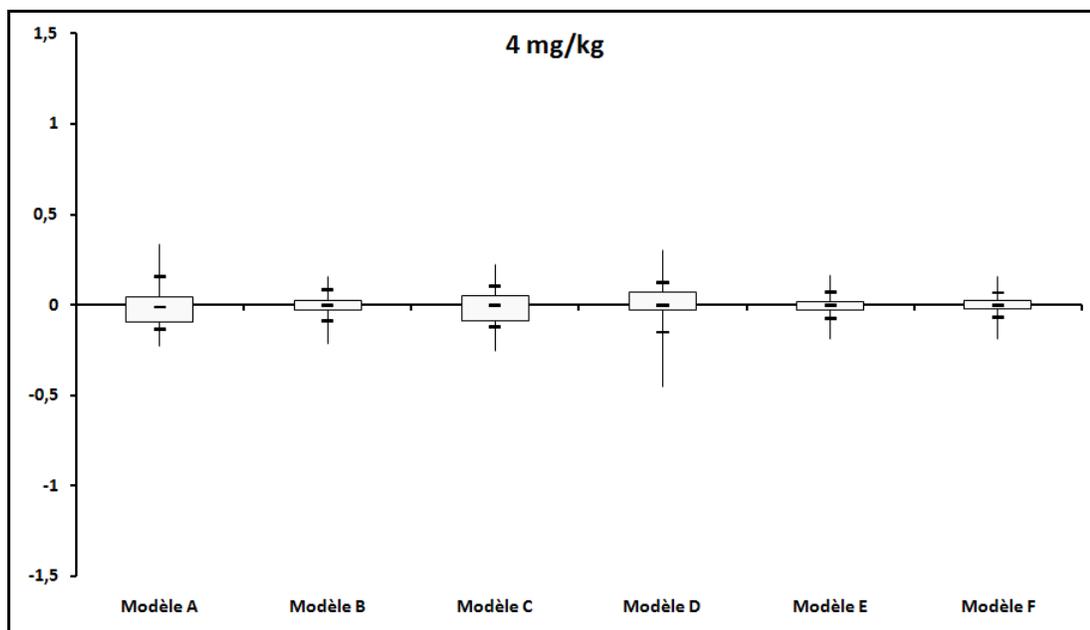
Porc : 28      Dose : 30 mg/kg

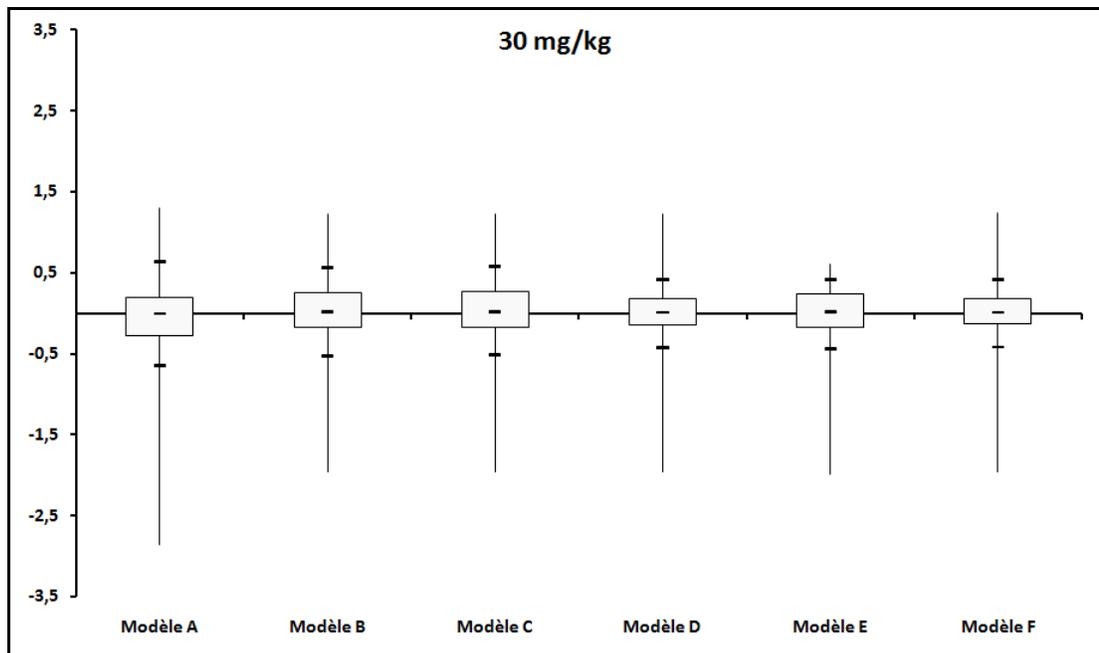
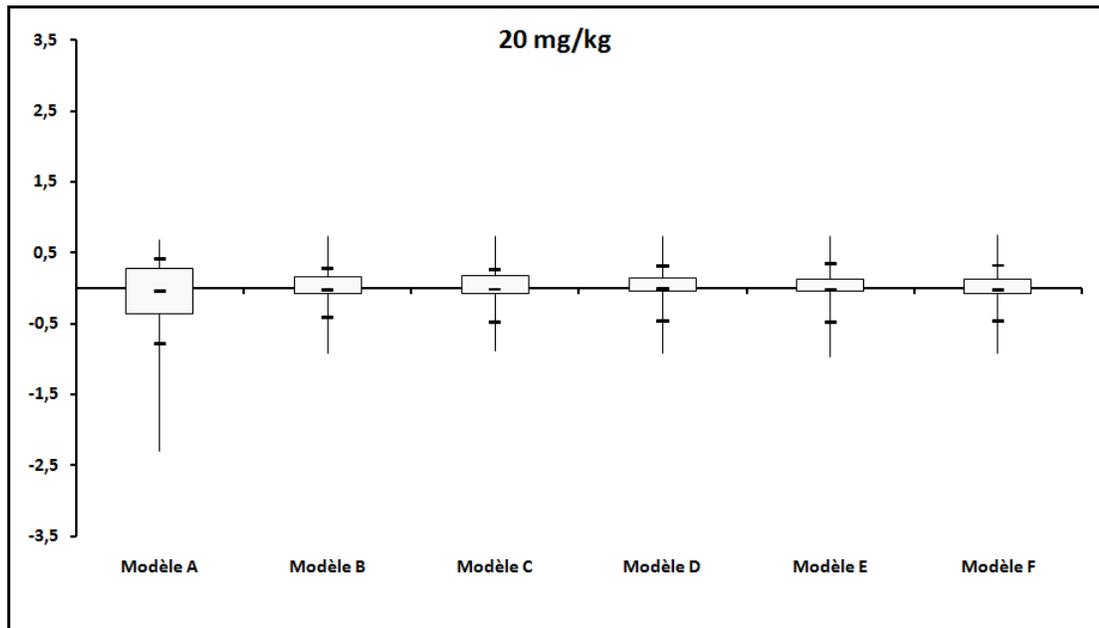


Porc : 46      Dose : 30 mg/kg



**Annexe 5 : Distribution des résidus**

**Annexe 6 : Résidus des différents modèles selon la dose administrée**



**Annexe 7 : Communication scientifique. Actes de conférences du 20ème congrès de l'International Pig Veterinary Society, Durban (Afrique du Sud), du 22 au 26 juin 2008, volume 1, page 246.**

**ORAL AMOXICILLIN SATURATES ITS OWN ABSORPTION AT THERAPEUTIC  
DOSES COMMONLY USED IN SWINE**

DAVE BERNIER,<sup>1</sup> FRANCIS BEAUDRY,<sup>1</sup> ROMAIN BERAUD,<sup>1</sup> CANDIDO  
POMAR,<sup>2</sup> ANN LETELLIER,<sup>1</sup> JÉRÔME R.E. DEL CASTILLO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, C.P. 5000 ST-HYACINTHE (QC), J2S 7C6  
CANADA*

<sup>2</sup> *AGRICULTURE CANADA, C.P. 90 STATION LENNOXVILLE, SHERBROOKE  
(QC), J1M 1Z3 CANADA*

**Introduction**

The therapeutic efficacy of oral amoxicillin (AMX) against *S. suis* and *H. parasuis* is variable, even for isolates that are sensitive to the penicillins. The oral bioavailability of AMX in pigs is in the range of 30% (1), i.e. 3 times lower than in humans. Because AMX is a substrate of PepT1, which absorbs the peptides arising from protein digestion in pigs (2), we hypothesize that the extent of AMX intestinal absorption in pigs may be hindered as a result of PepT1 saturation. The objective of this study is to document the oral pharmacokinetics (PK) of AMX in pigs in order to assess its absorption by PepT1.

## Materials and Methods

Twelve pigs (females and barrows averaging 20 kg BW) were instrumented with portal vein and aortic catheters, a gastrostomy tube. Pigs had ad libitum access to tap water and a 19% CP diet during the 10-day acclimation. Pigs were then fasted overnight, and dosed intragastrically with AMX sodium at doses of 4, 12, 20 or 30 mg/kg BW. A protein-free diet, which does not require PepT1-mediated uptake, was served during the experiment. Portal and aortic blood was sampled on 15 occasions over 8 h after dosing. Plasma was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ , and analyzed with liquid chromatography, tandem mass spectrometry (accuracy  $\geq 93.6\%$ ; precision  $\leq 11.5\%$ ; quantification limit = 0.1 mg/L).

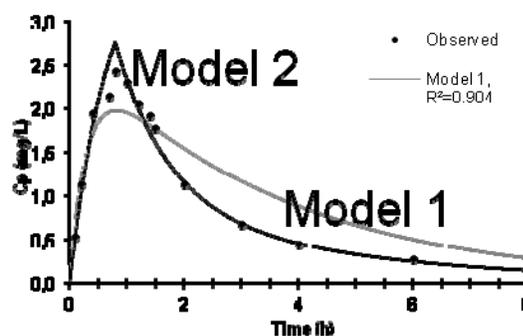
Data was subject to compartmental PK modelling with ADAPT II. The goodness-of-fit to data of 1-compartment open models with 1<sup>st</sup>-order absorption (Model 1) or parallel 1<sup>st</sup>-order plus saturable, time constrained absorption (Model 2) was assessed with the Akaike Information Criterion. This metric was subject to the signed-rank test to determine the best PK model. The effect of dose on the absorption PK parameters was subject to linear regression analysis. The 0.05  $\alpha$ -level was used for both types of tests.

## Results

Figure 1 illustrates the fits of Model 1 and Model 2 to a typical set of time-plasma AMX concentration. Their plateau phases were characteristically sharp. Model 2 provided significantly better goodness of fit for all doses ( $P=0.0117$ ). In addition, the relative difference in area under the curve of aortic AMX concentrations with respect to portal concentrations logarithmically increased with dose ( $P= 0.0080$ ).

Table 1 presents the AMX absorption PK parameters of Model 2. The estimates of duration of the carrier-mediated uptake (Duration), ratio of enzyme kinetic parameters ( $V_{max}/K_{50}$ ), and 1<sup>st</sup>-order absorption rate constant ( $k_a$ ) were similar for both sampling sites, and some were slightly affected by dose.

Annexe 1, Figure 1. Observed and predicted portal plasma amoxicillin concentrations in a pig, as a function of time (12 mg/kg BW dose).



Annexe 1, Table 1. Mean estimates of amoxicillin absorption kinetic parameters, as a function of sampling site.

Parameter (units)	Site	Range, linear regression trend, and probability			
		Min	Max	Trend	P-value
Duration (h)	P	0.70	1.50	↗	0.20
	A	0.70	1.20	↗	0.11
$V_{max}/K_{50}$ ( $h^{-1}$ )	P	9.69	128.2	0	0.82
	A	7.47	191.4	0	0.65
$k_a$ ( $h^{-1}$ )	P	4.3E-3	3.4E-1	↗	0.29
	A	1.3E-8	3.7E-1	↗	0.27

Legend: P, portal vein; A, aorta; ↗, increase.

## Discussion

Our results reveal that the oral absorption of AMX in pigs is the sum of carrier-mediated and 1<sup>st</sup>-order processes. As compared to humans (3), AMX in pigs had much shorter access time to the carrier system. This is compatible with the concentration of PepT1 in the jejunum and the fast rate of intestinal transit in pigs. In addition, AMX was absorbed by a 1<sup>st</sup>-order process that may reflect differences in intestinal pH for swine and humans. Finally, pigs had a higher V<sub>max</sub>/K<sub>50</sub> than humans, which suggests that porcine PepT1 has lower transport capacity and/or higher affinity for AMX. Hence, oral AMX in pigs might be subject to food-drug interactions, which may affect its therapeutic efficacy and increase its environmental waste.

## References

1. Agersø H, Friis C (1998). *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 21: 41-6.
2. Klang JE, Burnworth LA, Pan YX, Webb KE Jr., Wong EA (2005). *J. Anim. Sci.*, 83: 172-81.
3. Piotrovskij VK, Paintaud G, Alván G, Trnovec T (1994). *Pharm. Res.*, 11: 1346-50.