

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Suivi physique et densitométrique aux rayons X des effets sur l'os de la
chlortétracycline chez le porc

Par

Martin GUILLOT

Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade

Maître ès sciences

en sciences vétérinaires

option biomédecine

Décembre 2008

© Martin Guillot, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Suivi physique et densitométrique aux rayons-X des effets sur l'os de la
chlortétracycline chez le porc

présenté par :
Martin GUILLOT

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sheila Laverty, président-rapporteuse

Jérôme R.E. del Castillo, directeur de recherche

Kate Alexander, codirectrice de recherche

Martine Denicourt, membre du jury



SOMMAIRE

RESUME

Les tétracyclines s'accumulent dans l'os par des chélates colorés avec le calcium de l'os néoformé, et sont relâchées pendant la résorption osseuse. Elles inhibent la résorption osseuse et stimulent l'ostéogénèse. Nos hypothèses sont 1) chez le porc en croissance, les tétracyclines décoloreraient réversiblement l'os et augmenteraient la densité minérale osseuse (DMO) de manière détectable par imagerie quantitative. Ces effets augmenteraient avec la durée du traitement et l'âge des animaux ; 2) la tomographie quantitative (qCT) serait plus exacte à estimer la DMO que l'absorptiométrie à rayons-X à double énergie (DEXA).

Cent douze porcs mâles castrés sevrés à 21 jours ont été aléatoirement alloués à une nourriture sans antibiotique (n=48) ou à une nourriture complétée en chlortétracycline (800 ppm) distribuée à l'âge de 28 ou 84 jours pour une durée de 28 ou 56 jours (n=16/groupe). Huit témoins et traités finissant leur traitement ont été aléatoirement choisis chaque 28^{ème} jour. La décoloration des 2 premières vertèbres lombaires a été évaluée et leurs DMO mesurées. Leurs DMO ont été estimées grâce à un examen DEXA et qCT sur les porcs traités pendant 56 jours ainsi que leurs témoins.

Nos hypothèses ont été vérifiées. Les tétracyclines induisent une décoloration osseuse réversible et augmentent la DMO de façon persistante. Ces deux phénomènes augmentent avec la durée d'administration et l'âge au début du traitement. La qCT contrairement au DEXA est un outil performant d'estimation de la DMO chez les porcs en croissances soumis ou non aux tétracyclines. La qCT permet aussi la détection de l'augmentation de la DMO observée.

MOTS CLEFS

Absorptiométrie à rayons-X à double énergie ; Décoloration osseuse ; Densité osseuse ; Porcs ; Tétracyclines ; Tomographie quantitative.

ABSTRACT

Tetracyclines accumulate in bones via chelation with calcium ions in new bone and are removed during bone resorption. They inhibit bone resorption and stimulate osteogenesis. Our hypotheses are 1) in growing pigs, tetracyclines may induce a reversible bone discoloration and affect bone mineral density (BMD), which quantitative imaging may detect. Both effects increase with treatment duration and the age of pigs; 2) quantitative computed tomography (qCT) may be more accurate to estimate BMD than dual energy X-ray absorptiometry (DEXA).

One hundred and twelve weaned 21 day-old castrated male pigs were randomly fed a drug-free diet (n=48) or a diet fortified with 800 ppm CTC started at 28 or 86 day of age, and maintained for 28 or 56 days (n=16/group). Every 28 days, 8 control and 8 treated pigs were randomly chosen. The first two lumbar vertebrae bone discoloration and BMD were evaluated. The pigs treated for 56 days as well as their controls were subject to qCT and DEXA for estimation of BMD of the above vertebrae.

Our hypotheses were confirmed. Tetracyclines induce a reversible bone discoloration and a persistent increase in BMD, which both increase with treatment duration and age at treatment onset. The magnitude of the effect of CTC exposure on DXA and qCT-BMD estimations reveals that qCT is a more reliable tool than DXA for monitoring BMD in this context. The increase in BMD induced by tetracyclines can be detected and monitored by qCT.

KEY-WORDS

Bone discoloration; Bone mineral density; Dual energy X-ray absorptiometry; Pigs; Quantitative computed tomography; Tetracyclines.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	iii
RESUME.....	iii
MOTS CLEFS.....	iii
ABSTRACT.....	iv
KEY-WORDS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES EQUATIONS.....	xi
LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xv
AVANT PROPOS.....	xvii
1. RECENSION DE LA LITTERATURE.....	1
1.1. Les tétracyclines.....	1
1.1.1. Structure.....	1
1.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	3
1.1.3. Actions pharmacologiques.....	4
1.1.4. Pharmacocinétique.....	5
1.1.5. Utilisations courantes dans l'industrie porcine.....	6
1.2. L'os : un tissu vivant en perpétuel remaniement.....	7
1.2.1. Propriétés du tissu osseux.....	7
1.2.2. Croissance de l'os.....	10
1.3. Interactions des tétracyclines avec le tissu osseux.....	11
1.3.1. Dépôt des tétracyclines dans le tissu osseux.....	11
1.3.2. Modulation du métabolisme osseux.....	12
1.3.3. Impact sur l'industrie porcine.....	14
1.4. Propriétés des rayons-X.....	15
1.4.1. Généralités.....	15
1.4.2. Théorie ondulatoire.....	15
1.4.3. Théorie corpusculaire.....	15

1.4.4. Interactions avec la matière	15
1.5. La tomодensitométrie.....	17
1.5.1. La production des rayons-X	17
1.5.2. Formation de l'image	18
1.5.3. La qualité de l'image	21
1.5.4. Les artefacts.....	22
1.6. Mesure de la densité minérale osseuse par tomодensitométrie.....	23
1.6.1. Principes de base	23
1.6.2. Applications générales.....	24
1.6.3. Applications chez le porc	25
1.6.4. Sources d'erreurs	26
1.7. L'absorptiométrie à rayons-X à double énergie.....	27
1.7.1. Principes de physique	27
1.7.2. Mesure de la DMO	29
1.7.3. Sources d'erreur.....	30
1.8. Récapitulatif et objectifs.....	32
2. METHODOLOGIE	34
2.1. Conditions expérimentales	34
2.1.1. Animaux	34
2.1.2. Logement.....	34
2.2. Protocole expérimental.....	35
2.2.1. Alimentation.....	35
2.2.2. Constitution des groupes de traitement	36
2.2.3. Estimation des variables zootechniques	38
2.2.4. Prélèvements sanguins et euthanasie.....	38
2.2.5. Imagerie	38
2.2.6. Dissection	40
2.3. Analyse de la décoloration de l'os	41
2.4. Analyses de la DMO	42
2.4.1. Densité physique	42
2.4.2. Imagerie.....	44

2.5. Analyses statistiques	45
3. PUBLICATIONS	47
3.1. In growing pigs, chlortetracycline induces a reversible green bone discoloration and persistent increase of bone mineral density dependent of dosing regimen	48
3.1.1. Abstract.....	48
3.1.2. Key words:.....	49
3.1.3. Introduction	49
3.1.4. Materials and methods.....	50
3.1.5. Results	56
3.1.6. Discussion.....	63
3.1.7. Literature cited.....	69
3.2. Dietary chlortetracycline induces differential effects on the accuracy of qCT and DXA at monitoring the vertebral bone mineral density in growing pigs.	76
3.2.1. Abstract.....	76
3.2.2. Key words.....	77
3.2.3. Introduction	77
3.2.4. Materials and methods.....	78
3.2.5. Results	81
3.2.6. Discussion.....	83
3.2.7. Conclusions	86
3.2.8. Acknowledgments	86
3.2.9. References	86
4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	90
4.1. Choix d'une approche expérimentale.....	90
4.2. Décoloration osseuse induite par les tétracyclines	91
4.3. Conséquences et suivi des effets des tétracyclines sur le métabolisme osseux	93
4.4. Déterminants de la DMO et limitations	95
5. CONCLUSION	98

6. REFERENCES.....	99
7. ANNEXES	xix
7.1. ANNEXE I : Marqueurs biologiques du métabolisme osseux.....	xx
7.1.1. Marqueurs de la formation osseuse	xx
7.1.2. Marqueur de la résorption osseuse	xxi
7.1.3. Références	xxiii
7.2. Annexe II : Exactitude et précision d'une mesure physique.....	xxv
7.2.1. Exactitude.....	xxv
7.2.2. Précision	xxv
7.2.3. Références	xxvi
7.3. ANNEXE III : Synthèse du protocole expérimental.....	xxvii
7.4. ANNEXE IV : Principales teneurs nutritives des aliments croissance et finition.....	xxviii
7.5. ANNEXE V : Exemples de décoloration osseuse des vertèbres L2	xxix
7.6. ANNEXE VI : Résumé de la communication par affiche présentée au vingtième congrès de l'International Pig Veterinary Society	xxx
7.6.1. Introduction	xxx
7.6.2. Materials and Methods	xxx
7.6.3. Results	xxxi
7.6.4. Discussion.....	xxxii
7.6.5. References	xxxii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Nature des substituants des différentes tétracyclines selon les carbones du noyau naphtacène.....	2
Tableau II : Principales caractéristiques des aliments distribués aux porcs.....	35
Tableau III : Marqueurs biologiques du métabolisme osseux possédant un kit de détection avec une réactivité croisée pour le porc.....	xxiii

Article 1

Table 1. Independent variables used in the multiple linear regression analyses of body weight and bone mineral densities of the second lumbar vertebra of pigs.....	56
Table 2. Distribution of body weights of pigs at the times of changes in the medication regimes of dietary chlortetracycline, and results of selected statistical comparisons.....	57
Table 3. Predictors and intercept retained in the final linear regression models of the measured or calculated bone mineral density for the second lumbar vertebra.	60

Article 2

Table 1. Predictors and intercepts retained in the final linear regression models of estimated bone mineral density (BMD) for the second lumbar vertebra.....	82
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de la tétracycline et numérotation des atomes de carbone.	1
Figure 2 : Schéma expliquant le nombre de porcs réparti aléatoirement dans les différents groupes de traitement et pour les temps de mesure, et correspondance avec l'âge des animaux.	37
Figure 3 : Placement de la ROI au centre de la projection des vertèbres L1 et L2 sur l'image issu de l'examen DEXA.	44
Figure 4 : Placement d'une ROI sur une acquisition de qCT dans les 3 plans au cœur du corps d'une vertèbre L2 de porc du temps T6.	45

Article 1

Figure 1. Probability of obtaining a discoloration score of 0 on the second lumbar vertebra as a function of withdrawal time and CTC treatment duration.	59
Figure 2. Trabecular BMD of the second lumbar vertebra of pigs, as a function of age and treatment group, plus linear regression trends.	61
Figure 3. BMD of the body of the second lumbar vertebra as a function of BW and age at the treatment onset, plus linear regression trend.	62
Figure 4. BMD of the body of the second lumbar vertebra as a function of its trabecular BMD.	63

Article 2

Figure 1. Relationships between physically-measured BMD of the second lumbar vertebra of pigs and imaging-estimated BMD, plus linear regression trends.	83
--	----

LISTE DES EQUATIONS

Equation 1 : Caractérisation de l'atténuation des RX	17
Equation 2 : Intensité d'un RX en fonction du Coefficient d'atténuation	19
Equation 3 : Conversion du coefficient d'atténuation en HU	20
Equation 4 : Relation entre l'intensité d'un RX et le coefficient d'atténuation de masse	28
Equation 5 : Décomposition de l'équation 4 en fonction des milieux traversés.....	28
Equation 6 : Densité apparente de l'os.....	43
Equation 7 : Densité réelle de l'os.	43
Equation 8 : DMO mesurée.....	43

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS

%	Pourcentage
/	Divisé par
×	Multiplié par
°C	Degrés Celsius
μ	Coefficient d'atténuation
$\mu_{m,os}$	Coefficient d'atténuation de masse de l'os
$\mu_{m,TM}$	Coefficient d'atténuation de masse des tissus mous
μ_{eau}	Coefficient d'atténuation de l'eau
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
A	Nombre de masse d'un atome
ALP	Phosphatase alcaline
BALP	Isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline
BMD	Bone mineral density
C	Carbone
Ca ;	Calcium
Ca ²⁺	Ion calcium
cm	Centimètre
cm ²	Centimètre carré
cm ³	Centimètre cube
CTC	Chlortétracycline
CTX	Télopeptide C-terminal du collagène de type I
DEXA	Absorptiométrie à rayons-X à double énergie
DFOV	Champs d'inclusion de l'image (« <i>display field of view</i> »)
DMO	Densité minérale osseuse
eV	Electronvolt
g	Gramme
GMQ	Gain moyen quotidien
HU	Unité de Hounsfield

I	Energie d'un rayon-X
I_0	Energie d'un rayon-X non atténué
IC	Indice de conversion
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (c'est-à-dire)
K_2HPO_4	Phosphate de potassium
keV	Kiloélectronvolt
kg	Kilogramme
kVp	potentiel maximal de kilovoltage (« <i>kilovoltage peak</i> »)
m	Mètre
mAs	Milliampères-secondes
M_{air}	Masse de l'échantillon dans l'air
M_{eau}	Masse de l'échantillon dans l'eau
$M_{eau/degaz}$	Masse de l'échantillon dégazé dans l'eau
mg	Milligramme
N	Azote
N	Nombre de photons transmis
N_0	Nombre de photons incidents
NaI	Iodure de sodium
NTX	Télopeptide N-terminal du collagène de type I
O	Oxygène
OTC	Oxytétracycline
$(p \times x)$	Densité surfacique d'un tissu d'épaisseur x
$(p \times x)_{os}$	Densité surfacique de l'os
$(p \times x)_{TM}$	Densité surfacique des tissus mous
P	Phosphore
pKa	Constante de dissociation acide
qCT	Tomodensitométrie quantitative
RIA	Analyse radio-immunologique
ROI	Région d'intérêt
RX	Rayons-X
SDPS	Syndrome de dépérissement post-sevrage

T1, T2, ..., T6	Temps de mesure numéro 1, 2, ..., 6
TC	Tétracycline
TRAP	Phosphatase acide résistante au tartrate
x	Épaisseur du milieu traversé
Z	Nombre atomique d'un atome

REMERCIEMENTS

A Monsieur Jérôme del Castillo

Pour avoir accepté de me diriger tout au long de cette aventure, pour ses conseils éclairés et pour m'avoir donné goût de poursuivre malgré tout en recherche.

A Madame Kate Alexander

Pour avoir accepté de me codiriger, de m'avoir soutenu moralement et scientifiquement, et de m'avoir toujours encouragé à poursuivre mes recherches en imagerie médicale.

A Madame Sheila Laverty

Pour avoir accepté d'être la présidente du jury.

A madame Martine Denicourt

Pour avoir accepté d'être membre du jury.

A Monsieur Candido Pomar

Pour ses conseils éclairés et son écoute.

Aux membres d'Agroalimentaire Canada de Lennoxville

Pour leur soutien technique efficace et leur chaleureux accueil.

**Aux membres du service d'imagerie du Centre Hospitalier Vétérinaire de
Saint-Hyacinthe**

Pour leur disponibilité et leur joie de vivre.

A mes parents

Pour avoir toujours encouragé mes projets.

A Agathe

Pour être à mes côtés tous les jours.

AVANT PROPOS

L'élevage porcin est de nos jours un élevage intensif au sein d'une filière industrialisée. Il en découle que la médecine porcine est une médecine de population. Les animaux sont considérés dans leur ensemble pour leurs conditions zootechniques et sanitaires. Un grand nombre d'animaux sont regroupés, pouvant faciliter la transmission de maladies. Les traitements peuvent donc être effectués pour un groupe d'individus avec des contraintes économiques majeures. La prophylaxie antibiotique est une pratique courante. Elle se définit comme étant une médication contre une maladie ou une pathologie, d'efficacité prouvée, la plus courte possible et à une dose thérapeutique sur des animaux sans signe clinique et a pour but de diminuer la pression infectieuse de l'élevage. Elle tend à minimiser les pertes de croissance qui sont économiquement très délétères. La distribution se fait la plupart du temps via l'aliment ou l'eau de boisson. Cette technique est rapide, efficace et avantageuse sur le plan financier (Dunlop et al. 1998; Cromwell 2002; Friendship and Prescott 2006).

L'élevage porcin est un des plus gros consommateurs d'antibiotiques. La moitié des antibiotiques utilisés sont des tétracyclines de première génération (tétracycline, oxytétracycline et chlortétracycline) sous la forme d'aliment médicamenteux (Prescott 1997). Ce sont des antibiotiques à large spectre très actifs contre les principales bactéries du système respiratoire du porc : *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pijpers et al. 1989; Baert et al. 2000). Elles sont aussi utilisées comme promoteur de croissance à dose sub-thérapeutique. Les porcelets après le sevrage sont la cible principale de ces traitements (Prescott 1997; Dunlop et al. 1998).

A la fin des années 1990, un nouveau virus a été détecté dans les élevages porcins à travers le monde : le circovirus porcin de type 2. Ce virus est en partie responsable du syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS). Il concerne les porcs entre 2 et 4 mois d'âge. Sa morbidité peut atteindre 50% et son taux de mortalité plus de 20% (Segalès et al. 2006). C'est une maladie polyfactorielle qui a pour principales

conséquences des retards de croissance et des problèmes respiratoires englobés dans le complexe des maladies respiratoires porcines (Segalès et al. 2006). Cette maladie est un fléau pour l'élevage porcin. Depuis son apparition, les éleveurs intensifient l'usage des tétracyclines pour minimiser les retards de croissance et éviter ou combattre les maladies bactériennes respiratoires secondaires. De plus, l'âge d'apparition du SDPS a conduit les éleveurs à effectuer des traitements de plus longue durée et sur des animaux plus âgés que traditionnellement.

Parallèlement à ces changements sur le schéma thérapeutique des tétracyclines, les abattoirs porcins au Canada rapportent une augmentation de l'incidence des carcasses décolorées jaune-verdâtres. Cette coloration anormale est principalement détectée au niveau des côtes lors de l'ouverture de la carcasse. Elle est liée à la présence de résidus de tétracyclines dans l'os et a un fort impact négatif sur toute la filière porcine. Les producteurs dont les porcs présentent cette anomalie voient leurs revenus diminués. Finalement, cette coloration anormale apporte un questionnement sur le risque de résidus de tétracycline pour le consommateur et sur le risque d'augmentation des résistances bactériennes aux tétracyclines.

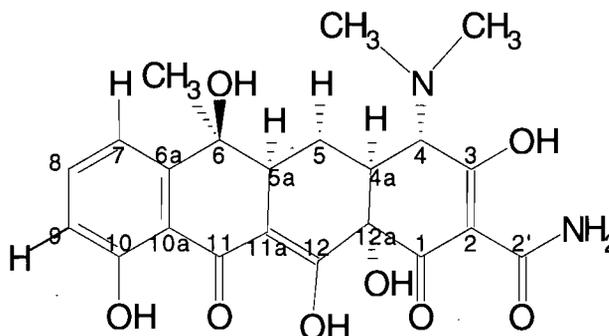
1. RECENSION DE LA LITTERATURE

1.1. Les tétracyclines

1.1.1. Structure

Les tétracyclines sont des naphthacèncarboxamides (Chambers 2001). Les tétracyclines de première génération sont des composés naturels produits par des bactéries filamenteuses de l'espèce *Streptomyces*. Elles comportent la chlortétracycline (CTC), l'oxytétracycline (OTC) et la tétracycline (TC). Les tétracyclines de deuxième génération sont des composés de semi-synthèse. Les deux représentants principaux sont la doxycycline (DC) et la minocycline (MC) (Einstein et al. 1994). Les tétracyclines de troisième génération, les glycyclines, sont aussi des composés de semi-synthèse formés par des substitutions sur le carbone 9 des tétracyclines de deuxième génération (Chopra 2001). Les tétracyclines forment donc une famille avec une structure commune bien conservée. La structure de base (Figure 1) correspond à celle de la TC (Chambers 2001) même si la première découverte fut la CTC en 1948 (Chopra 2001).

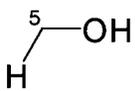
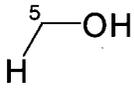
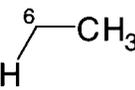
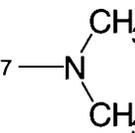
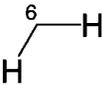
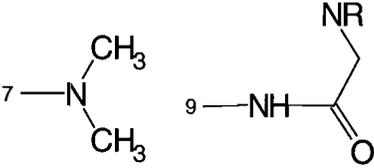
Figure 1. Structure de la tétracycline et numérotation des atomes de carbone.



Les groupements d'intérêts sont portés par le carbone 2' (fonction carboxylamide), les carbones 1, 2 et 3 (système β - dicétone), le carbone 4 (amine

tertiaire), les carbones 6 et 10 (groupe phénol) et les carbones 11, 11a et 12 (système β – dicétone). Les autres molécules de la famille (Tableau 1) découlent de substitutions sur les carbones 5, 6, 7 et 9 (Einstein et al. 1994; Chambers 2001).

Tableau I. Nature des substituants des différentes tétracyclines selon les carbones du noyau naphtacène.

Génération	Nom	Groupes substituants	Carbone substitué
Première	CTC	7—Cl	numéro 7
	OTC		numéro 5
Deuxième	DC		numéros 5 et 6
			
	MC		numéros 6 et 7
Troisième	Glycylines		numéros 6, 7 et 9
			

R = groupement alkyl

1.1.2. Propriétés physico-chimiques

1.1.2.1. Généralités

Les tétracyclines sont des molécules solubles dans les acides, les bases diluées et les éthers glycoliques. Elles sont peu solubles dans l'eau et les alcools. Elles sont insolubles dans l'éther et les hydrocarbures. Elles forment des sels avec les acides et les bases. Elles sont surtout instables en solutions alcalines mais stables sous forme sèche (Regna 1959).

1.1.2.2. Constante de dissociation acide

La constante de dissociation acide (pKa) est la constante qui détermine l'équilibre entre les formes ionisées et neutres d'un acide ou d'une base faible. Les tétracyclines possèdent trois groupes ionisants. Un est associé au système céto-énole porté par les carbones 2 et 3 (pKa d'environ 3,3), un est associé au système céto-énole phénolique portés par les carbones 10, 11 et 12 (pKa d'environ 7,7) et un est associé à l'amine tertiaire portée par le carbone 4 (pKa d'environ 9,7). Ainsi, dans les différentes conditions de pH de l'organisme, les tétracyclines sont ionisées. Elles seront sous forme de zwitterion à un pH compris entre 4 et 7. Sa forme prédominante sera celle où le système céto-énole est chargée négativement, le céto-énole phénolique est neutre et l'amine tertiaire est chargée positivement (Regna 1959; Colaizzi and Klink 1969). Cette forme est majoritaire dans les fluides biologiques. Ainsi, les tétracyclines pourront diffuser la plupart des membranes biologiques malgré leur caractère ionique.

1.1.2.3. Coefficient de partage octanol : eau

Le coefficient de partage octanol : eau permet d'évaluer la liposolubilité d'une molécule. Cette propriété est importante puisque plus une molécule xénobiotique est liposoluble, plus elle a le potentiel de diffuser vers sa cible pharmacologique pour être biologiquement active. Le profil du coefficient de partage octanol : eau de certaines tétracyclines en fonction du pH de la solution est bien connu (Colaizzi and Klink 1969). La liposolubilité est maximale à des pH compris entre 4 et 7, pH où la forme zwitterionique prédomine. Dès que le pH sort de cette zone, la liposolubilité diminue rapidement. Bien que les profils soient identiques, les substituants propre à chaque tétracycline affectent la solubilité de la molécule. Les tétracyclines de deuxième

génération sont jusqu'à dix fois plus liposolubles que celles de première. Parmi la première génération, la CTC est la plus liposoluble.

1.1.2.4. Chélation de cations multivalents

Il est connu depuis longtemps que les tétracyclines forment des chélates colorés avec les cations bi- et tri-valents métalliques (Albert and Rees 1956). Les groupes cétones et énoles de la molécule sont majoritairement responsables de cette propriété (Kunin and Finland 1960) et sont conservés dans les différentes tétracyclines (Jin et al. 2007). Le complexe cation-ligand, dans le cas des ions métalliques, s'effectue par étapes qui conduisent généralement à la formation d'un complexe 1 : 1 ou 1 : 2 (Ibsen and Urist 1961). Cette propriété explique le caractère ostéotrope des tétracyclines (cf 1.3.1.1).

1.1.2.5. Fluorescence

La fluorescence des tétracyclines est visible dans l'ensemble des tissus où les tétracyclines sont présentes et elles permettent de suivre la distribution de l'antibiotique (Milch et al. 1958). Cette fluorescence persiste dans les os (Milch et al. 1957) où son intensité est corrélée positivement à la concentration en antibiotique (Ibsen et al. 1963).

1.1.3. Actions pharmacologiques

1.1.3.1. Action antibiotique

Les tétracyclines sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique (Keck and Borne 1995). Cette action est ciblée sur la sous-unité 30S des ribosomes et sur l'ARN de transfert de la cellule bactérienne (Einstein et al. 1994). Cette propriété est due à l'oxygène de la fonction carboxylamide portée par le carbone 2' (del Castillo 2000).

1.1.3.2. Inhibition des métalloprotéases de la matrice extracellulaire

Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire regroupent les endopeptidases neutres zinc-dépendantes, qui sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Acharya et al. 2004). De nombreuses métalloprotéases de la matrice extracellulaire sont inhibées de manière dose-dépendante par les tétracyclines grâce à des mécanismes non antibactériens (Greenwald et al. 1998; Karna et al. 2001; Acharya et al. 2004). Les implications sont diverses en fonction de la métalloprotéase inhibée. Ainsi, les tétracyclines diminuent la capacité métastatique de certaines cellules

cancéreuses (Acharya et al. 2004). Chez la souris, elles ont un effet anti-inflammatoire et neuroprotecteur lors d'ischémie (Domercq and Matute 2004). Elles interviennent aussi dans la régulation de la résorption osseuse (Gomes et al. 1984; Rifkin et al. 1994; Aoyagi et al. 1996; Greenwald et al. 1998; Holmes et al. 2004) (cf 3.4.4).

1.1.4. Pharmacocinétique

Plusieurs études de pharmacocinétique ont été menées chez l'humain et les animaux domestiques (Kunin and Finland 1960; Einstein et al. 1994) et notamment chez le porc (Mevius et al. 1986; Kilroy et al. 1990; Pijpers et al. 1991; Nielsen and Gyrd-Hansen 1996; Baert et al. 2000; del Castillo 2000).

1.1.4.1. Absorption

L'absorption des tétracyclines s'effectue de manière passive principalement au niveau de l'intestin (Kunin and Finland 1960; Pijpers et al. 1991; Einstein et al. 1994). Cette absorption est rapide et est d'autant plus importante que les molécules sont lipophiles (DC et MC > CTC > TC > OTC). Au niveau de l'estomac, elle est faible et retardée. Ces observations sont en accord avec les caractéristiques chimiques (pKa) et l'étude de Colaizi (1969) sur la liposolubilité des tétracyclines en fonction du pH. Pourtant, une disparité existe entre les espèces. Chez le porc l'absorption intestinale est largement plus faible que chez les autres espèces (Einstein et al. 1994). La biodisponibilité (proportion de médicament administré par une voie extravasculaire qui atteint la circulation systémique sous sa forme originale ou inchangée) par voie orale est de l'ordre de 30% pour les carnivores domestiques pour les tétracyclines de première génération et chez l'humain d'environ 90% pour celles de deuxième. Chez le porc elle varie de 3 à 18% pour les tétracyclines de première génération et est d'environ 21% pour la doxycycline (Baert et al. 2000). Chez toutes les espèces, les tétracyclines sont liées aux protéines plasmatiques dans différentes mesures (20 à 93%). La différence de biodisponibilité s'explique par des différences d'absorption. La chélation des cations est identique pour toutes les molécules, mais la quantité de cations apportée par l'alimentation varie entre les espèces et pourrait expliquer ces disparités d'absorption (Wanner et al. 1991). Cette hypothèse est soutenue par la diminution de la biodisponibilité parfois observée lors d'une prise de nourriture concomitante à une

administration de tétracyclines par voie orale (Mevius et al. 1986; Nielsen and Gyrd-Hansen 1996). Chez le chien et l'Homme une faible absorption au niveau du colon existe (Kunin and Finland 1960) mais n'est pas rapportée chez le porc.

1.1.4.2. Distribution

Le volume de distribution (constante de proportionnalité à un temps donné entre la quantité de médicament dans le corps et la concentration plasmatique de ce médicament) des tétracyclines chez le porc est compris entre 0,7 et 1,4 (Mevius et al. 1986; Kilroy et al. 1990; Pijpers et al. 1991; Nielsen and Gyrd-Hansen 1996; Baert et al. 2000; del Castillo 2000). Ce volume de distribution est d'autant plus grand que la molécule est lipophile. De plus, les tétracyclines sont distribuées dans tous les tissus de l'organisme chez toutes les espèces. Les concentrations les plus fortes (1,5 à 4 fois la concentration plasmatique) se retrouvent dans le foie et le rein. Les concentrations les plus faibles (de l'ordre du $\mu\text{g/g}$) sont au niveau du cerveau et de l'os (Buyske et al. 1960; Kunin and Finland 1960; Black and Gentry 1984). Un effet de séquestration se produit pour le tissu osseux et la dentine (Einstein et al. 1994).

1.1.4.3. Métabolisme

Aucun métabolisme ne semble affecter les tétracyclines chez le porc alors qu'une forme conjuguée inactive de la DC est excrétée chez l'humain (Einstein et al. 1994).

1.1.4.4. Excrétion

L'excrétion est majoritairement urinaire par filtration glomérulaire. Une faible partie est excrétée par un transport actif au niveau de la bile. Il s'en suit un cycle entéro-hépatique (Einstein et al. 1994). La doxycycline est une exception puisqu'elle est fortement éliminée par les fèces (Kunin and Finland 1960; Einstein et al. 1994).

1.1.5. Utilisations courantes dans l'industrie porcine

Les tétracyclines possèdent un large spectre d'activité. Elles sont actives contre les infections à bactéries Gram négatifs et Gram positifs, les mycoplasmes, les chlamydias, les rikettsies, et certains protozoaires (Einstein et al. 1994; Chambers 2001). Les tétracyclines les plus utilisées dans l'industrie porcine sont la CTC et l'OTC par voie orale dans l'aliment ou l'eau de boisson et la OTC par voie intra-musculaire

(Friendship and Prescott 2006). La pratique la plus courante est l'administration via des aliments médicamenteux contenant de l'OTC ou de la CTC (Leman et al. 1992). Elles sont utilisées aux États-Unis comme promoteurs de croissance (Prescott 1997) et dans des programmes de prophylaxie non spécifiques (Friendship and Prescott 2006). Les bactéries pathogènes du système pulmonaire sont la cible principale : *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae* et *M. hyopneumoniae* (Pijpers et al. 1989; Baert et al. 2000). Malheureusement, les concentrations efficaces contre ces bactéries ne sont pas souvent atteintes avec les aliments médicamenteux conduisant à l'administration de dose sub-thérapeutique (Prescott 1997) et parfois à l'application de schémas thérapeutiques empiriques (del Castillo et al. 1998).

1.2. L'os : un tissu vivant en perpétuel remaniement

1.2.1. Propriétés du tissu osseux

1.2.1.1. Fonctions

L'os possède deux rôles fondamentaux. Un rôle structural de protection des tissus mous et la moelle osseuse (Shea and Miller 2005) et de résistance à la force de gravité et aux forces infligées lors du mouvement (Boskey 2002). Un rôle métabolique puisqu'il représente une source et un dépôt de calcium et de phosphore (Shea and Miller 2005).

1.2.1.2. Les cellules

1.2.1.2.1. Ostéoblastes

Les ostéoblastes, cellules d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la synthèse de la matrice osseuse (Boskey 2002) et de sa minéralisation (Vaughan 1981b; Shea and Miller 2005). Ce sont les cellules qui initient le processus de résorption osseuse en sécrétant une collagénase (Rifkin et al. 1994; Shea and Miller 2005).

1.2.1.2.2. Ostéoclastes

Les ostéoclastes, cellules d'origine monocyttaire, sont responsables de la résorption osseuse (Shea and Miller 2005). Cette destruction de la matrice osseuse et des

minéraux est effectuée par la production d'acides et d'enzymes de digestion spécifiques (collagénases, cathepsines et protéases) (Vaughan 1981b; Boskey 2002).

1.2.1.2.3. Ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes enfermés dans la matrice minéralisée qu'ils ont produite. Ces cellules restent cependant biologiquement actives (Metz et al. 2003). Elles sont connectées aux autres cellules osseuses par de long bras cytoplasmiques cheminant dans la matrice osseuse (Boskey 2002; Shea and Miller 2005). Les ostéocytes sont les capteurs mécaniques et chimiques de l'os. Cela leur confère un rôle actif dans le déclenchement du remodelage osseux (Metz et al. 2003) et le maintien de l'homéostasie (Shea and Miller 2005).

1.2.1.2.4. Cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes inactivés présents à la surface de l'os mature. Elles participent à la régulation du calcium plasmatique, à la nutrition des ostéocytes et à l'initiation la résorption osseuse par les ostéoclastes (Vaughan 1981b; Shea and Miller 2005).

1.2.1.3. Composition

L'os est formé :

- D'une matrice organique qui représente 20 à 40% du poids de l'os et est composée à 90% par du collagène de type I. Le collagène est synthétisé et déposé en couches par les ostéoblastes. Le 10% restant est composé de glycoprotéines et de protéoglycanes, molécules capables de capter des ions, puis d'albumine et de facteurs de croissance (Vaughan 1981c; Boskey 2002; Shea and Miller 2005).
- De cristaux d'hydroxyapatite ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$) qui représentent 75% du poids de l'os sec, pour 50% de son volume. L'hydroxyapatite confère à l'os sa rigidité et sa force. Elle est une forme cristalline pauvre, donc facilement soluble. Le calcium et le phosphore présents dans les cristaux d'hydroxyapatite sont en équilibre avec le calcium et le phosphore en solution dans l'organisme (Vaughan 1981c; Boskey 2002; Shea and Miller 2005).

- De l'eau et du gras qui représentent 5 à 10% et 1 à 5% du poids de l'os respectivement. (Vaughan 1981c; Boskey 2002; Shea and Miller 2005)

1.2.1.4. Homéostasie

Les différentes cellules osseuses sont régulées par les hormones du métabolisme osseux et par les cytokines qui peuvent se fixer sur leurs récepteurs membranaires (Shea and Miller 2005). Les stimulus mécaniques et chimiques captés par les ostéocytes démarrent la régulation locale entre les cellules osseuses et permettent ainsi un processus d'auto-organisation de la structure de l'os (Huiskes 2000; Metz et al. 2003). Les hormones du métabolisme osseux régulent de manière plus globale la calcémie. L'hormone parathyroïdienne (PTH) augmente la calcémie en agissant sur les reins, les intestins et l'os. Au niveau de l'os, elle augmente la résorption osseuse en stimulant les ostéoclastes. La calcitonine est produite par la thyroïde. Cette hormone diminue la résorption osseuse par inhibition directe des ostéoclastes. La vitamine D est produite au niveau de la peau. Cette vitamine agit sur les reins, les intestins, la glande parathyroïde et l'os. Elle diminue la résorption osseuse par inhibition des ostéoclastes et de la PTH (Vaughan 1981a; Boskey 2002). Une carence en vitamine D entraîne ainsi une ostéopénie (Fujita et al. 1991).

1.2.1.5. Le modelage et le remodelage osseux

Le modelage et le remodelage sont les deux procédés fondamentaux qui gouvernent le métabolisme osseux (Allen 2003). Le modelage osseux est le processus qui permet la modification de la taille et de la forme de l'os (Shea and Miller 2005). Lors de ce processus, la formation et la résorption osseuse sont distincts dans le temps et l'espace (Allen 2003). Le remodelage osseux est le phénomène qui remplace l'os ancien par du nouveau (Shea and Miller 2005). Il nécessite l'action couplée des ostéoblastes et des ostéoclastes. Cette action coordonnée s'effectue au niveau des unités multicellulaires (ensemble des cellules participant au remodelage, organisées autour d'un vaisseau sanguin), appelées ostéons (Allen 2003). Les ostéocytes exercent un rétrocontrôle négatif sur le taux de renouvellement osseux quand leur nombre augmente au sein des ostéons (Metz et al. 2003). Ainsi, le remodelage est le processus continu par lequel l'os adapte son architecture aux contraintes mécano-élastiques (Huiskes 2000; Boyde 2003)

et métaboliques (Allen 2003). Les variations de métabolisme peuvent être suivies par des marqueurs biochimiques (Annexe I). Elles pourront aussi se traduire par une variation de la densité minérale osseuse (DMO, (Heaney 2003).

L'os spongieux est soumis à un renouvellement osseux beaucoup plus rapide que l'os cortical (Vaughan 1981a). L'os spongieux est ainsi le reflet du métabolisme osseux de l'organisme (Cann 1999; Akahoshi et al. 2005). De plus, le renouvellement osseux est d'autant plus actif que l'os renferme de la moelle osseuse rouge, *i.e.* les vertèbres, les côtes et le sternum (Li et al. 1999; Shea and Miller 2005).

1.2.2. Croissance de l'os

1.2.2.1. Ossification endochondrale

Ce type d'ossification, dont le centre d'ossification est une matrice cartilagineuse (Shea and Miller 2005), est impliqué dans la formation des os longs, des vertèbres et dans la croissance longitudinale de l'os (Allen 2003). Au niveau embryonnaire, le futur os est uniquement formé par cette matrice ou périchondre. Une invasion vasculaire du périchondre a pour conséquence l'apport de cellules qui formeront la moelle osseuse hématopoïétique et l'ossification progressive de cette matrice cartilagineuse avec la formation d'os spongieux par les ostéoblastes. Les cellules de la couche externe de la matrice cartilagineuse se différencient rapidement pour former le périoste. La matrice cartilagineuse est conservée pour former les plaques de croissance et le cartilage articulaire. La croissance en longueur de l'os s'effectue au niveau de la zone hypertrophique de la plaque de croissance par la formation d'os spongieux. Les processus de remodelage osseux à partir des ostéons au niveau de l'os spongieux formé permettent d'augmenter la force et la rigidité de l'os (Vaughan 1981a; Boskey 2002; Lawrence and Fowler 2002).

1.2.2.2. Ossification intra-membranaire

Ce type d'ossification est impliqué dans la formation des os plats, la croissance en circonférence des os au niveau du périoste (Boskey 2002). Les cellules mésenchymateuses sont le point de départ de ce type de croissance (Shea and Miller 2005). Ces cellules sécrètent une matrice organique qui servira de patron à la minéralisation. Les ostéoblastes sécrètent des spicules d'os radiés (ou trabécules) autour

des centres d'ossification qui forment ainsi de l'os trabéculaire ou spongieux. A la périphérie, de l'os compact est distribué sous la forme de fines lamelles et est recouvert par le périoste (Vaughan 1981a).

1.3. Interactions des tétracyclines avec le tissu osseux

1.3.1. Dépôt des tétracyclines dans le tissu osseux

1.3.1.1. Chélation des ions calcium

De manière identique aux autres cations bi- et trivalents, les tétracyclines forment avec l'ion calcium (Ca^{2+}) un complexe 1:1 ou 2:2 (Ibsen and Urist 1961). Les tétracyclines ont donc une grande affinité pour l'hydroxyapatite, majeur constituant de l'os (MacDonald et al. 1964). Les études de fluorescence des tétracyclines montrent ainsi une intensité plus élevée au niveau des régions de production osseuse (Milch et al. 1957; 1958). Cela suggère une affinité particulière des tétracyclines pour la matrice minérale osseuse nouvellement formée (Ibsen 1985). Cette propriété est utilisée en histologie, où la croissance osseuse est détectée par marquage des coupes d'os avec des tétracyclines (Brian 1992). Une autre conséquence de cette affinité pour l'hydroxyapatite est qu'une grande quantité de tétracycline inhibe la croissance osseuse chez la souris. Cette rétention de calcium diminue la calcification de l'os métaphysaire et augmente l'épaisseur des plateaux épiphysaires, comme observé lors d'hyperparathyroïdie (MacDonald et al. 1964). Cette propriété explique aussi la toxicité des tétracyclines pendant la période de développement osseux fœtal (Kunin and Finland 1960).

1.3.1.2. Cinétique d'accumulation et de déplétion

L'hétérogénéité morphologique et physiologique de l'os, implique une pharmacocinétique et une pharmacodynamie complexe pour les agents capables de se lier à l'os. Les facteurs physiologiques (lactation, ménopause) ou pathologiques (ostéoporose, tumeur osseuse, diabète mellitus) qui accroissent le taux de résorption osseuse, peuvent augmenter la vitesse de déplétion des agents ostéotropes (Stepensky et al. 2003).

Seulement des données fractionnaires existent sur la cinétique d'accumulation et de déplétion des tétracyclines dans l'os chez les rongeurs. Les tétracyclines rejoignent le tissu osseux dans les secondes après une injection intraveineuse (Milch et al. 1958). Seulement une faible proportion (3 à 6% de la quantité biodisponible) est retrouvée dans l'os quelque soit la dose administrée (Buyske et al. 1960; Black and Gentry 1984). Alors que les tétracyclines s'accumulent peu dans les tissus non calcifiés (Milch et al. 1958; Benitz et al. 1967), elles persistent pendant quelques semaines à quelques mois dans l'os (Buyske et al. 1960; Benitz et al. 1967; Li et al. 1989).

La déplétion osseuse des tétracyclines s'effectue de manière irréversible et est positivement corrélée à la résorption osseuse (Li et al. 1989). Il existe une phase de déplétion rapide (une semaine environ) suivie d'une phase de déplétion lente (trois mois environ) qui correspond à l'activité de résorption osseuse (Stepensky et al. 2003). Cependant, ces phénomènes sont peu connus pour l'instant (Stepensky et al. 2003).

1.3.1.3. Décoloration de l'os

Suite à une administration de minocycline chez le chien, une décoloration sombre de l'os au niveau des fémurs a été décrite. Cette décoloration n'était accompagnée d'aucun autre changement macroscopique (Benitz et al. 1967). Chez l'humain, plusieurs cas cliniques rapportent une décoloration des os par les tétracyclines. Ces observations font suite à une administration chronique par voie orale sur plusieurs années (Oklund et al. 1981). De même, il est rapporté une coloration sombre des dents après une administration de minocycline par voie orale pendant 2 ans (Wolfe and Reichmister 1984). De plus, lors d'une intervention chirurgicale, une décoloration bleue-verdâtre du fémur est décrite chez un patient recevant chroniquement des tétracyclines. Cette décoloration n'affectait ni le cartilage ni les tissus péri-articulaires (McCleskey and Littleton 2004). Ainsi ces études démontrent qu'une décoloration des os est liée à une accumulation progressive de tétracyclines dans ce tissu.

1.3.2. Modulation du métabolisme osseux

1.3.2.1. Actions sur les ostéoclastes

Plusieurs études rapportent que les tétracyclines diminuent la résorption osseuse en agissant sur les ostéoclastes.

Différentes actions directes sont rapportées :

- Diminution de la formation des ostéoclastes matures (Bettany et al. 2000).
- Diminution du nombre d'ostéoclastes actifs au niveau des sites de résorption osseuse (Rifkin et al. 1994).
- Induction de l'apoptose des ostéoclastes (Bettany et al. 2000; Holmes et al. 2004).

Des actions indirectes sont aussi rapportées :

- Inhibition de l'interleukine-6 lors de destruction osseuse à médiation immunitaire qui implique une inhibition de l'induction des ostéoclastes (Kirkwood et al. 2003).
- Inhibition de l'activité des ostéoclastes qui dégradent alors moins de matrice osseuse par diminution de la production d'acide, et par diminution de la formation de podosomes (Rifkin et al. 1994).

1.3.2.2. Actions sur les métalloprotéases de la matrice extracellulaire de l'os

La résorption osseuse est aussi inhibée grâce à l'action des tétracyclines sur les métalloprotéases de la matrice extracellulaire de l'os (collagénases, gélatinases, et stromelysine). Plusieurs actions sont décrites :

- Inhibition de l'activité de certaines collagénases par chélation du calcium, mise en évidence dans un modèle de résorption osseuse induite par la PTH (Gomes et al. 1984).
- Diminution de l'activité de collagénases chez les patients atteints de périodontite (Chang et al. 1994; Rifkin et al. 1994).
- Inhibition dose-dépendante de l'activité des collagénases et de la gélatinase. De plus, les collagénases impliquées dans les phénomènes de destruction osseuse sont inhibées avec des doses beaucoup moins importantes que la collagénase nécessaire à l'initiation de la résorption osseuse (Greenwald et al. 1998).

1.3.2.3. Actions sur les ostéoblastes

Les tétracyclines semblent avoir moins d'impact sur les ostéoblastes. Cependant certaines études décrivent une stimulation de l'ostéogénèse. Cette stimulation est due à une stimulation directe consécutive à une concentration des tétracyclines dans les pré-

ostéoblastes et les ostéoblastes (Sasaki et al. 1994). Chez un modèle de rat ostéoporotique, il est rapporté une inhibition de la perte osseuse et une déposition osseuse au niveau de l'endoste. Cette déposition est due à une stimulation de la production de collagène par les ostéoblastes qui est suivie d'une augmentation de la production osseuse (Aoyagi et al. 1996).

1.3.3. Impact sur l'industrie porcine

1.3.3.1. Impact chez l'animal

La décoloration des os est visible sur la carcasse. Ces carcasses sont dépréciées et le producteur voit donc son revenu diminué. De plus, des coûts supplémentaires sont imputés pour la transformation de cette carcasse qui doit être désossée. Ainsi cette anomalie se répercute sur l'ensemble de la filière.

1.3.3.2. Impact sur la santé humaine

Comme tous les antibiotiques, les tétracyclines sont soumises à une réglementation sur les résidus. Les limites maximales de résidus de tétracycline fixées par Santé Canada sont 0,2 (muscles); 0,6 (foie) et 1,2 (reins) mg/kg. Dans l'os porcin, des concentrations résiduelles de tétracyclines entre 0,14 et 50 mg/kg sont fréquemment détectées. L'incidence de ces résidus est plus importante chez les porcelets que les porcs. Ces résidus ont un fort impact sur la contamination des produits carnés provenant de viande désossée mécaniquement (Kühne et al. 2000). Les tétracyclines peuvent aussi être extraites de l'os en milieu acide. La présence de tétracyclines peut alors être augmentée pour les produits carnés contenant de l'os soumis à ces conditions. De plus jusqu'à 50% des tétracyclines liés peuvent être libérées après ingestion (Kühne and Körner 2001). Les résidus d'antibiotiques peuvent avoir des effets nocifs sur la flore intestinale du consommateur (Emborg 2003). De plus, mêmes de très faibles quantités de tétracyclines mènent au développement de résistances bactériennes (Roberts 1996).

1.4. Propriétés des rayons-X

1.4.1. Généralités

Les propriétés des rayons-X (RX) découlent du fait que ce sont des radiations électromagnétiques (Bushberg et al. 2002a). Les RX ne possèdent pas de masse et ne sont pas influencés par les champs magnétiques et électriques. Ils suivent une trajectoire rectiligne avec une vitesse constante dans un milieu donné (Meynaud-Collard et al. 2001; Bushberg et al. 2002a).

1.4.2. Théorie ondulatoire

Les RX se comportent comme une onde. Cette onde est alors la combinaison d'une oscillation électrique et magnétique orientées perpendiculairement. Ainsi un RX est caractérisé par sa longueur d'onde. La longueur d'onde est définie par la distance séparant deux points identiques de deux ondes successives. Elle est exprimée en mètre (m). Les RX ont une longueur d'onde comprise entre 10^{-12} et 10^{-8} m (Bushberg et al. 2002a).

1.4.3. Théorie corpusculaire

Les RX se comportent aussi comme une particule transportant une certaine quantité d'énergie. Cette particule est appelée photon. L'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Elle est exprimée en électronvolt (eV). Un électronvolt est l'énergie acquise par un électron lorsqu'il traverse dans le vide une différence de potentiel de un volt. Les RX ont une énergie comprise entre 10^3 et 10^8 eV (Bushberg et al. 2002a).

1.4.4. Interactions avec la matière

Quand un RX rencontre de la matière, il peut interagir de trois manières. Il peut la traverser, être diffusé ou être absorbé (Meynaud-Collard et al. 2001; Bushberg et al. 2002b). Dans le premier cas, le rayonnement ne subit pas de modification. Par contre, dans les autres cas, il est modifié.

1.4.4.1. La diffusion

Lors de ce phénomène le photon est redirigé lorsqu'il rencontre un atome. Si l'énergie du photon est suffisamment élevée pour éjecter un électron, on parle de diffusion de Compton. Dans ce cas, une partie de l'énergie est transmise du RX à l'un des électrons de l'atome traversé. Un RX d'énergie plus faible et de direction différente résulte donc de cette interaction. La probabilité d'apparition de la diffusion de Compton augmente lorsque l'énergie du RX incident augmente et lorsque la densité du milieu traversé augmente. D'une manière moins importante, elle augmente quand le rapport du nombre atomique sur le nombre de masse (Z/A ; Z étant égal au nombre de protons d'un atome et A est égal au nombre de protons et de neutrons) des atomes traversés augmente. Donc elle sera plus importante pour les tissus contenant de l'hydrogène où $Z/A = 1$ alors que pour les autres constituant du tissu (carbone, oxygène, azote), $Z/A = 0,5$ (Bushberg et al. 2002e). En imagerie médicale, lorsque le RX diffusé est détecté par un capteur, la qualité de l'image est affectée par diminution du contraste.

1.4.4.2. L'effet photoélectrique

L'effet photoélectrique réfère à l'absorption d'un RX par un atome du milieu traversé (Meynaud-Collard et al. 2001). La totalité de l'énergie transportée par le photon est transférée aux électrons de l'atome et un électron sera éjecté (Bushberg et al. 2002b). La probabilité d'apparition de l'effet photoélectrique est inversement proportionnelle au cube de l'énergie du RX incident et proportionnel au cube du nombre atomique moyen des atomes du milieu traversé. Ainsi, plus un RX est énergétique, moins il a de chance d'être absorbé. De plus, un matériel avec un nombre atomique élevé comme le plomb absorbera d'avantage les RX.

1.4.4.3. Notion d'atténuation

Aux niveaux d'énergie des RX utilisés en imagerie médicale, lorsqu'un faisceau de RX traverse un tissu, certains RX sont extraits de ce faisceau soit par diffusion (Compton) soit par absorption (effet photoélectrique). Ce phénomène est appelé atténuation (Bushberg et al. 2002b; Lang and Duryea 2003).

Equation 1 : Caractérisation de l'atténuation des RX

$$N/N_0 = \exp(-\mu x)$$

Où N_0 est le nombre de photons incidents, N le nombre de photons transmis et μ le coefficient d'atténuation, x l'épaisseur du milieu traversé. Ainsi, l'atténuation des RX est proportionnelle à la densité du tissu traversé. Elle dépend dans une moindre mesure de la composition en hydrogène du tissu. Plus la quantité d'hydrogène est importante, plus le tissu est soumis à la diffusion de Compton.

1.5. La tomodynamétrie

1.5.1. La production des rayons-X

1.5.1.1. Le tube à rayons-X

La tomodynamétrie est une technique d'imagerie utilisant les propriétés des RX, qui produit des images transversales du patient. Le faisceau de RX est produit par un tube à RX, qui est un tube cathodique. Des électrons (radiation corpusculaire) sont accélérés depuis la cathode et sont convertis en RX (radiation électromagnétique) lors de leur impact sur l'anode (Bushberg et al. 2002c). Lors de tomodynamétrie, le tube est placé sur un portique qui tourne 360° autour du patient. Les RX résultants sont captés par une série de détecteurs opposée au tube (Bushberg et al. 2002e). Lors d'une acquisition en mode axial, le tube revient en position initiale pour chaque coupe et la production du faisceau est arrêtée pour attendre un repositionnement de la table pour la prochaine coupe. Lors d'une acquisition hélicoïdale, le tube tourne tout au long de l'acquisition avec une production continue de RX et un mouvement simultané de la table. Le « *pitch* » peut être défini comme étant la distance de déplacement de la table lors d'une rotation de 360° du tube divisé par l'épaisseur de coupe (Bushberg et al. 2002e).

1.5.1.2. Qualité et quantité de rayons-X

Trois paramètres importants influencent la production du faisceau de RX : le kVp (potentiel maximal de kilovoltage ou « *kilovoltage peak* »), les mA (milliampères) et le temps d'exposition en secondes (s). Lors de l'impact des électrons sur l'anode est formé

un faisceau polyénergétique de RX dont l'énergie maximale est donnée par la différence de potentiel maximum entre l'anode et la cathode (Bushberg et al. 2002c; Lang and Duryea 2003). Le choix d'un kVp détermine la pénétrabilité du faisceau de RX dans les tissus, aussi appelée qualité du faisceau. Il détermine indirectement le nombre de RX produit (Bushberg et al. 2002c).

Le mA détermine le nombre d'électrons générés autour du filament cathodique, qui sont bombardés après accélération sur l'anode. Cette interaction est responsable du flux de RX formant le faisceau produit. Cette composante est intimement reliée au temps d'exposition pendant lequel les électrons seront bombardés. Les variables mA et temps sont associées sous forme de milliampères-secondes (mAs). Ainsi, les mAs sont proportionnels au nombre de RX émis par le tube (Bushberg et al. 2002c).

1.5.1.3. Géométrie du faisceau

Le diamètre du faisceau de RX au niveau du patient est appelé « *scan field of view* » ou champ de vue de l'examen (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003). Chaque coupe a une certaine épaisseur à prédéterminer : l'épaisseur de coupe (Hathcock and Stickle 1993). L'épaisseur de coupe, généralement comprise entre 1 et 10 mm, est principalement déterminée par la collimation du faisceau à la sortie du tube (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

1.5.2. Formation de l'image

1.5.2.1. Détection du faisceau de rayon-X

Les détecteurs utilisés dans les scanners modernes sont des scintillateurs couplés à un photorécepteur (Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e). Lorsqu'un RX est capté par un détecteur, il génère de la lumière dans le photodétecteur, qui est convertie en un signal électrique proportionnel à l'intensité du RX afférent. Les détecteurs sont généralement alignés en série. Les scanners de dernière génération, appelées multibarettes qui présentent plusieurs rangées de détecteurs, qui peuvent acquérir plusieurs coupes simultanément (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

1.5.2.2. Acquisition de l'image

Le faisceau de RX traverse le patient, est atténué en fonction du tissu qu'il traverse et est capté par les récepteurs. Un « rayon » est une transmission à travers le patient captée par un détecteur donné à un moment donné (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

Equation 2 : Intensité d'un RX en fonction du Coefficient d'atténuation

$$I = I_0 \times \exp(-\mu x)$$

Où I est l'intensité du rayon, I_0 l'intensité de référence équivalente à un rayon non atténué, μ le coefficient d'atténuation linéaire moyen le long du rayon et x l'épaisseur du patient au niveau du rayon (Bushberg et al. 2002e).

L'atténuation des RX est enregistrée pour toutes les projections de chaque coupe pour une acquisition axiale ou de manière continue pour une acquisition hélicoïdale (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003). Une multitude de projections du patient sont ainsi obtenues lorsque le tube tourne autour du patient, permettant l'acquisition d'une information en trois dimensions (3D) (Cann 1988; Bushberg et al. 2002e).

1.5.2.3. Reconstruction tomographique de l'image

L'information provenant de l'atténuation des RX incidents qui ont traversé les tissus, est transformée en image qui est la projection en deux dimensions (2D) d'une coupe de tissu en 3D chez le patient (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003). Ainsi chaque pixel de l'image a son équivalent au niveau du patient appelé un voxel. Le voxel est constitué de dimensions égales à celle du pixel dans le plan de l'image (axe x et y) et sa troisième dimension (axe z) est l'épaisseur de coupe (Cann 1988; Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

Chaque voxel est traversé par plusieurs rayons lors de la rotation du tube à RX. La résolution de l'équation 2 permet d'obtenir une matrice de données compilant les valeurs de μ pour chaque voxel d'une coupe transversale (Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e). Dans le cas d'une acquisition hélicoïdale, une interpolation des données permet de reconstituer des coupes axiales d'épaisseur voulue. L'application d'un filtre appelé convolution (aussi appelé kernel ou algorithme) puis d'une transformation de Fourier inverse permettent le passage de la matrice d'intensité en

matrice d'image (cette opération mathématique est aussi nommée rétroprojection-reconstruction filtrée). La matrice d'image comporte généralement 512*512 pixels. La taille de l'image en cm est définie par le « *display field of view* » (DFOV) ou champ d'inclusion de l'image dans lequel se projette la matrice d'image (Cann 1988; Bushberg et al. 2002e). Plusieurs types de filtres peuvent être appliqués pour la reconstruction de l'image. Ils sont en général nommés selon le type de tissu qu'ils mettent en valeur dans l'image (Bushberg et al. 2002e).

1.5.2.4. Le nombre tomographique

L'équation 2 permet de comprendre que la valeur de μ est dépendante de l'intensité du rayon mesuré, donc du scanner et du kVp utilisé lors de l'examen (Lang and Duryea 2003). Pour permettre une standardisation de la valeur attribuée à chaque pixel une échelle de nombres tomographiques a été créée (Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e). Elle est appelée échelle de Hounsfield, où les valeurs sont données en unités de Hounsfield (HU). Avant l'enregistrement des données et la mise en image, tous les scanners effectuent la conversion du coefficient d'atténuation de chaque voxel en HU.

Equation 3 : Conversion du coefficient d'atténuation en HU

$$HU = (\mu - \mu_{\text{eau}} / \mu_{\text{eau}}) \times 1000$$

Où μ est le coefficient d'atténuation du voxel avant transformation et μ_{eau} le coefficient d'atténuation de l'eau (Bushberg et al. 2002e).

L'échelle de Hounsfield est une échelle linéaire qui s'étend de -1000 à + 3096 HU. L'air a une valeur de -1000, les tissus mous une valeur comprise entre -300 et -100, l'eau une valeur de 0. Les produits de contraste iodés (selon leur concentration en iode) et l'os ont une valeur comprise entre +300 et +3096 (Hathcock and Stickle 1993).

Ainsi est obtenue l'image d'une coupe axiale du patient où à chaque pixel de l'image correspond une valeur spécifique en HU (Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003). Compte tenu de sa construction, le nombre de HU est proportionnel à la densité moyenne du voxel correspondant et sera quantitatif (Bushberg et al. 2002e).

1.5.2.5. Visualisation de l'image

Une image tomographique contient 4096 niveaux de gris possibles pour chaque pixel. Cette information est dans un premier temps compressée en 256 niveaux de gris pour l'affichage à l'écran. Elle sera lue par l'œil humain qui est capable de discerner 30 à 90 niveaux de gris. Pour faciliter la lecture de l'image, le contraste peut être modifié (largeur de fenêtrage) et centré (centre de fenêtrage) sur une valeur voulue de HU (Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e).

1.5.3. La qualité de l'image

1.5.3.1. La résolution de contraste

Le contraste est défini comme étant la proportion de différence dans l'échelle de gris entre deux régions adjacentes de l'image (Bushberg et al. 2002d). La tomographie est la technique d'imagerie utilisant les RX qui possède la meilleure résolution de contraste (Bushberg et al. 2002e).

1.5.3.2. La résolution spatiale

La résolution spatiale décrit la capacité d'une technique d'imagerie à situer de manière exacte deux objets au niveau des deux dimensions spatiales (axes x et y) de l'image. La tomographie possède une résolution spatiale passable comparée aux autres techniques d'imagerie médicale (Bushberg et al. 2002d).

1.5.3.3. L'influence des paramètres d'ajustement sur la qualité de l'image

Les paramètres d'ajustement influent sur la qualité de l'image (Bushberg et al. 2002e) :

- Augmenter les mAs améliore la résolution de contraste.
- Augmenter le FOV avec une matrice d'image fixe, augmente la taille des pixels donc améliore le contraste mais diminue la résolution spatiale.
- Augmenter l'épaisseur de coupe diminue la résolution spatiale et augmente le contraste.
- Les filtres « os » ont la meilleure résolution spatiale (mise en valeur des rebords osseux) mais une résolution de contraste faible. Inversement, les filtres « tissus

mous » améliorent le contraste (meilleure visualisation des tissus mous dans l'image) mais possèdent une résolution spatiale plus faible.

- Augmenter le pitch diminue la résolution spatiale.

1.5.4. Les artefacts

1.5.4.1. Durcissement du faisceau

Lorsque le faisceau polyénergétique de RX traverse un tissu, les RX les moins énergétiques sont préférentiellement atténués. Plus le faisceau se propage à travers le patient, plus il est composé des RX de haute énergie du faisceau primaire. Ce phénomène est appelé durcissement du faisceau. Un voxel est traversé par des rayons de différentes projections qui ne possèdent pas la même énergie selon l'importance de leur durcissement. La reconstruction algorithmique est donc perturbée et la valeur HU du pixel ne reflète pas la réalité physique du voxel correspondant. L'os est le tissu le plus atténuant, il est donc plus soumis à ce phénomène que les tissus mous. Des filtres de correction existent pour pallier à ce problème (Cann 1988; Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

1.5.4.2. Artefact de mouvement

Un mouvement du patient lors de l'acquisition implique la formation d'images fantômes ou d'images doubles (Bushberg et al. 2002e).

1.5.4.3. Effet du volume partiel

Lorsqu'un voxel contient un mélange de deux tissus différents la valeur en HU du pixel sera le reflet de la moyenne pondérée des μ de ces deux tissus qui ne sera pas représentative de la réalité physique (Cann 1988; Hathcock and Stickle 1993; Bushberg et al. 2002e).

1.6. Mesure de la densité minérale osseuse par tomодensitométrie

1.6.1. Principes de base

1.6.1.1. Mesure d'une densité volumique

Nous avons vu que l'image tomographique est formée de pixels dont les niveaux de gris dépendent de leur valeur en HU. Cette valeur en HU est théoriquement le reflet exact du μ du voxel correspondant. Il est donc possible, par comparaison avec un étalon de mesure, de transformer cette information en équivalent de DMO, exprimée en gramme par centimètre cube (g/cm^3) (Cann 1988; Meynaud-Collard et al. 2001; Lang and Duryea 2003). L'évaluation de la DMO utilisant la tomодensitométrie se nomme tomодensitométrie quantitative (qCT). La qCT, de par sa nature volumétrique, est capable de prendre en compte l'effet de la croissance osseuse. La densité obtenue est donc indépendante du volume total de l'os mesuré (Ebbesen et al. 1998; Lang et al. 2002; Van Rijn et al. 2003; Pitukcheewanont et al. 2005; Kaste et al. 2006).

1.6.1.2. Utilisation d'un fantôme de calibration

La qCT requiert l'utilisation d'un étalon de mesure, appelé fantôme de calibration osseux. Cet outil de référencement pallie aux variations du nombre tomographique. En effet, l'échelle de Hounsfield dépend de chaque scanner et le nombre tomographique est dépendant de l'énergie employée lors de l'examen (Cann 1988; Suzuki et al. 1988). Des variations journalières et à long terme du nombre tomographique sont ainsi notées du fait de la variation du voltage au niveau du tube, de la taille et du positionnement de l'objet scanné (Cann 1988; Suzuki et al. 1988). Le fantôme doit être utilisé pour chaque examen (Cann and Genant 1980; Cann 1988; Suzuki et al. 1988). Il doit être placé dans le même DFOV et le plus près possible de la zone d'intérêt (Cann 1988; Suzuki et al. 1988; Samii et al. 2002).

1.6.1.3. Mesure au sein d'une région d'intérêt

Une région d'intérêt (ROI) est une délimitation géographique dessinée sur l'image dans laquelle est effectué le calcul du HU moyen de cette région. Cette ROI peut être dessinée à la main ou être automatisée. La première a l'avantage de pouvoir contenir

le maximum d'os ciblé. La seconde a l'avantage d'avoir un volume constant. Pour augmenter la précision et l'exactitude de la mesure (Annexe II), cette région doit être la plus grande possible et n'inclure que de l'os (Cann 1988; Suzuki et al. 1988). Utiliser une ROI automatisée ou manuelle n'engendre pas de variations significatives pour certains (Steiger et al. 1990; Link et al. 2004), mais pour d'autres, l'utilisation d'une ROI automatisée améliore la précision de la mesure (Cann 1988). L'avantage majeur de l'utilisation de la tomodensitométrie est la possibilité de mesurer spécifiquement l'os spongieux (reflet du métabolisme osseux, cf 1.2.1.5) au sein d'une ROI (Cann 1989; Akahoshi et al. 2005).

1.6.2. Applications générales

1.6.2.1. Vue d'ensemble

La qCT est considérée comme le « *gold standard* » technique pour la mesure de DMO. En effet, la mesure de DMO par qCT est corrélée positivement (coefficients de corrélation supérieurs à 0,9 pour les études *in vitro*) avec la densité physique de l'os (Cann 1988; Yuh et al. 1994; Van Rijn et al. 2003; Link et al. 2004; Kaste et al. 2006).

Une première dichotomie peut se faire entre l'utilisation dans le cadre du diagnostic des affections osseuses, comme les ostéomalacies, l'ostéodystrophie, l'hyperparathyroïdie ou l'ostéoporose, et l'utilisation pour le suivi de patients lors de progression d'une affection ou de la réponse à un traitement (Cann 1988; Meynaud-Collard et al. 2001). Cependant, il est intéressant de séparer les applications en fonction de la région examinée car ces régions présentent des contraintes de mesure différentes.

1.6.2.2. Densitométrie osseuse centrale

La qCT centrale (vertèbres et fémur) est une technique de routine pour le diagnostic de l'ostéoporose et le suivi de traitements ayant un impact sur l'os (Genant 1985; Cann 1999). Les mesures se font généralement au niveau des vertèbres T12 à L4. La ROI contient l'os spongieux sur une coupe centrée sur la veine basi-vertébrale (Cann and Genant 1980; Steiger et al. 1990; Cann 1999; Bergot et al. 2001; Kaste et al. 2006). Cette technique permet de différencier de manière la plus exacte les personnes souffrant d'ostéoporose par rapport à une population normale (Grampp et al. 1997; Cann 1999; Bergot et al. 2001; Bousson et al. 2006). Selon les études *in vivo*, la précision des

mesures effectuées par qCT centrale est comprise entre 1 et 3 % (Ebbesen et al. 1998; Lang and Duryea 2003; Van Rijn et al. 2003). Les mesures au niveau du fémur sont moins aisées du fait des difficultés de positionnement dans cette région. Mais la technique se développe grâce aux calculs de HU sur des reconstructions 3D de cette région (Cann 1999; Lang and Duryea 2003; Bousson et al. 2006; Stiehl et al. 2007). Une précision entre 0,6 et 1,1 % est ainsi obtenue (Lang and Duryea 2003).

1.6.2.3. Densitométrie osseuse périphérique

Le renouvellement osseux de l'os spongieux et de l'os cortical est plus lent au niveau des os périphériques, car ils recrutent difficilement les ostéoclastes de la moelle osseuse, par contre, ces os sont faciles à évaluer (Cann 1989; Cann 1999). Les techniques de qCT périphérique ont été développées pour augmenter la performance de l'examen et diminuer la dose de radiation émise (Sievänen et al. 1998). La qCT au niveau des os périphériques est apte à évaluer la micro-architecture osseuse, la qualité osseuse et la force de l'os (Les et al. 1994; Lochmüller et al. 2002; Teo et al. 2006). Elle permet ainsi d'évaluer l'impact de certaines pathologies, telles l'arthrose et l'incongruité articulaire et de la mise en charge sur l'os sous-chondral (Eckstein et al. 1997; Cornelissen et al. 1999; Hoogbergen et al. 2002; Samii et al. 2002).

1.6.3. Applications chez le porc

Les applications chez le porc sont d'ordre expérimental. Le porc est un modèle intéressant puisque l'architecture de l'os spongieux et les processus de remodelage osseux sont les mêmes que chez l'humain (Inui et al. 2004; Akahoshi et al. 2005). Le porc a permis d'étudier l'impact à long terme sur la DMO d'une gastrectomie totale (Maier et al. 1997), partielle (Tatara et al. 2007) et des corticoïdes (Akahoshi et al. 2005). L'os de porc a aussi permis de mener des études in vitro sur le lien entre les propriétés mécaniques de l'os et la DMO (Teo et al. 2006), sur les changements osseux liés à l'âge (Inui et al. 2004) et sur l'influence du gras sur la valeur estimée de la DMO (Yu et al. 1995). Le porc miniature pourrait être préféré au porc standard comme modèle, car son poids en fin de croissance de 60 kg est proche du poids moyen de l'humain adulte (Inui et al. 2004).

1.6.4. Sources d'erreurs

1.6.4.1. Positionnement par rapport au portique du scanner

Le μ d'un objet varie selon qu'il soit centré ou non par rapport au portique du scanner. Pour augmenter l'exactitude des mesures, la zone anatomique d'intérêt et le fantôme de référence doivent être centrés (Cann and Genant 1980; Suzuki et al. 1988; Cann 1989; Yuh et al. 1994).

1.6.4.2. Sélection de la région d'intérêt

Si la ROI n'est pas positionnée exactement au même endroit sur une coupe, la précision de la mesure diminue. L'utilisation de ROI elliptiques les plus grandes possibles diminue cette erreur (Cann and Genant 1980; Suzuki et al. 1988; Steiger et al. 1990). De plus, l'utilisation de programmes informatiques spécifiques augmente la précision de ces mesures (Lang and Duryea 2003).

1.6.4.3. Composition de l'os spongieux

La source majeure d'inexactitude avec la tomодensitométrie est attribuable au volume partiel (Cann 1988; Lang and Duryea 2003). Un voxel peut contenir de l'os spongieux mais aussi du gras et/ou de la moelle osseuse (Cann 1988; Yuh et al. 1994; Ebbesen et al. 1998; Lang and Duryea 2003). La présence de gras diminue la valeur de HU calculée car sa valeur en HU est plus faible que celle de l'os (Cann 1989; Lang and Duryea 2003). Ce problème a un fort impact puisque la quantité de gras au niveau de la moelle osseuse augmente progressivement avec l'âge (Cann 1989; Ebbesen et al. 1998; Lang and Duryea 2003). De plus, le gras est en plus grande quantité au niveau de la moelle osseuse des vertèbres par rapport aux os périphériques et à la hanche. Elle est à l'origine d'une erreur d'exactitude de 5 à 15 % selon l'âge du patient (Lang and Duryea 2003). Des techniques de qCT à double énergie ont été développées pour minimiser ce phénomène (Cann 1988; Lang and Duryea 2003). Avec ces techniques, l'exactitude est améliorée mais la précision est diminuée et la dose de radiation est augmentée (Suzuki et al. 1988).

1.6.4.4. Durcissement du faisceau de rayon-X

Le phénomène de durcissement du faisceau affecte en théorie le nombre tomographique. Ceci conduirait à une erreur d'exactitude lors du calcul de la DMO. Les scanners modernes incluent des algorithmes de reconstruction qui corrigent en quasi-totalité le problème (Cann and Genant 1980; Cann 1988).

1.7. L'absorptiométrie à rayons-X à double énergie

1.7.1. Principes de physique

L'absorptiométrie à rayons-X à double énergie (DEXA) est une technologie de densitométrie basée sur l'atténuation des RX enregistrée à deux niveaux d'énergie.

1.7.1.1. Production des rayons-X

Les RX sont produits par un tube placé sur un portique. Ce tube est capable de générer un faisceau polyénergétique de RX possédant un spectre à double énergie (Cann 1989; Lang and Duryea 2003). En règle générale, le pic de basse énergie est compris entre 40 et 100 kVp et celui de haute énergie entre 70 et 140 kVp (Lang and Duryea 2003). Ce spectre d'énergie bimodal est obtenu soit par un filtre en terre rare à la sortie du tube (Lang and Duryea 2003) ou par une variation du voltage du tube sur une échelle de quelques millisecondes.

1.7.1.2. Détection des rayons-X

Deux types de géométrie du système existent en fonction de la présence d'un détecteur unique ou d'une série de détecteurs. Dans le cas de l'utilisation d'un détecteur unique, celui-ci est situé en face du tube. Une géométrie « en crayon » est alors déterminée entre le tube et le détecteur. Le détecteur est constitué d'un cristal d'iodure de sodium (NaI) couplé à un tube photomultiplicateur. Un RX qui interagit avec le cristal de NaI produit un scintillement de lumière visible. Ce scintillement est détecté par le tube photomultiplicateur, qui produit un courant électrique pulsé proportionnel à l'intensité du RX incident (Koo et al. 2002; Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

Dans le cas de l'utilisation d'une série de détecteurs, une géométrie « en fanon » est formée entre le tube et le système de détecteurs. Un détecteur est constitué d'un scintillateur couplé à des photodiodes. Quand un RX est capté par un scintillateur, celui-ci produit de la lumière visible. Cette lumière est transmise aux photodiodes qui la convertissent en un courant électrique proportionnel à l'énergie du RX incident. Cette technologie augmente la vitesse de l'examen puisque des régions anatomiques plus grandes peuvent être incluses dans le faisceau. Elle améliore aussi la résolution spatiale de l'image en utilisant un arrangement de petits détecteurs (de l'ordre du millimètre) (Koo et al. 2002; Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

1.7.1.3. Acquisition des données

Les détecteurs mesurent l'intensité des RX incidents qui ont été atténués par les tissus traversés et la transmettent à un ordinateur. L'équation 2 peut s'écrire en utilisant le coefficient d'atténuation de masse μ_m (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

Equation 4 : Relation entre l'intensité d'un RX et le coefficient d'atténuation de masse

$$I = I_0 \times \exp(-\mu_m \times p \times x)$$

Où I est l'énergie du RX mesuré, I_0 l'énergie d'un RX non atténué, p la densité du tissu traversé et x son épaisseur. Une valeur intéressante ressort de cette équation : $p \times x$ qui est la densité surfacique du tissu traversé (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

Equation 5 : Décomposition de l'équation 4 en fonction des milieux traversés

$$I = I_0 \times \exp(-(\mu_{m,TM}(p \times x)_{TM} + \mu_{m,os}(p \times x)_{os}))$$

Où $\mu_{m,TM}$ est le coefficient d'atténuation de masse des tissus mous, $(p \times x)_{TM}$ la densité surfacique des tissus mous, $\mu_{m,os}$ le coefficient d'atténuation de masse de l'os et $(p \times x)_{os}$ la densité surfacique de l'os. Cette équation est valable si l'on considère que la composition des tissus est homogène. Le faisceau de RX contenant deux niveaux d'énergie, les détecteurs enregistrent deux intensités pour un même rayon. L'intensité d'un RX non atténué (I_0) est obtenue par une calibration journalière ou lors de chaque examen. L'équation 4 s'appliquant aux deux énergies, deux équations à deux inconnues pour chaque rayon sont compilées par l'ordinateur. Il obtient une cartographie en deux dimensions (2D) des densités surfaciques des tissus mous et de l'os (Bushberg et al. 2002e; Lang and Duryea 2003).

1.7.1.4. Formation de l'image

Une image, projection en 2D du patient, est obtenue en appliquant un algorithme de reconstruction des données acquises. Des filtres de correction pour les régions contenant du gras à proximité de l'os peuvent être appliqués en utilisant comme référence les zones contenant uniquement des tissus mous. L'image est une carte en 2D de densité surfacique où chaque pixel a une valeur déterminée de DMO ou tissu mou. Selon l'algorithme utilisé, la DMO ou celle des tissus mous est favorisée (Lang and Duryea 2003; Koo et al. 2004a).

1.7.2. Mesure de la DMO

1.7.2.1. Mesure d'une densité surfacique

L'image DEXA est par nature une cartographie en 2D de la densité surfacique (g/cm^2). La DMO est calculée dans une région d'intérêt. Cette région peut-être n'importe quel os ou partie de l'os imagé (Lang and Duryea 2003). Les faiblesses majeures de cette technique sont d'une part qu'elle mesure obligatoirement une densité totale de l'os (Ebbesen et al. 1998; Kaste et al. 2006). Ainsi, l'os cortical ne peut pas être différencié de l'os spongieux. D'autre part, elle est dépendante du diamètre de l'os imagé (Van Rijn et al. 2003; Leonard et al. 2004; Pitukcheewanont et al. 2005; Kaste et al. 2006). En effet, si deux os avec la même densité volumique sont considérés, le plus large a une densité surfacique plus grande (Lang and Duryea 2003). La densité obtenue ne peut être comparée directement avec une densité obtenue en tomодensitométrie quantitative du fait de leur nature différente. L'utilisation de populations de référence appropriées et la correction des valeurs du DEXA peuvent cependant permettre cette comparaison (Watts 2004; Kaste et al. 2006).

1.7.2.2. Applications générales

Le DEXA a toujours été en compétition avec la tomодensitométrie quantitative pour ses applications cliniques (Cann 1999). Il est considéré comme l'outil de choix pratique en densitométrie osseuse (Finkelstein et al. 1994; Yuh et al. 1994; Bergot et al. 2001; Koo et al. 2002; Van Rijn et al. 2003; Kaste et al. 2006). Son coefficient de corrélation entre le contenu minéral osseux prédit *in vitro* et la quantité de cendre est supérieur à 0,9. Il est facile d'utilisation et possède une excellente précision (comprise

entre 0,5 et 1%). De plus, il génère une faible dose d'exposition aux RX (jusqu'à dix fois moins que la qCT) (Igarashi and Ezawa 1993; Finkelstein et al. 1994; Yuh et al. 1994; Ebbesen et al. 1998; Bergot et al. 2001; Van Rijn et al. 2003). C'est une méthode valide pour le diagnostic des affections osseuses tels les ostéomalacies, l'ostéodystrophie, l'hyperparathyroïdie, ou l'ostéoporose, ainsi que pour le suivi de patients (Cann 1988; Meynaud-Collard et al. 2001). C'est la modalité la plus utilisée pour le diagnostic et le suivi de l'ostéoporose malgré qu'elle soit inférieure à la qCT pour départager les patients avec ou sans fracture vertébrale (Genant 1985; Guglielmi et al. 1994; Grampp et al. 1997; Cann 1999; Lang et al. 2002).

1.7.2.3. Applications chez le porc

Les applications chez le porc, comme pour la densitométrie, sont d'ordre expérimental. De nombreuses études utilisent les porcelets comme modèle pour les enfants. Le DEXA est valide pour déterminer la DMO et la composition en gras des porcelets en croissance, en utilisant des données convenablement standardisées et des algorithmes de reconstructions adaptés (Svendsen et al. 1993; Koo et al. 1995; Koo et al. 1995b; Koo et al. 2002; 2004a; Koo et al. 2004b). Le DEXA permet aussi de mener des études sur la composition corporelle des porcs charcutiers (Mitchell et al. 2001).

1.7.3. Sources d'erreur

1.7.3.1. Positionnement par rapport au portique

Des mesures répétables exigent un positionnement correct du patient. Ainsi le DEXA est sensible aux déformations osseuses de type scoliose (Watts 2004; Kaste et al. 2006). Une rotation de l'os conduit à une augmentation des tissus mous environnants, donc une sous-estimation possible de la DMO (Lang and Duryea 2003).

1.7.3.2. Dépendance au diamètre de l'os

Dé part sa nature surfacique, la DMO obtenue par DEXA est dépendante du diamètre de l'os imagé. Il est nécessaire d'avoir une population de référence bien choisie (connaissance des spécificités anatomiques osseuses) pour interpréter les données de densité (Lang and Duryea 2003; Watts 2004). Chez l'enfant, où l'os augmente de

volume sans changer de densité, le DEXA sous-estime la valeur réelle de DMO (Van Rijn et al. 2003; Pitukcheewanont et al. 2005).

1.7.3.3. Dépendance à la composition en gras

La technique de calcul de la DMO est basée sur le fait que les tissus mous sont uniformes, avec une distribution homogène du gras. Si la quantité de gras est sous-estimée, la DMO sera sous-estimée (Lang and Duryea 2003; Kaste et al. 2006).

1.7.3.4. Anomalies osseuses

De nombreuses anomalies osseuses pathologiques ou liées au vieillissement peuvent diminuer l'exactitude de la mesure. La superposition des calcifications aortiques, les ostéophytes et l'hypertrophie des apophyses osseuses conduisent à une surestimation de la DMO. Un hémangiome, des micro-fractures conduisent à une sous-estimation de la DMO (Yuh et al. 1994; Ebbesen et al. 1998; Lang and Duryea 2003).

1.8. Récapitulatif et objectifs

Cette revue de littérature nous a permis de comprendre que les tétracyclines sont des molécules qui possèdent une structure similaire, mais certaines de leurs propriétés physico-chimiques diffèrent. Ces différences (corrélées à une différence de liposolubilité) expliquent en partie leurs caractéristiques propres en termes de biodisponibilité, de distribution et d'activité.

La faculté des tétracyclines à former des chélates avec les ions calcium leur confère une grande affinité pour le tissu osseux néoformé. Bien qu'il soit connu que les tétracyclines sont libérées de l'os lors de la résorption osseuse, les données concernant leur cinétique de déplétion sont fragmentaires. Ces données sont difficiles à obtenir car l'os est un tissu hétérogène du point de vue de sa constitution et de son métabolisme. L'accumulation des tétracyclines dans l'os induit sa décoloration verdâtre. L'impact de cette décoloration pour la filière porcine dans son ensemble est néfaste. Ainsi, il est attendu que l'accumulation des tétracyclines dans l'os induise une décoloration réversible. L'intensité de la décoloration sera positivement corrélée avec la durée et l'âge au début du traitement.

Les tétracyclines ont aussi un effet sur le modelage et le remodelage osseux. Ils inhibent l'activité des ostéoclastes de manière directe et indirecte. Cela a pour conséquence une diminution de la résorption osseuse dans les conditions pathologiques où ces cellules sont hyperactives. Les tétracyclines semblent aussi activer la production osseuse par les ostéoblastes. L'activité ostéoblastique et ostéoclasique est interdépendante. Une inhibition des ostéoclastes associée à une stimulation des ostéoblastes déséquilibrerait la régulation osseuse vers l'anabolisme. Ainsi il est attendu une augmentation de la densité de l'os spongieux suivant l'accumulation des tétracyclines dans l'os.

Les variations de DMO peuvent être suivies par des techniques d'imagerie. Le « *gold standard* » technique est la qCT qui permet d'obtenir une densité de l'os spongieux volumétrique. Le « *gold standard* » pratique est le DEXA qui permet d'obtenir une DMO globale surfacique. Ce dernier a l'avantage d'être peu coûteux et plus facile à mettre en œuvre. Ces deux techniques devraient permettre le suivi de

l'accumulation des tétracyclines dans l'os de porc de manière non invasive. La tomодensitométrie quantitative devrait apporter un suivi plus exact.

Il est donc justifié d'étudier, chez des porcs ayant consommé durant leur croissance des aliments fortifiés en CTC (choisi comme modèle de tétracyclines du fait de sa large utilisation), les facteurs liés au plan thérapeutique qui contribuent à la prévalence de la coloration verdâtre de l'os et les conséquences de ce traitement sur l'os.

Les objectifs de ce travail sont :

- 1) D'évaluer l'effet de l'âge au début du traitement et de la durée d'administration de la CTC, sur la décoloration de l'os, de la DMO, et de l'accumulation de cet antibiotique dans l'os chez des porcs en croissance.
- 2) De valider une technique d'imagerie pour le suivi non invasif chez le porc de la DMO et si possible de l'accumulation des tétracyclines dans l'os.

2. METHODOLOGIE

2.1. Conditions expérimentales

La phase expérimentale s'est déroulée dans les bâtiments du centre de recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada de Lennoxville, (Québec) depuis le post-sevrage (21 jours d'âge) jusqu'à l'âge d'abattage (168 jours d'âge).

2.1.1. Animaux

Les porcelets, mâles castrés sevrés de 21 jours d'âge (N=112), provenaient tous d'une ferme naisseur de statut sanitaire élevé¹. Leur bon état de santé était certifié par un vétérinaire. Ils ont reçu pendant leur sevrage un aliment nourrisson exempt de toute tétracycline.

2.1.2. Logement

Les porcs en phase de post-sevrage (entre 21 et 70 jours d'âge) ont été regroupés dans la pouponnière dans des parcs à sol latté de 180x180 cm. Les animaux ont été répartis dans des salles d'ambiance identique qui comprenaient 6 parcs de 4 animaux (8 porcs supplémentaires hors étude permettaient d'obtenir une ambiance identique des salles). La température, électroniquement contrôlée, a été maintenue constante à 26°C. Les animaux en phase d'engraissement (entre 77 et 140 jours d'âge) puis en phase de finition (entre 140 et 168 jours) ont été regroupés dans une même salle dans le bâtiment d'engraissement. Ils logeaient par 12 animaux dans des parcs de taille amovible à sol bétonné de 180x260 cm (jusqu'à 60kg) puis de 260x498 cm (jusqu'à 80 kg) puis de 520x520 cm (parmi les 8 porcs supplémentaires, 4 complètent un parc d'animaux traités). La température a été progressivement baissée de 22 à 18°C par des paliers de 0,5°C par semaine.

L'eau de boisson et l'aliment ont été distribués à volonté. En pouponnière, une quantité connue d'aliment a été distribuée et la quantité de rejet a été notée pour connaître la consommation de chaque parc. Ensuite, chaque parc du local

¹ Perfo-Porcs Inc., Notre-Dame du Bon Conseil, Québec.

d'engraissement comprenait une station d'alimentation informatisée² dont l'accès était réduit à un individu et qui reposait sur une balance électronique. De plus, chaque porc était muni d'une puce nominative implantée sur l'oreille, reconnue lors de la prise alimentaire. Ainsi, la quantité d'aliment ingérée pouvait être enregistrée quotidiennement pour chaque animal.

2.2. Protocole expérimental

Le protocole de cette étude et les conditions d'utilisation des animaux ont été approuvés par le comité bioéthique d'Agroalimentaire et Agriculture Canada et les animaux manipulés selon un code de pratique approprié (Olfert et al. 1993). L'annexe III présente une synthèse de ce protocole.

2.2.1. Alimentation

2.2.1.1. Alimentation de base

Quatre aliments exempts d'antibiotiques ont été distribués en fonction de l'âge des animaux (Tableau II et Annexe III).

Les porcs du groupe témoin (n=48) ont reçu cette alimentation pendant toute la durée de l'expérience. Les animaux des groupes traités avec un aliment complété en CTC ont reçu l'aliment exempt d'antibiotiques correspondant à leur âge, en dehors de leur période de traitement.

Tableau II : Principales caractéristiques des aliments distribués aux porcs

Caractéristique	Aliment			
	1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge	Croissance	Finition
Source	Commerciale ³	Commerciale ⁴	Maison	Maison
Teneur garantie				
Protéines bruts (g/100g)	18	17,5	17,7	15,7
Calcium (g/100g)	0,9	0,85	0,7	0,56
Phosphore total (g/100g)	0,63	0,7	0,5	0,46

² IVOG, Insentec, BV.

³ Moulée Perfo-porc Plus 1^{er} âge porcelets, Shur-Gain, St Marys, ON.

⁴ Moulée Perfo-porc Plus 2^{ème} âge porcelets, Shur-Gain, St Marys, ON.

2.2.1.2. Exposition à l'aliment complétement en CTC

Un pré-mélange commercial⁵ a été utilisé pour compléter à une dose équivalente de 800 ppm de chlorhydrate de CTC l'aliment des groupes traités. Depuis l'apparition du SDPS, la pratique est de traiter des porcs plus âgés et plus longtemps. Ainsi, un groupe de traitement à 28 jours d'âge (n=32) et un groupe de traitement tardif à 84 jours d'âge (n=32) ont été formés. Pour étudier l'effet de la durée d'administration de la nourriture complétement en CTC, ces 2 groupes de traitement ont été subdivisés également en un sous-groupe traité pendant 28 jours (n=16) et un sous-groupe traité pendant 56 jours (n=16 ; Annexe III).

2.2.2. Constitution des groupes de traitement

Dès leur arrivée, une répartition aléatoire des porcs a été effectuée par strates de poids (inférieur ou supérieur à la moyenne) afin d'obtenir un poids moyen semblable entre les différents parcs de 4 animaux. Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux d'un parc donné recevaient le même traitement.

Pour le premier temps de mesure (T1), 8 animaux ont été choisis au hasard parmi les 112 porcelets avant leur entrée en pouponnière (Figure 2). Ensuite des temps de mesure ont été effectués toutes les 28 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation (temps T2 à T6) sur les porcs traités et leurs témoins respectifs. En pouponnière, 32 porcs ont été choisis aléatoirement en vue de recevoir le traitement débutant à 28 jours. Ensuite, parmi ces porcs traités, 8 ont été choisis au hasard pour le deuxième temps de mesure (T2), 8 ont reçu un aliment exempt de CTC jusqu'à la fin de l'expérience et 16 ont reçu une alimentation complétement pendant 28 jours supplémentaires.

La même procédure a ensuite été appliquée successivement pour la répartition des porcs dans les groupes expérimentaux et le choix des porcs pour les temps T3 à T5. Pour le temps T6, six porcs de chaque groupe expérimental ont été choisis aléatoirement.

⁵ Aureomycin® 220 G Premix, Alpharma Canada Corporation, Mississauga, ON.

2.2.3. Estimation des variables zootechniques

Tous les porcs ont été pesés à leur arrivée, avant chaque changement de nourriture et à chaque temps de mesure. Ces informations ont permis de calculer la courbe de croissance (courbe du poids en kg en fonction de l'âge en jours) et le gain moyen quotidien (dérivée mathématique de la courbe précédente). Le gain moyen quotidien (GMQ), reflète les capacités de développement de l'animal sans tenir compte de sa consommation alimentaire. De plus, ces informations recueillies sur le poids combinées à celles sur la consommation ont permis de calculer l'indice de conversion moyen des animaux (quantité d'aliment en kg nécessaire pour que l'animal grossisse de 1 kg sur une période de temps donnée). L'indice de conversion (IC) moyen reflète les capacités anaboliques de l'animal sur une période de temps donnée.

2.2.4. Prélèvements sanguins et euthanasie

A chaque temps de mesure, les porcs choisis aléatoirement ont été tranquilisés par une injection intra-musculaire d'azapérone⁶ (2 à 4 mg/kg). Après effet, une veinoponction jugulaire sur tube hépariné a été effectuée sur chaque porc. Ces tubes ont été immédiatement placés dans de la glace et centrifugés à 4°C et 1500g pendant 15 minutes. Le plasma de ces échantillons a ensuite été conservés à -80°C pour des analyses ultérieures de concentration plasmatique de CTC. Puis les porcs ont été euthanasiés par une surdose intraveineuse de pentobarbital sodique⁷ (> 4 mg/kg). Les porcs en extra ont été tués à l'abattoir du centre de recherche selon une technique classique d'abattage.

2.2.5. Imagerie

Les vertèbres sont les os les plus métaboliquement actifs (cf 1.2.1.5). De plus, la DMO des 2 premières vertèbres lombaires est représentative de l'ensemble des vertèbres lombaires (Kaste et al. 2006). Enfin, il a été anticipé que les modifications de DMO induite par les tétracyclines seraient positivement corrélées avec la durée du traitement.

⁶ Stresnil injection, Merial Canada Inc., Baie d'Urfée, QC.

⁷ Euthanyl©, Bimeda-MTC animal health Inc., distribué par Vétoquinol Canada Inc., Lavaltrie, QC.

C'est pourquoi les examens de densitométrie par imagerie ont été effectués sur les deux premières vertèbres lombaires (L1 et L2) des porcs des temps T1 (témoins de départ), puis sur les porcs ayant reçu l'aliment complétement en CTC pendant 56 jours et leurs témoins respectifs (temps T3, T5 et T6). Ces examens sur des cadavres, reproduisent des conditions *in vivo*. Cependant, compte tenu de la distance géographique entre le DEXA et le CT-scan, il a été préféré d'euthanasier des animaux avant d'effectuer les acquisitions d'image pour éviter le stress du transport. La précision de chaque technique a été évaluée par des mesures répétées sur un porc choisi au hasard aux temps T1, T3 et T6.

2.2.5.1. DEXA

Les examens de DEXA ont été effectués au centre de recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada de Lennoxville avec un appareil à détecteur unique⁸. Les cadavres ont été placés en décubitus latéral droit avec les membres pelviens étirés vers l'arrière. La fonction « pédiatrique » a été utilisée pour les porcs du temps T1 (alternance de 140 et 76 kVp ; 0,30 mA). La fonction « large » a été utilisée pour le temps T3, T5 et T6 (alternance de 140 et 70 kVp ; 0,75 mA). Ces fonctions correspondaient aux images de la meilleure qualité par rapport à l'épaisseur de tissu à traverser. En décubitus dorsal (position la plus fréquemment utilisée pour un examen DEXA de la colonne vertébral), les porcs de plus de 130 kg ne passaient pas sous le tube à RX. Le mode « colonne vertébrale latérale » a été utilisé pour scanner les vertèbres lombaires en projection latérale.

2.2.5.2. qCT

Après les examens de DEXA, les animaux ont été placés en décubitus dorsal dans des supports en V de bois pour aligner la colonne vertébrale lors de l'atteinte de la rigidité cadavérique. Les porcs ont été alors conservés à une température de 4°C. Ils ont été transportés le lendemain, dans un camion frigorifié, au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal (Saint Hyacinthe, Québec).

⁸ DEXA GE Lunar, GE Healthcare Canada, Saint-Laurent, QC.

Un scanner de troisième génération⁹ a été utilisé pour tous les examens de qCT. La rigidité cadavérique a permis de placer les porcs en décubitus dorsal. Pour chaque examen, un fantôme de calibration fait de 5 cylindres solides de densités connues en K_2HPO_4 ¹⁰ a été placé directement sous l'animal, au niveau des lombes (Fujii et al. 1988). Les acquisitions ont été effectuées avec un protocole fixe pour tous les animaux scannés : 120kV ; 100mA ; mode hélicoïdale avec un *pitch* de 1 et une rotation du tube de 1s ; épaisseur de coupe de 1 mm, DFOV de 40 cm avec une matrice de reconstruction de 512x512 pixels et un filtre « os ». Ces acquisitions devaient inclure au moins les 3 premières vertèbres lombaires et chaque coupe devait inclure l'ensemble du fantôme de calibration.

2.2.6. Dissection

Les vertèbres lombaires sont métaboliquement très actives, facilement dissécables et la décoloration induite par les tétracyclines est facilement évaluable. Ainsi les vertèbres lombaires étaient les os de choix pour :

- Mesurer la densité physique de l'os de tous les porcs pour étudier l'impact des tétracyclines sur le métabolisme osseux.
- Analyser la décoloration osseuse induite par les tétracyclines.
- Servir de référence aux techniques de densitométrie osseuse par imagerie.

Les côtes, sites fréquents de dépistage de la décoloration osseuse à l'abattoir, ne possèdent, d'une part, pas assez d'os trabéculaire et, d'autre part, sont trop sensibles à la respiration pour être un site propice pour les examens de densitométrie osseuse.

Les trois premières vertèbres lombaires de tous les porcs étudiés ont été prélevées manuellement de la carcasse par dissection au couteau. Dans un premier temps les muscles et les tissus adjacents à l'os ont été enlevés grossièrement. Les vertèbres ainsi disséquées ont été congelés à -20°C jusqu'à 3 mois après la fin de l'expérimentation pour permettre un traitement simultané de l'ensemble des échantillons. Les troisièmes vertèbres lombaires ont été utilisées pour mettre au point les

⁹ CT Hi speed ZX/i, GE Healthcare Canada, Saint-Laurent, QC.

¹⁰ Model 3 CT Calibration Phantom, Mindways Software, Inc., Austin, TX.

techniques de dissection terminale de l'os et les techniques de mesure de la densité physique.

2.3. Analyse de la décoloration de l'os

Les vertèbres L1 et L2 ont été utilisées pour évaluer la décoloration de l'os. L'analyse a été effectuée à l'insu du statut de traitement du porc et de la vertèbre. La dissection des vertèbres a été poursuivie grâce à une cuisson à 120°C pendant 4 heures puis un retrait de tous les tissus mous et de la moelle épinière avec une pince. Cette technique assurait l'intégrité de l'os et de la décoloration verdâtre induite par les tétracyclines. Les techniques classiques de dissection par ébullition dans l'eau (avec ou sans adjonction de détergents) induisaient une disparition de cette décoloration. L'utilisation d'insectes pour manger la chair nécessitait une cuisson jusqu'à dessèchement de la viande et n'apportait donc pas d'avantage. L'inconvénient de notre technique est l'impossibilité de l'étude biomécanique de l'os puisqu'il a été chauffé.

La référence de coloration était la couleur gris-blanc d'un os non soumis à un traitement aux tétracyclines. Une échelle subjective d'intensité de décoloration verdâtre de l'os a été utilisée : 0 pour absence de décoloration, 1 pour traces de décoloration, 2 pour faible décoloration, 3 pour décoloration modérée, et 4 pour forte décoloration (Annexe V).

Juste après la cuisson et de manière concomitante à la dissection, l'intensité de décoloration a été référencée pour chaque vertèbre. Lorsque la vertèbre refroidie, une pellicule blanchâtre de graisse apparaît, ce qui empêche de juger correctement de la décoloration de l'os.

2.4. Analyses de la DMO

2.4.1. Densité physique

2.4.1.1. Obtention des échantillons d'os

Après la caractérisation de la décoloration des vertèbres, les os ont été conservés à -20°C pendant 6 mois pour permettre l'ajustement du protocole de mesure de la densité à l'aide des vertèbres L3.

Les corps vertébraux ont été bouillis dans l'eau pendant 5h. L'ébullition a dissout le cartilage, ce qui a permis de détacher le corps vertébral du reste de la vertèbre (au niveau des jonctions cartilagineuses ventro-latéralement au canal vertébral) et la partie fibreuse des disques intervertébraux. Ensuite, les corps vertébraux ont été dégraissés par immersion dans du chloroforme¹¹ sous agitation pendant 48h. Le chloroforme est évaporé et l'os déshydraté par séchage au four à une température de 80°C pendant 16h. Ces corps vertébraux ont été pesés à l'aide d'une balance de précision à 0,1 mg¹².

Les échantillons d'os spongieux ont été obtenus par extraction d'une carotte d'os au centre des corps vertébraux à l'aide d'une mèche diamantée circulaire creuse¹³ de 1,6 cm de diamètre interne. Ces échantillons ont été immergés dans le chloroforme sous agitation pendant 12h, puis placés au four à une température de 80°C pendant 8h afin de les peser comme décrit précédemment.

2.4.1.2. Mesure de la densité physique

La densité physique de l'os doit être mesurée in vitro sur des échantillons dégraissés. Elle peut être calculée soit, grâce à la densité apparente (équation 6), soit par la densité réelle (équation 7 ; (Galante et al. 1970)). Dans le cas de la densité apparente, le volume est calculé grâce aux dimensions extérieures de l'échantillon. Dans le cas de la densité réelle, le volume est obtenu par le principe d'Archimède grâce à une double pesée dans l'air puis dans l'eau. En effet, le principe d'Archimède stipule qu'un solide

¹¹ Chloroforme 99%, Baker analysed® ACS reagent, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ.

¹² AccuSeries Balances accu-124, Fisher Scientific, Arvada, CO.

¹³ Diamond holesaw, Stay sharp, Exchange A Blade, Delta, CB.

immergé dans un liquide est soumis à une poussée hydrostatique dont la valeur est égale au poids du volume de liquide déplacé par l'échantillon.

Equation 6 : Densité apparente de l'os.

Densité apparente (g/cm³) = Masse d'os déshydraté (g) / Volume de l'échantillon (cm³)

Equation 7 : Densité réelle de l'os.

Densité réelle (g/cm³) = M_{air} * Densité de l'eau / (M_{air} - M_{eau})

Où M_{air} est la masse de l'échantillon d'os déshydraté dans l'air (g), M_{eau} est la masse de l'échantillon d'os dans l'eau (g) et la densité de l'eau est exprimée en g/cm³.

Les dimensions de nos échantillons ne pouvaient être obtenues compte tenu de leurs formes irrégulières. Les mesures de densité physique sur les échantillons de corps vertébraux et d'os spongieux ont donc été obtenues par la méthode d'Archimède. La mesure de masse dans l'eau pour l'os est délicate car c'est un matériel poreux. Il faut donc éliminer l'air interstitiel présent en remplissant les pores de l'échantillon par de l'eau avant d'effectuer la pesée. La densité de l'échantillon est alors calculée grâce à l'équation 8.

Equation 8 : DMO mesurée

DMO (g/cm³) = M_{air} * Densité de l'eau / (M_{air/degaz} - M_{eau})

Où M_{air} est la masse de l'échantillon d'os déshydraté dans l'air (g), M_{air/degaz} est la masse de l'échantillon d'os dégazé dans l'air, M_{eau} est la masse de l'échantillon d'os dans l'eau (g) et la densité de l'eau est exprimée en g/cm³.

Le dégazage des échantillons a été effectué par immersion dans de l'eau distillée à 40°C pendant 48h. Une agitation ultrasonore¹⁴ de 30 minutes a été effectuée à 24h et 36h pour aider l'eau à pénétrer dans les pores. Les différentes masses des échantillons d'os dans l'air et dans l'eau distillée ont été mesurées au mg près, à l'aide d'une balance de précision à 0,1 mg¹⁵ équipée d'un dispositif de détermination de masses volumiques¹⁶.

¹⁴ Ultrasonic Cleaner model 5510, Branson, Danbury, CT.

¹⁵ AccuSeries Balances accu-124, Fisher Scientific, Arvada, CO.

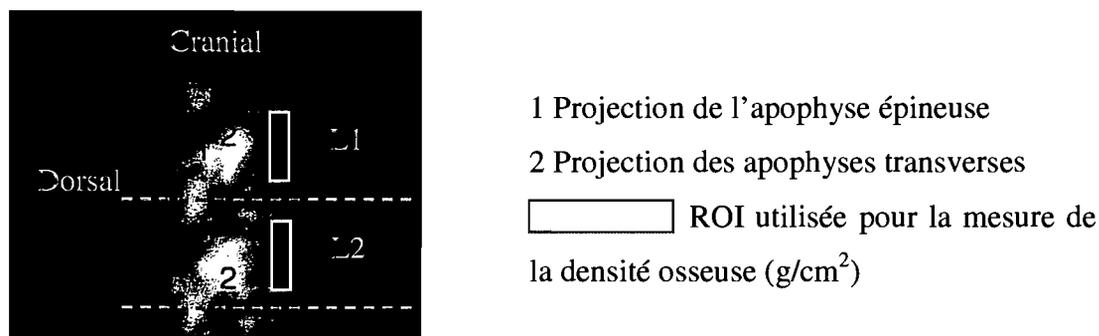
¹⁶ Sartorius YDK 01, Sartorius AG, Goettingen, Germany.

2.4.2. Imagerie

2.4.2.1. DEXA

Les acquisitions de DEXA ont été analysées à l'insu du groupe de traitement, à l'aide du programme DPX-alpha ostéodensitomètre software version 4.7¹⁷. Les vertèbres L1 et L2 ont été repérées par rapport à la dernière vertèbre thoracique. Une analyse manuelle a été effectuée pour placer une ROI au centre de la projection des corps vertébraux de ces vertèbres en excluant la projection des apophyses transverses et épineuses (Figure 3). La DMO surfacique (en g/cm^2) des zones ainsi délimitées est alors obtenue directement.

Figure 3 : Placement de la ROI au centre de la projection des vertèbres L1 et L2 sur l'image issu de l'examen DEXA



2.4.2.2. qCT

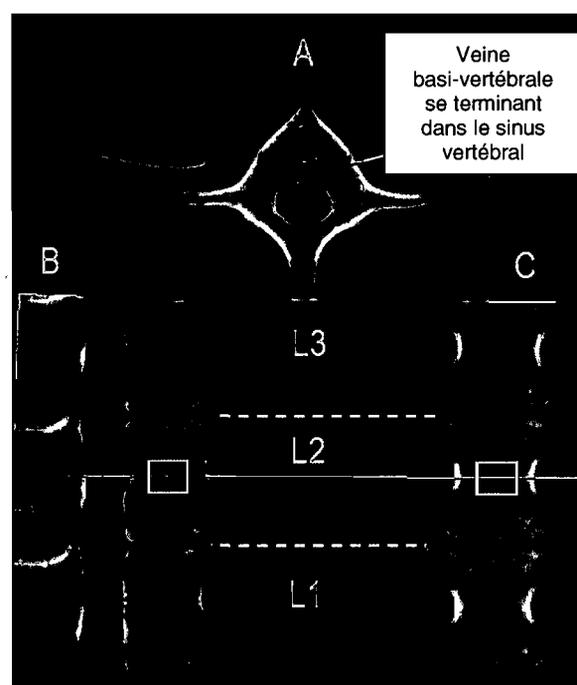
Les acquisitions de qCT ont été analysées à l'insu du traitement, à l'aide du programme qCT PROTM BIT¹⁸. Ce programme a permis d'effectuer une analyse de la DMO sur une reconstruction en 3D des vertèbres L1 et L2. Il permet aussi de compiler automatiquement les données de référence obtenues à partir du fantôme de calibration. Ainsi, la DMO volumique (en g/cm^3) d'une ROI déterminée par l'utilisateur a été obtenue directement. Pour chaque vertèbre analysée, une ROI cylindrique a été définie au centre du corps vertébral. La hauteur du cylindre a été fixée à 5 mm pour les

¹⁷ Lunar Corporation, Madison, USA

¹⁸ qCT PROTM Bone Investigational Toolkit, version 2.1, Mindways Software Inc., Austin, TX.

vertèbres des porcs du temps T1 et à 9 mm pour celles du temps T3, T5 et T6. La surface de la base du cylindre a été fixée entre 25 et 30 mm² (T1); 60 et 65 mm² (T3); 80 et 85 mm² (T5); et 90 et 95 mm² (T6). La visualisation de cette ROI dans 3 plans (sagittal, dorsal et transversal) ont permis d'exclure l'os cortical, de centrer correctement cette région dans le corps vertébral et d'éviter le sinus vertébral (située dorsalement au corps vertébral et ventralement au canal vertébral ; figure 4).

Figure 4 : Placement d'une ROI sur une acquisition de qCT dans les 3 plans au cœur du corps d'une vertèbre L2 de porc du temps T6



A : coupe transverse au centre de la vertèbre L2

B : coupe sagittale au centre des vertèbres L1, L2, et L3

C : coupe dorsale au centre des vertèbres L1, L2, et L3

Le cercle rouge sur la coupe transverse délimite la base du cylindre.

Le trait rouge repère la position du cylindre au niveau des projections sagittale et dorsale et les rectangles jaunes délimitent la ROI sur ces projections.

Il est important de noter que l'os cortical et la veine basi-vertébrale sont évités.

2.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS¹⁹.

Des analyses de régression logistique pour données ordinales ont été effectuées pour déterminer les effets du traitement à la CTC, de l'âge au début du traitement, la durée d'administration, le temps de retrait, l'âge, le poids, la DMO et le GMQ, ainsi que

¹⁹ SAS system for Windows, 9.2 release. Cary, NC, U.S.A.

de leurs interactions sur le risque d'obtenir une décoloration nulle. Une modélisation par étapes a été utilisée avec un seuil d'inclusion des facteurs de prédiction de $p = 0,15$ et un seuil de maintien de ces facteurs de $p = 0,20$. Le postulat de proportion des côtes a été vérifié à chaque étape.

Des analyses de régressions linéaires ont été effectuées pour déterminer les effets des précédentes variables, de leur transformés et de leur interactions sur la DMO (physique et par imagerie). Une modélisation par « étapes en avant » a été utilisée avec un seuil d'inclusion des facteurs de $p = 0,15$ et un seuil de maintien de ces facteurs de $p = 0,20$, ainsi qu'une modélisation « par étape de retrait » avec un seuil de maintien de $p = 0,10$. Une analyse complète des résidus a été menée. Le choix du modèle le plus appropriée a été basée sur cette analyse de résidus combinée à l'obtention d'un modèle optimum sur la base de la maximisation des coefficients de détermination et de la statistique de Mallow.

3. PUBLICATIONS

Article 1 : M. Guillot, K. Alexander, C. Pomar, J.R.E. del Castillo (2008). In growing pigs, chlortetracycline induces a reversible green bone discoloration and persistent increase of bone mineral density dependent of dosing regimen. *Journal of Animal Science* (soumis).

Article 2 : M. Guillot, K. Alexander, C. Pomar, J.R.E. del Castillo (2008). Dietary chlortetracycline induces differential effects on the accuracy of qCT and DXA at monitoring the vertebral bone mineral density in growing pigs. *The Veterinary Journal* (soumis).

3.1. In growing pigs, chlortetracycline induces a reversible green bone discoloration and persistent increase of bone mineral density dependent of dosing regimen

M. Guillot,* K. Alexander,† C. Pomar,‡ J.R.E. del Castillo*

*Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), Department of Veterinary Biomedical Sciences, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6;

†Department of Clinical Sciences, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6;

‡ Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Québec, Canada, J1M 1Z3

3.1.1. Abstract

We studied in 21 day-old castrated male pigs (N=112) the effects of exposure to dietary chlortetracycline on bone color and bone mineral density (BMD), and the ability of a quantitative computed tomography (qCT) technique to evaluate the effects of tetracyclines (TC) on trabecular BMD. We hypothesized that the TC induce reversible bone discoloration and affect BMD and that effects increase with treatment duration and the age of pigs. Pigs were kept in the research facility for 147 days, and randomly allocated to a drug-free diet (n=48) or a diet fortified with 800 ppm of chlortetracycline, starting either at 28 or 84-d of age, and for either a 28 or 56-d duration (n=16 pigs/group). Control and treated pigs were randomly picked at 28-d intervals for dissection of the two first lumbar vertebrae and evaluation of discoloration and BMD under blind conditions. Before dissection, the first 8 pigs, and pigs medicated for 56 d, as well as their controls, were subject to a qCT examination. Logistic regression analysis for ordinal data and linear regression analysis were respectively used to determine the effects of age, BW, treatment onset, dosing duration, and withdrawal time on the odds of

a bone discoloration score of 0, and on BMD. The odds of losing a 0-score increased with increasing dosing duration ($p = 0.0002$) and age at treatment onset ($p = 0.0002$), and the odds of keeping a 0-score increased with the interaction of withdrawal time and age at treatment onset ($p = 0.001$). The measured trabecular BMD linearly increased with age ($p < 0.0001$), a trend further increased by the square of treatment duration ($p = 0.0076$). The qCT-estimated BMD quadratically increased with age ($p < 0.0001$), a trend further increased by the age at the treatment onset ($p = 0.0318$). The vertebral body BMD curvilinearly increased with BW (positive linear term, $p < 0.0001$; and negative quadratic term, $p = 0.0242$), and gently increased with the square of age at treatment onset ($p = 0.0972$). This study indicates that TC-induced bone discoloration is reversible and may be prevented with a proper dosing regimen design. In addition, TC induces a persistent increase on BMD that could be detected with qCT.

3.1.2. Key words:

Bone mineral density, bone discoloration, tetracyclines, quantitative computed tomography, pigs.

3.1.3. Introduction

Green bone discoloration of pig carcasses is an increasing concern. Following the emergence of a new genotype of type 2 porcine *Circovirus* in Canada (Carman et al. 2008), which induces a severe immunosuppressive disease (Segalès et al. 2006) and increases the risk of bacterial infections in 2 to 4 month-old pigs (Gagnon et al. 2008), the use of tetracyclines (TC) had intensified. Bone discoloration, which may be caused by TC, is a nuisance for producers, as it raises doubts about the wholesomeness of pork carcasses (Kühne et al. 2000), and might be coincident to the selection of antibiotic-resistant bacteria (Perrin-Guyomard et al. 2001).

The ability of TC to accumulate in bone has long been known (Buyske et al. 1960). Tetracyclines, which form colored chelation complexes with metal ions (Albert et al. 1956), specifically bind to the calcium ions of bone (Ibsen et al. 1961), particularly in new bone (Ibsen 1985). Moreover, TC decrease bone resorption by inhibition of osteoclasts through direct (inhibition of mature osteoclast production, and apoptosis) and

indirect (inhibition of osteoclast enzymes) mechanisms (Bettany et al. 2000; Rifkin et al. 1994).

As TC molecules are released during the process of bone resorption (Milch et al. 1958), we hypothesize that bone discoloration in pigs is reversible, once dietary intake of TC ceases. Moreover, considering that TC inhibit osteoclastic activity, we additionally hypothesize that the use of TC-fortified diets affects bone mineral density (**BMD**). The objectives of this study were: 1) to evaluate in growing pigs the effects of age at TC treatment onset and dosing duration on bone color and BMD, and 2) to assess the ability of a quantitative computed tomography (**qCT**) technique to evaluate the effects of TC on trabecular BMD. It was expected that both bone discoloration and BMD would increase with longer treatment duration and increased age at treatment onset. Chlortetracycline (**CTC**) was used as the model TC.

3.1.4. Materials and methods

The experimental protocol followed in this study was approved by the bioethical comity of Agriculture and Agri-Food Canada and care according to a recommended code of practice (Agriculture and Agri-Food Canada 1993) and to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Olfert et al. 1993).

3.1.4.1. Animals and housing

A total of 112 weaned castrated male piglets (Yorkshire × Landrace; Perfo-Porcs Inc., Notre-Dame du Bon Conseil, Qc) with no previous exposure to TC were placed in the research facility (Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Qc) at a mean age of 26.6 ± 2.8 d. The pigs were subject to a veterinary examination before being randomly distributed into pens of 4 animals in the nursery section of the facilities.

Nursery pens had slatted floors providing $0.8 \text{ m}^2/\text{pig}$. At 70-d of age, pigs were transferred to the growing facilities, where they were randomly separated into groups of 12 animals. Growing pens had solid floors and mobile walls, allowing progressive expansion of the surface area from 1 to $2.2 \text{ m}^2/\text{pig}$. The pigs were kept in this facility for the entire duration of the growing (up to 140-d of age) and finishing phases (up to 168-d of age).

Environmental conditions were completely controlled, with a constant room temperature of 26°C in the nursery room, and decreasing temperature (from 22°C to 18°C, by 0.5°C weekly increments) in the growing room. Relative humidity was kept between 30 and 40%.

3.1.4.2. Diet and experimental design

Feeds and water were supplied *ad libitum* during the whole study. In the nursery, feeds were given in weighed amounts to each pen. In the grower facilities, feeds were given through computerized IVOG-feeders (Insentec B.V., Marknesse, The Netherlands), thus allowing the determination of individual, real-time feed intake.

Four basic diets were used: nursery-1 (28 to 42-d of age), nursery-2 (42 to 56-d of age), growing (56 to 140-d of age); and finishing (140 to 168-d of age). Nursery pigs were fed with commercial diets (Shur-Gain, Nutreco Canada Inc., St Marys, ON), in which the calculated total nutrient content (as fed basis) were 18% CP, 0.9% Ca, and 0.63% P (Perfo-porc Plus first age piglets), and 17.5% CP, 0.85% Ca, and 0.7% P (Perfo-porc plus second age piglets). Then, pigs were fed with growing and finishing diets in which the calculated total nutrient content (as fed basis) were respectively 17.7% CP, 0.7% Ca, and 0.5% P; and 15.7% CP, 0.56% Ca, and 0.46% P. Both diets contained 0.24 % of L-lysine HCl, 98% (as fed basis). All pigs were weighed before each dietary upgrade.

Control pigs (n=48) were fed the afore-mentioned drug-free diets during the whole experiment. Medicated pigs were fed the same diets, but fortified with 800 ppm of CTC hydrochloride (Aureomycin[®] 220 G Premix, Alpharma Canada Corporation, Mississauga, ON). Dietary CTC was given starting either at 28 or 84-d of age, and for either a 28 or 56-d duration (coded **CTC 28_28**, **28_56**, **84_28**, and **84_56**; n=16 pigs/group).

On the first experimental day, 40 of the 120 piglets were randomly selected: 8 of them were used for the first checkpoint (**D28**), and the other 32 started the course of dietary CTC. Afterwards, pigs were randomly picked every 28 days, i.e. the times of the other checkpoints (coded **D56**, **D84**, **D112**, **D140**, and **D168**). At D56, 8 control pigs and 8 medicated pigs were evaluated, 8 medicated pigs were switched back to the drug-free diet until D168, and the other 16 were left on the medicated diet for another 28 days. At

D84, 8 control pigs and 8 medicated pigs were evaluated, 8 medicated pigs were switched to the drug-free diet until D168. Simultaneously, another 32 control pigs were randomly selected to start their course of dietary CTC. The same sampling strategy was applied at D112 and D140. At D168, 6 pigs from each medicated and control groups were randomly selected for the final checkpoint.

3.1.4.3. Weighing, euthanasia and dissection

At each checkpoint, all pigs were weighed. The ones selected to undergo evaluation were sedated with intramuscular azaperone (2-4 mg/kg; Stresnil injection, Merial Canada Inc., Baie d'Urfée, QC), following which they were moved to a quiet room where they received pharmacological euthanasia with an intravenous overdose of sodium pentobarbital (> 4 mg/kg; Euthanyl[®], Bimeda-MTC Animal Health Inc., distributed by Vétoquinol Canada Inc., Lavaltrie, QC). Finally, following imaging (as described below), their first and second lumbar vertebrae (L1 and L2) were manually dissected, tagged with the pig's identification number, and stored at -20°C pending evaluation of bone discoloration.

3.1.4.4. Imaging procedures

Before dissection, control and medicated pigs from D28, D84, D140, and D168 were subject to post-mortem dual energy X-ray absorptiometry examination of the lumbar vertebrae, the procedures and results of which will be presented in separate communication. Then, they were stored overnight at 4°C, placed in dorsal recumbency in wooden troughs to maintain vertebral column alignment. The next day, the cadavers were sent to the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire of the Université de Montréal for quantitative computed tomography (qCT) examination of the lumbar vertebrae.

3.1.4.5. Lumbar BMD estimation with qCT

The qCT scan of the lumbar vertebrae was performed at D28, d 84, D140, and D168 on the medicated and control pigs for estimation of trabecular bone mineral density (BMD). Animals were placed on the CT table (CT Hi speed ZX/i, GE Healthcare Canada, Saint-Laurent, QC) in dorsal recumbency, overlying a calibration phantom made of 5 cylindrical reference rods (Model 3 CT Calibration Phantom,

Mindways Software, Inc., San Francisco, CA) parallel to the pig's longitudinal axis. The qCT scan settings were the following: X-ray tube set at 120 kV and 100 mA, helical mode, pitch of 1 with a tube rotation time of 1 s, 1 mm slice thickness, 40 cm field of view, 512×512 pixel matrix, and bone algorithm.

All qCT examinations were analyzed after acquisition of D168 data, with the evaluator unaware of the pigs' treatment status, using BMD analytical software (QCT PRO™ Bone Investigational Toolkit, version 2.1, Mindways Software Inc., Austin, TX). Both L1 and L2 were subject to 3D analysis. Trabecular BMD was estimated within a user-defined cylindrical region of interest (**ROI**), centered in the vertebral body. The length of the ROI was set to 5 mm for the D28 vertebrae and to 9 mm for the other checkpoints. The basal surface area of the ROI was between 25 and 30 mm² for the D28 vertebrae, between 60 and 65 mm² for that of D84, between 80 and 85 mm² for that of D140, and between 90 and 95 mm² for that of the D168 vertebrae.

3.1.4.6. Bone discoloration measurements

The tagged lumbar pieces containing L1 and L2 were heated for 4 hours at 120°C to enable complete manual dissection. Then, green bone discoloration was semi-quantitatively scored as 0 (none), 1 (trace), 2 (light), 3 (medium), or 4 (dark) under blind conditions.

3.1.4.7. Lumbar vertebra preparation for physical BMD determination

All L1 and L2 vertebrae were placed in a water bath at 100°C for 5 h to isolate and clean the vertebral bodies, which were then placed for 48 h in an agitated chloroform bath (Chloroform 99%, reagent grade, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ). Afterwards, the defatted vertebral bodies were dried for 16 h in an oven set at 80°C. Finally, the dry weights of the vertebral bodies were measured with an electronic scale to the nearest 0.1 mg (AccuSeries, model accu-124, Fisher Scientific, Arvada, CO).

Physical BMD was determined first on the vertebral bodies using the Archimedes' principle "any body submerged in a fluid is buoyed up by a force equal to the weight of the fluid displaced." The displaced fluid volume is equal to the volume of the body fully submerged in the fluid; therefore, the density of the body is determined with the equation:

$$\rho = W(a) \times \rho(w) / W(a) - W(w),$$

Where ρ is the density of the body; $\rho(w)$ is the density of the water, $W(a)$ is the weight of the body in air, and $W(w)$ is the body of the solid in water, as measured on a hydrostatic scale.

To this end, all bone specimens were degassed in distilled water at 40°C for 48h, placed for 30 min in an ultrasonic bath (Ultrasonic Cleaner model 5510, Branson, Danbury, CT). Each specimen was then weighed in air and in distilled water to the nearest 0.1 mg with the electronic scale, which had been fitted with a density determination kit (Sartorius YDK 01, Sartorius AG, Goettingen, Germany). The following equation was used to determine the physical BMD of the specimens:

$$\text{BMD} = W_b(a/\text{dry}) \times \rho(w) / W_b(a/\text{degas}) - W_b(w),$$

where $W_b(a/\text{dry})$ is the dry weight of the bone sample, $W_b(a/\text{degas})$ is its weight in air after degassing, and $W_b(w)$ is its weight in water (Galante et al. 1970).

A rod-shaped trabecular bone sample was then cut from the center of each vertebral body, parallel to the long axis, using a diamond-coated coring blade (Diamond holesaw, Stay Sharp, Exchange A Blade, Delta, BC) with a 16 mm inner diameter. The cortical bone at each base of the rods was removed, and the trabecular bone cores were placed in the agitated chloroform bath for another 12 h, and dried for 8 h at 80°C, after which the dry trabecular bone weights were measured to the nearest 0.1 mg. Physical BMD measurements were made on these rods according to the same methodology as above, except that degassing time was reduced to 36h.

3.1.4.8. Statistical analysis

The descriptive statistics of BW data from control and medicated pigs were examined to assess departure from the normal distribution, after which two-sample t-tests were performed at the 0.05 α -level to compare the mean BW between control and treated pigs (at treatment onset) and between treatment duration groups (at the time of switch back to the drug-free feed).

Logistic regression analysis for ordinal data (McCullagh 1980) was performed to examine the effects of treatment, age at the treatment onset, dosing duration, withdrawal time, BMD, BW, pig age, and feed efficiency on the odds of a bone discoloration equal to 0 (reference value). The statistical significance of the above predictors, their

associated polynomials, and all their possible dual interactions was tested with a stepwise-forward algorithm, with a threshold of $P = 0.15$ for including these factors in the model, and a threshold of $P = 0.20$ for their removal (Hosmer et al. 1989). The likelihood ratio test, and the score test for the proportional odds assumption were examined at each step to assess respectively the significance of the newly added predictor (or of the newly reduced model), and the validity of the proportional odds assumption for the response variable (Brant 1990). Furthermore, the best model was selected based on optimization of the association between predicted probabilities and observed response (Ananth et al. 1997). The odds ratio (OR) and 95 % confidence intervals (95 % CI) of an imperceptible bone discoloration (i.e. score = 0) were calculated using standard formulae (Hosmer et al. 1989).

Table 1 lists the variables tested as predictors of growth, and of BMD (physical and qCT-estimated) in multiple linear regression analysis (Kutner et al. 2004). All these regression analyses were performed with stepwise-forward procedures, using a threshold for entry and for maintenance in the model of $p = 0.15$ and $p = 0.20$ respectively, and with backward procedures with a threshold of $p = 0.10$ for stay in the model. A thorough residue analysis was performed for each model. If heteroscedasticity of the residues was observed, a dependent variable transformation was tested and a weighted least square linear regression analysis was performed. The best model selection was based on optimizing the scatter of residues over the regression line, coefficient of determination, and Mallows' C_p criterion (Kutner et al. 2004). All statistical analyses were performed with a statistical software program (SAS system for Windows, 9.2 release. Cary, NC, U.S.A).

Table 1. Independent variables used in the multiple linear regression analyses of body weight and bone mineral densities of the second lumbar vertebra of pigs¹.

Independent variable ²	Dependent variable				
	BW, kg	tBMD, g/cm ³	qBMD, g/cm ³	bBMD, g/cm ³	
				Model 1	Model 2
BW, kg	-	X	X	X	X
Pig age, d	X	X	X	X	X
Age at treatment onset, d	X	X	X	X	X
Treatment duration, d	X	X	X	X	X
Withdrawal time, d	X	X	X	X	X
Feed efficiency, kg/kg	X	X	X	X	X
tBMD, g/cm ³	-	-	-	-	X

¹tBMD = measured trabecular bone mineral density; qBMD = qCT-estimated trabecular bone mineral density; bBMD = measured bone mineral density of the vertebral body; X = variable used; - = variable not used.

²Variable may be subject to transformation or be used in dual interaction in the final model.

3.1.5. Results

At D28 and D84, the BW of control pigs was similar to the ones of pigs starting a course of dietary CTC (Table 2). The same findings were recorded at the D56 and D112 (long-term medication startpoint), at which the 28 day-medicated pigs and pigs continuing medication up to 56 days had similar BW. Furthermore, all pairs of groups compared had similar ranges of BW data.

Table 2. Distribution of body weights of pigs at the times of changes in the medication regimes of dietary chlortetracycline, and results of selected statistical comparisons.

Check point ¹	Groups tested ²	Number of pigs	BW, kg			
			Mean	SE	Range	p-value
D28	Controls	78	9.17	0.2	[5.6, 12.9]	0.46
	CTC 28_28 + 28_56	16	8.79	0.5	[6.4, 12.8]	
D56	CTC 28_28	14	25.8	1.2	[18.9, 32.2]	0.85
	CTC 28_56	14	26.2	1.1	[18.2, 34.8]	
D84	Controls	22	48.8	1.9	[36.8, 68.7]	0.41
	CTC 84_28 + 84_56	26	50.6	1.2	[40.5, 64.0]	
D112	CTC 84_28	14	83.0	1.8	[71.6, 95.4]	0.93
	CTC 84_56	14	82.7	2.2	[72.5, 100.4]	

¹ Check points: D28, D84 = weighing at the onsets of exposure to dietary CTC; D56, D112 = weighings at the times of ending the 28-d long course of dietary CTC.

² Treatment groups: CTC 28_28 = pigs put on a 28-d course of dietary CTC starting at 28-d of age; CTC 28_56 = pigs put on a 56-d course of dietary CTC starting at 28-d of age; CTC 84_28 = pigs put on a 28-d course of dietary CTC starting at 84-d of age; CTC 84_56 = pigs put on a 56-d course of dietary CTC starting at 84-d of age.

An outbreak of intestinal salmonellosis occurred between D140 and D168, causing 2 deaths and 8 affected pigs. Clinically affected pigs (i.e. with diarrhea, fever, or both) were excluded from the experiment to avoid possible bias associated with the use of parenteral antibiotic therapy. In addition, biosecurity regulations preempted further admission of whole pig cadavers for qCT examination. Therefore, the lumbar region of the D140 and D168 pig cadavers was resected, placed in hermetic bags, and chemically

sterilized before submission to the diagnostic imaging service for *ex-vivo* qCT examination, applying the same protocol as already described.

As the variability in BW increased with age, weighted least-square linear regression was performed using a BW^{-1} weighting factor. This analysis revealed an increase in BW with a 3rd-order polynomial of age ($p = 0.0241$ for the linear effect, and $p < 0.0001$ for the quadratic and cubic effects), a trend that was further increased by the interaction of age at treatment onset with age ($p = 0.1016$). The R^2 of this regression model was 0.98.

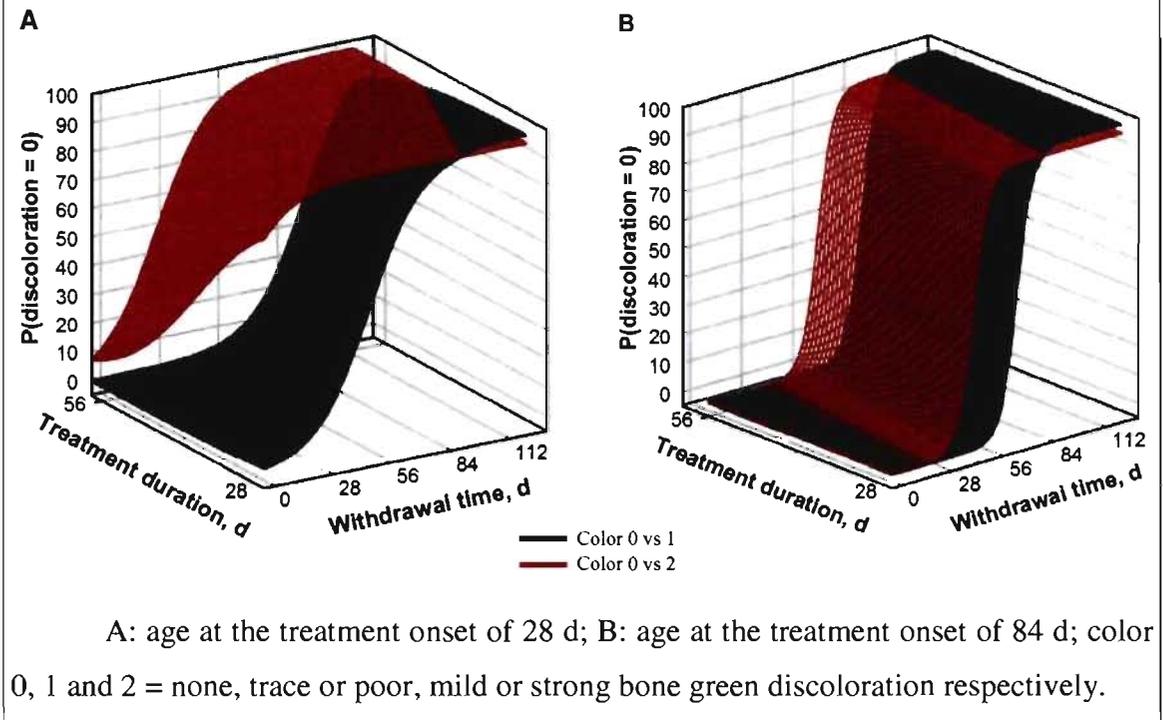
3.1.5.1. Bone Discoloration

No discoloration was noticed in control pigs. In contrast, the discoloration score was unchanged among pigs of a given medicated pig group at D56, D84, D112, and D140: 2 for CTC 28_28; 3 for CTC 28_56, and CTC 84_28; and 4 for CTC 84_56. But at D168, differences in discoloration score were noted within treatment groups. The CTC 28_28 pigs had scores of 0 (5 of 6 animals) or 1. The CTC 28_56 had scores of 0 (3 of 6 animals), 1, or 2 (2 of 6). The CTC 84_28 pigs had scores of 0 (1 of 6 animals), 1 (4 of 6), or 2. Finally, equal numbers of the six CTC 84_56 pigs had scores of 3 and 4. The discoloration implicated only bone tissue and was more intense in cortical bone.

To comply with the proportional odds assumption, the original bone discoloration scoring system had to be reduced into 3 independent categories: 0 = no discoloration; 1 = traces or light green discoloration; 2 = moderate or dark green discoloration.

Figure 1 delineates the probabilities of obtaining a discoloration score of 0 on L2, with respect to a score of 1 and to a score of 2. The odds of losing a 0-score (i.e. becoming discolored) increased with increasing dosing duration (OR = 1.151; 95 % CI = [1.070 - 1.239]; $p = 0.0002$) and age at treatment onset (OR = 1.227; 95 % CI = [1.100 - 1.368]; $p = 0.0002$), and the odds of keeping a 0-score increased with the interaction of withdrawal time and age at treatment onset (OR = 1.003; 95 % CI = [1.001 - 1.005]; $p = 0.001$).

Figure 1. Probability of obtaining a discoloration score of 0 on the second lumbar vertebra as a function of withdrawal time and CTC treatment duration.



3.1.5.2. Bone mineral density

Table 3 presents the estimated coefficients of the predictors included in the final regression models of measured or qCT-estimated BMD of L2, ranked by their order of inclusion. It should be noted that growth-related and drug-related variables, but not feed efficiency, were retained in the models.

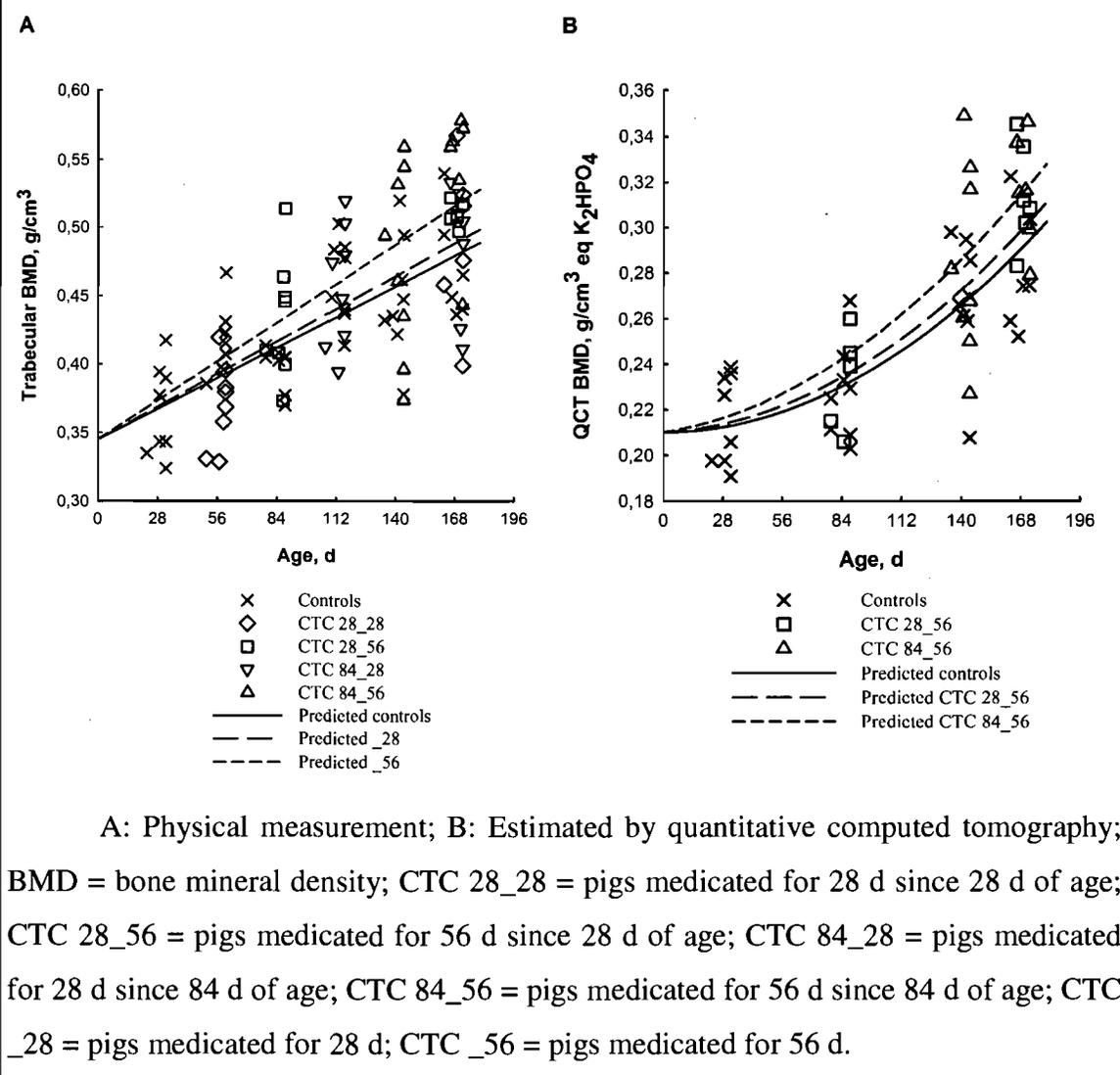
The increase in density as a function of age was linear for the measured BMD but curvilinear for the estimated BMD (Figure 2). Moreover, the CTC-dosing duration was a better predictor than age at treatment onset for the physically-measured BMD, but the opposite was true for the qCT-estimated BMD.

Table 3. Predictors and intercept retained in the final linear regression models of the measured or calculated bone mineral density for the second lumbar vertebra.¹

Dependent variable	Predictor	Estimate	SE	p-value	Cumulative R ²
tBMD	Intercept	0.3445	0.0114	< 0.0001	-
	Age	0.0008	1.0 × 10 ⁻⁴	< 0.0001	0.50
	Square treatment duration × Age	6.9 × 10 ⁻⁸	2.5 × 10 ⁻⁸	0.0076	0.54
qBMD	Intercept	0.2101	0.0071	< 0.0001	-
	Squared age	2.9 × 10 ⁻⁶	4.1 × 10 ⁻⁷	< 0.0001	0.60
	Age at the treatment onset × Age	1.7 × 10 ⁻⁶	7.7 × 10 ⁻⁷	0.0318	0.64
bBMD, model 1	Intercept	0.4250	0.0122	< 0.0001	-
	BW	0.0016	0.0004	< 0.0001	0.50
	Squared BW	-5.3 × 10 ⁻⁶	2.3 × 10 ⁻⁶	0.0242	0.53
	Square age at the treatment onset	2.3 × 10 ⁻⁶	1.4 × 10 ⁻⁶	0.0972	0.54
bBMD, model 2	Intercept	0.1454	0.0192	< 0.0001	-
	tBMD	0.6986	0.0557	< 0.0001	0.77
	Natural logarithm of BW	0.0151	0.0040	0.0003	0.80
	Treatment duration × withdrawal time	-5.8 × 10 ⁻⁶	2.1 × 10 ⁻⁶	0.0065	0.81

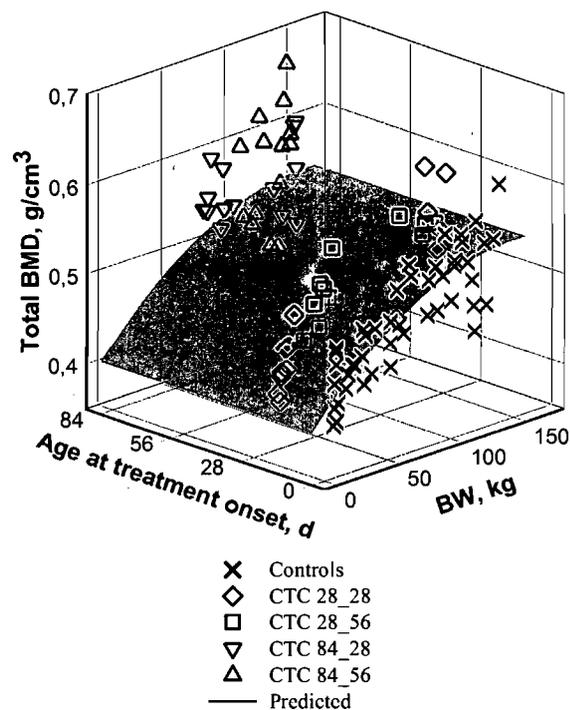
¹R² = coefficient of determination; tBMD = measured trabecular bone mineral density; qBMD = qCT-estimated trabecular bone mineral density; bBMD = measured bone mineral density of the vertebral body.

Figure 2. Trabecular BMD of the second lumbar vertebra of pigs, as a function of age and treatment group, plus linear regression trends.



There is a curvilinear increase of vertebral body BMD with increasing BW, and a gentle positive slope associated with the square of age at treatment onset (Figure 3).

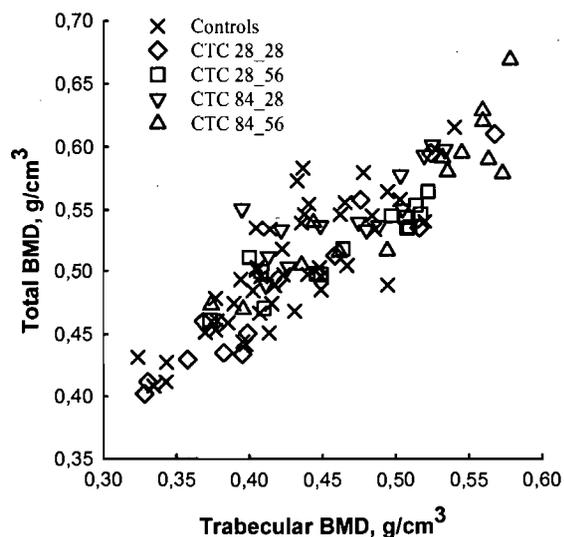
Figure 3. BMD of the body of the second lumbar vertebra as a function of BW and age at the treatment onset, plus linear regression trend.



BMD = bone mineral density; CTC 28_28 = pigs medicated for 28 d since 28 d of age; CTC 28_56 = pigs medicated for 56 d since 28 d of age; CTC 84_28 = pigs medicated for 28 d since 84 d of age; CTC 84_56 = pigs medicated for 56 d since 84 d of age.

The vertebral body BMD linearly increased with trabecular BMD, but this relationship was lowered by drug exposure (Figure 4). The other modifiers of this relationship are presented in Table 3.

Figure 4. BMD of the body of the second lumbar vertebra as a function of its trabecular BMD.



BMD = bone mineral density; CTC 28_28 = pigs medicated for 28 d since 28 d of age; CTC 28_56 = pigs medicated for 56 d since 28 d of age; CTC 84_28 = pigs medicated for 28 d since 84 d of age; CTC 84_56 = pigs medicated for 56 d since 84 d of age.

3.1.6. Discussion

The ability of TC to form colored complexes with multivalent metal cations has been known since the early years of the antibiotic era (Albert et al. 1956; Weinberg 1957). These same chelating sites on CTC are also present on the other types of TC molecules (Jin et al. 2007), therefore our results with CTC can safely be inferred to the rest of this family of drugs. Our study confirmed that the chronic administration of dietary TC is a cause of green bone discoloration in growing pigs. The persistence of TC-metal complexes in bone has already been described in rats dosed parenterally with 8 to 75 mg.kg⁻¹.d⁻¹ of TC for 1 month (Benitz et al. 1967), and in rats and dogs fed daily with a TC-fortified diet for one year (Buyske et al. 1960). In humans, several cases of TC-induced bone discoloration concomitant with a chronic oral intake of TC have been reported (McCleskey (Capt.) et al. 2004; Oklund et al. 1981). In our study, feeding pigs dietary CTC for 4 weeks was sufficient to induce a light vertebral discoloration. In rats,

bone discoloration seemed to be dose dependent (Benitz et al. 1967). Although we could not test this variable due to space limitations in the research facility, discoloration scoring revealed that dosing duration and withdrawal time affected the intensity of discoloration. Further investigation using several different dietary CTC concentrations may be useful in determining a “no discoloration effect level” for TC in pigs.

The intensity of bone discoloration was uneven on a given vertebra, which reflects the heterogeneity of bone turnover (Shea et al. 2005; Stepensky et al. 2003). Indeed, a more intense discoloration was subjectively noted on the cortical bone, where bone lamellae are more dense as compared to those of the trabecular bone (Shea et al. 2005). Besides, discoloration did not occur on the joints or growth cartilage, which are known to be ineffective binding sites for the TC (Milch et al. 1957).

The probability of green bone discoloration was higher with increasing treatment duration, which is consistent with the cumulative deposition of TC in bone (Buyske et al. 1960). This deposition occurs during the processes of bone modeling and remodeling, where the drug molecules are fixed on the newly formed bone by chelating with calcium (Milch et al. 1957; Milch et al. 1958; Stepensky et al. 2003). At the end of the course of dietary CTC, for identical treatment duration, bone discoloration was darker in older pigs, which may be related to the increase of available chelating sites due to higher bone mass and volume. Besides, similar levels of discoloration were observed among pigs within a given medicated group after terminating the course of dietary CTC, which may result from saturation of bone TC deposition sites. This view is challenged by the loss of drug that parallels bone resorption (Klein et al. 1976; Milch et al. 1958; Stepensky et al. 2003), a process that uncouples the cation-TC complexes. Hence, it is more likely that this within-group homogeneity in bone discoloration be explained by a dynamic equilibrium between drug deposition and removal. The acidic osteoclastic secretion at the site of bone resorption hinders the ability of released TC molecules to complex anew with the multivalent cations in bone (Jin et al. 2007), which would favor their redistribution to the bloodstream. A study using several dosages of TC may allow confirmation of these hypotheses.

The TC-induced bone discoloration reversed itself when a sufficient withdrawal time was given, and could entirely vanish in 8 weeks. This finding is consistent with

removal through bone resorption (Shea et al. 2005; Stepensky et al. 2003), which is a perpetual process (Vaughan 1981a). Only few studies have focused on the pharmacokinetics and persistence of TC in bones. Following a single dose, a small fraction of TC molecules are retained in the bone of rats (Buyske et al. 1960), dogs (Kelly et al. 1960), and pigs (Black et al. 1984), and persist for several weeks in rats and dogs (Buyske et al. 1960; Kelly et al. 1960). A two-compartment model was proposed in rats to differentiate the elimination speeds of TC, occurring within 1 week from a fast compartment, but occurring over 2 months from a slow compartment representing bone resorption (DeMoss et al. 1997). A one-compartment model has also been proposed, where TC had already been excreted from the body but, and under steady state condition, each bone represented an individual compartment, from which TC was considered irreversibly eliminated (Li et al. 1989).

The discoloration disappeared at a slower rate when the age at treatment onset increased, in agreement with the age-related decrease in bone turnover rate (Li et al. 1989). Although a similar discoloration score was observed for each pig within a given medicated group immediately at the end of its treatment course, a large within-group variation in discoloration score was noted at D168. This variable discoloration is likely related to differences in bone remodeling rate among animals, which is affected by several factors such as aging, mechanical constraints including exercise, underlying disease, endocrine factors and local factors (Allen 2003; Boyde 2003; Shea et al. 2005).

Finally, the odds of bone TC discoloration was higher when treatment was started at the later growth stages, which is consistent both with an increase in potential chelating sites in older pigs, or with their lower rate of bone turn-over. Interestingly, the OR reported in our study are identical to the risk ratio, as the prevalence of a positive discoloration in unexposed cases was null (Zhang et al. 1998). For example, as compared with controls, medicated pigs were 1.2 times per increment of increased age at treatment onset more at risk of presenting a TC bone discoloration. This risk of bone discoloration was similar for medicated pigs per increment of increased treatment duration.

Trabecular bone, because its turnover rate is higher than that of cortical bone (Vaughan 1981a), is a valuable site for studying bone metabolism (Akahoshi et al.

2005). The vertebrae, whose trabecular bone benefits from the high vascular supply of its surrounding red marrow, have a high rate of metabolic activity (Li et al. 1999; Shea et al. 2005). Therefore, vertebrae were considered the bones of choice to study both accumulation of TC on bone and BMD. Lumbar, as compared with thoracic vertebrae, are commonly used in live studies assessing BMD by qCT due to the minimal impact of respiratory movement (Cann 1988; Genant 1985; Steiger et al. 1990). Even if our study was post-mortem, we wanted developed a model that could be used *in vivo*. Furthermore, samples of trabecular bone of the lumbar vertebrae are also easily obtained. Finally, the trabecular BMD of human L1 and L2 accurately predict those of all lumbar vertebrae (Steiger et al. 1990). For these reasons, we chose to limit our assessment to L1 and L2, as both the structure and remodeling process of trabecular bone are similar in swine and humans (Mosekilde et al. 1987; Tsutsumi et al. 2004).

Our results indicate that CTC exposure induced an increase in both vertebral body and trabecular BMD, compatible with the metabolic effect of TC on bone. *In vivo*, TC reportedly inhibits bone resorption (Rifkin et al. 1994), stimulates osteogenesis (Bain et al. 1997), or both (Aoyagi et al. 1996), related to effects on bone cells that are distinct from their antibacterial action. Several *in vitro* studies report direct and indirect actions of TC on osteoclasts, which are the primary cell involved in bone resorption (Vaughan 1981b), and osteoblasts, which are the main cell involved in bone formation (Vaughan 1981b). TC induce a dose-dependent apoptosis on osteoclasts (Bettany et al. 2000; Holmes et al. 2004), and inhibit their maturation (Holmes et al. 2004). Others studies report a dose-dependent inhibition by TC of several matrix metalloproteinases activities such as gelatinase, osteoblast-derived collagenase, osteoclast-derived collagenase, or stromelysin, all enzymes involved in bone extracellular matrix degradation (Acharya et al. 2004; Greenwald et al. 1998; Rifkin et al. 1994). Moreover, TC induce bone formation by stimulating osteoblast functions (Bain et al. 1997; Sasaki et al. 1994).

Also, although CTC exposure was of limited duration, the increases in physical and qCT-estimated BMD in medicated pigs persisted for up to D168, as indicated by the interaction between age and CTC exposure variables (i.e. dosing duration or age at treatment onset). This is consistent with the effects of TC on bone (Akahoshi et al. 2005; Aoyagi et al. 1996; Greenwald et al. 1998; Holmes et al. 2004; Rifkin et al. 1994), as

detailed above. These effects may persist as long as TC are present at pharmacological concentrations in bone, but since bone TC concentration could not be measured in this study, formal verification of these relationships is lacking. Indirect measurement may be provided by the intensity of green bone discoloration, which could be used as an indicator of the bone accumulation of the drug.

The vertebral body BMD has both cortical and trabecular components. The increase in BMD induced by CTC was less pronounced for the vertebral body than for the trabecular bone, as indicated by the extent of the increase in R^2 associated with the inclusion of CTC-related exposure variables. This observation suggests that cortical bone is less affected by TC than trabecular bone, a situation that may be associated with the difference in their respective rates of bone turnover (Li, 1989). Also, although TC increase cortical bone mass through apposition of endosteal new bone (Aoyagi et al. 1996), this increase in cortical mass and volume does not affect average cortical BMD. Measurement of cortical BMD and thickness in control and TC-medicated pigs, e.g. by micro-CT examination *ex vivo* (Hanson et al. 2004), would be necessary to confirm this hypothesis. Interestingly, the vertebral body BMD of pigs used at D168 was lower than what would be expected from their trabecular BMD, a situation that allowed the inclusion in the regression model #2 of an interaction term of dosing duration with withdrawal time. This was especially true for pigs put on dietary CTC starting at 28-d old. It is conceivable that the amount of CTC that accumulated in the cortical bone of treated pigs would not suffice to alter its BMD for a prolonged interval after termination of the dosing regimen. As a consequence, the vertebral BMD would return to physiological values by D168, provided sufficient withdrawal time.

In the present study, measured and qCT-estimated trabecular BMD increased respectively linearly and quadratically with age. The predictive difference between both regression models may be attributed to the lack of qCT measurements at D56 and D112. In growing mini-pigs, BMD continuously increased with age up to a maximum value obtained after completion of skeletal growth (Inui et al. 2004). Similarly, trabecular BMD in children increases with age, with a peak increase during puberty, after which the rate of BMD increase slows down (Bonjour et al. 1991; Heaney et al. 2000; Van Rijn et al. 2003). As our study was restricted to the duration of commercial swine rearing, it

was not surprising that our data failed to show evidence of a trabecular BMD asymptote. We did record a continuous increase in BMD similar to that of children and growing mini-pigs, except that no peak increase in BMD was apparent. This finding was expected, because the rate of increase in BMD is modified by the anabolic effects of sex hormones (Inui et al. 2004), and therefore it is unlikely that a step up in the rate of BMD increase would occur in castrated pigs.

In our study, the trabecular BMD was the largest determinant of vertebral body BMD. Yet, vertebral body BMD in smaller pigs had lower values than what would be predicted from their trabecular BMD values, which suggests that the cortical bone growth rate in those pigs was higher than that of their trabecular bone. Since cortical bone represents 80% of bone mass (Leonard et al. 2004; Shea et al. 2005), our results indirectly support the reported BW-related variation of bone weight of pigs, which is greatest between 28 and 70 kg (Richmond et al. 1972). Moreover, a similar pattern of increase of BMD relative to BW has been reported for a study in growing pigs submitted to dual energy X-ray absorptiometry examination of bone (Mitchell et al. 2001). Similarly, cortical BMD in growing mini-pigs has been shown to increase at a steeper rate in younger animals as compared to older ones, a trend that precedes age-related change in trabecular BMD (Inui et al. 2004). Finally, the vertebral body BMD increased with BW, but the magnitude of its effect clearly decreased as pigs got heavier, as evidenced by the negative slope of its quadratic term in model #1, and by the selection of log-transformed BW as predictor of model #2.

Non-invasive assessment of trabecular BMD with qCT has been widely used in humans (Cann 1988). In pigs, qCT has been only used as a biological model for humans (Akahoshi et al. 2005; Inui et al. 2004; Lee et al. 2004; Maier et al. 1997; Piert et al. 2003; Yu et al. 1995). Only one other study with qCT has focused on pigs as the target species (Nielsen et al. 2007). In the present study, qCT was used to assess the effects of an osteotropic drug on the growth-related changes in trabecular and vertebral BMD in pigs. An advantage of qCT is that it estimates BMD in a volumetric fashion, regardless of the bone growth, and it discriminates between cortical and trabecular bone (Cann 1989; Van Rijn et al. 2003). The successful demonstration of an increase in trabecular BMD of CTC-medicated pigs by qCT, suggests the validity of this technique as a non-

invasive tool for assessing the effects of the exogenous factors that potentially affect bone metabolism. A detailed discussion about qCT validation, use and limitations in this study will be presented in a separate communication.

The TC are the most often used dietary antibiotics in swine medicine (Prescott 1997). Besides their efficacy at treating the common bacterial pathogens of weaned piglets (Friendship et al. 2006), the growth-promoting effect of these drugs has been known since years (Dunlop et al. 1998; Prescott 1997). Hence, it was not surprising to note that CTC-medicated pigs grew at a slightly faster rate, especially the ones starting their course of medicated diet at the later growth stages.

To conclude, the present study results suggest that a proper dosing regimen design may prevent TC-induced bone discoloration. Practically, the risk of bone discoloration may be minimized by avoiding the continuous use of therapeutic doses of CT for more than 4 wk, and by limiting its use to pigs at the nursery stage. Bone TC residues are often found in piglet and finishing pig carcasses during deboning or transformation (Kühne et al. 2000), and this is considered a potential sign of antibiotic contamination (Kühne et al. 2001). However, further investigations on pharmacokinetics and residue concentration of TC in bone are needed to properly assess the human health risk of consuming bones with green discoloration. We also demonstrated a persistent increase of BMD related to TC medication, which could be assessed with qCT. Therefore, qCT may be a useful non-invasive tool to study TC accumulation in bone.

3.1.7. Literature cited

Acharya MR, Venitz J, Figg D and Sparreboom A (2004). Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist. Updat.* **7**: 195-208.

Agriculture and Agri-Food Canada (1993). Recommended code of practice for the care and handling of farm animals - pigs. Ottawa, ON, Canada., Publ. No. 1898E. Agriculture and Agri-Food Canada.

Akahoshi S, Sakai A, Arita S, Ikeda S, Morishita Y, Tsutsumi H, Ito M, Shiraishi A and Nakamura T (2005). Modulation of bone turnover by alfacalcidol and/or alendronate does not prevent glucocorticoid-induced osteoporosis in growing minipigs. *J. Bone Miner. Metab.* **23**: 341-350.

Albert A and Rees CW (1956). Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. *Nature* **177**(4505): 433-4.

Allen MJ (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.* **32**(3): 101-113.

Ananth CV and Kleinbaum DG (1997). Regression models for ordinal responses: a review of methods and applications. *Int. J. Epidemiol.* **26**(6): 1323-33.

Aoyagi M, Sasaki T, Ramamurthy NS and Golub LM (1996). Tetracycline/Fluibiprofen combination therapy modulates bone remodelling in ovariectomized rats: preliminary observations. *Bone* **19**(6): 629-635.

Bain S, Ramamurthy NS, Impeduglia T, Scolman S, Golub LM and Rubin C (1997). Tetracycline prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats. *Bone* **21**(2): 147-153.

Benitz K-F, Roberts GKS and Yusa A (1967). Morphologic effects of minocycline in laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **11**: 150-170.

Bettany JT, Peet NM, Wolowacz RG, Skerry TM and Grabowski PS (2000). Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. *Bone* **27**(1): 75-80.

Black WD and Gentry RD (1984). The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. *Can. Vet. J.* **25**: 158-161.

Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman D and Rizzoli R (1991). Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**(3): 555-63.

Boyd A (2003). The real response of bone to exercise. *J. Anat.* **203**: 173-189.

Brant R (1990). Assessing proportionality in the proportional odds model for ordinal logistic regression. *Biometrics* **46**(4): 1171-8.

Buyske DA, Eisner HJ and Kelly RG (1960). Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **130**: 150-156.

Cann CE (1988). Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review. *Radiology* **166**: 509-522.

Cann CE (1989). Why, when and how to measure bone mass: a guide for the beginning user. *Proceedings of the 1989 AAPM Summer School*, Woodbury NY, Frey GD and Yester MV 250-285.

Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusic P, Fairles J, Alexander HS and van Dreumel T (2008). The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004-2006. *Can. J. Vet. Res.* 72(3): 259-68.

DeMoss DL and Wright GL (1997). Analysis of whole skeleton 3H-tetracycline loss as a measure of bone resorption in maturing rats. *Calcif. Tissue Int.* 61(5): 412-7.

Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH, Friendship RA, Clarke RC and Black WD (1998). Antimicrobial drug use and related management practices among Ontario swine producers. *Can. Vet. J.* 39: 87-96.

Friendship RM and Prescott JF (2006). Drug therapy and prophylaxis. In: *Diseases of swine, 9th edition.* B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire and D. J. Taylor: Blackwell publishing. p 1131-1144.

Gagnon CA, del Castillo JRE, Music N, Fontaine G, Harel J and 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 545-558.

Galante J, Rostoker W and Ray RD (1970). Physical properties of trabecular bone. *Calcif. Tissue Res.* 5(3): 236-46.

Genant HK (1985). Assessing osteoporosis: CT's quantitative advantage. *Diagn. Imaging* 7(8): 52-57.

Greenwald RA, Golub LM, Ramamurthy NS, Chowdhury M, Moak SA and Sorsa T (1998). In vitro sensitivity of the three mammalian collagenase to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone* 22(1): 33-38.

Hanson NA and Bagi CM (2004). Alternative approach to assessment of bone quality using micro-computed tomography. *Bone* 35(1): 326-33.

Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V and Weaver C (2000). Peak bone mass. *Osteoporos. Int.* 11(12): 985-1009.

Holmes SG, Still K, Buttle DJ, Bishop NJ and Grabowski PS (2004). Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. *Bone* 35(2): 471-478.

Hosmer DW and Lemeshow S (1989). *Applied logistic regression*. New York U.S.A.

Ibsen KH (1985). Studies on the association of the tetracyclines with mineralized tissue. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **200**(November): 85-86.

Ibsen KH and Urist MR (1961). Complexes of calcium and magnesium with oxytetracycline. *Prop. Soc. Exp. Biol. Med.* **109**(797-801).

Inui A, Itamoto K, Takuma T, Tsutsumi H, Tanigawa M, Hayasaki M, Taura Y and Mamba K (2004). Age-related changes of bone mineral density and microarchitecture in miniature pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **66**(6): 599-609.

Jin L, Amaya-Mazo X, Apel ME, Sankisa SS, Johnson E, Zbyszynska MA and Han A (2007). Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. *Biophys. Chem.* **128**(2-3): 185-96.

Kelly RG and Buyske DA (1960). Metabolism of tetracycline in the rat and the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **130**: 144-9.

Klein L and Jackman KV (1976). Assay of bone resorption in vivo with 3H-tetracycline. *Calcif. Tissue Res.* **20**(3): 275-90.

Kühne M and Körner U (2001). Bound chlortetracycline residues in bones release under acidic conditions. *Food Chem.* **72**: 41-44.

Kühne M, Wegmann S, Kobe A and Fries R (2000). Tetracyclines residues in bones of slaughtered animals. *Food control* **11**: 175-180.

Kutner MH, Nachtsheim CJ, Neter J and Li W (2004). Multiple linear regression. In: *Applied linear statistical models. Fifth edition*. M. H. Kutner. New York. NY: Mc Graw-Hill Companies, Inc. p 214-508.

Lee J, In Shin H and Kim SY (2004). Fractional quantitative computed tomography for bone mineral density evaluation: accuracy, precision, and comparison to quantitative computed tomography. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **28**(4): 566-571.

Leonard MB, Shults J, Elliott DM, Stallings VA and Zemel BS (2004). Interpretation of whole body Dual Energy X-Ray Absorptiometry measures in children: comparison with peripheral quantitative computed tomography. *Bone* **34**(6): 1044-1052.

Li M, Liang H, Shen Y and Wronski TJ (1999). Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats. *Bone* **24**(2): 95-100.

Li XQ, Donovan CA and Klein L (1989). A pharmacokinetic model in the rat and rabbit of the direct measurement of mature bone resorption in vivo with [3H] Tetracycline. *J. Pharm. Sci.* **78**(10): 823-828.

Maier GW, Kreis ME, Zittel TT and Becker HD (1997). Calcium regulation and bone mass loss after total gastrectomy in pigs. *Ann. Surg.* **225**(2): 181-192.

McCleskey (Capt.) PE and Littleton KH (2004). Minocycline-induced blue-green discoloration of bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* **86A**(1): 146-148.

McCullagh P (1980). Regression models for ordinal data (with discussion). *J. R. Stat. Soc. Series B* **42**: 109-142.

Milch RA, Rall DP and Tobie JE (1957). Bone localisation of the tetracyclines. *J. Natl. Cancer Inst.* **19**: 87-91.

Milch RA, Rall DP and Tobie JE (1958). Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* **40A**(4): 897-910.

Mitchell AD, Scholz AM and Pursel VG (2001). Total body and regional measurements of bone mineral content and bone mineral density in pigs by dual energy X-ray absorptiometry. *J. Anim. Sci.* **79**(10): 2594-604.

Mosekilde L, Kragstrup J and Richards A (1987). Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif. Tissue Int.* **40**(6): 318-22.

Nielsen DH, McEvoy FJ, Madsen MT, Jensen JB and Svalastoga E (2007). Relationship between bone strength and dual-energy X-ray absorptiometry measurements in pigs. *J. Anim. Sci.* **85**(3): 667-72.

Oklund SA, Prolo DJ and Gutierrez RV (1981). The significance of yellow bone. Evidence for tetracycline in adult and human. *JAMA* **246**: 761-763.

Olfert ED, Cross BM and McWilliam AA (1993). *The care and use of experimental animals, vol. 1*. Ottawa, ON, Canadian council on animal care.

Perrin-Guyomard A, Cottin S, Corpet DE, Boisseau J and Poul JM (2001). Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **34**(2): 125-36.

Piert M, Zittel TT, Jahn M, Stahlschmidt A, Becker GA and Machulla HJ (2003). Increased sensitivity in detection of a porcine high-turnover osteopenia after total gastrectomy by dynamic ¹⁸F-fluoride ion PET and quantitative CT. *J. Nucl. Med.* **44**(1): 117-24.

Prescott JF (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food. *Can. Vet. J.* **38**(December): 763-766.

Richmond RJ and Berg RT (1972). Bone growth and distribution in swine as influenced by liveweight, breed, sex, and ration. *Can. J. Anim. Sci.* **52**: 47-56.

Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM and Ramamurthy NS (1994). Modulation of bone resorption by tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**: 165-180.

Sasaki T, Ramamurthy NS and Golub LM (1994). Bone cells and matrix bind chemically modified non-microbial tetracycline. *Bone* **15**(3): 373-375.

Segalès J, Allan GM and Domingo M (2006). Porcine circovirus diseases. In: *Diseases of swine, 9th edition*. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire and D. J. Taylor. Ames, IA: Blackwell publishing. p 299-308.

Shea JE and Miller SC (2005). Skeletal function and structure: implication for tissue-targeted therapeutics *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 945-957.

Steiger P, Block JE, Steiger S, Heuck A, Frielander A, Ettinger B, Harris ST, Glüer C-C and Genant HK (1990). Spinal bone mineral density measured with quantitative CT: effect of region of interest, vertebral level, and technique. *Radiology* **175**: 537-543.

Stepensky D, Kleinberg L and Hoffman A (2003). Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **42**(10): 863-881.

Tsutsumi H, Katagiri K, Takeda S, Nasu T, Igarashi S, Tanigawa M and Mamba K (2004). Standardized data and relationship between bone growth and bone metabolism in female Gottingen minipigs. *Exp. Anim.* **53**(4): 331-7.

Van Rijn RR, van der Sluis IM, Link TM, Grampp S, Guglielmi G, Imhof H, Glüer C, Adams JE and van Kuijk C (2003). Bone densitometry in children: a critical appraisal. *Eur. Radiol.* 13: 700-710.

Vaughan J (1981a). Bone as a tissue. In: *The physiology of bone, third edition.* London: Oxford university press. p 1-26.

Vaughan J (1981b). Cellular elements of the skeleton. In: *The physiology of bone, third edition.* London: Oxford university press. p 27-55.

Weinberg ED (1957). The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations. *Bacteriol. Rev.* 21(1): 46-68.

Yu CY, Lin RM, Tsai KH and Chang GL (1995). Fat in the prediction of bone strength of porcine lumbar vertebrae by quantitative computed tomography. *J. Formos. Med. Assoc.* 94(7): 418-22.

Zhang J and Yu KF (1998). What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. *JAMA* 280(19): 1690-1.

3.2. Dietary chlortetracycline induces differential effects on the accuracy of qCT and DXA at monitoring the vertebral bone mineral density in growing pigs.

Martin Guillot ^a, Kate Alexander ^b, Candido Pomar ^c, Jérôme R.E. del Castillo ^a

^a Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ), Groupe de recherche en maladie infectieuse du porc (GREMIP), Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), Department of Veterinary Biomedical Sciences, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6;

^b Department of Clinical Sciences, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. C.P. 5000 Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6;

^c Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Québec, Canada, J1M 1Z3

3.2.1. Abstract

We studied in growing pigs the effects of exposure to dietary chlortetracycline (CTC) on the bone mineral density (BMD) assessment with quantitative computed tomography (qCT) and dual energy X-ray absorptiometry (DXA). Pigs were given drug-free (n=48) or 800 ppm CTC-fortified diets for 56-d, starting either at 28 or 84-d old (n=16 pigs/group). At day 28, 8 control pigs were picked for qCT and DEXA, and dissection of the second lumbar vertebrae. Eight controls and treated pigs were picked at day 84 and 140, and 6 pigs of each group at day 168. Several CTC-exposure variables had significant effects ($p < 0.05$) on the relationships between qCT-BMD and trabecular BMD and vertebral body BMD (R^2 increments of 0.03 and 0.01, respectively), DXA-BMD and trabecular and vertebral body BMD (R^2 increments of 0.40 and 0.10, respectively). This study demonstrates that qCT is more reliable than DXA at monitoring tetracycline-induced changes in BMD.

3.2.2. Key words

Bone mineral density; pigs; dual energy X-ray absorptiometry; quantitative computed tomography; tetracyclines.

3.2.3. Introduction

Osseous accumulation of tetracyclines (TC) via chelation with the calcium ions in new bone has long been known (Milch et al., 1957, 1958), and is a feature shared by all molecules of this family of drugs (Jin et al., 2007). Tetracyclines are removed during bone resorption by uncoupling of TC-cations (Klein and Jackman, 1976). Moreover, TC decrease bone resorption by several mechanisms, such as inducing apoptosis in osteoclasts, inhibiting osteoclast maturation, and inhibiting several bone matrix metalloproteinases (Rifkin et al., 1994). Tetracyclines also induce bone formation by stimulating osteoblasts (Bain et al., 1997).

Quantitative computed tomography (qCT) and dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) can assess BMD non-invasively (Ebbesen et al., 1998). As its turnover rate is higher than that of cortical bone (Vaughan, 1981), trabecular bone is more sensitive to changes in bone metabolism (Li et al., 1999). Quantitative CT discriminates cortical and trabecular bone, and can separately estimate their volumetric BMD (Cann, 1988). In contrast, DXA, a two-dimensional projection technique, estimates the area BMD of combined cortical and trabecular bone (Watts, 2004). Although qCT is considered the technical gold standard, DXA is more popular because of its simplicity (Bergot et al., 2001). Pigs have been used, both as model for humans (Koo et al., 1995) and as the target species, to assess bone strength (Nielsen et al., 2007), bone mineral content (Mitchell et al., 2001), or body composition (Koo et al., 2002).

We hypothesized that the use of TC-fortified diets in growing pigs modifies their BMD. This specific point is developed in a separate paper. The objectives of this preliminary study were to compare the effects of TC on the ability of qCT and DXA for assessment of BMD in lumbar vertebra of growing pigs. The best method could be used in growing pigs to investigate non-invasively the effect of TC on BMD. It was expected that qCT would be more accurate than DXA in assessing BMD. Chlortetracycline (CTC) was used as model for TC.

3.2.4. Materials and methods

The experimental protocol was developed according to a recommended code of practice and the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Olfert et al. 1993) and approved by the Agriculture and Agri-Food Canada bioethics committee.

3.2.4.1. Experimental design

A total of 112 weaned castrated crossbred male piglets with no previous exposure to TC were used. Pigs entered the research facility (Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Qc) at a mean age of 26.6 d (SD = 2.8).

Feeds and water were supplied *ad libitum* during the whole study. Four basic diets were used: nursery-1 (28 to 42-d of age), nursery-2 (42 to 56-d of age), growing (56 to 140-d of age); and finishing (140 to 168-wk of age). Control pigs (n=48) were fed the above mentioned drug-free diets during the whole experiment. Medicated pigs were fed the same diets, but fortified with 800 ppm of CTC hydrochloride (Aureomycin[®] 220 G Premix, Alpharma Canada Corporation, Mississauga, ON).

Dietary CTC was given starting either at 28 or 84-d of age, and for either a 28 or 56-d duration (n=16 pigs/group). On the first experiment day, 40 of the 112 piglets were randomly selected: 8 of them were used for the first checkpoint (D28), and the other 32 started the course of dietary CTC. Afterwards, pigs were randomly picked every 28 days, i.e. the times of the other checkpoints (coded D56, D84, D112, D140, and D168). At D56, 8 control pigs and 8 medicated pigs were evaluated, 8 medicated pigs were switched back to the drug-free diet until D168, and the other 16 were left on the medicated diet for another 28 days. At D84, 8 control pigs and 8 medicated pigs were evaluated, 8 medicated pigs were switched to the drug-free diet until D168. Simultaneously, another 32 control pigs were randomly selected to start their course of dietary CTC. The same sampling strategy was applied at D112 and D140. At D168, 6 pigs from each medicated and control groups were randomly selected for the final checkpoint (Fig. 1).

All pigs were weighed immediately before each dietary change and at each checkpoint. Pigs selected for the checkpoints were sedated with intramuscular azaperone

(2-4 mg/kg; Stresnil injection, Merial Canada Inc.), then euthanized with intravenous sodium pentobarbital (> 4 mg/kg; Euthanyl[®], Bimeda-MTC Animal Health Inc.).

3.2.4.2. Lumbar BMD estimation by DXA

DXA examination was made on all pigs selected for checkpoints D84, D140 and D168, upon euthanasia but before dissection. Lateral projection lumbar spine DXA was performed with a Lunar DPX-alpha bone densitometer (DEXA GE Lunar, GE Healthcare Canada), using a pencil-shaped X-ray beam and a single detector. At D28, scans were performed in paediatric resolution mode with the X-ray tube set at 76 and 140 kVp, and 0.3 mA. All the others were performed in adult slow resolution mode with the X-ray tube set at 76 and 140 kVp, and 0.75 mA.

BMD of L1 and L2 were estimated using bone densitometer software (version 4.7, DEXA GE Lunar, GE Healthcare Canada) on a rectangular region of interest (ROI), manually placed in the mid-portion of each vertebral body projection. Vertebral end plates and transverse processes, predominately made of cortical bone, were thereby avoided.

3.2.4.3. Lumbar BMD estimation by qCT

After the DXA scan, carcasses were stored overnight at 4°C, in dorsal recumbency on wooden troughs to ensure vertebral column alignment. The next day, they were sent to the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire of the Université de Montréal, where qCT scans of the lumbar vertebrae were performed. Animals were scanned in dorsal recumbency, overlying a calibration phantom (Model 3 CT Calibration Phantom, Mindways Software, Inc.) parallel to the pig's longitudinal axis. The CT scan (CT Hi speed ZX/i, GE Healthcare Canada) settings were as follows: 120 kVp and 100 mA, helical mode, pitch of 1, tube rotation time of 1 s, 1 mm slice thickness. Images were reconstructed using a 40 cm field of view, 512×512 pixel matrix, and bone algorithm.

After study completion, the trabecular BMD of all L1 and L2 were estimated in random order with the evaluator blinded to the animal's group assignment. Using BMD analytical software (QCT PRO[™] Bone Investigational Toolkit, version 2.1, Mindways Software Inc.), 3-dimensional analysis was performed on a user-defined cylindrical ROI,

centred in the vertebral body, as described elsewhere (M. Guillot et al, unpublished data).

3.2.4.4. Lumbar vertebra preparation for physical BMD determination

After imaging procedures, L1 and L2 were dissected, cleaned in a water bath at 100°C for 5 h and their vertebral bodies were isolated, defatted, dried and degassed. Then, physical whole vertebral body BMD was measured using the Archimedes' principle by weighing them in air and water (Galante et al., 1970). Physical trabecular BMD was then similarly measured on a rod-shaped trabecular bone sample cut from the centre of each vertebral body, parallel to the long axis, using a diamond-coated coring blade (Diamond holesaw, Exchange A Blade, Delta, BC) with a 16 mm inner diameter. Physical BMD was used as reference for studying the imaging estimated BMD.

In the present study, we present only results from L2 of D28 pigs and pigs treated for 56 d and their respective controls (D84, D140 and D168). The other results are presented in a separate paper.

3.2.4.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SAS system for Windows, 9.2 release. Multiple linear regression was used to assess the ability of qCT-BMD and of DXA-BMD to predict the vertebral body and trabecular BMD (Kutner et al. 2004). In addition, the regression models tested the following variables to assess their effects on the estimated-to-measured BMD relationships: body weight, pig age, age at the treatment onset, treatment duration, withdrawal time, and feed efficiency. These analyses were performed with stepwise-forward procedures, using a threshold of $p = 0.15$ for entry and $p = 0.20$ for maintenance of the variables in the model, and with backward procedures with a threshold of $p = 0.10$ for variable maintenance in the model. The relevance of variable transformations and of dual interactions was tested. A thorough residue analysis was performed for each model. Final model was selected by optimizing the scatter of residues over the regression line, coefficient of determination (R^2), and Mallows' C_p criterion.

The accuracies of qCT and DXA were assessed by comparing the values of the Akaike information criterion (AIC; (Akaike 1974) associated with their respective linear

regression models of physically-measured BMD. The smaller the AIC value, the more accurate the regression model is.

The instrument precision of qCT and DXA was assessed in terms of coefficient of variation, based on four separate analyses performed on 3 randomly-selected pigs at D28, D84 and D140. To evaluate the operator's short-term precision in terms of coefficient of variation, BMD analyses were repeated at 1 week and 1 month, for all qCT and DXA scans.

3.2.5. Results

An outbreak of intestinal salmonellosis occurred between D140 and D168. Clinically affected pigs were excluded from the experiment. To comply with biosafety regulations, the lumbar region of the D140 and D168 cadavers was resected, placed in hermetic bags, and chemically sterilized before *ex vivo* qCT examination, as described above.

At D168, the size of most pigs obstructed the movement of the X-ray tube of the DXA, requiring removal of the lumbar region while preserving the surrounding soft tissues. *Ex vivo* DXA examination was performed as described above, except that adult medium resolution mode was used.

Ten DXA scans where the vertebral end plates or the transverse apophysis, or both, overlapped with ROI were excluded.

The AIC values of the regression models for the prediction of trabecular BMD were -322.5 with qCT-BMD and -250.6 with DXA-BMD. Those for predicting vertebral body BMD were -342.1 with qCT-BMD and -290.5 with DXA-BMD.

The R^2 increments associated with CTC exposure were higher for the models involving DXA with respect to those involving qCT (Table 1). The measured BMD increased linearly with qCT-BMD but non-linearly with DXA-BMD (Figure 1).

The coefficients of variation for qCT-BMD and DXA-BMD instrument precision were both 1.8%. The coefficients of variation for qCT and DXA short-term operator precision were 1.5 % and 5.7 %, respectively.

Table 1. Predictors and intercepts retained in the final linear regression models of estimated bone mineral density (BMD) for the second lumbar vertebra.^a

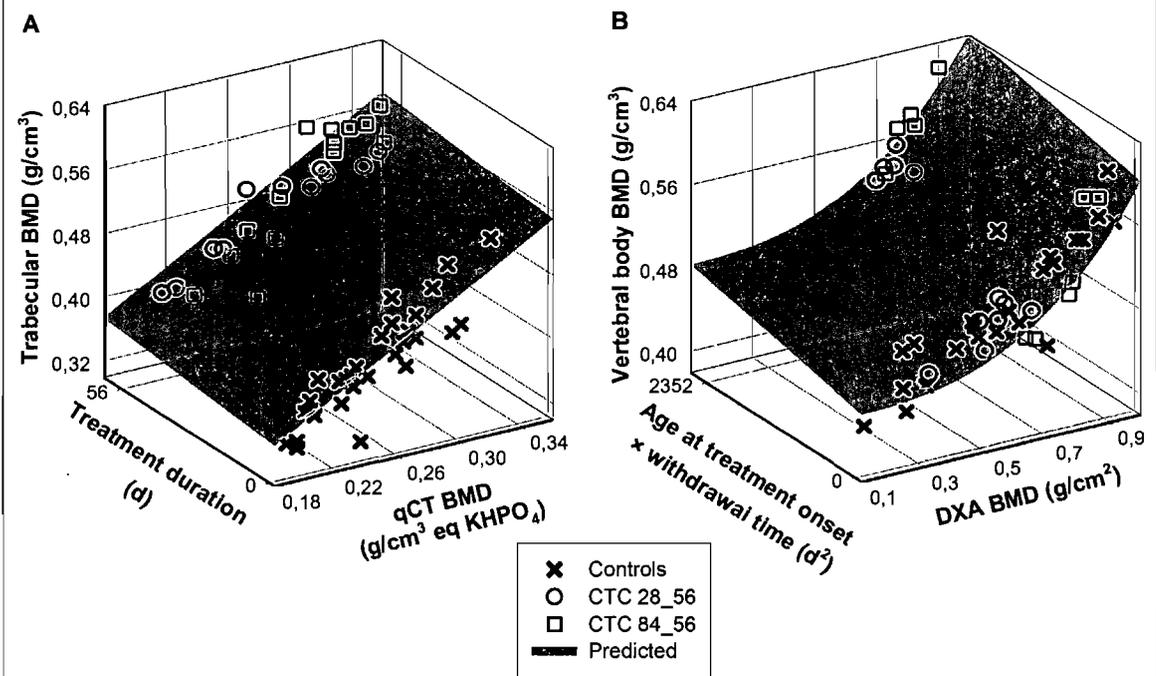
Dependent variable	Predictor	Estimate	SE	p-value	c. R ²
Trabecular BMD (g/cm ³ ; model involving qCT)	Intercept	0.149	0.032	< 0.0001	-
	qCT-BMD (eq K ₂ PO ₄ g/cm ³)	1.118	0.121	< 0.0001	0.71
	Treatment duration (d)	3.7 × 10 ⁻⁴	1.8 × 10 ⁻⁴	0.0417	0.74
Trabecular BMD (g/cm ³ ; model involving DXA)	Intercept	0.368	0.016	< 0.0001	-
	Age at the treatment onset × withdrawal time (d ²)	3.1 × 10 ⁻⁵	5.6 × 10 ⁻⁶	< 0.0001	0.40
	Square DXA-BMD ([g/cm ²] ²)	0.154	0.031	< 0.0001	0.64
Vertebral body BMD (g/cm ³ ; model involving qCT)	Intercept	0.012	0.117	0.9183	-
	qCT-BMD (eq K ₂ PO ₄ g/cm ³)	1.143	0.127	< 0.0001	0.72
	BW (kg)	0.009	0.004	0.0390	0.73
	Squared age at the treatment onset (d ²)	1.6 × 10 ⁻⁵	5.9 × 10 ⁻⁶	0.0103	0.74
	Age at the treatment onset (d)	-1.3 × 10 ⁻³	5.2 × 10 ⁻⁴	0.0140	0.75
	Cubic BW (kg ³)	4.1 × 10 ⁻⁷	1.7 × 10 ⁻⁷	0.0195	0.76
	Squared BW (kg ²)	-1.1 × 10 ⁻⁴	4.8 × 10 ⁻⁵	0.0252	0.79
Vertebral body BMD (g/cm ³ ; model involving DXA)	Intercept	0.445	0.012	< 0.0001	-
	Cubic DXA-BMD ([g/cm ²] ³)	0.160	0.023	< 0.0001	0.55
	Age at the treatment onset × withdrawal time (d ²)	1.5 × 10 ⁻⁵	4.4 × 10 ⁻⁶	0.0020	0.65

^a SE = standard error; c. R² = cumulative coefficient of determination; BW = body weight.

3.2.6. Discussion

Based on linear regression analysis and AIC values, both trabecular and vertebral body BMD were more accurately predicted by our qCT than by our DXA technique. The DXA assessment of trabecular BMD was poor, which is expected from the type of data generated with this technique. Indeed, DXA-BMD estimation results from an undifferentiated measurement of cortical and trabecular bone (Watts, 2004), whereas qCT-BMD measurements are restricted to the trabecular bone (Cann, 1988).

Figure 1. Relationships between physically-measured BMD of the second lumbar vertebra of pigs and imaging-estimated BMD, plus linear regression trends.



A: Trabecular BMD as a function of qCT-BMD and treatment duration; B: Vertebral body BMD as a function of DXA-BMD and interaction of the age at treatment onset and withdrawal time; BMD = bone mineral density; CTC 28_56 = pigs medicated for 56 d since 28 d of age; CTC 84_56 = pigs medicated for 56 d since 84 d of age.

Bone is a heterogeneous tissue; therefore some measurement error occurs when BMD is determined with imaging techniques, because the BMD of the ROI must be extrapolated to the surrounding bone tissues. With DXA, variable bone positioning adds to this error in BMD measurement (Steiger et al., 1990; Watts, 2004), especially in whole animals where positioning is more difficult than in bone specimens.

The relationships between the physically-measured BMD and qCT-BMD were linear, with a coefficient slightly over 1 suggesting an underestimation of the true BMD. This likely is related to fat and protein content in the bone marrow within the ROI (Cann, 1988). But, those involving DXA-BMD were curvilinear, which may be related to the increase in physically-measured BMD that is partly associated with pig growth (M. Guillot et al., unpublished data). In this case, the curvilinear relationships may result from increasing interference of bone size on DXA-BMD estimation. DXA-BMD of a ROI is the ratio of the estimated bone mineral content to the measured projected area of the region (Watts, 2004). For 2 bones of identical BMD, the larger one will be underestimated by DXA (Leonard et al., 2004).

Tetracyclines induce an increase in trabecular BMD, related to their metabolic effect in newly formed bone (M. Guillot et al., unpublished data). The inaccuracy of qCT at estimating the BMD of TC-exposed pigs may result from heterogeneous accumulation of drug in the trabecular bone, which would lead to variation of drug effect in this tissue. Hence the BMD estimated from the ROI may not be perfectly representative of the whole trabecular bone (Steiger et al., 1990), even if the largest possible ROI is drawn.

The effect of the CTC treatment on the ability of imaging techniques to predict the trabecular BMD was higher for DXA than qCT, as indicated by the increase in

cumulative R^2 associated with the addition of CTC-exposure variables. The positive interaction of age at the treatment onset and withdrawal time indicates that the discrepancy between DXA-BMD and physically-measured BMD increased after the end of TC exposure, resulting in a biased estimation of DXA-BMD for treated pigs at D168. This is consistent with the inability of DXA to detect an increase of BMD in a growing bone, in particular if it is subject to the anabolic effects of TC.

The inclusion of a third-order polynomial of body weight in the qCT model is related to the cortical BMD increase during bone growth (Heaney et al., 2000). The inclusion of a second-order polynomial of treatment duration results in a TC effect on the bone surrounding the ROI for BMD assessment. Specifically, this bone includes the vertebral end-plates and the sub-cortical bone, in which increased bone modelling allows TC to persist (Milch et al., 1957), with a subsequent increase in overall physical BMD without a concurrent increase in trabecular qCT-BMD (M. Guillot et al., unpublished data). This apparent TC-induced increase in cortical BMD is also evidenced by the greater accuracy of DXA-BMD in assessing vertebral body BMD compared to trabecular BMD. Nonetheless, the DXA estimation of vertebral body BMD is biased, which could be related both to the exclusion of vertebral end plates in DXA measurements and the anabolic effect of TC.

The instrument precision of qCT and DXA resembled those previously reported (Yuh et al., 1994; Bergot et al., 2001). Operator precision was better with qCT than with DXA, which reflects the difficulty in positioning the pigs in lateral recumbency and is consistent with previous studies (Finkelstein et al., 1994; Watts, 2004). As expected, the computer-assisted 3-dimensional ROI used with qCT improved measurement precision (Lang and Duryea, 2003).

In vivo imaging was not attempted, as we wished to avoid the negative impacts of stress induced by multiple anaesthesias and transportation between the two imaging facilities. The protocol modifications required for biosafety reasons had no apparent impact, as the scan region remained unchanged, and the relationship between the physically-measured BMD and imaging BMD was not affected in the involved pigs.

3.2.7. Conclusions

As expected, qCT was more accurate than DXA at assessing vertebral BMD in growing pigs. In addition, the magnitude of the effect of TC exposure on DXA-BMD estimation was surprisingly high, suggesting that DXA should not be used to monitor TC-induced BMD changes in growing pigs. In contrast, the marginal influence of TC exposure on qCT-BMD assessment suggested that qCT is useful in this context. Hence, qCT may also be a reliable tool for investigating the impact of other osteotropic substances or bone metabolism modulators on BMD in growing pigs.

3.2.8. Acknowledgments

Funding for this study has been provided by Ontario Pork, Fédération des Producteurs de Porcs du Québec, and the Canadian Meat Council. The authors wish also to thank Mr. Dave Bernier, Mr. Keenan Brown and Mrs. Normande Ouellet for their excellent technical assistance, and Dr. Francis Beaudry for its insightful advice.

3.2.9. References

- Akaike H** (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control* **19**(6): 716-723.
- Bain S, Ramamurthy NS, Impeduglia T, Scolman S, Golub LM and Rubin C** (1997). Tetracycline prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats. *Bone* **21**(2): 147-153.
- Bergot C, Laval-Jeantet AM, Hutchinson K, Dautraix I, Caulin F and Genant HK** (2001). A comparison of spinal quantitative computed tomography with dual energy X-ray absorptiometry in European women with vertebral and nonvertebral fractures. *Calcif. Tissue Int.* **68**: 74-82.

- Cann CE** (1988). Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review. *Radiology* **166**: 509-522.
- Ebbesen EN, Thomsen JS, Beck-Nielsen H, Nepper-Rasmussen HJ and Mosekilde L** (1998). Vertebral bone density evaluated by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry and quantitative computed tomography in vitro. *Bone* **23**(3): 283-290.
- Finkelstein JS, Cleary RL, Butler JP, Antonelli RA, Mitlak BH, Deraska DJ, Zamora-Quezada JC and Neer RM** (1994). A comparison of lateral versus anterior-posterior spine Dual Energy X-Ray Absorptiometry for the diagnosis of osteopenia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**: 724-730.
- Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V and Weaver C** (2000). Peak bone mass. *Osteoporos. Int.* **11**(12): 985-1009.
- Jin L, Amaya-Mazo X, Apel ME, Sankisa SS, Johnson E, Zbyszynska MA and Han A** (2007). Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. *Biophys. Chem.* **128**(2-3): 185-96.
- Klein L and Jackman KV** (1976). Assay of bone resorption in vivo with 3H-tetracycline. *Calcif. Tissue Res.* **20**(3): 275-90.
- Koo WWK, Hammami M and Hockman EM** (2002). Use of fan beam Dual X-Ray Absorptiometry to measure body composition in piglets. *J.Nutr.* **132**: 1380-1383.
- Koo WWK, Massom LR and Walters J** (1995). Validation of accuracy and precision of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry for infants. *J. Bone Miner. Res.* **10**: 1111-1115.
- Kutner MH, Nachtsheim CJ, Neter J and Li W** (2004). Multiple linear regression. In: *Applied linear statistical models. Fifth edition.* M. H. Kutner. New York. NY: Mc Graw-Hill Companies, Inc. p 214-508.
- Lang TF and Duryea J** (2003). Peripheral bone mineral assessment of the axial skeleton. In: *Contemporary endocrinology: Osteoporosis: pathophysiology and clinical management.* E. S. Orwoll and M. Blizotes. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. p 83-104.

- Leonard MB, Shults J, Elliott DM, Stallings VA and Zemel BS** (2004). Interpretation of whole body Dual Energy X-Ray Absorptiometry measures in children: comparison with peripheral quantitative computed tomography. *Bone* **34**(6): 1044-1052.
- Li M, Liang H, Shen Y and Wronski TJ** (1999). Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats. *Bone* **24**(2): 95-100.
- Milch RA, Rall DP and Tobie JE** (1957). Bone localisation of the tetracyclines. *J. Natl. Cancer Inst.* **19**: 87-91.
- Milch RA, Rall DP and Tobie JE** (1958). Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* **40A**(4): 897-910.
- Mitchell AD, Scholz AM and Pursel VG** (2001). Total body and regional measurements of bone mineral content and bone mineral density in pigs by dual energy X-ray absorptiometry. *J. Anim. Sci.* **79**(10): 2594-604.
- Nielsen DH, McEvoy FJ, Madsen MT, Jensen JB and Svalastoga E** (2007). Relationship between bone strength and dual-energy X-ray absorptiometry measurements in pigs. *J. Anim. Sci.* **85**(3): 667-72.
- Olfert ED, Cross BM and McWilliam AA** (1993). *The care and use of experimental animals, vol. 1*. Ottawa, ON, Canadian council on animal care.
- Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM and Ramamurthy NS** (1994). Modulation of bone resorption by tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**: 165-180.
- Steiger P, Block JE, Steiger S, Heuck A, Frielander A, Ettinger B, Harris ST, Glüer C-C and Genant HK** (1990). Spinal bone mineral density measured with quantitative CT: effect of region of interest, vertebral level, and technique. *Radiology* **175**: 537-543.
- Vaughan J** (1981a). Bone as a tissue. In: *The physiology of bone, third edition*. London: Oxford university press. p 1-26.
- Watts NB** (2004). Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA). *Osteoporosis International* **15**: 847-854.
- Yuh I, Yamamoto I, Shigei M, Ohnaka Y, Tadaka M and Morita R** (1994). Vertebral bone mineral measurement: a comparative study between

quantitative computed tomography and Dual X-Ray Absortometry. *J. Bone Miner. Res.* **12**(1): 27-31.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette étude avait pour objectif d'étudier les déterminants du risque de décoloration osseuse secondaire à l'exposition chronique aux tétracyclines chez le porc en croissance. Les effets de ce traitement sur la DMO ont aussi été étudiés. Enfin, les performances de deux techniques courantes d'ostéodensitométrie centrale (qCT et DEXA) ont été évaluées dans ce contexte.

4.1. Choix d'une approche expérimentale

Plusieurs approches sont envisageables pour étudier les facteurs qui influent sur les modifications de l'os de porc induites par l'administration de CTC et de caractériser ces modifications. La première consiste à utiliser une approche épidémiologique, soit avec des prélèvements aléatoires dans les abattoirs des os de porcs, soit avec des élevages porcins choisis aléatoirement. Selon la méthode d'échantillonnage, trois types d'études sont différenciées : transversales (échantillonnage sans regard de l'exposition et de la maladie), cohortes (échantillonnage basé sur l'exposition), et cas-contrôles (échantillonnage en fonction de la maladie) (Martin et al. 1987). Dans tous les cas, des critères d'inclusion et d'exclusion doivent être appliqués à l'étude. L'avantage majeur d'une étude épidémiologique est de pouvoir mettre en évidence des facteurs confondants. Cependant, le choix des critères d'analyse peut biaiser les résultats (Martin et al. 1987). De plus, dans ces approches, seul le statut final des animaux est connu, ce qui rend la compréhension du processus physio-pathologique impliqué délicate. Enfin, l'ensemble des analyses sur l'os est effectué de manière *in vitro* sur les prélèvements effectués au cours de l'étude.

Nous avons donc choisi d'utiliser un élevage expérimental pour se rapprocher des conditions réelles; tout en contrôlant les facteurs de variabilité liés à la conduite d'élevage et à l'administration des antibiotiques. Notre approche consistait à exposer les animaux d'un élevage porcine expérimental à un seul antibiotique via l'aliment de manière, et ce de manière aléatoire. Le risque principal de cette méthode était de ne pas observer la décoloration osseuse induite par les tétracyclines (si le modèle n'inclut pas les facteurs de risques adéquats). Il était aussi important de respecter autant que possible

les conditions conventionnelles d'élevage pour que l'inférence des résultats obtenus sur la population ciblée soit envisageable. Cet environnement permettait aussi de tester des modèles *in vivo* d'analyse de la DMO chez le porc par imagerie (qCT et DEXA). Les porcs en post-sevrages sont la population la plus à risque pour les infections respiratoires et pour laquelle les tétracyclines sont le plus utilisées. La pratique la plus répandue dans cette période est l'apport d'une alimentation complétementée en CTC de 400 à 1100 ppm (Muirhead and Alexander 1997). C'est pourquoi nous avons choisi une complémentation de l'aliment des groupes traités à une dose de 800 ppm de chlorhydrate de CTC.

4.2. Décoloration osseuse induite par les tétracyclines

Les tétracyclines décolorent l'os de manière réversible et l'intensité de décoloration dépend du schéma thérapeutique. Le risque de décoloration est plus élevé lorsque la durée du traitement ou l'âge au début de l'administration augmentent. Ces conclusions sont cohérentes avec le fait que la coloration est secondaire à la chélation des ions calcium de l'os néoformé et avec une excréation des tétracyclines lors de la résorption osseuse (cf 3.1.6.).

Il subsiste une interrogation liée à la concentration des tétracyclines dans l'os. L'augmentation de l'intensité de décoloration avec la durée du traitement suggère que la concentration des molécules de CTC dans l'os augmente, mais nous ne disposons pas d'une technique validée de dosage pour le faire. Le dosage de cette molécule est validée dans le sang, le lait et différents tissus de l'organisme (De Ruyck et al. 1999; Samanidou et al. 2005; 2007). Mais le dosage dans l'os reste difficile. En particulier à cause de la propriété des tétracyclines à former des chélates ce qui rend leur extraction difficile et irrégulière selon les techniques utilisées (Korner et al. 2001). Pour obtenir un dosage exact il faudrait s'assurer d'une libération de toutes les molécules fixées sans les altérer chimiquement ce qui n'est pas obtenu de manière satisfaisante pour l'instant (Korner et al. 2001). De plus le traitement à la chaleur effectué pour obtenir une dissection satisfaisante des vertèbres pour le reste de notre étude a probablement diminué la quantité dosable de CTC dans l'os compte tenu de son instabilité supposée au traitement thermique (Kuhne et al. 2001).

L'autre outil utilisé dans certaines études est la quantification de la fluorescence secondaire à la présence de la CTC dans l'os (Kühne et al. 2000; Korner et al. 2001). Mais l'estimation de la concentration des tétracyclines dans l'os par cette technique nécessite aussi l'existence d'un dosage performant de ces antibiotiques dans l'os. Elle n'était donc pas être une méthode de remplacement.

La connaissance de la pharmacocinétique de la CTC dans l'os permettrait aussi de prévoir l'évolution des concentrations de la molécule dans ce tissu. Malheureusement, peu d'études ont étudiés la pharmacocinétique des tétracyclines dans l'os et aucune ne propose un modèle satisfaisant. Ces études avaient en fait pour objectif de suivre et de quantifier la résorption osseuse et non pas de décrire la pharmacocinétique des tétracyclines (Li et al. 1989; DeMoss and Wright 1997). Elles ont utilisé les tétracyclines comme marqueur de la résorption osseuse mais sans tenir compte que les tétracyclines inhibent cette résorption. Ainsi, ni la phase d'accumulation des tétracyclines dans l'os ne pouvait être correctement suivi puisque leur protocole n'était pas conçu pour cela, ni la phase d'élimination puisque leurs hypothèses de départ étaient inexactes.

Par contre, ces mêmes études (Li et al. 1989; DeMoss and Wright 1997) ont utilisé des tétracyclines marquées au tritium. Cette technique, en acceptant le postulat que le tritium reste fixé aux molécules de tétracyclines, est intéressante pour palier aux problèmes de dosage dans l'os puisqu'elle permet un dosage indirect des molécules marquées par une quantification de la radioactivité émise. Elle permet aussi un suivi à long terme de la distribution des molécules dans l'organisme de part sa longue demi-vie (environ 12 ans). De plus, cette technique ne permet pas la détection exacte lors de changement rapide du métabolisme osseux, notamment lors de la croissance (DeMoss and Wright 1997). Enfin, la radioactivité émise contraint l'utilisation de cette technique à des centres de recherche adéquatement équipés et oblige le traitement des déchets, dont l'urine. Par contre, l'utilisation des tétracyclines tritiées n'est pas adaptée à des animaux atteints d'un mal-fonctionnement rénal puisque le produit est éliminé dans l'urine. Elle oblige aussi le sacrifice des animaux de par la longue persistance de cette radioactivité.

4.3. Conséquences et suivi des effets des tétracyclines sur le métabolisme osseux

Les tétracyclines augmentent la DMO chez les porcs en croissance comme il été anticipé de leur action sur le métabolisme osseux (cf 3.1.6). Cette augmentation est persistante et est induite aussi bien au niveau de l'os trabéculaire que de l'os cortical. Ces effets sont aussi cohérents avec ceux que l'on a démontrés sur la décoloration osseuse puisqu'ils augmentent avec la durée d'administration ou l'âge au début du traitement, seuls ou en interaction. Bien que l'intensité de décoloration été fortement corrélée avec la DMO, cette variable n'a pas pu être incluse dans le modèle de régression linéaire. En effet, les différents modèles de DMO ont été déstabilisés par l'entrée de la variable décoloration. La forte colinéarité de l'intensité de décoloration avec les autres variables du traitement à la CTC pourrait expliquer ce phénomène. L'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux par groupe aurait pu permettre de limiter ce phénomène.

La mesure de la DMO permet d'obtenir une information finale sur le métabolisme osseux résultant du bilan net de l'activité des cellules osseuses pendant une période de temps. Le suivi de l'activité des ostéocytes peut être fait grâce au dosage de différents bio-marqueurs du métabolisme osseux (Annexe I). Ce suivi complémentaire à la densitométrie permet une quantification des deux facettes du métabolisme osseux. La formation osseuse est généralement suivie grâce aux dosages de la phosphatase alcaline spécifique à l'os, l'ostéocalcine et les propeptides du collagène de type I. La résorption osseuse est suivie grâce au dosage de produits de la dégradation du collagène de type I. Les données obtenues reflètent les différents éléments du bilan métabolique dressé par les outils de densitométrie. (Heaney 2003) Une augmentation de densité peut alors être attribuée à une forte production d'os sans changement de la résorption, mais peut aussi être associée à une forte inhibition de la résorption accompagnée d'une légère augmentation de la production. Il aurait été ainsi possible de connaître la part de chacun de ces mécanismes impliqués lors de l'augmentation de DMO induite par les tétracyclines. Il est important de noter que pour qu'une augmentation de DMO soit observée, cela implique une augmentation de la production osseuse associée ou non à une inhibition de la résorption. Une inhibition de la résorption osseuse comme unique

phénomène conduirait à une diminution de la DMO. En effet, le phénomène de résorption osseuse initie celui de production (Rifkin et al. 1994).

La DMO peut être estimée à l'aide de plusieurs techniques d'imagerie. Les techniques de références sont chez l'humain le DEXA et la qCT (cf 1.6.). Seul le DEXA a été validé pour son utilisation chez le porcelet en jeune âge, dans un contexte d'estimation de la composition corporelle (Koo et al. 2002). La variation de la DMO lors de la croissance chez le porc par DEXA a été étudiée (Mitchell et al. 2001). Mais les densités estimées par imagerie n'ont été ni corrélées ni validées par rapport à des mesures physiques des os ciblés. Il était donc nécessaire de s'assurer de la validité de ces techniques chez le porc en croissance. De plus, l'utilisation d'une molécule affectant le métabolisme osseux suscitait la question de son influence éventuelle sur ces techniques d'estimation de la DMO par imagerie. Notre étude a démontrée que la qCT, contrairement au DEXA, est une méthode fiable pour l'estimation de la DMO trabéculaire des vertèbres chez le porc en croissance soumis ou non à la CTC. Cette technique permet aussi de prédire adéquatement dans ce contexte la densité totale du corps vertébral. Par contre, le traitement à la CTC a trop d'impact sur l'estimation de la DMO par notre technique de DEXA (cf 3.2.6.). De plus, l'utilisation du suivi par qCT de nos animaux ont permis de démontrer que l'augmentation de DMO induite par les tétracyclines était détectable par cette méthode (cf 3.1.6.).

L'effet anabolisant des tétracyclines conduirait à une augmentation de la déposition d'os cortical et de la taille des vertèbres. L'impact négatif du traitement sur la capacité du DEXA à estimer de manière exacte la DMO chez les animaux traités est essentiellement relié à la dépendance du DEXA à la géométrie de l'os (Watts 2004). Pour pallier à ce phénomène il serait envisageable de tester une méthode de mesure de la vertèbre dans son ensemble plutôt que dans une ROI restreinte au centre de la projection du corps vertébral. Ainsi, plus d'os cortical serait inclus dans l'estimation. Il a aussi été proposé dans une étude d'évaluer la géométrie de l'os imagé pour calculer une densité volumique (Igarashi and Ezawa 1993), en tenant compte de la densité surfacique estimée en DEXA et de la hauteur moyenne mesurée de l'os. L'estimation ainsi obtenue est mieux corrélée aux mesures physique de l'os que les mesures traditionnelles car elle

n'est plus dépendante du volume de l'os. L'inconvénient de cette dernière technique est qu'il est nécessaire de sacrifier l'animal et de disséquer entièrement l'os imagé.

La qCT apparaît comme la méthode de choix pour étudier de manière non invasive les effets des tétracyclines sur la DMO chez le porc en croissance. Les études ultérieures concernant les effets des tétracyclines sur la DMO, comme l'utilisation de différentes doses de complémentation de la nourriture, pourront être menées sans sacrifice d'animaux. De manière plus générale, cet outil pourra être utilisé pour la mesure de la DMO de manière non invasive chez le porc en croissance pour l'étude de l'action de différentes substances ostéotropes ou de modificateurs du métabolisme osseux. Il reste cependant à évaluer l'impact d'anesthésies à répétitions sur l'évolution de la DMO sur un animal en croissance. L'utilisation de l'imagerie permettra d'effectuer des mesures répétées sur un même animal et de diminuer le nombre d'animaux sacrifiés.

4.4. Déterminants de la DMO et limitations

Nous avons mis en évidence que la DMO est en partie déterminée par l'âge et le poids des animaux (cf 3.1.5.2). La DMO trabéculaire chez nos animaux, augmente quadratiquement avec l'âge. Cette observation est cohérente avec ce qui est décrit chez le porc miniature et l'enfant où la DMO trabéculaire augmente continuellement avec l'âge jusqu'à atteindre un maximum de vitesse d'augmentation à la puberté pour croître ensuite plus lentement et atteindre une valeur maximale de DMO au début de l'âge adulte. (Bonjour et al. 1991a; Heaney et al. 2000; Inui et al. 2004). Compte tenu de la limitation de notre projet à des porcs charcutiers il est normal que le pic de DMO n'ait pas été observé. Par contre, l'augmentation de la DMO du corps vertébrale est plutôt reliée à l'augmentation du poids, ce qui rejoint les résultats des études décrivant la croissance chez le porc. (Richmond and Berg 1972)

D'autres déterminants importants de la DMO ont été mis en évidence tels que le niveau d'activité, l'âge, le sexe, la génétique et l'alimentation. L'os adapte sa DMO en fonction des informations mécaniques qu'il reçoit. Ainsi, un niveau d'activité modéré à tendance à augmenter la DMO, en particulier au niveau de l'os cortical et sous-cortical. (Eckstein et al. 1997; Hoogbergen et al. 2002; Hagihara et al. 2005) Par contre une activité trop intense à tendance à diminuer la DMO trabéculaire, l'os ainsi fragilisé est

alors plus objet aux micro-fractures. (Eckstein et al. 1997; Cornelissen et al. 1999; Boyde 2003) La baisse d'activité physique, ainsi que la diminution de la masse musculaire pourrait induire une diminution de la DMO. (Proctor et al. 2000) Les hommes et les femmes ne présentent pas la même évolution de DMO en fonction de l'âge. Enfants ils présentent une DMO similaire, puis pendant la puberté, les femmes présentent une DMO plus grande que les hommes. (Bonjour et al. 1991b; McCormick et al. 1991; del Rio et al. 1994) Cette situation s'inverse à l'âge adulte après l'atteinte d'une valeur maximale de DMO. La baisse de DMO peut alors devenir problématique chez la femme âgée suite aux changements hormonaux suivant la ménopause et au vieillissement cellulaire. (Eriksen and Langdahl 1997) Des variations similaires avec l'âge sont reportées chez le cochon miniature. (Inui et al. 2004) Les différentes ethnies ne présentent pas non plus les mêmes changements de DMO avec l'âge (McCormick et al. 1991), obligeant aux outils diagnostiques d'intégrer cette différence pour permettre une bonne inférence. (Lang and Duryea 2003) Enfin les différences dans l'alimentation peuvent induire des différences notables de DMO, comme il a été démontré chez les porcs charcutiers. (Shaw et al. 2006) Il a aussi été reporté qu'un niveau adéquat de calcium dans l'alimentation par rapport au besoin permet d'augmenter la DMO, alors qu'un déséquilibre induit une diminution. (Fujita et al. 1991; Maier et al. 1997)

Compte tenu des nombreux facteurs qui influent sur la DMO, il est important de contrôler l'environnement, les animaux et l'alimentation des études de densitométrie osseuse. Cela implique que les inférences de telles études sont aussi limitées au même type de population dans le même type d'environnement que ceux étudiés. Il apparaît aussi que certains facteurs tel le niveau d'activité sont difficiles à contrôler. L'utilisation de puces d'accélérométrie peut permettre d'obtenir des informations sur l'activité des animaux. Mais le coût élevé du matériel et le temps d'analyse sont des facteurs dissuasifs d'une utilisation courante de cette pratique.

La DMO est aussi déterminée par la manière dont elle est mesurée ou estimée. Il est important de bien définir quelle partie de l'os est sujet à la mesure : trabéculaire, cortical, ou total. Aussi, l'os est un matériel poreux possédant une microstructure complexe, ce qui rend la mesure de sa densité difficile. (Galante et al. 1970) La DMO, quelle que soit la région osseuse ciblée, est toujours relative au poids d'os par unité de

volume. Mais la DMO varie particulièrement en fonction de ce qui est défini comme volume réelle du réseau osseux. Selon les méthodes d'évaluation (et le domaine de recherche), la définition du volume minéral osseux varie, ce qui induit une variation de la DMO mesurée. (Zou et al. 1997; Aspden and Li 1998) Il est donc important de définir la méthode physique de mesure pour savoir ce qui a réellement été mesuré. La comparaison entre des études utilisant des méthodes d'analyse différentes est donc difficile. Il est aussi important de toujours utiliser dans les études de densitométrie osseuse une population contrôle à laquelle se référer. La même problématique est présente lors de l'estimation de la DMO par imagerie. Il faut bien définir quelle région osseuse est estimée. Il faut aussi intégrer le fait que les estimations sont effectuées à l'aide de fantôme de calibration. (Fujii et al. 1988; Cann 1989; Cann 1999) Les mesures obtenues ne sont donc pas comparables directement d'une étude à une autre, ce qui oblige l'utilisation d'une population contrôle. (Engelke and Glüer 2006) Dans le cas où des valeurs de références d'une population sont connues, les études subséquentes doivent être effectuées avec le même appareil et la même technique. Les biais liés aux erreurs de chaque technique de densitométrie par imagerie doivent aussi être prise en compte dans l'interprétation de données estimées (cf 1.6.4 et 1.7.3).

5. CONCLUSION

Nos principales hypothèses ont été vérifiées. Chez le porc en croissance, les tétracyclines induisent sur l'os une décoloration verdâtre réversible, dont l'intensité augmente avec la durée d'administration et l'âge au début du traitement. Les tétracyclines induisent aussi une augmentation de la DMO elle aussi dépendante du schéma thérapeutique. La qCT est la technique qui permet d'estimer adéquatement la DMO chez les porcs en croissance exposés chroniquement aux tétracyclines. Elle permet de plus de détecter et de suivre l'augmentation de DMO induite par les tétracyclines de manière similaire aux mesures de densité physique.

Compte tenu des risques de décoloration osseuse démontrés dans cette étude, nous conseillons aux éleveurs de ne pas traiter leurs porcs avec un aliment complétement en CTC pendant plus de 4 semaines. L'âge d'administration ne devrait pas être supérieur à 16 semaines pour permettre à la décoloration de s'estomper. Ainsi les carcasses seront préservées d'une dépréciation physique, ainsi que d'un risque élevé de résidus d'antibiotique. Résidus qui posent de nombreux problèmes de santé publique reliés au développement de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.

Le principal défi à relever ensuite sera de pouvoir estimer avec exactitude la concentration de CTC dans l'os. Ces données pourront alors être confrontées à l'intensité de décoloration et aux mesures de DMO. Une relation positive entre l'intensité de décoloration et la concentration de CTC dans l'os permettrait d'établir une grille d'évaluation à l'abattoir des os de porcs pour détecter facilement les animaux à haut risque de contamination résiduelle provenant de ce tissu. Une relation positive entre la concentration de CTC dans l'os et la DMO permettrait d'envisager de suivre cette molécule de manière non invasive dans ce tissu, ce qui représenterait un modèle d'application de pharmacocinétique non invasive. Le dosage sanguin de la CTC dans les échantillons prélevés lors de cette étude sera une première étape dans l'évaluation de la concentration de cette molécule dans l'os. En effet une modélisation pharmacocinétique à partir de ces échantillons, des paramètres zootechniques de croissance et de la prise alimentaire de nos animaux permettra d'estimer les variations de concentration de CTC dans l'os.

6. REFERENCES

- Acharya, MR, Venitz , J, Figg, D and Sparreboom, A** (2004). Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist. Updat.* **7**: 195-208.
- Akahoshi, S, Sakai, A, Arita, S, Ikeda, S, Morishita, Y, Tsutsumi, H, Ito, M, Shiraishi, A and Nakamura, T** (2005). Modulation of bone turnover by alfacalcidol and/or alendronate does not prevent glucocorticoid-induced osteoporosis in growing minipigs. *J. Bone Miner. Metab.* **23**: 341-350.
- Albert, A and Rees, CW** (1956). Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. *Nature* **177**(4505): 433-4.
- Allen, MJ** (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.* **32**(3): 101-113.
- Aoyagi, M, Sasaki, T, Ramamurthy, NS and Golub, LM** (1996). Tetracycline/Fluibiprofen combination therapy modulates bone remodelling in ovariectomized rats: preliminary observations. *Bone* **19**(6): 629-635.
- Aspden, RM and Li, B** (1998). Reproducibility of techniques using Archimedes' principle in measuring cancellous bone volume by L. Zou, R. D. Bloebaum and K. N. Bachus. *Med Eng Phys* **20**(5): 393-5.
- Baert, K, Croubels, S, Gasthuys, F, De Busser, J and De Backer, P** (2000). Pharmacokinetics and oral bioavailability of a doxycycline formulation (Doxycycline 75 %) in nonfasted young pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **23**: 45-48.
- Benitz, K-F, Roberts, GKS and Yusa, A** (1967). Morphologic effects of minocycline in laboratory animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **11**: 150-170.
- Bergot, C, Laval-Jeantet, AM, Hutchinson, K, Dautraix, I, Caulin, F and Genant, HK** (2001). A comparison of spinal quantitative computed tomography with dual energy X-ray absorptiometry in European women with vertebral and nonvertebral fractures. *Calcif. Tissue Int.* **68**: 74-82.
- Bettany, JT, Peet, NM, Wolowacz, RG, Skerry, TM and Grabowski, PS** (2000). Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. *Bone* **27**(1): 75-80.

- Black, WD and Gentry, RD** (1984). The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. *Can. Vet. J.* **25**: 158-161.
- Bonjour, JP, Theintz, G, Buchs, B, Slosman, D and Rizzoli, R** (1991a). Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**(3): 555-63.
- Bonjour, JP, Theintz, G, Buchs, B, Slosman, D and Rizzoli, R** (1991b). Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* **73**(3): 555-63.
- Boskey, AL** (2002). Connective tissues of the musculoskeletal system. *Textbook of small animal surgery, Slatter, Vol. 2, Third edition.* Philadelphia, Saunders: 1774-1784.
- Bousson, V, Le Bras, A, Roqueplan, F, Kang, Y, Mitton, D, Kolta, S, Bergot, C, Skalli, W, Vicaut, E, Kalender, W, Engelke, K and Laredo, JD** (2006). Volumetric quantitative computed tomography of the proximal femur: relationships linking geometric and densitometric variables to bone strength. Role for compact bone. *Osteoporos. Int.* **17**: 855-864.
- Boyde, A** (2003). The real response of bone to exercise. *J. Anat.* **203**: 173-189.
- Brian, KH** (1992). Historical overview of studies on bone growth and repair. *Bone, Vol. 6 : Bone Growth-A.* BK Hall. Boca Raton, Florida, Library of congress, CRC Press Inc.
- Bushberg, JT, Seibert, JA, Leidholdt, EM, Jr, and Boone, JM** (2002a). Radiation and the atom. The essential physics of medical imaging, second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams: 17-30.
- Bushberg, JT, Seibert, JA, Leidholdt, EM, Jr, and Boone, JM** (2002b). Interaction of radiation with matter. The essential physics of medical imaging, second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams: 31-60.
- Bushberg, JT, Seibert, JA, Leidholdt, EM, Jr, and Boone, JM** (2002c). X-ray production, X-ray tubes; and generator. The essential physics of medical imaging, second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams: 97-144.

- Bushberg, JT, Seibert, JA, Leidholdt, EM, Jr, and Boone, JM** (2002d). Image quality. The essential physics of medical imaging, second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams: 255-292.
- Bushberg, JT, Seibert, JA, Leidholdt, EM, Jr, and Boone, JM** (2002e). Computed tomography. The essential physics of medical imaging, second edition. Philadelphia, Lippincott Williams and Williams: 327-372.
- Buyske, DA, Eisner, HJ and Kelly, RG** (1960). Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **130**: 150-156.
- Cann, CE** (1988). Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review. *Radiology* **166**: 509-522.
- Cann, CE** (1989). Why, when and how to measure bone mass: a guide for the beginning user. Proceedings of the 1989 AAPM Summer School, Woodbury NY, Frey GD and Yester MV
- Cann, CE.** (1999). "Bone densitometry: understand it before you apply it." April 2008, from http://www.qct.com/Pages/Understand_It.html
- Cann, CE and Genant, HK** (1980). Precise measurement of vertebral mineral content using computed tomography. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **4**(4): 493-500.
- Chambers, HF** (2001). Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutic, tenth edition. JG Hardamn, LE Limbird and A Goodman Gilman, The Mc Gram Hill Companies, Inc: 1239-1271.
- Chang, KM, Ramamurthy, NS, McNamara, TF, Evans, RT, Klausen, RT, Murray, PA and Golup, LM** (1994). Tetracyclines inhibit porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism. *J. Periodontal. Res.* **29**: 464-469.
- Chopra, I** (2001). Glycyclines: third-generation tetracyclines antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**: 464-469.
- Colaizzi, JL and Klink, PR** (1969). pH-partition behaviour of tetracyclines. *J. Pharm. Sci.* **58**(10): 1184-1189.

- Cornelissen, BP, van Weeren, PR, Ederveen, AG and Barneveld, A** (1999). Influence of exercise on bone mineral density of immature cortical and trabecular bone of the equine metacarpus and proximal sesamoid bone. *Equine Vet. J.* **31**(Suppl. November): 79-85.
- Cromwell, GL** (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.* **13**(1): 7-27.
- De Ruyck, H, De Ridder, H, Van Renterghem, R and Van Wambeke, F** (1999). Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. *Food Addit Contam* **16**(2): 47-56.
- del Castillo, JRE** (2000). Pharmacocinétique et pharmacodynamie des tétracyclines administrées via l'aliment chez le porc. Université de Montréal, Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques: 199 p.
- del Castillo, JRE, Elsener, J and Martineau, GP** (1998). Pharmacokinetic modelling of in-feed tetracyclines in pigs using a meta-analytic compartmental approach. *Journal of swine health and production* **6**(5): 189-202.
- del Rio, L, Carrascosa, A, Pons, F, Gusinye, M, Yeste, D and Domenech, FM** (1994). Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res* **35**(3): 362-6.
- DeMoss, DL and Wright, GL** (1997). Analysis of whole skeleton 3H-tetracycline loss as a measure of bone resorption in maturing rats. *Calcif. Tissue Int.* **61**(5): 412-7.
- Domercq, M and Matute, C** (2004). Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**(12): 609-612.
- Dunlop, RH, McEwen, SA, Meek, AH, Friendship, RA, Clarke, RC and Black, WD** (1998). Antimicrobial drug use and related management practices among Ontario swine producers. *Can. Vet. J.* **39**: 87-96.
- Ebbesen, EN, Thomsen, JS, Beck-Nielsen, H, Nepper-Rasmussen, HJ and Mosekilde, L** (1998). Vertebral bone density evaluated by Dual-Energy X-

- Ray Absorptiometry and quantitative computed tomography in vitro. *Bone* **23**(3): 283-290.
- Eckstein, F, Jacobs, CR and Merz, BR** (1997). Mechanobiological adaptation of subchondral bone as a function of joint incongruity and loading. *Med. Eng. Phys.* **19**(December): 720-728.
- Einstein, R, Jones, RS, Knifton, A and Starmer, GA** (1994). Antibacterial drugs. Principles of veterinary therapeutics. Singapore, Congman scientific and technical Ed: 42-423.
- Emborg, H-D** (2003). Relation between the occurrence of resistance to antimicrobial growth promoters among *Enterococcus faecium* isolated from boilers and boiler meat. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 273-284.
- Engelke, K and Glüer, C** (2006). Quality and performance measures in bone densitometry, Part 1: Errors and diagnosis. *Osteoporos. Int.* **17**: 1283-1292.
- Eriksen, EF and Langdahl, BL** (1997). The pathogenesis of osteoporosis. *Horm Res* **48 Suppl 5**: 78-82.
- Finkelstein, JS, Cleary, RL, Butler, JP, Antonelli, RA, Mitlak, BH, Deraska, DJ, Zamora-Quezada, JC and Neer, RM** (1994). A comparison of lateral versus anterior-posterior spine Dual Energy X-Ray Absorptiometry for the diagnosis of osteopenia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**: 724-730.
- Friendship, RM and Prescott, JF** (2006). Drug therapy and prophylaxis. Diseases of swine, 9th edition. BE Straw, JJ Zimmerman, S D'Allaire and DJ Taylor, Blackwell publishing: 1131-1144.
- Fujii, Y, Tsunenari, T, Tsutsumi, M, Miyauchi, A, Yamada, H, Fukase, M, Yoshimoto, Y, Okuno, Y, Kusakabe, H, Miyoshi, K, Fukunaga, M, Morita, R and Fujita, T** (1988). Quantitative computed tomography: comparison of two calibration phantoms. *J. Bone Miner. Metab.* **6**(2): 71-74.
- Fujita, T, Fukase, M, Amai, Y, Nakao, Y, Matsui, T and Shiozawa, S** (1991). Calcium and vitamin D in osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* **9**(2): 180-184.
- Galante, J, Rostoker, W and Ray, RD** (1970). Physical properties of trabecular bone. *Calcif. Tissue Res.* **5**(3): 236-46.

- Genant, HK** (1985). Assessing osteoporosis: CT's quantitative advantage. *Diagn. Imaging* **7**(8): 52-57.
- Gomes, BC, Golub, LM and Ramamurthy, NS** (1984). Tetracyclines inhibit parathyroid hormone-induced bone resorption in organ culture. *Experientia* **40**: 1273-1275.
- Grampp, S, Genant, HK, Mathur, A, Lang, P, Jergas, M, Tadaka, M, Glüer, C-C, Lu, Y and Chavez, M** (1997). Comparison of non-invasive bone mineral measurements in assessing age-related loss, fracture discrimination, and diagnostic classification. *J. Bone Miner. Res.* **12**: 697-711.
- Greenwald, RA, Golub, LM, Ramamurthy, NS, Chowdhury, M, Moak, SA and Sorsa, T** (1998). In vitro sensitivity of the three mammalian collagenase to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone* **22**(1): 33-38.
- Guglielmi, G, Grimston, SIK, Fischer, KC and Pacifici, R** (1994). Osteoporosis: diagnosis with lateral and posteroanterior Dual X-Ray Absorptiometry compared with quantitative CT. *Radiology* **192**: 845-850.
- Hagihara, Y, Fukuda, S, Goto, S, Iida, H, Yamazaki, M and Moriya, H** (2005). How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? *J Bone Miner Metab* **23**(4): 289-94.
- Hathcock, JT and Stickle, RL** (1993). Principles and concepts of computed tomography. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **23**(2): 399-415.
- Heaney, RP** (2003). Is the paradigm shifting ? *Bone* **33**(4): 457-465.
- Heaney, RP, Abrams, S, Dawson-Hughes, B, Looker, A, Marcus, R, Matkovic, V and Weaver, C** (2000). Peak bone mass. *Osteoporos. Int.* **11**(12): 985-1009.
- Holmes, SG, Still, K, Buttle, DJ, Bishop, NJ and Grabowski, PS** (2004). Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. *Bone* **35**(2): 471-478.
- Hoogbergen, MM, Niessen, WJ, Schuurman, AH, Spauwen, PHM and Kauer, JMG** (2002). Subchondral bone mineral density patterns representing the loading history of the wrist joint. *J. Hand Surg.* **27B**(2): 150-154.

- Huiskes, R** (2000). If bone is the answer, then what is the question? *J. Anat.* **197**: 145-156.
- Ibsen, KH** (1985). Studies on the association of the tetracyclines with mineralized tissue. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **200**(November): 85-86.
- Ibsen, KH, Saunders, RL and Urist, MR** (1963). Fluorometric determination of oxytetracycline in biological material. *Anal. Biochem.* **5**: 505-514.
- Ibsen, KH and Urist, MR** (1961). Complexes of calcium and magnesium with oxytetracycline. *Prop. Soc. Exp. Biol. Med.* **109**(797-801).
- Igarashi, C and Ezawa, I** (1993). Fundamental evaluation of Dual X-Ray Absorptiometry (DXA) for measurement of bone mineral density in rats. *J. Bone Miner. Metab.* **11**(2): 23-29.
- Inui, A, Itamoto, K, Takuma, T, Tsutsumi, H, Tanigawa, M, Hayasaki, M, Taura, Y and Mamba, K** (2004). Age-related changes of bone mineral density and microarchitecture in miniature pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **66**(6): 599-609.
- Jin, L, Amaya-Mazo, X, Apel, ME, Sankisa, SS, Johnson, E, Zbyszynska, MA and Han, A** (2007). Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. *Biophys. Chem.* **128**(2-3): 185-96.
- Karna, E, Palka, J and Wolczynski, S** (2001). Doxyxline-induced inhibition of prolydase activity in humans skin fibroblasts and its involvement in impaired collagen biosynthesis. *Eur. J. Pharmacol.* **430**: 25-31.
- Kaste, SC, Tong, X, Hendrick, JM, Karimova, EJ, Srivastava, DK, Tylavsky, FA, Snider, TL and Carbone, LD** (2006). QCT versus DXA in 320 survivor of childhood cancer: association of BMD with fracture history. *Pediatr. Blood Cancer* **47**(7): 936-943.
- Keck, G and Borne, PM** (1995). Nouvelles conceptions en antibiothérapie et leurs applications pratiques en médecine vétérinaire. *Rev. Med. Vet.* **146**(5): 309-320.
- Kilroy, CR, Hall W, F, Bane, DP, Bevill, RF and Koritz, GD** (1990). Chlortetracycline in swine – bioavailability and pharmacokinetics in fasted and fed pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **13**: 49-58.

- Kirkwood, K, Martin, T, Andreadis, ST and Kim, YJ** (2003). Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 1809-1819.
- Koo, WWK, Hammami, M and Hockman, EM** (2002). Use of fan beam Dual X-Ray Absorptiometry to measure body composition in piglets. *J.Nutr.* **132**: 1380-1383.
- Koo, WWK, Hammami, M and Hockman, EM** (2004a). Validation of bone and body composition measurements in small subjects with pencil beam Dual Energy X-Ray Absorptiometry. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**(1): 79-84.
- Koo, WWK, Hammami, M, Skypailo, RJ and Ellis, KJ** (2004b). Bone and body composition measurements of small subjects: discrepancies from software for fan-beam dual energy X-ray absorptiometry. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**(6): 647-650.
- Koo, WWK, Massom, LR and Walters, J** (1995). Validation of accuracy and precision of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry for infants. *Journal of Bone Minereral Resherch* **10**: 1111-1115.
- Koo, WWK, Walters, J and Bush, AJ** (1995b). Technical considerations of Dual-Energy X-Ray Abasorptiometry based bone mineral measurements for pediatric studies. *J. Bone Miner. Res.* **10**: 1998-2004.
- Korner, U, Kuhne, M and Wenzel, S** (2001). Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: methodology and examination of field samples. *Food Addit. Contam.* **18**(4): 293-302.
- Kühne, M and Körner, U** (2001). Bound chlortetracycline residues in bones release under acidic conditions. *Food Chem.* **72**: 41-44.
- Kühne, M, Wegmann, S, Kobe, A and Fries, R** (2000). Tetracyclines residues in bones of slaughtered animals. *Food control* **11**: 175-180.
- Kuhne, M, Korner, U and Wenzel, S** (2001). Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: the effect of heat treatments on bound tetracycline residues. *Food Addit Contam* **18**(7): 593-600.
- Kunin, CM and Finland, M** (1960). Clinical pharmacology of the tetracyclines antibiotics. *Clin Pharmacol Ther* **15**(September): 51-69.

- Lang, TF and Duryea, J** (2003). Peripheral bone mineral assessment of the axial skeleton. *Contemporary endocrinology: Osteoporosis: pathophysiology and clinical management*. ES Orwoll and M Bliziotes. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc: 83-104.
- Lang, TF, Guglielmi, G, Van Kuijk, C, De Serio, A, Cammisa, M and Genant, HK** (2002). Measurement of bone mineral density at the spine and proximal femur by volumetric quantitative computed tomography and Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in elderly women with and without vertebral fractures. *Bone* **30**(14): 247-250.
- Lawrence, TLJ and Fowler, VR** (2002). *Tissues: Basic structure and growth. Growth of farm animals*, Second edition. New York, NY, CABI publishing: 21-85.
- Leman, AD, Straw, BE, Mengeling, WL, D'Allaire, S and Taylor, DJ** (1992). *Therapeutics. Diseases of swine*, 7th edition. Ames, Iowa, Iowa state university press.
- Leonard, MB, Shults, J, Elliott, DM, Stallings, VA and Zemel, BS** (2004). Interpretation of whole body Dual Energy X-Ray Absorptiometry measures in children: comparison with peripheral quantitative computed tomography. *Bone* **34**(6): 1044-1052.
- Les, CM, Keyak, JH, Stover, SM, Taylor, KT and Kaneps, AJ** (1994). Estimation of material properties in the equine metacarpus with use of quantitative computed tomography. *J. Orthop. Res.* **12**: 822-833.
- Li, M, Liang, H, Shen, Y and Wronski, TJ** (1999). Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats. *Bone* **24**(2): 95-100.
- Li, XQ, Donovan, CA and Klein, L** (1989). A pharmacokinetic model in the rat and rabbit of the direct measurement of mature bone resorption in vivo with [³H] Tetracycline. *J. Pharm. Sci.* **78**(10): 823-828.
- Link, TM, Koppers, BB, Licht, T, Bauer, J, Lu, Y and Rummeny, EJ** (2004). In vitro and in vivo spiral CT to determine bone mineral density: initial experience in patients at risk for osteoporosis. *Radiology* **231**: 805-811.

- Lochmüller, EM, Bürklein, D, Kuhn, V, Glaser, C, Müller, R, Glüer, CC and Eckstein, F** (2002). Mechanical strength of the thoracolumbar spine in the elderly: prediction from in situ Dual-Energy X-Ray Absorptiometry, quantitative computed tomography (QCT), upper and lower limb peripheral QCT, and quantitative ultrasound. *Bone* **31**(1): 77-84.
- MacDonald, NS, Ibsen, KH and Urist, MR** (1964). Effect of tetracycline on retention of calcium and strontium in rodents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **115**: 1125-1128.
- Maier, GW, Kreis, ME, Zittel, TT and Becker, HD** (1997). Calcium regulation and bone mass loss after total gastrectomy in pigs. *Ann. Surg.* **225**(2): 181-192.
- Martin, SW, Meek, AH and Willeberg, P** (1987). *Veterinary epidemiology. Principles and methods.* Ames, Iowa, Iowa State University Press.
- McCleskey, PE and Littleton, KH** (2004). Minocycline-induced blue-green discoloration of bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* **86A**(1): 146-148.
- McCormick, DP, Ponder, SW, Fawcett, HD and Palmer, JL** (1991). Spinal bone mineral density in 335 normal and obese children and adolescents: evidence for ethnic and sex differences. *J Bone Miner Res* **6**(5): 507-13.
- Metz, LN, Martin, RB and Turner, AS** (2003). Histomorphometric analysis of the effects of osteocyte density on osteonal morphology and remodelling. *Bone* **33**(5): 753-759.
- Mevius, DJ, Vellenga, L, Breukink, HJ, Nouws, JFM, Vree, TB and Driessens, F** (1986). Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration. *Vet. Q.* **8**(4): 274-284.
- Meynaud-Collard, P, Mathon, D, Asimus, E and Autefage, A** (2001). La densitométrie : revue bibliographique. *Rev Med Vet* **152**(1): 49-60.
- Milch, RA, Rall, DP and Tobie, JE** (1957). Bone localisation of the tetracyclines. *J. Natl. Cancer Inst.* **19**: 87-91.
- Milch, RA, Rall, DP and Tobie, JE** (1958). Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J. Bone Joint Surg. Am.* **40A**(4): 897-910.

- Mitchell, AD, Scholz, AM and Pursel, VG** (2001). Total body and regional measurements of bone mineral content and bone mineral density in pigs by dual energy X-ray absorptiometry. *J. Anim. Sci.* **79**(10): 2594-604.
- Muirhead, MR and Alexander, TJJ** (1997). Treating disease. Managing pig health and the treatment of disease. Sheffield, UK, 5M Enterprises Ltd: 107-132.
- Nielsen, P and Gyrd-Hansen, N** (1996). Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **19**: 305-311.
- Oklund, SA, Prolo, DJ and Gutierrez, RV** (1981). The significance of yellow bone. Evidence for tetracycline in adult and human. *JAMA* **246**: 761-763.
- Olfert, ED, Cross, BM and McWilliam, AA** (1993). The care and use of experimental animals, vol. 1. Ottawa, ON, Canadian council on animal care.
- Pijpers, A, Schoevers, EJ, Haagsma, N and Verheijden, JHM** (1991). Plasma levels of oxytetracycline, doxycycline, and minocycline in pigs after oral administration in feed. *J. Anim. Sci.* **69**: 4512-4522.
- Pijpers, A, Van Klingerren, B, Schoevers, EJ, Verheijden, JHM and Van Miert, ASJPAM** (1989). In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **12**: 267-276.
- Pitukcheewanont, P, Safani, D, Church, J and Gilsanz, V** (2005). Bone measures in HIV-1 infected children and adolescents: disparity between quantitative computed tomography and Dual-Energy, X-Ray Absorptiometry measurements. *Osteoporos. Int.* **16**: 1393-1396.
- Prescott, JF** (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food. *Can. Vet. J.* **38**(December): 763-766.
- Proctor, DN, Melton, LJ, Khosla, S, Crowson, CS, O'Connor, MK and Riggs, BL** (2000). Relative influence of physical activity, muscle mass and strength on bone density. *Osteoporos Int* **11**(11): 944-52.
- Regna, PP** (1959). The chemistry of antibiotics. Antibiotics. in their chemistry and non-medical uses. Princeton, U.S.A, H. S. Goldberg, Ed: 58-173.

- Richmond, RJ and Berg, RT** (1972). Bone growth and distribution in swine as influenced by liveweight, breed, sex, and ration. *Can. J. Anim. Sci.* **52**: 47-56.
- Rifkin, BR, Vernillo, AT, Golub, LM and Ramamurthy, NS** (1994). Modulation of bone resorption by tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**: 165-180.
- Roberts, MC** (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Review* **19**: 1-24.
- Samanidou, VF, Nikolaidou, KI and Papadoyannis, IN** (2005). Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *J Sep Sci* **28**(17): 2247-58.
- Samanidou, VF, Nikolaidou, KI and Papadoyannis, IN** (2007). Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J Sep Sci* **30**(15): 2430-9.
- Samii, VF, Les, CM, Schulz, KS, Keyak, JH and Stover, SM** (2002). Computed tomographic osteoabsortometry of the elbow joint in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* **63**(8): 1159-1166.
- Sasaki, T, Ramamurthy, NS and Golub, LM** (1994). Bone cells and matrix bind chemically modified non-microbial tetracycline. *Bone* **15**(3): 373-375.
- Segalès, J, Allan, GM and Domingo, M** (2006). Porcine circovirus diseases. Diseases of swine, 9th edition. BE Straw, JJ Zimmerman, S D'Allaire and DJ Taylor. Ames, IA, Blackwell publishing: 299-308.
- Shaw, DT, Rozeboom, DW, Hill, GM, Orth, MW, Rosenstein, DS and Link, JE** (2006). Impact of supplement withdrawal and wheat middling inclusion on bone metabolism, bone strength, and the incidence of bone fractures occurring at slaughter in pigs. *J Anim Sci* **84**(5): 1138-46.
- Shea, JE and Miller, SC** (2005). Skeletal function and structure: implication for tissue-targeted therapeutics *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 945-957.
- Sievänen, H, Koskue, V, Rauhio, A, Kannus, P, Heininen, A and Vuori, I** (1998). Peripheral quantitative computed tomography in human long bones :

- evaluation of in vitro and in vivo precision. *J. Bone Miner. Res.* **13**(5): 871-882.
- Steiger, P, Block, JE, Steiger, S, Heuck, A, Frielander, A, Ettinger, B, Harris, ST, Glüer, C-C and Genant, HK** (1990). Spinal bone mineral density measured with quantitative CT: effect of region of interest, vertebral level, and technique. *Radiology* **175**: 537-543.
- Stepensky, D, Kleinberg, L and Hoffman, A** (2003). Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **42**(10): 863-881.
- Stiehl, JB, Jacobson, D and Carrera, G** (2007). Morphological analysis of the proximal femur using quantitative computed tomography. *Int. Orthop.* **31**(3): 287-292.
- Suzuki, S, Okumura, H, Yamamuro, T and Yamamoto, I** (1988). Bone mineral measurement by CT apparatus with simultaneous use of reference phantom: error factors and clinical evaluation. *J. Bone Miner. Metab.* **6**(3): 164-171.
- Svensden, OC, Haarbo, J, Hassager, C and Christiansen, C** (1993). Accuracy of measurements of body composition by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in vivo. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**(5): 60-68.
- Tatara, MR, Krupski, W, Sliva, E, Maciejewski, R and Dabrowski, A** (2007). Fundectomy-evoked osteopenia in pigs is mediated by the gastric-hypothalamic-pituitary axis. *Exp. Biol. Med.* **232**: 1449-1457.
- Teo, JCM, Si-Hoe, KM, Keh, JEL and Teoh, SH** (2006). Relationship between CT intensity, micro-architecture and mechanical properties of porcine vertebral cancellous bone. *Clin. Biomech.* **21**(235-244).
- Van Rijn, RR, van der Sluis, IM, Link, TM, Grampp, S, Guglielmi, G, Imhof, H, Glüer, C, Adams, JE and van Kuijk, C** (2003). Bone densitometry in children: a critical appraisal. *Eur. Radiol.* **13**: 700-710.
- Vaughan, J** (1981a). Bone as a tissue. The physiology of bone, third edition. London, Oxford University Press: 1-26.
- Vaughan, J** (1981b). Cellular elements of the skeleton. The physiology of bone, third edition. London, Oxford University Press: 27-55.

- Vaughan, J** (1981c). Chemistry of bone matrix. The physiology of bone, third edition. London, Oxford University Press.
- Wanner, M, Walker, W, Sutter, HM, Riond, JL and Broz, J** (1991). Influence of dietary citric acid and calcium on the bioavailability of orally administered chlortetracycline in piglets. *Zentralblat Veterinarmed.*, A **38**: 755-762.
- Watts, NB** (2004). Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA). *Osteoporosis International* **15**: 847-854.
- Wolfe, ID and Reichmister, J** (1984). Minocycline hyperpigmentation: skin, tooth, nail and bone involvement. *Cutis* **33**(May): 457-458.
- Yu, L, Lin, RM, Tsai, KH and Chang, G** (1995). Fat in the prediction of bone strength of porcine lumbar vertebrae by quantitative computed tomography. *J. Formos Med. Assoc.* **97**(7): 418-422.
- Yuh, I, Yamamoto, I, Shigei, M, Ohnaka, Y, Tadaka, M and Morita, R** (1994). Vertebral bone mineral measurement: a comparative study between quantitative computed tomography and Dual X-Ray Absorptiometry. *J. Bone Miner. Res.* **12**(1): 27-31.
- Zou, L, Bloebaum, RD and Bachus, KN** (1997). Reproducibility of techniques using Archimedes' principle in measuring cancellous bone volume. *Med Eng Phys* **19**(1): 63-8.

7. ANNEXES

ANNEXE I : Marqueurs biologiques du métabolisme osseux

ANNEXE II : Exactitude et précision d'une mesure physique

ANNEXE III : Synthèse du protocole expérimental

ANNEXE IV : Principales teneurs nutritives des aliments croissance et finition

ANNEXE V : Exemples de décoloration osseuse des vertèbres L2

ANNEXE VI : Résumé de la communication par affiche présentée au vingtième congrès de l'International Pig Veterinary Society

7.1. ANNEXE I : Marqueurs biologiques du métabolisme osseux

7.1.1. Marqueurs de la formation osseuse

7.1.1.1. Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme synthétisée par le foie, les intestins, la rate, le rein, du placenta et l'os. Dans l'os, elle est produite par les ostéoblastes. Elle intervient dans la formation de la matrice osseuse et la minéralisation par un mécanisme encore inconnu (Fohr et al. 2003). L'isoenzyme spécifique à l'os (BALP) est le marqueur le plus exacte d'une augmentation d'activité des ostéoblastes (Allen 2003).

7.1.1.2. Ostéocalcine

L'ostéocalcine, une protéine dépendante de la vitamine K, est synthétisée par les ostéoblastes, les odontoblastes et les chondrocytes de la zone hypertrophique de la plaque de croissance. Dans l'os, elle est déposée dans la matrice extracellulaire et une faible partie est relâchée dans le sang (Fohr et al. 2003). Malgré sa liaison à la matrice osseuse, elle n'est pas libérée dans le plasma lors de résorption osseuse. La concentration plasmatique d'ostéocalcine reflète donc l'activité de synthèse des ostéoblastes (Allen 2003) et est bien corrélée positivement à la croissance osseuse (Tsunenari et al. 1988).

7.1.1.3. Propeptides du collagène de type I

Le collagène de type I est synthétisé par les ostéoblastes à partir d'un précurseur, le procollagène de type I. Lors de cette synthèse, des propeptides amino- et carboxy-terminaux sont libérés à partir du procollagène. La concentration sérique de ces propeptides est donc le reflet de la synthèse de collagène de type I (Allen 2003). Le collagène de type I est constitutif de l'os, la peau, la dentine, la cornée, les vaisseaux, les tendons et le fibrocartilage. Mais le renouvellement du collagène osseux est beaucoup plus important que celui des autres tissus. Ces autres tissus participent donc faiblement à la quantité de propeptides circulants par rapport à l'os. Ainsi, les propeptides du collagène de type I sont des marqueurs assez spécifiques de l'activité des ostéoblastes (Fohr et al. 2003).

7.1.2. Marqueur de la résorption osseuse

7.1.2.1. Produits de dégradation du collagène de type I

Les produits de dégradation du collagène de type I sont les fragments peptidiques issus de la destruction par les ostéoclastes du collagène de type I mature (Fohr et al. 2003). Les fragments des régions amino- et carboxy-terminales sont appelés respectivement télopeptide N-terminal (NTX) et télopeptide C-terminal (CTX). Le NTX est considéré comme un marqueur très sensible et spécifique de la résorption osseuse (Asaba et al. 2006; Stepensky et al. 2003) et indique un niveau d'activité ostéoclastique élevé (Allen 2003). Les ponts protéiques entre différentes molécules de collagène sont libérés sous forme de pyridinoline et de déoxypyridinoline. Ce dernier, provenant uniquement du collagène de type I synthétisé dans l'os, est le marqueur le plus spécifique et exact de la résorption osseuse (Fohr et al. 2003; Stepensky et al. 2003).

7.1.2.2. Phosphatase acide résistante au tartrate

Les phosphatases acides sont des enzymes de dégradation exprimées par la prostate, l'os, la rate, les plaquettes, les globules rouges et les macrophages. Elles sont inhibées par le (L+) tartrate sauf pour une isoforme : la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP). La sous-forme TRAP-5b est uniquement produite par les ostéoclastes. TRAP-5b est donc un marqueur spécifique de l'activité ostéoclastique (Fohr et al. 2003).

7.1.2.3. Apports et limites

Les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux sont complémentaires aux techniques d'imagerie et de densitométrie car ils permettent d'avoir un accès en temps réel de la réponse cellulaire osseuse (Heaney 2003). Ces marqueurs sont détectables dans le sang (formation et résorption) et dans l'urine (résorption uniquement) (Allen 2003; Fohr et al. 2003). Ils permettent d'effectuer des mesures répétées sur un animal sans perturber le métabolisme osseux (Allen 2003). Les méthodes analytiques utilisées sont généralement l'ELISA et l'analyse radio-immunologique (RIA) (Allen 2003; Fohr et al. 2003).

Certaines limites sont décrites :

- Le temps de collecte, le statut de jeûne, la présence de fracture dans les deux dernières années peuvent faire varier la concentration de ces marqueurs (Obrant et al. 2005).
- Un rythme diurnal et saisonnier existe pour la plupart d'entre eux. Il est recommandé d'utiliser une série de marqueurs pour palier à ces variations (Allen 2003; Fohr et al. 2003).
- La conservation des échantillons doit être réalisée rapidement à des températures inférieures à -20°C , voire -80°C pour certains marqueurs (Fohr et al. 2003).
- Ils présentent une bonne sensibilité pour les pathologies osseuses systémiques mais leur utilisation est controversée dans le cas de pathologies osseuses localisées (Allen 2003).
- Ils n'existent pas d'essai clinique chez les animaux pour valider leur utilisation. Cependant, des réactivités croisées existent entre espèces pour certains tests notamment chez le porc (Tableau II).

Tableau III : Marqueurs biologiques du métabolisme osseux possédant un kit de détection avec une réactivité croisée pour le porc

(Allen 2003; Fohr et al. 2003)

Item	Marqueur					
	BALP	Propeptides du collagène-I	Ostéocalcine	Pyridinoline	Déoxy- pyridinoline	Télopeptides du collagène (portion carboxy- terminale)
Kit d'analyse	Métra BAP*	Metra CICP*	Metra osteocalcin*	Metra DPD*	Metra PYD*	Serum CrossLaps* / Urine CrossLaps*
Méthode d'analyse	Immuno- capture	ELISA				
Spécimen	Serum			Urine	Serum/Urine	
Conservation (°C)	<-20		≤-80	<-20		

- * De Quidel Corporation (San Diego, CA), <http://www.quidel.com>
- ** De Nordic Biosciences diagnostics (Herlev, Danemark), <http://www.nbdiagnostics.com>

7.1.3. Références

Allen MJ (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. . *Vet Clin Pathol* **32**(3): 101-113.

Asaba Y, Hiramatsu K, Matsui Y, Harada A, Nimura Y, Katagiri N, Kobayashi T, Takewaka T, Ito M, Niida S and Ikeda K (2006). Urinary γ -glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption *Bone* **39**(6): 1276-1282

Fohr B, Woitge HW and Seibel MJ (2003). Molecular markers of bone turnover: basic and analytical aspects. In: *Contemporary endocrinology: Osteoporosis:*

pathophysiology and clinical management. E.S. Orwoll and M. Bliziotes.
Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. p 163-184.

Heaney RP (2003). Is the paradigm shifting ? *Bone* **33**(4): 457-465.

Obrant KJ, Ivaska KK, Gerdhem P, Atalo SL, Petterson K and Väänänen HK
(2005). Biochemical markers of bone turnover are influenced by recently
sustained fracture. *Bone* **36**(5): 786-792.

Stepensky D, Kleinberg L and Hoffman A (2003). Bone as an effect compartment:
models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet* **42**(10): 863-881

Tsunenari T, Takenaka M, Fukase M and Fujita T (1988). Can serum osteocalcin
levels predict bone turnover in patients with osteoporosis ? *J Bone Miner
Metab* **6**(3): 158-163.

7.2. Annexe II : Exactitude et précision d'une mesure physique

7.2.1. Exactitude

L'exactitude signifie « l'égalité de la mesure avec la grandeur mesurée » (Le petit Robert, dictionnaire de la langue française). L'exactitude définit l'écart entre la valeur de référence ou réelle que l'on désire mesurer de la valeur moyenne mesurée par une série de tests avec une modalité donnée. En d'autre terme l'exactitude détermine la capacité d'une modalité à mesurer la valeur réelle du matériel étudié. Elle décrit l'erreur systématique d'une mesure et est souvent exprimée grâce au biais. Le biais est alors la différence entre la valeur attendue avec le test et la valeur réelle. Dans le cadre de la densitométrie osseuse, l'exactitude de la densité minérale osseuse mesurée est évaluée in vitro par la mesure de la densité volumique réelle de l'os étudié. De même, le contenu minéral osseux évalué (principalement au DEXA) est corrélé avec la quantité de cendre de l'os étudié. L'exactitude est la traduction du mot anglais « *trueness* » mais le mot « *accuracy* » est le plus souvent utilisé à sa place, bien qu'il soit moins strict (décrit le déplacement total d'une mesure par rapport à la valeur réel et non seulement l'erreur systématique). (Engelke et al. 2006; Shepherd et al. 2003)

7.2.2. Précision

7.2.2.1. Définition

La précision est en français courant synonyme du mot exactitude dans le cadre d'une mesure (Le petit Robert, dictionnaire de la langue française). Par contre, son utilisation scientifique découle du terme anglais « *precision* » et définit alors la capacité d'une modalité à produire une mesure répétable. La précision décrit l'erreur aléatoire. Autrement dit, la précision définit l'écart entre les valeurs obtenues par des tests indépendants pour une modalité donnée sous des conditions prédéfinies. La précision d'une modalité est exprimée en termes d'imprécision et présentée sous forme d'erreurs types ou plus souvent sous forme de coefficients de variation (erreur type/moyenne). Quand les mesures sont répétées au cours d'une période de quelques mois, la précision est dite à court terme. Elle est dite à long terme si cette période est de plusieurs mois à

quelques années. En densitométrie osseuse, les sources majeures d'imprécisions sont l'appareil utilisé, l'opérateur et le patient. (Engelke et al. 2006; Shepherd et al. 2003)

7.2.2.2. Répétabilité

La répétabilité, traduction du mot anglais « *repeatability* » est utilisé pour définir la précision d'une mesure quand des tests indépendants sont répétés avec un matériel à tester, une méthode et des conditions identiques (Engelke et al. 2006).

7.2.2.3. Reproductibilité

La reproductibilité, traduction du mot anglais « *reproducibility* » est utilisé pour définir la précision d'une mesure quand des tests indépendants sont répétés avec un matériel à tester et une méthode identique dans des conditions différentes (laboratoire et personnel) (Engelke et al. 2006).

7.2.3. Références

Engelke K and Glüer C (2006). Quality and performance measures in bone densitometry, Part 1: Errors and diagnosis. *Osteoporos Int* **17**: 1283-1292.

Shepherd J, Njeh C and Genant HK (2003). Use of bone densitometry in the clinical management of osteoporosis. In: *Contemporary endocrinology: Osteoporosis: pathophysiology and clinical management*. E. S. Orwoll and M. Bliziotes. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. p 105-118.

7.3. ANNEXE III : Synthèse du protocole expérimental

CTC		Groupes (porcs)	Âge (j)	21		28	42		56	70		84	98		112	126		140	168		
Début (j)	Durée (j)		Temps	T1		T2		T3		T4		T5		T6							
28	28	CTC28-28 (n=16)	Euthanasie Activité			8 I														6 I	
28	56	CTC28-56 (n=16)	Euthanasie Activité						8 I+II												6 I+II
84	28	CTC84-28 (n=16)	Euthanasie Activité									8 I									6 I
84	56	CTC84-56 (n=16)	Euthanasie Activité														8 I+II				6 I+II
0	0	Témoins (n=48)	Euthanasie Activité		8 I+II			8 I			8 I+II			8 I				8 I+II			6 I+II
Régie		Pesée		X	X		X	X		X	X			X			X				X
		Aliment (granulés)		Nourrisson		1 ^{er} âge	2 ^{ème} âge		Croissance								Finition				
		Logement		Quarantaine		Pouponnière				Engraissement				Finition							

CTC : alimentation complétementée en CTC à 800 ppm; Temps : temps de mesures ; Euthanasie : nombre de porcs euthanasié lors du temps de mesure ; Activité I : prise de sang pour dosage de la concentration de CTC plasmatique et dissection des vertèbres lombaires 1, 2 et 3 ; Activité II : examens d'imageries DEXA et CT-scan

7.4. ANNEXE IV : Principales teneurs nutritives des aliments croissance et finition

Caractéristiques	Aliment	
	Croissance	Finition
Ingrédients		
Blé (g/100g)	10	10.9
Maïs (g/100g)	44.6	43.9
Gluten 21% (g/100g)	5	5.5
Soja 48% (g/100g)	15	7.9
Canola (g/100g)	8	4.3
Déchets de boulangerie (g/100g)	7.5	10
Graisse (g/100g)	2.1	1.6
Limestone (g/100g)	1.2	0.77
Phosphate dicalcique 21% (g/100g)	0.42	0.35
Mélange de vitamines (g/100g)	1	1
Mélange minéral (g/100g)	0.5	0.5
Sel (g/100g)	0.31	0.22
L-lysine HCl, 98% (g/100g)	0.24	0.24
Teneur calculée		
Protéines brutes (g/100g)	17.7	15.7
Ca (g/100g)	0.7	0.56
P, total (g/100g)	0.5	0.46

7.5. ANNEXE V : Exemples de décoloration osseuse des vertèbres L2

Apophyses épineuse et transverse :

Absence de décoloration



Intensité de décoloration = 2

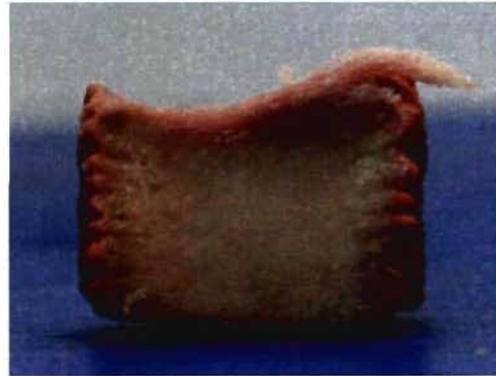


Intensité de décoloration = 4



Corps vertébral :

Absence de décoloration



Intensité de décoloration = 2



Intensité de décoloration = 4



7.6. ANNEXE VI : Résumé de la communication par affiche présentée au vingtième congrès de l'International Pig Veterinary Society

TETRACYCLINE-INDUCED BONE STAINING IN PIGS IS REVERSIBLE AND DEPENDS ON DOSING REGIMEN DESIGN

MARTIN GUILLOT¹, KATE ALEXANDER¹, CANDIDO POMAR², ANN LETELLIER¹, JEROME R.E. DEL CASTILLO¹

¹ UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, C.P. 5000 ST-HYACINTHE (QC) J2S 7C6 CANADA

² AGRICULTURE CANADA, C.P 90, STN LENNOXVILLE, SHERBROOKE (QC) J1M 1Z3 CANADA.

7.6.1. Introduction

Bone discoloration of pig carcasses is an increasing concern (Kühne M. et al 2000). This is likely related to the use of tetracyclines (TC), which use in Canada has increased following the emergence of a new genotype of PCV-2 (Gagnon CA et al. 2008). Bone metabolism is affected by these osteotropic drugs (Rifkin B.R. et al 1994). We hypothesize that the use of TC-fortified diets in pigs induces bone discoloration and affects bone density. Both effects increase with treatment duration and the age of pigs. The objectives of this study were (i) to evaluate in growing pigs the effects of age at treatment onset and dosing duration on bone color and density, and (ii) to assess the ability of a medical imaging technique to evaluate the effects of TC on bone. Chlortetracycline (CTC) was used as model TC.

7.6.2. Materials and Methods

Three week-old castrated male piglets (N=112) were kept in the research facility for 21 weeks, and randomly fed with drug-free diet (Controls; n=48) or a diet fortified with 800 ppm CTC. Medicated pigs started their course of dietary CTC at 4 or 12 week-old, which were maintained for 4 or 8 weeks (coded 4_4, 4_8, 12_4, and 12_8; n=16

pigs/group). Every 28 days, 8 control and 8 treated pigs were randomly chosen, jugular blood was sampled and were given pharmacological euthanasia. At the end, 6 pigs from each group were examined. The three first lumbar vertebrae were dissected to evaluate discoloration (none=0 to strong=4) on blind conditions for each pig. Before their dissection, the 4_8 and 12_8 pigs, as well as their controls, were subject to quantitative computed tomography (qCT) for estimation of cancellous bone mineral density (BMD). Logistic regression analysis for ordinal data was used to determine the effects of treatment, starting age, dosing duration, and withdrawal time on the odds of a bone discoloration score equal to 0. Linear regression analysis was used to determine the effects and interactions of the above independent variables on bone density. Both analyses were performed with the 0.05 α -level.

7.6.3. Results

Figure 1 illustrates the time-course of the bone discoloration scores. The risk of a positive score increased with dosing duration and age at treatment onset ($p < 0.0001$), but decreased with increasing withdrawal time and with its interaction with age at treatment onset ($p < 0.026$). Figure 2 illustrates the effects of age and exposure to CTC on the BMD of the second lumbar spine vertebrae (L2). The BMD quadratically increased with age ($p < 0.0001$), a trend that was further increased by CTC ($p = 0.039$).

Figure 1. Discoloration of L2 as function of age and treatment duration, plus linear post-treatment trends.

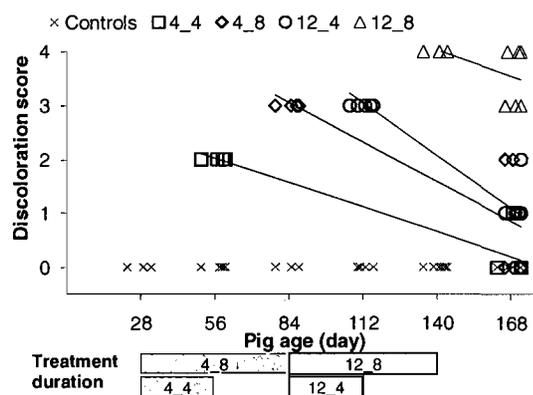
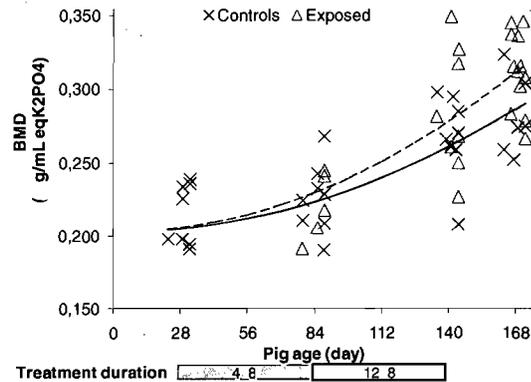


Figure 2. BMD of L2 estimated by qCT as function of age and CTC exposure, plus regression trends.



7.6.4. Discussion

Our hypothesis was confirmed. The risk of bone TC discoloration is higher when treatment is started at the later growth stages and with prolonged dosing duration. This discoloration was reversible with a sufficient withdrawal time. But the discoloration vanishes at a slower rate when the age at treatment onset increases, in agreement with the age-related decrease in bone turnover rate. As expected from its bone metabolic effects (Rifkin B.R. et al 1994), exposure to TC induced a persistent increase in BMD. Proper dosing regimen design may prevent TC-induced bone discoloration.

7.6.5. References

- Kühne, M, Wegmann, S, Kobe, A and Fries, R (2000).** Tetracyclines residues in bones of slaughtered animals. *Food control* **11**: 175-180.
- Gagnon, CA, del Castillo, JRE, Music, N, Fontaine, G, Harel, J and 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* **20**: 545-558.
- Rifkin, BR, Vernillo, AT, Golub, LM and Ramamurthy, NS (1994).** Modulation of bone resorption by tetracyclines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **732**: 165-180.