

Détermination des valeurs critiques pour l'antibiogramme vétérinaire par une approche de type Monte Carlo

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Julien François Germain Sylvain REY
Né le 3 mars 1984 à Rodez (12)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN**

JURY

PRESIDENT :
M. Eric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :
M. Pierre-Louis TOUTAIN
M. Didier CONCORDET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
Mme Céline ROUSSET

Chercheuse à l'UMR 181 INRA-ENVT



Feuille professeurs envt

Remerciements

Au Professeur Eric Oswald,

Professeur à la faculté de médecine de Toulouse,

Biologie Moléculaire

Qui nous a fait l'honneur d'accepter présider ce jury de thèse,

Hommages respectueux.

Au Professeur Pierre-Louis Toutain,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Physiologie et Thérapeutique

Pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse,

Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

Au Professeur Didier Concordet

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Mathématiques, Statistiques, Modélisation

Pour son aide et pour nous faire l'honneur de participer à ce jury de thèse,

Hommages respectueux.

Au Dr Céline Laffont- Rousset,

Chercheuse contractuelle à l'UMR 181 INRA-ENVIT

Pour sa précieuse aide pour la réalisation de l'étude de population.

Sincères remerciements pour sa disponibilité.

Au Professeur Guy-Pierre Martineau,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour

Pour ses nombreux rappels sur la zootechnie du porc,

Sincères remerciements pour son accueil.

Au Professeur Alain Bousquet-Mélou,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pharmacologie et Thérapeutique

Pour son aide dans la correction de cette thèse,

Sincères remerciements.

A mes parents et mon frère,
Pour avoir toujours avoir été là pour me soutenir et m'avoir laissé la liberté de mes choix

Aux Drs Bonnemaire, Paba, Dubourdieu, Grandsire, Blanche, Soulier, Laffont et Arnal,
Pour leur accueil chaleureux et pour m'avoir transmis la passion de leur métier.

A Vincent,
Avec une pensée pour la fin de G2E ...

A Camille,
Pour tous ces fous rires de prépa qui m'en feront garder des souvenirs impérissables,

Au Docteur Ribot,
Pour ces pauses café derrière chez Richard.

A Stéphanie, Mélinda, Antony, Mathilde, Marion, Christelle, Claire-Lyse, Amandine et les autres,
Pour ces années d'école inoubliables.

A mes colocataires semi-belge et québécois et à toute l'équipe de la clinique équine de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Saint Hyacinthe
Pour leur accueil chaleureux et ce semestre fantastique.

A David, Nick, Roger, Richard, Syd, Jimmy, Robert, John Paul et John
Pour tous ces bons moments.

Et à tous ceux que j'oublie et sans qui je n'en serais pas là.

« Les genêts, doucement balancés par la brise,
Sur les vastes plateaux font une houle d'or ;
Et, tandis que le pâtre à leur ombre s'endort,
Son troupeau va broutant cette fleur qui le grise ;

Cette fleur qui le fait bêler d'amour, le soir,
Quand il roule des hauts des monts vers les étables,
Et qu'il croise en chemin les grands bœufs vénérables
Dont les doux beuglements appellent l'abreuvoir ;

Cette fleur toute d'or, de lumière et de soie,
En papillons posée au bout des brins menus,
Et dont les lourds parfums semblent être venus
De la plage lointaine où le soleil se noie....

Certes, j'aime les prés où chantent les grillons,
Et la vigne pendue aux flancs de la colline,
Et les champs de bleuets sur qui le blé s'incline,
Comme sur des yeux bleus tombent des cheveux blonds.

Mais je préfère aux prés fleuris, aux grasses plaines,
Aux coteaux où la vigne étend ses pampres verts,
Les sauvages sommets, de genêts recouverts,
Qui font au vent d'été de si fauves haleines.

Vous en souvenez-vous, genêts de mon pays,
Des petits écoliers aux cheveux en broussailles
Qui s'enfonçaient sous vos rameaux comme des cailles,
Troublant dans leur sommeil les lapins ébahis ?

Comme l'herbe était fraîche à l'abri de vos tiges !
Comme on s'y trouvait bien, sur le dos allongé,
Dans le thym qui faisait, aux sauges mélangé,
Un parfum enivrant à donner des vertiges !
[...] »

François Fabié, *Les Genêts*.

Sommaire

1	La sensibilité bactérienne aux antibiotiques : problématiques, mesures et applications .	13
1.1	Critères de mesure de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques	14
1.1.1	La concentration minimale inhibitrice (CMI)	14
1.1.2	Méthode en milieu solide par mesure du diamètre des cercles d'inhibition	16
1.1.3	Autres indicateurs pertinents de sensibilité bactérienne in vitro.....	19
1.1.4	Limites de ces indicateurs	20
1.2	Notion de cut-off et approches utilisées par les organismes normatifs pour fixer les breakpoints	21
1.2.1	Définitions	21
1.2.2	Cut-Off épidémiologique	22
1.2.3	Cut-Off cliniques.....	23
1.2.4	Cut-off pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD)	25
1.3	Détermination des breakpoints de l'antibiogramme.....	28
1.3.1	Détermination des breakpoints utilisés en médecine humaine.....	29
1.3.2	Détermination des breakpoints utilisés en médecine vétérinaire	30
1.4	Les différentes approches pour la détermination d'un cut-off PK/PD de l'amoxicilline chez le porc	34
1.4.1	Détermination des cut-off PK/PD	34
1.4.2	Le porc, une espèce cible de l'amoxicilline	40
1.4.3	L'amoxicilline	41
1.5	Conclusions	53
2	Partie expérimentale réalisée à l'UMR 181 INRA, ENVT	54
2.1	Matériel et méthodes	54
2.1.1	Collections de données pharmacocinétiques.....	54
2.1.2	Analyse des cinétiques plasmatiques de l'amoxicilline chez le porc par une approche conventionnelle (analyse individuelle et calcul des paramètres statistiques à partir des estimations des paramètres pharmacocinétiques individuels).....	62
2.1.3	Analyse de population des cinétiques de l'amoxicilline chez le porc.....	62
2.2	Détermination des valeurs-seuils.....	76
3	Résultats des simulations de Monte Carlo et discussion.....	77
3.1	Résultats.....	77
3.2	Discussion.....	83
	Références	90
	Annexes	97
	Table des illustrations.....	116

Introduction

Les antibiotiques dédiés à l'usage vétérinaire sont devenus des éléments majeurs et irremplaçables de l'arsenal thérapeutique.

Toutefois, leur emploi à large échelle en élevage a rapidement conduit à une diminution de la sensibilité bactérienne par sélection de résistances acquises.

Ce phénomène, rendu préoccupant par le peu de découvertes de nouvelles substances antibiotiques impose une rationalisation de l'usage des antibiotiques actuellement commercialisés, que ce soit dans le cadre de la médecine humaine ou vétérinaire. Cela a donné naissance aux concepts d'usage prudent, d'usage responsable, d'usage raisonné ou encore d'usage durable des antibiotiques avec la rédaction d'un ensemble de recommandations de bonnes pratiques par différentes organisations internationales (OMS, FAO, OIE, EMEA, FDA, VICH...) ou professionnelles comme l'association International Pig Veterinary Society.

Un usage raisonné des antibiotiques en première intention chez les animaux de production doit se baser sur des données épidémiologiques c'est-à-dire une connaissance *a priori* des germes impliqués et de leur sensibilité aux différents antibiotiques. C'est la raison pour laquelle on parle d'antibiothérapie probabiliste. En France, ces données sont collectées et mises en forme par l'AFSSA dans le cadre du réseau RESAPATH. Par opposition, une antibiothérapie de seconde intention encore dite antibiothérapie dirigée doit se fonder sur la connaissance du germe responsable de l'infection et de sa sensibilité aux différents antibiotiques ce qui nécessite la réalisation d'un antibiogramme.

L'interprétation d'un antibiogramme rend indispensable le recours à des indicateurs quantitatifs standardisés de la sensibilité bactérienne. Le plus usité est la concentration minimale inhibitrice ou CMI (cf infra). La CMI, exprimée en µg/mL, n'est guère utilisable par un prescripteur ; et pour exploiter sur le terrain les résultats d'un antibiogramme de façon opérationnelle, il convient de les exprimer qualitativement en fixant des classes (sensible, intermédiaire et résistant) permettant de faire un choix rationnel d'un traitement antibiotique sur le germe concerné.

Ces limites de ces classes, appelées valeurs-seuils ou breakpoints (voir définition page 28), ont été déterminées historiquement chez l'homme, en suivant différentes approches conduisant à des valeurs différentes selon les pays. Aujourd'hui un processus d'harmonisation des valeurs européennes est en cours pour la médecine humaine sous l'égide de l'EUCAST. En revanche, aucune initiative équivalente n'existe en médecine vétérinaire et les valeurs les

plus communément utilisées pour les animaux, notamment en France, sont celles de la médecine humaine ; à ce titre, les breakpoints utilisés en médecine vétérinaire ne tiennent pas compte des spécificités animales en termes de distribution des CMI, de pharmacocinétique et de schémas posologiques des antibiotiques. Pire encore, dans le cas de substances uniquement utilisées en médecine vétérinaire, les breakpoints sont simplement copiés des valeurs établies chez l'homme pour des antibiotiques de la même classe. Ces valeurs de breakpoint pour les antibiogrammes utilisés en médecine vétérinaire peuvent être complètement inadaptées ; à titre d'exemple, le CLSI (anciennement nommé NCCLS) donne pour l'ampicilline un breakpoint pour les *Enterobacteriaceae* de 8.0µg/mL (limite supérieure de la classe sensible), alors que le pic de concentration sérique chez le chien est à environ 3.6µg/mL avec un dosage standard de 11mg/kg ; ce breakpoint est inadapté car il est établi que l'efficacité de l'ampicilline sur des germes à Gram négatif nécessite d'être au dessus de la CMI pendant environ 80% de l'intervalle de dosage (Walker, 2006).

Par ailleurs, l'existence, en parallèle de ces « breakpoints », de « cut-off » cliniques et épidémiologiques (voir pages 22 et 23) dont la définition et l'usage varient d'une organisation normative à une autre ajoute de la confusion à l'interprétation d'un antibiogramme ; par exemple, le comité vétérinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) donne des « cut-off » épidémiologiques spécifiques aux espèces animales mais qui ne servent pas de « breakpoint », ces derniers étant ceux fixés pour l'homme. Les Tableau 1 à Tableau 5 (pages 32 et 33) montrent à titre d'exemple l'hétérogénéité des valeurs des breakpoints proposés pour l'ampicilline par différentes organisations normatives en Europe. Cette situation rend difficilement compréhensible ce qu'apporte réellement un antibiogramme pour le prescripteur et on comprend pourquoi la spécificité, la sensibilité, les valeurs prédictives positives ou négatives ainsi que le gain diagnostique ne sont jamais rapportés pour les antibiogrammes contrairement à d'autres tests diagnostiques comme ceux de la biologie clinique.

Notre étude vise à démontrer la faisabilité d'établir des cut-off des indices PK/PD par une approche dite de Monte Carlo. Un indice PK/PD est un critère capable de prédire l'efficacité bactériologique et clinique d'un antibiotique. Ils sont au nombre de trois (AUC/CMI, Cmax/CMI et T>CMI) et nous les présenterons dans le chapitre 1.2.4. Compte tenu de la grande difficulté actuelle d'établir des cut-off cliniques en médecine vétérinaire, le VAST qui est le comité vétérinaire du CLSI a repris les idées de l'EUCAST consistant à faire appel aux cut-off PK/PD pour l'aide à la décision dans la fixation des breakpoints vétérinaires. Pour

illustrer cette possibilité, nous avons pris comme sujet d'étude le cas de l'amoxicilline chez le porc. L'usage des antibiotiques chez le porc est le plus souvent collectif notamment en cas de métaphylaxie et de prophylaxie ; cela rajoute un facteur à prendre en compte impérativement dans la fixation des breakpoints, qui est l'importante variabilité interindividuelle des expositions à l'antibiotique ce que les indices PK/PD peuvent prendre en compte explicitement.

Dans une première partie de notre travail de thèse, nous rappellerons les méthodes de mesure de la sensibilité bactérienne et les approches utilisées dans la détermination des valeurs seuils (breakpoints et cut-off) ainsi que les principes des approches dites de Monte Carlo. Dans une deuxième partie, nous présenterons les données expérimentales utilisées, les méthodes d'analyse de ces données (analyse de population et simulations de Monte Carlo). Les résultats obtenus et leur discussion feront l'objet de la troisième partie de notre thèse.

1 La sensibilité bactérienne aux antibiotiques : problématiques, mesures et applications

Le bon usage des antibiotiques en médecine, nécessite d'estimer, chez un patient donné (médecine humaine ou médecine vétérinaire individuelle) ou pour un groupe de sujets (médecine vétérinaire collective), les chances relatives de guérison d'une infection avec différents antibiotiques. C'est le premier usage d'un antibiogramme que d'orienter le prescripteur à faire un choix raisonné de l'antibiotique et c'est pour ce seul usage que les breakpoints sont fixés. En pratique, les antibiogrammes sont également utilisés rétrospectivement en médecine vétérinaire pour réaliser des enquêtes épidémiologiques ; on sait que l'utilisation des antibiotiques, même raisonnée, s'accompagne inévitablement de l'apparition de souches bactériennes résistantes par un effet de sélection ; il convient donc de réaliser un suivi à grande échelle de l'émergence de souches bactériennes résistantes afin de pouvoir réévaluer en temps réel les pratiques médicales. Cela est actuellement réalisé en France par des méta-analyses des résultats des antibiogrammes obtenus dans le cadre du réseau RESAPATH qui publie annuellement un rapport sur les pourcentages de résistance des principaux germes d'intérêt vétérinaire. Pour les germes zoonotiques (salmonelles) et pour les bactéries sentinelles, les enquêtes sont prospectives et elles font appel à d'autres réseaux nationaux et/ou européens.

Il apparaît que l'antibiogramme a deux usages : un usage premier qui consiste à aider le prescripteur à sélectionner un antibiotique (ou plutôt à éliminer des antibiotiques pour cause de « résistance ») et un usage secondaire qui permet de faire une épidémiologie rétrospective sans avoir à supporter les coûts d'une approche plus solide sur le plan scientifique et qui consisterait à faire des plans d'échantillonnage prospectifs et à mesurer directement des CMI. Ces deux objectifs entretiennent une certaine confusion entre des objectifs uniquement épidémiologiques et des objectifs thérapeutiques qui doivent prendre en compte plusieurs facteurs dont les données épidémiologiques. C'est ainsi que la notion de résistance « épidémiologique » ne recouvre pas celle de résistance « clinique ». De plus, l'usage des antibiogrammes pour faire de l'épidémiologie souffre de plusieurs critiques méthodologiques dont les plus importantes sont les biais d'échantillonnage et l'usage des diamètres d'inhibition plutôt que des CMI.

1.1 Critères de mesure de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques

La mesure de la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique repose essentiellement sur des mesures effectuées sur des cultures bactériennes *in vitro*.

1.1.1 La concentration minimale inhibitrice (CMI)

- **Définition**

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique capable, *in vitro*, d'empêcher une suspension limpide de 10^5 Unités Formant Colonies par millilitre de devenir trouble après 24h d'incubation à 37°C, l'apparition de cette turbidité correspondant à une multiplication d'un facteur 10 environ de la concentration en bactéries (Levison, 2004). Cette valeur est susceptible d'être influencée par des facteurs tels que le milieu, la taille de l'inoculum, la température ou le temps d'incubation, ce qui explique la nécessité de méthodes de détermination standardisées afin d'obtenir des résultats comparables (Andrews, 2001).

La CMI constitue l'indicateur le plus utilisé pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique, que ce soit dans des laboratoires de diagnostic pour évaluer la résistance d'un germe ou dans le cadre de recherches visant à évaluer *in vitro* l'activité d'une substance antibiotique.

Du fait de la variabilité de la sensibilité des souches bactériennes d'une même espèce (par exemple par acquisition de mécanismes de résistance) il est possible de décrire des distributions de CMI. Un premier clivage consiste à séparer une population bactérienne d'une même espèce en deux sous-population qualifiées respectivement de sauvage et de non sauvage ; la seconde correspond aux germes ayant mis en place des mécanismes de résistance et elle est séparée population de la sauvage par un cut-off épidémiologique estimé au sein d'organismes normatifs. On peut également décrire les phénomènes de résistance d'une population bactérienne par sa CMI₅₀ et sa CMI₉₀ qui sont respectivement la médiane et le neuvième décile des CMI de la population bactérienne étudiée.

- **Obtention**

Méthode sur milieu liquide

L'ensemencement est réalisé sur des milieux de cultures liquides contenant des concentrations décroissantes d'antibiotiques suivant une loi géométrique de raison 0.5.

On détermine alors par une méthode turbidimétrique la CMI du germe étudié comme la concentration la plus faible pour laquelle les bactéries ne se sont pas développées en 24h (voir Figure 1).

Les concentrations obtenues sont discontinues alors que le phénomène est supposé continu, d'où un biais de mesure par excès (CMI « vraie » $\leq$ CMI lue).

Ce type de méthode, initialement réalisé par une méthode de macrodilution (plus de 2mL de milieu de culture), a été remplacé par des méthodes de microdilution (moins de 500 μ L) et a été largement automatisé. Cependant, compte tenu de sa lourdeur, cette méthode est aujourd'hui peu utilisée en pratique dans les laboratoires d'analyse mais elle constitue la méthode de référence.

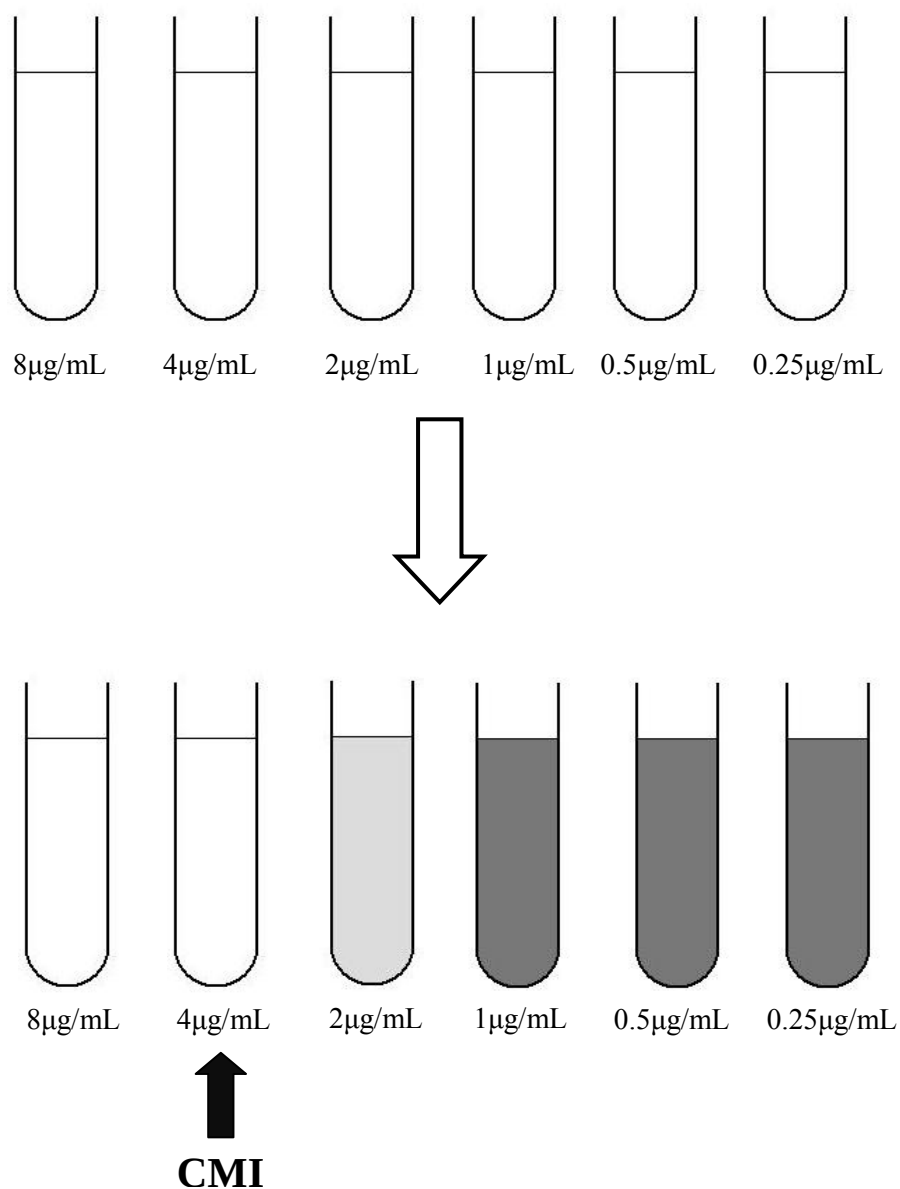


Figure 1 Schéma de la méthode de détermination de la CMI en milieu liquide
Les 6 tubes à essai contenant des concentrations décroissantes en antibiotiques sont ensemencés et mis à l'étuve pendant 24h. La CMI est alors déterminée par une méthode turbidimétrique comme la plus faible concentration en antibiotique ayant inhibé la croissance bactérienne.

1.1.2 Méthode en milieu solide par mesure du diamètre des cercles d'inhibition

La mesure des diamètres des cercles d'inhibition est la méthode la plus utilisée pour la mesure de la sensibilité bactérienne dans les laboratoires d'analyse. Elle consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'un antibiotique donné, sur un milieu de culture solide ensemencé. Il se forme alors un gradient de concentrations en antibiotique autour du disque de papier et la croissance bactérienne est bloquée jusqu'au diamètre où les concentrations du gradient sont égales ou supérieures à la CMI. Cela permet d'établir une corrélation entre ces diamètres d'inhibition sur les disques de gélose où les bactéries ne se développent pas en 24h et les CMI mesurées par une méthode de référence (existence d'une relation affine entre le diamètre de la zone d'inhibition et le logarithme de la CMI) (voir Figure 2).

Ce type de méthode, extrêmement rapide à mettre en œuvre, pose des problèmes d'interprétation des résultats et de leur expression en termes qualitatifs à cause du caractère imprécis de la relation liant les diamètres des disques d'inhibition aux CMI. En effet, on observe une importante variabilité des diamètres des disques d'inhibition pour des souches de mêmes CMI (voir Figure 3), de façon plus marquée chez les bactéries anaérobies que chez les bactéries aérobies (Metzler, et al., 1974). Cela a conduit à introduire de façon systématique pour l'expression qualitative des résultats de l'antibiogramme une catégorie intermédiaire et à classer fréquemment les bactéries sensibles en bactéries dites résistantes et cela, pour éviter un risque d'erreur qualifié de majeur, c'est-à-dire de déclarer à tort une bactérie réellement résistante comme étant sensible. La Figure 3 explique ce biais inéluctable dans l'expression des résultats d'un antibiogramme.



Figure 2 Photographie d'un antibiogramme réalisée par mesure des cercles d'inhibition (source : Wikipedia)

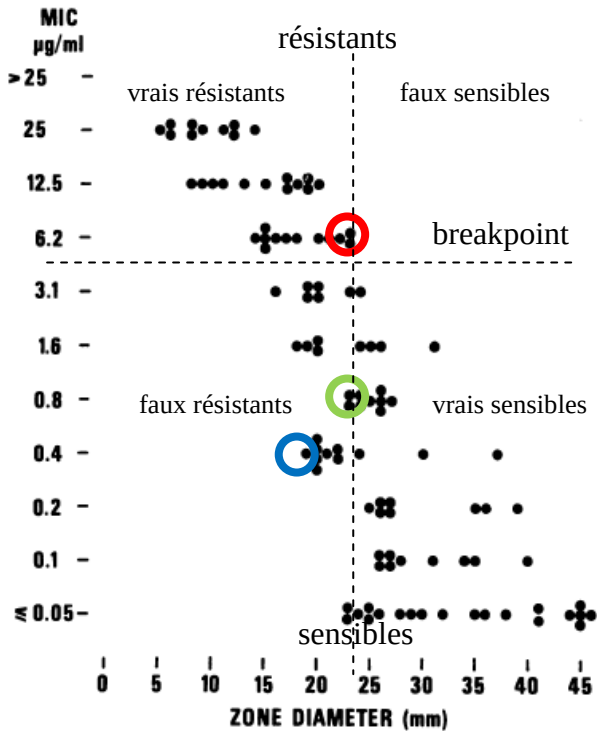


Figure 3a

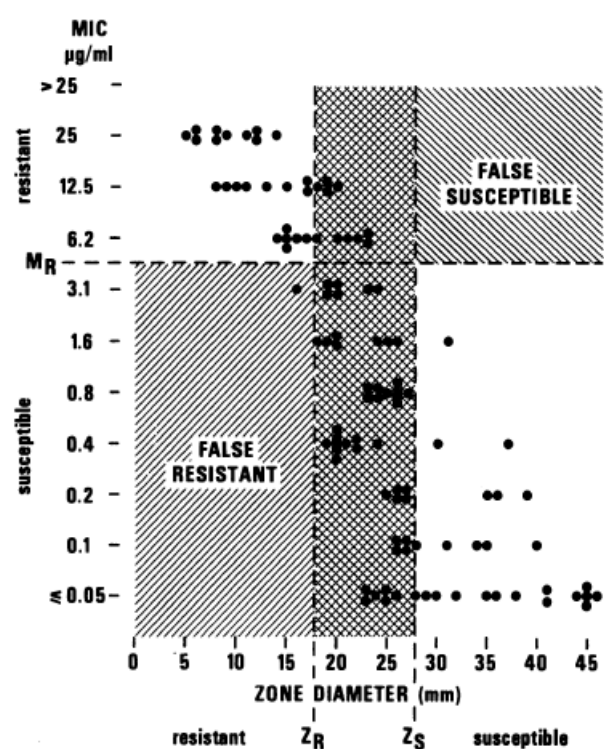


Figure 3b

Figure 3 Interprétation qualitative des résultats d'un antibiogramme (Metzler, et al., 1974)

La courbe de régression entre les CMI (en ordonnées) et les diamètres d'inhibition (en abscisses) appelée courbe de concordance va servir à délimiter les 3 classes qui serviront à donner au clinicien les résultats d'un antibiogramme en termes pratiques pour sa future prescription c'est-à-dire en sensible, intermédiaire et résistant.

Figure 3A : Pour cet exemple, on sait que les germes sont résistants pour des CMI supérieures à 3.1µg/mL; si on considère le germe entouré en vert qui est sensible et dont le diamètre d'inhibition est d'environ 24mm, on ne pourra pas le déclarer comme sensible au clinicien car pour ce même diamètre d'inhibition on retrouve des germes réellement résistants comme le germe entouré en rouge on va donc mettre la barre verticale de décision séparant les sensibles des non sensibles au niveau du plus grand diamètre d'inhibition rencontré chez les germes résistants. Cette décision a pour objectif d'éviter des erreurs dites « majeures » c'est-à-dire le risque de déclarer au clinicien un germe comme étant sensible alors qu'il est résistant ce qui est préjudiciable pour le patient. Le prix à payer pour éviter cette erreur majeure est de déclarer, sur cet exemple, de nombreux germes authentiquement sensibles (comme le germe entouré en bleu) comme étant résistants ; on parle ici d'erreur mineure car elle ne n'a pas les mêmes conséquences thérapeutiques pour le patient que la première.

Figure 3b : On voit l'intérêt pour l'exemple précédent d'ajouter une classe supplémentaire qualifiée d'intermédiaire et qui maintenant regroupe bon nombre de souches qui autrement auraient été déclarées résistantes. On dit alors au praticien que ce germe à sensibilité intermédiaire peut encore être traité avec l'antibiotique pour des doses maximales, ou encore si le germe se trouve dans des zones où l'antibiotique est en concentration plus élevée que dans le plasma.

Méthode en milieu solide par e-test

La méthode de détermination de la CMI par e-test utilise une languette graduée de papier imprégnée d'un antibiotique suivant un gradient connu et qui est déposée sur un milieu de culture ensemencé. On lit alors la valeur de CMI à la graduation correspondant à la limite de la zone d'inhibition de croissance de la bactérie étudiée. Cette méthode, plus onéreuse, n'est pas utilisée en médecine vétérinaire.

Problème d'homogénéité de données

L'absence de standard international au niveau des conditions de culture (taille de l'inoculum et nature du milieu de culture notamment (Kahlmeter, et al., 2006)) conduit à des résultats non comparables d'un pays à un autre. Par ailleurs, se pose le problème des bactéries nécessitant des conditions de cultures spécifiques (anaérobies strictes, mycoplasmes, ...) pour lesquelles les valeurs de CMI ne sont pas comparables à celles des bactéries étudiées sur les milieux de culture usuels. Cela dit, les organismes normatifs et les réseaux de surveillance (exemple : Resapath) imposent une méthode de culture et effectuent des contrôles.

1.1.3 Autres indicateurs pertinents de sensibilité bactérienne *in vitro*

- Concentration Minimale Antibactérienne (CMA)

La Concentration Minimale Antibactérienne est définie comme la plus petite concentration entraînant les premières modifications morphologiques ou physiologiques de la bactérie ou entraînant *in vitro* une diminution de 90% du nombre de microorganismes (Washington, 1979). Cet indicateur peut être évalué par la mise en évidence de changements morphologiques ou d'une variation dans la courbe de croissance de la population bactérienne, par exemple par une méthode turbidimétrique. De telles concentrations auraient un effet sur l'adhésion des bactéries aux surfaces épithéliales et augmenteraient leur sensibilité à être phagocytées, sans que toutefois des effets *in vivo* aient été clairement mis en évidence.

- Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide d'un antibiotique vis-à-vis d'un germe donné est la plus petite concentration capable d'inhiber *in vitro* la croissance bactérienne après sous-culture sur un milieu sans antibiotique (Andrews, 2001). Sa valeur est supérieure à celle de la CMI. Cet indicateur est moins fréquemment utilisé que la CMI mais il est souvent évalué dans le cadre d'hémocultures réalisées chez des patients souffrant d'endocardite.

Le rapport CMB/CMI permet de classer les antibiotiques suivant leurs caractères comme bactéricides (rapport proche de 1) ou bactériostatiques (rapport supérieur à 4) (Pankey, et al., 2004).

- Concentration Préventive de Mutants (CPM)

Elle correspond à la valeur de la CMI de la sous-population bactérienne la plus résistante d'une population et ne dérivant de la souche « sauvage » que par une seule mutation (Smith, et al., 2003). Etablie de façon similaire à la CMI mais avec un inoculum de taille plus importante (10^9 - 10^{10} UFC/mL), la CPM a une valeur toujours plus élevée que la CMI car en augmentant la taille de l'inoculum de 10^5 à 10^9 , on augmente la probabilité de mettre en culture des bactéries ayant mis en place leur premier mécanisme de résistance. En effet, toute population bactérienne présente des mutations spontanées avec un taux de fréquence de l'ordre de 10^{-8} , il est donc

nécessaire pour connaître la CMI de cette sous-population résistante de la rechercher sur de gros inocula, ce qui correspond aux situations cliniques ; lorsque l'infection s'est développée, ce n'est pas la CMI de la population dominante qu'il faut viser mais la CMI de la première sous-population résistante. La CPM permet de définir une fenêtre dite de sélection (des premiers résistants) comme étant l'intervalle de concentrations entre la CMI de la population initiale et la CPM, ce qui correspond à l'ensemble des concentrations d'antibiotique capables d'inhiber la croissance des souches les plus sensibles à un antibiotique mais pas des moins sensibles, d'où la sélection de ces dernières. Cette notion de fenêtre de sélection est surtout utilisée pour les quinolones dont les schémas thérapeutiques prennent en compte la CPM. La limite de cet indicateur est de ne pas être utilisable avec certaines classes d'antibiotiques, comme par exemple les β -lactamines, pour lesquelles le principal mécanisme de résistance efficace est l'acquisition de gènes codant pour une β -lactamase et non une mutation ponctuelle (Smith, et al., 2003).

1.1.4 Limites de ces indicateurs

L'ensemble de ces indicateurs sont établis *in vitro* dans des conditions statiques et ils ne reflètent pas les interactions hôte/pathogène, qu'elles soient spécifiques (le système immunitaire) ou non (réponse inflammatoire, hyperthermie etc.).

De même, ces indices sont obtenus avec des conditions de culture très éloignées des conditions pathologiques (Levison, 2004) :

- le milieu de culture ne contient pas de protéines, son pH est de 7.2 et la culture est réalisée dans des conditions aérobies, alors que les sites des infections sont fréquemment des milieux acides et anaérobies, et que la présence de protéines limite la quantité d'antibiotique libre.
- à l'exception de la CPM, ces indicateurs sont obtenus avec des inocula de tailles beaucoup plus faibles que ceux rencontrés *in vivo* : 10^5 UFC/mL dans les conditions normalisées de culture contre 10^8 à 10^{10} /g dans les sites d'infections cliniques. Des études ont montré un effet significatif de la taille de l'inoculum pour les β -lactamines avec des bactéries possédant une β -lactamase pouvant être active contre la substance étudiée (Turnidge, 1998).

- *in vitro*, les bactéries sont étudiées en phase de croissance exponentielle, plus favorable à l'action des antibiotiques, alors qu'*in vivo* elles ne sont plus en phase de croissance.
- dans les conditions de culture, les bactéries sont à l'état planctonique, alors que la présence de bactéries au sein de biofilms a été mise en évidence dans de nombreux contextes cliniques (exemple : contamination des sondes urinaires) et que sous cette forme, les bactéries peuvent présenter une sensibilité aux agents antibiotiques très nettement diminuée (ex. : résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à la tobramycine et de *Staphylococcus epidermidis* à la vancomycine augmentées d'un facteur 20 à 100) (Gilbert, et al., 1990).

Bien qu'étant des indicateurs répétables de la sensibilité aux antibiotiques et bien que fournissant des mesures de concentration pouvant être comparées à celles observées *in vivo* (Turnidge, 1998), ils ne sont pas suffisants pour évaluer la sensibilité d'un germe *in vivo*, ce qui conduit à la nécessité de critères permettant de remettre en perspective ces données purement microbiologiques.

1.2 Notion de cut-off et approches utilisées par les organismes normatifs pour fixer les breakpoints

* Nous avons décidé de conserver les termes anglais de cut-off et breakpoint pour ne pas rajouter à la confusion actuelle en matière de terminologie (y compris dans la littérature de langue anglaise) celle qui pourrait naître d'une traduction non consolidée en français (terminologie utilisée par le CLSI et reprise par Schwarz (Schwarz, et al.)). Le terme de breakpoint est uniquement utilisé pour les valeurs-critiques retenues pour l'antibiogramme

1.2.1 Définitions

Un cut-off est un critère interprétatif qui est utilisé dans des contextes différents (épidémiologie, clinique ou PK/PD) : il correspond à une valeur de CMI (pour les cut-off épidémiologique et clinique) ou à la valeur numérique de l'un des trois indices PKPD retenu (voir plus loin). Ces cut-off sont pris en compte par les organismes normatifs pour fixer les breakpoints des antibiogrammes en termes de CMI. Le clinicien n'a pas à connaître ces cut-

off et seul le(s) breakpoint(s) fait (font) l'objet de publications par les organismes normatifs dont le CLSI nous servira d'exemple.

1.2.2 Cut-Off épidémiologique

A partir d'un ensemble de souches collectées sur une espèce bactérienne liée à l'indication thérapeutique de l'antibiotique étudié, la fonction de répartition des CMI est déterminée. Dans le cas où cette fonction de répartition est multimodale, les souches formant la sous-population dont les CMI sont les plus faibles sont définies comme « sauvages », et les autres comme « non- sauvages ». La sous-population « sauvage » correspond à des bactéries n'ayant pas acquis de mécanisme de résistance à l'antibiotique étudié alors que les « non-sauvages » correspondent à celles ayant acquis un mécanisme de résistance (cas où la résistance complète est acquise en une seule étape : mutation ou acquisition d'un plasmide) ou celles présentant une réduction notable de leur sensibilité (cas où la résistance est acquise en plusieurs étapes) (Turnidge, et al., 2007). Le cut-off épidémiologique (ou bactériologique) est la valeur-seuil qui sépare ces deux sous-populations bactériennes (voir Figure 4).

N'étant qu'un critère purement épidémiologique, il n'a pas d'application clinique directe (Bywater, et al., 2006) mais permet de détecter et de quantifier l'acquisition de mécanismes de résistance dans une population bactérienne, et donc de réaliser un suivi épidémiologique des résistances bactériennes à différentes échelles (laboratoire, région, pays, ...). La notion de résistance clinique et de résistance bactériologique ne sont donc pas synonymes. Une souche qualifiée de résistante sur le plan épidémiologique peut être cliniquement sensible et vice versa.

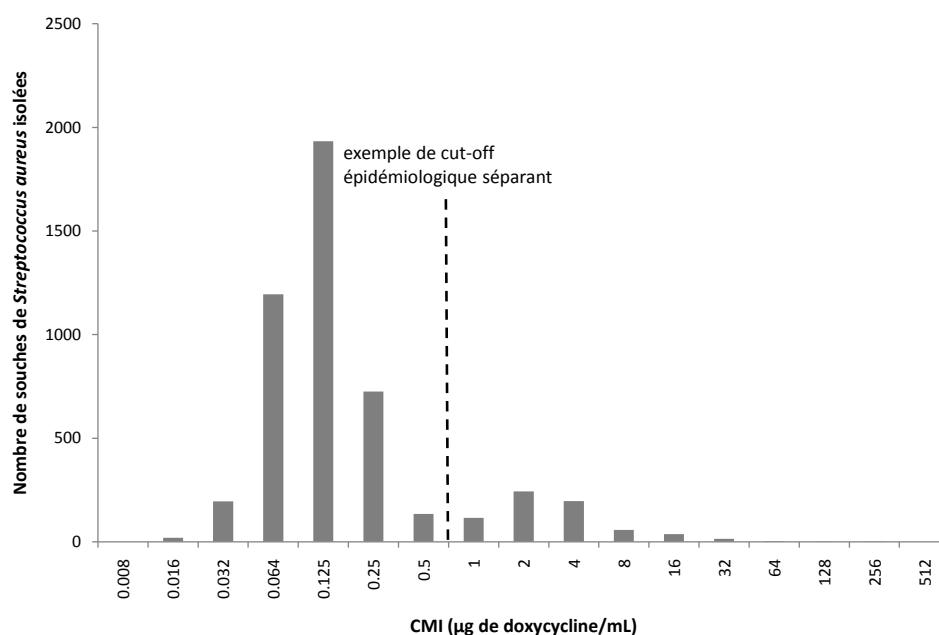


Figure 4 Histogramme des CMI observées chez *Staphylococcus aureus* pour la doxycycline (EUCAST) et exemple de cut-off épidémiologique.

On remarquera la distribution bimodale pouvant laisser penser à l'acquisition d'un mécanisme de résistance. On pourrait imaginer un cut-off épidémiologique séparant les deux sous-populations (trait en pointillés).

1.2.3 Cut-Off cliniques

Le cut-off clinique est défini comme la CMI maximale associée à une probabilité de guérison (au sens large) satisfaisante (ex. : 90% des sujets) avec un schéma thérapeutique donné. Les valeurs des cut-offs cliniques ne sont déterminables que dans un contexte clinique et pour un schéma thérapeutique fixé (ex : dose, voie d'administration.... qui seront revendiqués ultérieurement par l'AMM) (voir Figure 5). Lors d'essais cliniques prospectifs, on doit évaluer les résultats de l'antibiothérapie en termes de guérison clinique, de guérison bactériologique... et ensuite mettre en relation ces critères de jugement clinique avec les CMI des pathogènes responsables de l'infection (Turnidge, et al., 2007). Dans beaucoup d'infections, on ignore *a priori* la nature du germe impliqué et il est recommandé de collecter un minimum de 500 isolats représentant toutes les espèces bactériennes sensibles susceptibles d'être traitées par l'antibiotique étudié ou de 100 isolats d'une même espèce (CLSI, 2006). Ces valeurs sont déterminées pour chaque site d'infection (abcès, infection

urinaire, pulmonaire, LCR, ...). Ce type d'étude s'apparente à l'évaluation de la relation dose-effet avec la CMI d'isolats représentatifs dans le rôle de la dose. Cette approche permet de définir la sensibilité clinique par la gamme des CMI des germes qui seront effectivement éradiqués par l'antibiotique avec son schéma posologique, pour des conditions cliniques qui relèvent de chaque espèce etc. Au contraire, un germe cliniquement résistant est celui qui ne peut pas être éradiqué par le schéma posologique en question, ce qui ne veut pas dire que ce germe est porteur de gène de résistance. Le cut-off clinique n'est donc pas un paramètre mais une variable dont la valeur est contextuelle et étroitement associée à un schéma posologique pour une indication précise. Actuellement ces cut-off ne sont pas déterminés en médecine vétérinaire.

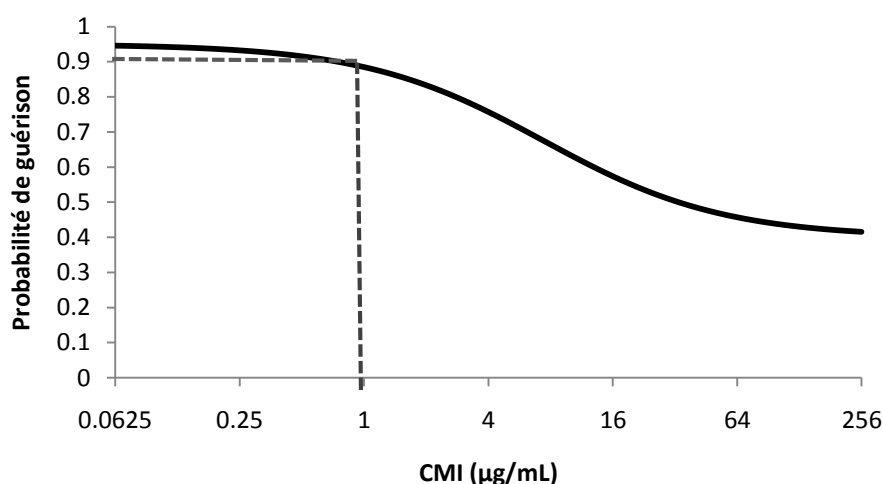


Figure 5 : Exemple fictif de relation entre la probabilité de guérison et la CMI du ou des agents pathogènes incriminés ; dans cet exemple fictif des germes responsables de l'infection étudiée ont été collectés et leurs CMI ont été comprises entre 0.0625 et 64µG/mL.

En utilisant un modèle de régression logistique, ces CMI ont été mises en relation avec les succès ou l'échec clinique correspondant. Ce modèle prévoit un pourcentage de succès thérapeutique de 90% pour une CMI de 1µg/mL, cette valeur indiquée par le trait pointillé peut servir de cut-off clinique. La probabilité de guérison d'environ 50% obtenue pour des CMI élevée n'est pas attribuable à l'action de l'antibiotique et correspondent à des guérisons spontanées.

1.2.4 Cut-off pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD)

Dans le cadre de l'antibiothérapie, des études prospectives chez l'animal de laboratoire ou rétrospectives chez l'homme, ont montré une corrélation entre des indicateurs tenant compte à la fois de la pharmacocinétique de l'antibiotique et de sa pharmacodynamie (les indices dits PK/PD) et les résultats cliniques (pourcentage de guérison, comptages bactériens etc.). Les indices PK/PD sont des indicateurs tenant à la fois compte de la concentration de l'agent antibiotique et de sa cinétique (par exemple dans le plasma, le lait ou l'urine) et d'un paramètre de sensibilité microbienne qui est la CMI (CLSI, 2006). Dans le cadre de l'antibiothérapie, ces indices PK/PD sont au nombre de trois (voir Figure 6):

- le temps passé au dessus de la CMI, qui est en général exprimé comme le pourcentage de l'intervalle de dosage pendant lequel la concentration plasmatique libre en antibiotique est supérieure à la CMI du pathogène,
- le $C_{\max}/CMI$, qui correspond au rapport du pic de concentration libre en antibiotique et de la CMI du pathogène
- l' AUC/CMI , qui correspond à l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques libres en antibiotique (souvent établie sur 24h à l'état d'équilibre de la CMI). On peut remarquer que la valeur de l' AUC est directement liée à la concentration moyenne en antibiotique sur l'intervalle de temps étudié. L'indice AUC/CMI reflète donc un rapport entre une concentration moyenne en antibiotique nécessaire par rapport à la CMI pour avoir un succès clinique ou une éradication bactériologique ; pour les quinolones par exemple, on estime qu'il faut des concentrations plasmatiques libres au moins égales à 5 fois la CMI de la population dominante.

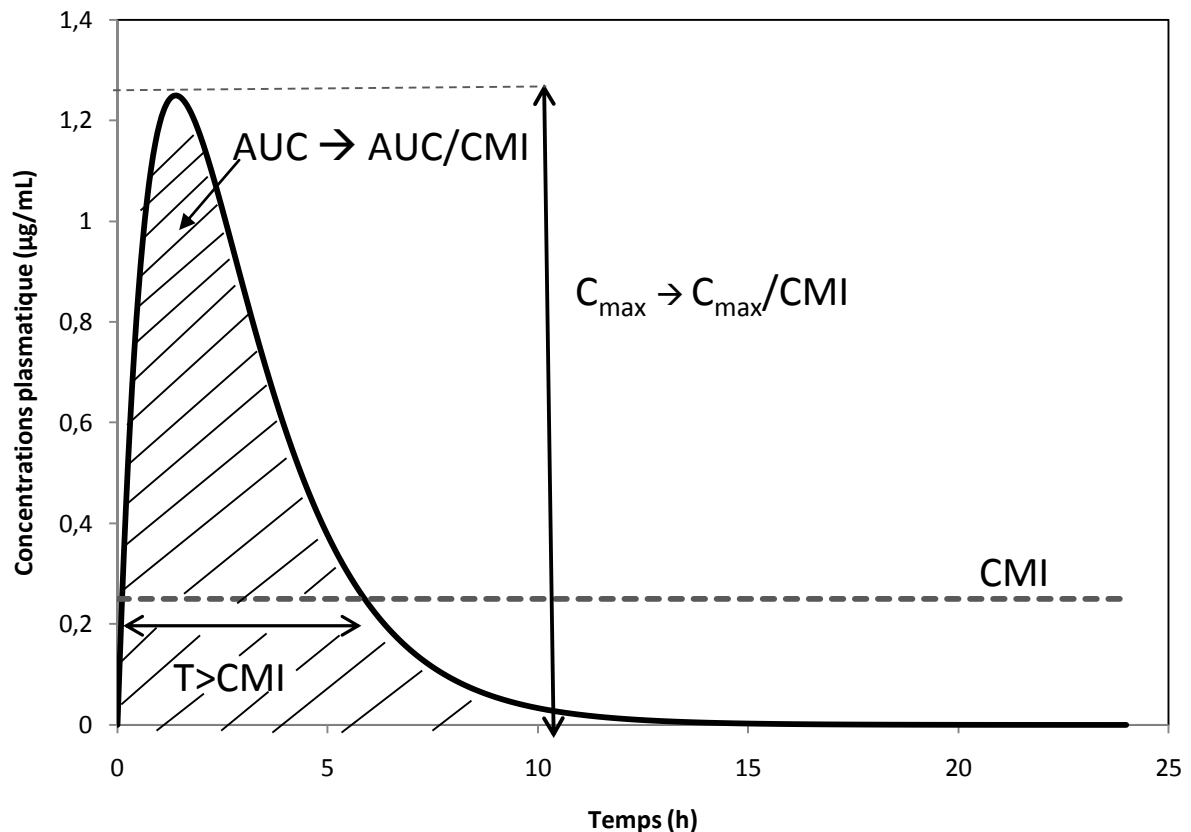


Figure 6 Illustration des indices PK/PD utilisés couramment pour les antibiotiques

La connaissance de la pharmacocinétique d'un antibiotique permet de définir les indices PK/PD $C_{\max}/CMI$, AUC/CMI et $T > CMI$: le pic des concentrations plasmatiques ($C_{\max}$) permet de définir l'indice $C_{\max}/CMI$, l'indice $T > CMI$ correspond au temps pendant lequel les concentrations plasmatiques sont supérieures à la CMI, et l'AUC, correspondant à la surface hachurée, permet de définir l'indice AUC/CMI .

Le choix de ces indices dépend de la famille d'antibiotiques étudié. Les antibiotiques temps-dépendants comme les β -lactamines ont une efficacité clinique corrélée au temps au dessus de la CMI, tandis que les antibiotiques concentration-dépendants ont une efficacité associée à l' AUC/CMI (cas des fluoroquinolones) ou au rapport $C_{\max}/CMI$ (cas des aminosides) (Craig, 1998, Frimodt-Møller, 2002, Lees, et al., 2006, Sanchez-Recio, et al., 2000).

Des valeurs-cibles de ces paramètres ont été déterminées de façon à ce que la probabilité de succès thérapeutique soit satisfaisante si ces valeurs étaient atteintes (Mouton, 2002) (cf. Figure 7). Il importe de remarquer que ces valeurs cibles, contrairement aux cut-off cliniques, sont génériques et, partant de là, extrapolables d'une espèce à une autre ; par exemple, quelle que soit l'espèce animale (rat, souris, homme et parfois espèces d'intérêt

vétérinaire) il faudra atteindre les valeurs-cibles communément retenues pour atteindre une probabilité de guérison satisfaisante (généralement 90%) ; elles sont :

- pour le rapport AUC/CMI supérieur à 125h, ce qui signifie que le succès thérapeutique est hautement probable si la concentration plasmatique moyenne de l'antibiotique sur l'intervalle de dosage est supérieure à cinq fois la CMI. Compte tenu des unités de l'AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$) et de celle de la CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), le rapport AUC/CMI a des heures pour unité ce qui ne facilite pas la compréhension de l'expression de cette valeur cible ; en fait, si l'on divise la valeur de l'AUC par l'intervalle de temps sur lequel elle a été calculée (ici 24h), on obtient la concentration plasmatique moyenne sur cet intervalle de temps. Le rapport AUC/CMI supérieur à 125h avec un intervalle de dosage de 24h s'interprète donc comme un rapport de la concentration plasmatique moyenne sur 24h et de la CMI supérieur à $125\text{h}/24\text{h}\approx 5$ (Toutain, et al., 2007).
- Pour le rapport C_{max} /CMI la valeur cible doit être au moins de 10 (Craig, 1998)
- Pour le temps au-dessus de la CMI, la valeur cible doit être supérieure à 40% de l'intervalle de dosage (bactéries à Gram positif) ou 80 à 100% (bactéries à Gram négatif)(Craig, 1998).

Les cut-off PK/PD sont déterminés à partir de ces indices PK/PD. Ils correspondent aux CMI maximales permettant d'atteindre les valeurs-cibles précitées dans le cadre d'un schéma posologique établi.

Ils sont typiquement des valeurs obtenues dans le cadre d'essais précliniques. Cette approche implique une connaissance des paramètres pharmacocinétiques (obtenus en général chez des sujets sains en phase I du développement d'un médicament) et des paramètres pharmacodynamiques, ici la CMI du germe, afin de déterminer l'impact d'indicateurs mixtes PK/PD sur l'issue thérapeutique.

L'intérêt de ce type de démarche est d'être facilement transposable à une autre formulation, à un autre schéma posologique ou à une autre espèce animale, puisque ces critères sont hybrides c'est-à-dire construits sur des informations pharmacocinétiques (propres à chaque espèce) et pharmacodynamiques.

La limite de ce type de cut-off est de ne pas prendre en compte directement l'aspect clinique. Ils ne servent que de prédicteurs de la résistance clinique et non d'évaluateur.

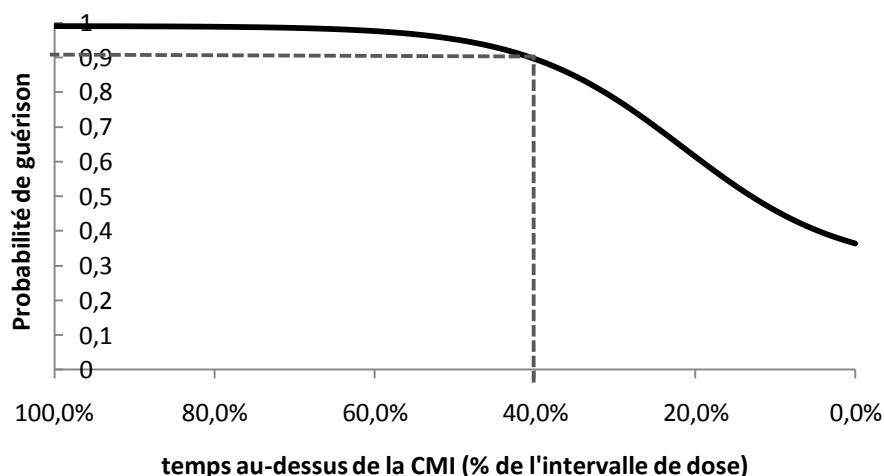


Figure 7 Exemple fictif de relation entre la probabilité de guérison et le temps pour lequel les concentrations plasmatiques de l'antibiotique sont au-dessus de la CMI. Les traits en pointillés montrent qu'à un temps au-dessus de la CMI de l'ordre de 40% de l'intervalle de dosage correspond une probabilité de guérison d'environ 90%.

1.3 Détermination des breakpoints de l'antibiogramme

Les breakpoints sont des valeurs numériques (1 ou 2) retenues pour restituer qualitativement au clinicien les résultats d'un antibiogramme en 2 ou 3 classes (sensible, intermédiaire et résistant) (Schwarz, et al., 2010). Ils prennent à la fois en compte l'aspect clinique (guérisons associées à l'antibiothérapie pour une CMI donnée) et les données épidémiologiques de l'agent pathogène incriminé, afin que le breakpoint ne coupe pas en deux une sous-population sauvage (Turnidge, et al., 2007). Les breakpoints sont fixés par un comité d'experts. Selon l'approche du comité vétérinaire du CLSI, le cut-off PK/PD doit servir de critère d'arbitrage entre le cut-off clinique (lorsqu'il est évalué) et le cut-off épidémiologique dans la décision du choix du breakpoint ; un arbre de décision a été proposé sur la façon de prendre en compte ces trois cut-offs (cf. Figure 8).

Les valeurs finales de breakpoints permettent de regrouper les bactéries en trois classes suivant la probabilité de succès thérapeutique qui serait observé suite à la mise en place d'une antibiothérapie avec le schéma posologique recommandé :

- « sensibles » : les souches bactériennes appartenant à cette classe sont associées une bonne probabilité de succès thérapeutique

- « sensibles intermédiaires » : cette classe peut être définie comme une classe « tampon » entre « sensible » et « résistante » permettant d'éviter les « erreurs majeures » c'est-à-dire de classer à tort une souche comme « sensible » (Turnidge, et al., 2007). Il est également admis que les souches appartenant à cette catégorie pourraient être correctement traitées si l'antibiotique se concentre au site de l'infection ou si des doses supérieures sont utilisées (EUCAST, 2000).
- les souches bactériennes classées « résistantes » sont des souches pour lesquelles la réponse thérapeutique est jugée insuffisante (Mouton, 2002). Le caractère « insuffisant » n'est guère explicité dans la littérature mais on trouve chez certains auteurs la règle du 90%/60% voulant dire qu'il y a succès si la probabilité de guérison au niveau d'une population est supérieure à 90% et qu'il y a échec si le taux de guérison est inférieur à 60%. Il est important de noter que le terme de « résistant » s'apparente à la notion de résistance clinique et non de résistance bactérienne. En d'autres termes, des bactéries ayant mis en place des mécanismes de résistance peuvent être considérées comme cliniquement sensibles si l'antibiotique est capable de les éradiquer au schéma posologique recommandé.

1.3.1 Détermination des breakpoints utilisés en médecine humaine

- CLSI (anciennement NCCLS)

Le CLSI établit ses breakpoints pour l'antibiogramme humain selon une réflexion similaire à celle employée pour l'antibiogramme vétérinaire (cf. infra) tenant compte à la fois des connaissances épidémiologiques, cliniques et PK/PD.

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST)

A ce jour, il existe en Europe six comités fixant des valeurs de breakpoints : CA-SFM (France), BSAC (Royaume Uni), CRG (Pays BAS), DIN (Allemagne), NWGA (Norvège) et SRGA (Suède), auxquels il faut ajouter les pays utilisant les valeurs établies par le CLSI. Cette multiplicité des comités peut conduire à proposer des valeurs différentes de breakpoints, ce qui peut créer de grandes confusions dans l'interprétation des antibiogrammes et dans les comparaisons internationales.

L'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) est un comité d'experts de l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) dont le but est d'harmoniser ces différentes valeurs de breakpoints utilisées en Europe.

Les breakpoints sont déterminés en tenant compte à la fois des données épidémiologiques d'une part et des données cliniques et PK/PD d'autre part :

- Une première étape consiste à déterminer la distribution des CMI de différentes espèces bactériennes en lien avec l'indication thérapeutique, ce qui permet de définir un cut-off épidémiologique pour la substance antibiotique dans l'indication thérapeutique étudiée.
- En parallèle, l'étude de données cliniques permet d'établir une relation du type dose/effet (ou indice_{PK/PD}/effet), ce qui permet de déterminer un cut-off PK/PD (éventuellement obtenu par une approche Monte Carlo).
- Le breakpoint est alors déterminé par consensus à partir de ces deux valeurs de cut-off en faisant en sorte de ne pas couper en deux la sous-population « sauvage » d'une espèce bactérienne majeure (Kahlmeter, 2004) afin d'éviter les problèmes d'interprétation. Si le cut-off clinique ou PK/PD est légèrement supérieur au cut-off épidémiologique, il peut être tout de même retenu comme breakpoint, quelques souches « sauvages » pourront alors être déclarées intermédiaires ou résistantes. Toutefois, si le cut-off épidémiologique est bien inférieur aux cut-offs clinique ou PK/PD, une approche plus conservatrice est appliquée et l'espèce bactérienne est considérée intermédiaire ou résistante (Turnidge, et al., 2007).

On remarquera que la notion de cut-off clinique n'est pas formellement utilisée par EUCAST.

1.3.2 Détermination des breakpoints utilisés en médecine vétérinaire

- *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI):*

En ce qui concerne la médecine vétérinaire, le comité vétérinaire du CLSI (VAST) retenait jusque récemment comme breakpoint pour les antibiogrammes des valeurs de cut-off épidémiologiques ou cliniques ; celles-ci devraient être déterminées sur la base d'une indication thérapeutique plutôt que pour un agent infectieux spécifique, excepté dans les cas où il existe des différences de sensibilité bactérienne cliniquement significatives entre les différents pathogènes associés à l'indication thérapeutique. Actuellement, sous l'impulsion de la Food and Drug Administration (FDA), l'organisme qui donne les Autorisations de Mise sur le Marché aux USA, le cut-off PK/PD est à prendre en compte notamment en cas de divergence importante entre les données épidémiologiques et cliniques.

Les valeurs des cut-off PK/PD, obtenues généralement par une méthode de Monte Carlo (cf. infra), servent d'aides à la décision dans le cas où les cut-off épidémiologique et clinique seraient différents ou lorsque l'on ne dispose pas de données cliniques. Le CLSI a ainsi établi un arbre décisionnel pour le choix des breakpoints (voir Figure 8).

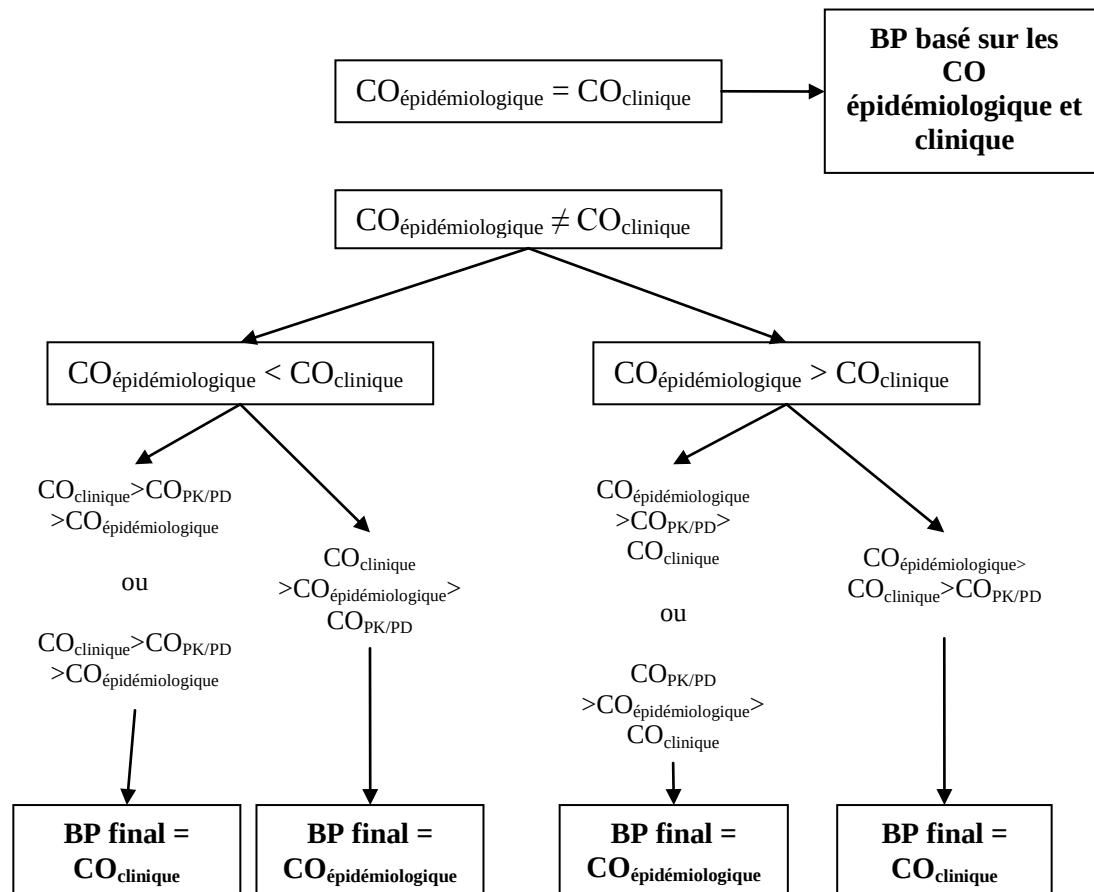


Figure 8 Arbre décisionnel proposé par le VAST du CLSI pour la détermination des breakpoints (CLSI 2006)

BP : breakpoint, CO : cut-off

- *EUCAST* : L'*EUCAST* n'a pas mis en place de breakpoints spécifiques aux espèces d'intérêt vétérinaire.
- En France, un groupe de travail « antibiogramme vétérinaire » a été constitué par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Ce groupe a établi des « valeurs-seuils » épidémiologiques pour différents antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire en se basant sur les données du réseau RESAPATH rassemblant

différents laboratoires d'analyses vétérinaires (CASFM, 2010). Ce sont donc des valeurs assimilables à des cut-off épidémiologiques sur les souches bactériennes d'intérêt vétérinaire et non de véritables breakpoints vétérinaires ; actuellement les prescripteurs vétérinaires, sans réellement le savoir, utilisent les breakpoints qui sont établis par le CA-SFM pour l'homme.

Tableau 1 Récapitulatif de valeurs de breakpoints utilisées en Belgique

	Sensible	Résistant
Enterobacteriaceae	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	$> 32\mu\text{g/mL}$
<i>Staphylococcus spp.</i>	$\leq 0.25\mu\text{g/mL}$	$> 5\mu\text{g/mL}$
<i>Streptococcus spp.</i>	$\leq 0.25\mu\text{g/mL}$	$> 8\mu\text{g/mL}$
Listeria	$\leq 2\mu\text{g/mL}$	
<i>Enterococcus spp.</i>	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	$> 16\mu\text{g/mL}$
<i>Pasteurella multocida</i>	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$> 4\mu\text{g/mL}$

Tableau 2 Récapitulatif de valeurs de breakpoints retenues par l'EUCAST

	Sensible	Résistant
Enterobacteriaceae		$> 8\mu\text{g/mL}$
<i>Enterococcus spp.</i>	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	$> 8\mu\text{g/mL}$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	$> 2\mu\text{g/mL}$
Autres <i>Streptococcus spp.</i>	$\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	$> 2\mu\text{g/mL}$
<i>Haemophilus influenzae</i>	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$> 1\mu\text{g/mL}$
<i>Moraxella catarrhalis</i>	$\leq 1\mu\text{g/mL}$	$> 1\mu\text{g/mL}$
Anaerobies (Gram+)	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	$> 8\mu\text{g/mL}$
Anaerobies (Gram -)	$\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	$> 2\mu\text{g/mL}$
Non spécifique de pathogène	$\leq 2\mu\text{g/mL}$	$> 8\mu\text{g/mL}$

Tableau 3 Récapitulatif de valeurs de breakpoints retenues par le CA-SFM

	Sensible	Résistant
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤4µg/mL	>8µg/mL
<i>Enterococcus spp.</i>	≤4µg/mL ¹	>8µg/mL ¹
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤0.5µg/mL	>2µg/mL
<i>Streptococcus spp.</i> (excepté <i>pneumoniae</i>)	≤0.5µg/mL	>2µg/mL
Pathogènes anaérobies stricts	≤4µg/mL	>8µg/mL

Tableau 4 Récapitulatif de valeurs de breakpoints retenues par le BSAC

	BSAC (Royaume Uni)	
	Sensible	Résistant
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>	≤8µg/mL	>16µg/mL
<i>Pasteurella multocida</i> ¹	≤1µg/mL	>1µg/mL
<i>Staphylococcus spp.</i> ^{1 2}	≤8µg/mL	>8µg/mL
<i>Enterococcus spp.</i>	≤8µg/mL	>8µg/mL
<i>Streptococcus</i> α-hémolytiques	≤1µg/mL	>1µg/mL
<i>Streptococcus</i> β-hémolytiques		

On notera l'existence de disparités plus ou moins importantes en fonction des espèces bactériennes (sources : British Society of Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, 2009), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2010), CA-SFM (CA-SFM, 2010) et documents transmis aimablement par P. De Backer)

¹ breakpoint de l'ampicilline, considérée comme représentative de la classe des aminopénicillines

² recommandations pour les organismes associés à des infections du tractus urinaire non compliquées

Tableau 5 Exemple de breakpoints retenus pour *Enterococcus spp.* par différents organismes normatifs européens

	Sensible	Résistant
Belgique	≤8µg/mL	>16µg/mL
EUCAST	≤4µg/mL	>8µg/mL
CA-SFM	≤4µg/mL	>8µg/mL
BSAC	≤8µg/mL	>8µg/mL

On notera la variabilité des valeurs suivant les organismes normatifs, rendant les comparaisons difficiles à l'échelle internationale.

Parallèlement aux organismes normatifs, des initiatives académiques ont proposé leurs propres valeurs de cut-off en se fondant sur les insuffisances de la situation actuelle ; c'est le cas de l'amoxicilline chez le porc qui fera l'objet de notre étude ; nous allons présenter l'approche de Schwarz qui est à l'origine de notre projet de travail de thèse.

Schwarz et al ont déterminé des valeurs de cut-off de l'amoxicilline vis-à-vis des principaux agents pathogènes rencontrés chez le porc (Schwarz, et al., 2008) grâce à une logique de raisonnement PK/PD. Cette étude est basée sur des études pharmacocinétiques publiées concernant des voies d'administration orales, intramusculaires et intraveineuses, avec des formulations différentes (Agerso, et al., 1998, Agerso, et al., 1998, Agerso, et al., 1998, Anfossi, et al., 2002, Hernandez, et al., 2005, Martinez-Larranaga, et al., 2004, Morthorst, 2002, Tanigawa, et al., 2003), et sur des CMI recueillies dans la littérature ou dans le cadre du programme allemand GERM-Vet (cf. Tableau 6 page 42).

1.4 Les différentes approches pour la détermination d'un cut-off PK/PD de l'amoxicilline chez le porc

1.4.1 Détermination des cut-off PK/PD

La détermination de la valeur d'un index PK/PD nécessite de sélectionner une valeur pour la dimension pharmacodynamique (toujours la CMI) et une valeur pour la dimension pharmacocinétique qui, dans le cas, de l'amoxicilline est le temps au dessus de la CMI sur l'intervalle de dosage. Pour des valeurs de CMI fixées, on évalue avec les données pharmacocinétiques si l'objectif PK/PD est ou non atteint. Ainsi on établit le cut-off PK/PD comme la plus grande valeur de CMI telle que l'objectif PK/PD soit atteint chez un pourcentage donné de sujets. Cette méthode peut être fondée sur des valeurs ponctuelles (moyenne, médiane, une valeur extrême...) des paramètres pharmacocinétiques ou bien sur l'ensemble des valeurs rencontrées dans une population par exemple par une approche de Monte Carlo.

1.4.1.1 Détermination des cut-offs PK/PD à partir de valeurs ponctuelles des paramètres pharmacocinétiques

Les cut-offs PK/PD peuvent être estimés à partir de deux types de valeurs ponctuelles :

- Les valeurs moyennes des paramètres pharmacocinétiques : on détermine la plus grande CMI telle que l'indice PK/PD calculé à partir des moyennes des paramètres pharmacocinétiques soit atteint (exemple : on calcule le rapport AUC/CMI à partir de la clairance moyenne).

Ce type d'approche permet d'obtenir de façon simple une valeur « moyenne » de cut-off PK/PD, mais elle ne prend pas en compte la variabilité interindividuelle, d'où la nécessité d'appliquer un facteur de sécurité pour couvrir toute la population.

- Les paramètres PK extrêmes : ceci correspond à une évaluation de l'efficacité minimale de la molécule (« pire des scénarii ») : on cherche à établir une valeur seuil minimale pour l'indice PK/PD en utilisant des valeurs pharmacocinétiques minorant l'effet du médicament, comme par exemple les plus grandes clairances.

Ce type d'approche ne tient pas compte de la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques ni de leurs covariances et elle peut conduire à des valeurs artificiellement élevées.

1.4.1.2 Détermination des cut-offs PK/PD à partir d'une distribution de paramètres pharmacocinétiques

Ce type d'approche s'oppose à l'estimation des index PK/PD par des valeurs ponctuelles et passe généralement par des méthodes dites de Monte Carlo.

1.4.1.3 Présentation générale des simulations de type Monte Carlo

Les méthodes de « Monte Carlo » regroupent des méthodes permettant d'obtenir des approximations numériques à partir de calculs basés sur des variables aléatoires auxquelles sont appliquées des méthodes déterministes (fonctions mathématiques).

De façon simplifiée, la méthode de Monte Carlo consiste à tirer au hasard les paramètres de départ (qui sont des variables aléatoires issues d'une distribution) et à calculer, grâce à une fonction connue la partie pharmacocinétique de l'index PK/PD. Par exemple, on va tirer au sort les valeurs des paramètres pharmacocinétiques qui permettent de calculer une cinétique plasmatique d'un animal fictif et on va calculer sur cet animal fictif le temps passé au-dessus de telle ou telle CMI (voir Figure 9 page 37); le processus répété des centaines, voire des milliers de fois, permet de construire une population virtuelle de patients dont les cinétiques plasmatiques sont authentiquement représentatives d'une population qui reste inobservable sur le plan expérimental. Bien entendu cette large population virtuelle n'a de sens que si les paramètres PK qui ont servi à la simuler sont eux-mêmes justes et précis.

Ces approches peuvent être qualifiées d'« expérimentales », dans le sens où les variables aléatoires peuvent être assimilées aux conditions initiales et les méthodes numériques aux techniques expérimentales (Hammersley, 1960). On parle de méthodes *in silico* au même titre que de méthodes *in vitro* ou *in vivo*.

Bien que des méthodes semblables aient été décrites auparavant, notamment l'expérience de l'aiguille de Buffon au XVIII^e siècle, ce type de méthodes n'a pu se développer que grâce à l'outil informatique et sa vitesse de calcul. Nicholas Metropolis, travaillant au laboratoire Los Alamos sous la direction de Von Neumann, fut le premier à véritablement développer cette approche dès 1947 (Metropolis, 1987). Ses travaux, portant sur la diffusion des neutrons au sein d'un noyau fissile, ne furent rendus possibles que par l'apparition du premier ordinateur électronique, l'ENIAC, Electronic Numerical Integrator Analyser and Computer, en 1946. Il publia avec Stanislas Ulam le premier article généralisant cette méthode en 1949 (Metropolis, et al., 1949).

Le terme de « Monte Carlo » employé par Ulam et Metropolis fait référence à Monaco et ses casinos et donc aux jeux de hasard. En effet, l'utilisation de données aléatoires est un élément-clé de ce type d'approche. En pratique, cela suppose l'emploi de générateurs de nombres (pseudo-) aléatoires capables de simuler de façon fiable des variables aléatoires suivant une loi donnée et ce, sans que se pose le problème de la période du générateur (Bonate, 2001).

Par ailleurs, ce type de simulation implique d'avoir des modèles statistiques valables, tant au niveau des fonctions de répartition des variables aléatoires utilisées comme variables explicatives qu'au niveau de la (des) fonction(s) déterministe(s) liant ces dernières à la (aux) variable(s) étudiée(s) (variable(s) expliquée(s)), faute de quoi les résultats seront nécessairement biaisés.

Ce type de simulation a d'abord été essentiellement utilisé dans des problèmes mathématiques où une approche purement analytique aurait été trop complexe à mettre en œuvre (physique nucléaire notamment) mais se sont progressivement démocratisées. En antibiothérapie cette méthode a été introduite par Drusano.

Aujourd'hui, les simulations de Monte Carlo sont couramment employées dans les domaines de l'industrie, des finances ou des assurances comme aide à la décision du fait de la possibilité d'étudier l'influence d'un événement sur les résultats de la simulation : on parle alors d'étude de scénario de type « what if ... ? » (« que se passerait-il si ... ? »).

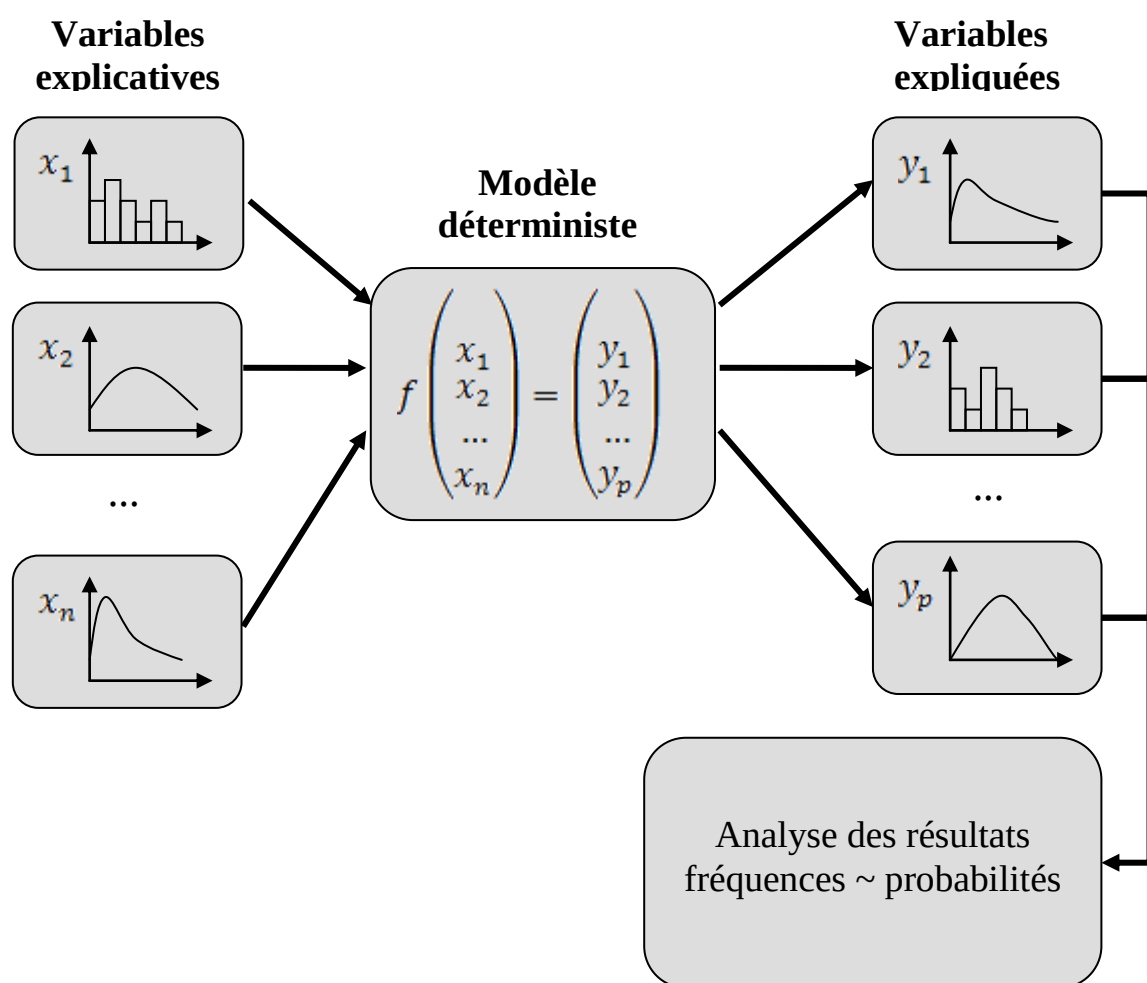


Figure 9 : Schéma de l'approche générale des méthodes Monte Carlo

Dans le cas de l'antibiothérapie, les variables explicatives qui serviraient aux simulations pourraient être par exemple les CMI des pathogènes rencontrés, la clairance de l'antibiotique utilisé et son volume de distribution. Une fonction déterministe permettrait alors par exemple de déterminer l'AUC/CMI. L'analyse statistique de ces indices PK/PD simulés pourrait permettre de déterminer une dose optimale.

1.4.1.4 Application des méthodes de Monte Carlo à la détermination de cut-offs PK/PD

Ce type de simulations peut servir à déterminer la fraction de la population atteignant un objectif PK/PD (Target Attainment Rate, TAR) donné, ce qui, appliqué à l'antibiothérapie, peut servir à déterminer le TAR en fonction de la CMI du germe isolé pour un antibactérien donné, et donc de déterminer une valeur seuil pour cette substance (Ambrose, et al., 2009).

Comme expliqué plus haut, ce modèle consiste à simuler par tirage au hasard un individu dans une population virtuelle, elle-même déterminée par les espaces des paramètres de population, et à déterminer, pour cet individu, la valeur de l'indice PK/PD pour une CMI donnée. En réitérant ce tirage un grand nombre de fois (ordre de grandeur : 1000) on obtient un échantillon d'indices PK/PD sensé être représentatif de la population. On peut alors déduire des index PK/PD la CMI maximale telle qu'une proportion suffisante de la population atteigne la cible PK/PD (Target Attainment Rate, TAR) (exemple : 95% de la population doit atteindre la cible PK/PD).

Cette méthode permet de prendre en compte la variabilité inter individuelle des paramètres pharmacocinétiques, mais est beaucoup plus lourde à mettre en œuvre. Elle nécessite une connaissance non biaisée et précise de ces paramètres, notamment leurs variances et covariances.

1.4.1.5 Autres exemples d'applications des méthodes de Monte Carlo dans le cadre de l'antibiothérapie

Dans le cadre de l'antibiothérapie, l'approche par simulation peut être poussée jusqu'à la détermination de la fonction de répartition des probabilités de guérison en fonction des CMI (Ambrose, et al., 2009).

Contrairement à l'approche classique par valeurs-seuils, cette méthode prend en compte les guérisons même associées à des indices PK/PD faibles.

Un tel indicateur permettrait un choix raisonné d'antibiothérapie dans le cas d'infection à bactéries multi-résistantes en mettant en avant la substance pour laquelle l'issue thérapeutique est la plus favorable (Mouton, 2002).

En médecine vétérinaire, ce type de simulations pourrait en outre permettre d'évaluer l'exposition individuelle dans le cadre de l'utilisation d'aliments médicamenteux employés notamment dans les filières porcine et avicole (Li, et al., 2008).

Toujours en médecine vétérinaire, les techniques de Monte Carlo ont été utilisées pour évaluer les TAR de la doxycycline chez le porc (Lees, et al., 2006) à partir des données de PK de population obtenues chez 215 porcs (Del Castillo et al., non publié).

En médecine humaine, les approches de type Monte Carlo peuvent également être utilisées pour réévaluer la dose et le schéma posologique d'un antibactérien déjà sur le marché à partir des connaissances acquises lors d'essais post-AMM (Montgomery, et al., 2001) ou à déterminer le cadre des phases de développement d'un médicament, notamment en phases I (détermination des premières doses chez l'homme à partir de données acquises chez l'animal) et II (Bonate, 2000). Pour l'évaluation ou la réévaluation des doses, la question à résoudre par simulation de Monte Carlo est : quelle est la dose de l'antibiotique qui permet d'atteindre l'objectif PK/PD chez 90% des sujets en prenant en compte les distributions des CMI données par les investigations épidémiologiques ?

Par ailleurs, ce type de méthode a permis d'évaluer et de comparer l'efficacité et le coût de différentes approches thérapeutiques, comme par exemple l'utilisation de la vancomycine à titre prophylactique chez les patients sous chimiothérapie immunodépressive (Penel, et al., 2009).

Enfin, ces simulations permettent également d'optimiser des essais cliniques (Bonate, 2000) et donc réduire leurs coûts : avoir un modèle simulant de façon fiable la population réelle est gage d'une bonne connaissance de la substance. Par ailleurs, les simulations de type « que se passerait-il si » permettent d'envisager des scénarii autres que ceux des phases de développement, ce qui permet par exemple d'évaluer l'impact d'une augmentation de 10% de la non-compliance, d'un changement d'indication thérapeutique, etc.

1.4.2 Le porc, une espèce cible de l'amoxicilline

Le porc est une espèce d'intérêt économique majeur représentant en France 36.2% de la consommation de viande avec 5.3 millions de tonnes équivalent carcasse, ce qui en fait la viande la plus consommée en France. La France est au troisième rang des pays producteurs de porc en Europe, avec 14.8 millions de têtes en 2007 (AgriMer, 2007). Les modes d'élevage contemporains en bandes conduisent à une antibiothérapie généralement de type métagylactique et prophylactique. Compte-tenu des contraintes liées aux modes d'élevage actuels, les traitements se font essentiellement par voie orale, soit par incorporation à l'alimentation, soit par incorporation à l'eau de boisson. La nature collective de ce type de traitement rend primordiale la prise en compte de la variabilité interindividuelle (en grande partie liée à la compétition inter-individus et à la différence de comportements alimentaires (Labroue, et al., 1993), dont les conséquences ne sont, en pratique, pas distinguables de la biodisponibilité).

La voie intramusculaire reste toutefois envisageable, par exemple dans le cas de traitement d'individus ciblés dans un lot ou pour les truies à l'attache.

Compte-tenu de l'importance des cheptels et des modalités de traitements, cette espèce est la plus grosse consommatrice d'antibiotiques en termes de masse de principes actifs avec 56.7% de la masse d'antibiotiques à usage vétérinaire vendus en France en 2008 (Chevance, et al., 2009).

Les marges réalisées par les éleveurs de porcs étant faibles, l'ajustement des posologies au plus juste est un critère important dans la mise en place d'un traitement.

Enfin et surtout, les enjeux de santé publique mettent cette espèce sous le regard inquisiteur du monde médical, qui, à juste titre, demande une rationalisation des pratiques d'antibiothérapie dans les filières agricoles et en particulier porcine.

Les principales affections d'origine bactérienne rencontrées dans cette espèce sont :

- la rhinite atrophique progressive due à *Pasteurella multocida*,
- la rhinite atrophique régressive due à *Bordetella bronchiseptica*,
- la bordetellose pulmonaire due à *Bordetella bronchiseptica*,
- la bronchopneumonie enzootique due à *Mycoplasma hyopneumoniae* (fréquemment compliquée par des opportunistes tels que *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Actinomyces pyogenes* ou *Streptococcus suis*)

- la pasteurellose due à *Pasteurella multocida*, rarement primaire, le plus souvent secondaire à une bronchopneumonie enzootique,
- la pleuropneumonie porcine due à *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

A cela s'ajoutent les pneumonies abcédatives résultant de la dissémination par voie hématogène d'infections primaires et les surinfections bactériennes de maladies respiratoires d'origine virale (Influenza, infection par le coronavirus respiratoire porcin) (Martineau, 1997). L'impact technico-économique de l'ensemble de ces maladies pulmonaires sur les marges des élevages porcins a été évalué respectivement à 0.52€ et 2.17€ par 100kg de porc produit, selon que l'élevage est moyennement ou sévèrement touché (Aubry, et al., 2010).

1.4.3 L'amoxicilline

1.4.3.1 Généralités

L'amoxicilline est un antibiotique de la famille des aminopénicillines d'origine semi-synthétique, actives sur les bactéries à Gram positif et certaines bactéries à Gram négatif.

Concernant les maladies respiratoires bactériennes du porc, les aminopénicillines possèdent *in vitro* une bonne activité vis-à-vis de pathogènes majeurs des voies respiratoires : *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, faisant de l'amoxicilline une molécule de choix pour le traitement des affections respiratoires d'origine bactérienne dans cette espèce. Toutefois il faut souligner que les β -lactamines sont inactives sur les infections à mycoplasmes et que les souches de *Bordetella bronchiseptica* peuvent présenter *in vitro* une résistance élevée aux aminopénicillines (Pijpers, et al., 1989).

Tableau 6 Récapitulatif de CMI d'amoxicilline observées chez le porc (d'après Schwarz (Schwarz, et al., 2008))

Bacteria	Time span	Country	Number of strains tested	MIC values (µg/ml)					MIC ₅₀	MIC ₉₀	Reference
				≤0.25	0.5	1	2	≥4			
<i>A. pleuropneumoniae</i>	1997–2004	Spain	229	28	154	10	3	34	0.5	≥64	Gutiérrez-Martín et al., 2006 ^a
	2002–2004	Switzerland	83	66	12	2	0	3	0.25	0.5	Matter et al. (2007)
	2004–2005	Germany	124	114	4	0	0	6	0.25	0.25	Wallmann (unpublished data)
<i>H. parasuis</i>	1998–2002	Denmark	52	0	0	52	0	0	1	1	Aarestrup et al. (2004)
	1995–2005	UK	30	22	3	1	1	3	0.5	1	Martín de la Fuente et al. (2007)
	2002–2004	Spain	30	6	2	2	2	17	16	≥32	Martín de la Fuente et al. (2007)
<i>B. bronchiseptica</i>	2000–2003	Germany	349	0	0	12	6	331	8	16	Kadlec et al. (2004)
	2002–2003	Germany	138	0	0	0	3	135	16	16	Wallmann et al. (2004)
	2004–2005	Germany	241	0	0	0	1	240	16	32	Wallmann (unpublished data)
<i>P. multocida</i>	2001	Germany	176	170	1	0	1	4	0.12	0.25	Wallmann et al. (2003)
	2002–2003	Germany	442	391	13	7	6	25	≤ 0.12	0.5	Wallmann et al. (2004)
	2004–2005	Germany	287	275	2	1	0	9	0.12	0.25	Wallmann (unpublished data)
	1987–1988	Spain	63	62	0	0	0	1	≤ 0.25	≤ 0.25	Yanedt et al. (2006)
	2003–2004	Spain	132	119	6	1	0	6	≤ 0.25	≤ 0.25	Yanedt et al. (2006)
<i>S. suis</i>	2004–2005	Germany	312	307	1	0	2	2	≤ 0.03	0.06	Wallmann (unpublished data)
	1999–2001	Spain	151	145	2	2	1	1	≤ 0.25	≤ 0.25	Vela et al. (2005) ^a

^a In these studies, susceptibility to amoxicillin (instead of susceptibility to ampicillin) was tested.

On constate que, alors que certaines espèces bactériennes comme *Pasteurella multocida* ont des valeurs de CMI₉₀ inférieures aux breakpoints couramment utilisés, d'autres présentent des valeurs bien plus élevée (ex. : *Bordetella bronchiseptica*)

1.4.3.2 Pharmacodynamie

Comme toutes les substances de la classe des β -lactamines, l'amoxicilline présente une activité antibactérienne de type bactéricide. Elles agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne en inhibant une étape de la réticulation du peptidoglycane en se liant de façon irréversible à des transpeptidases bactériennes appartenant à la famille des penicillin-binding-proteins. Cette liaison est rendue possible par la similitude stéréochimique entre le noyau β -lactame et le groupe fonctionnel D-Ala-D-Ala du pentapeptide (substrat usuel de ces transpeptidases) (Bryskier, 1999). Cette inactivation irréversible va conduire à un déséquilibre entre les transpeptidases et les autolysines bactériennes (enzymes autolytiques de la paroi), et entraîner une lyse de la bactérie sous l'effet de la pression osmotique intracellulaire (Hubschwerlen, et al., 2007). La lyse bactérienne semble plutôt associée à l'inactivation des PBP-1a et PBP-1b, tandis que l'inactivation préférentielle de la PBP-2 ou de la PBP-3 entraîne des anomalies morphologiques chez la bactérie (Riviere, et al., 2009).

L'extension du spectre d'activité des aminopénicillines à des bactéries à Gram négatif s'explique par leur capacité à traverser la membrane externe conférée par la présence d'un groupement aminobenzyl (Bryskier, 1999).

L'efficacité de la classe des β -lactamines a été corrélée au temps où la concentration plasmatique est supérieure à la CMI (Woodnutt, et al., 1999) : on parle d'antibiotique temps-dépendant. En effet une augmentation de la concentration plasmatique au-delà de la CMI de la bactérie impliquée n'entraîne pas d'augmentation de l'efficacité de l'antibiotique.

1.4.3.3 Pharmacocinétique

Absorption

Chez l'homme, l'amoxicilline administrée par voie orale, est absorbée au niveau de l'intestin grêle, en particulier au niveau du duodénum et du jéjunum (Barr, et al., 1994). La non-linéarité de son absorption a été mise en évidence chez l'homme (Paintaud, et al., 1992) et le rat (Torres-Molina, et al., 1992). Cela est dû au fait que l'amoxicilline peut être absorbée à la fois par des mécanismes de diffusion simple (non saturable) et par des mécanismes de transport saturables (normalement impliqués dans l'absorption des acides aminés). Par ailleurs, des études chez le porc ont mis en évidence une grande variabilité des biodisponibilités suite aux administrations de spécialités orales (moyenne $\pm$ sd) : $42\pm 10\%$ (Martinez-Larranaga, et al., 2004), respectivement $31\pm 15\%$ et $25\% \pm 8\%$ chez des porcs à jeun et des porcs nourris (Agerso, et al., 1998). Ces variations pourraient être expliquées par une dégradation de l'amoxicilline en milieu acide dans l'estomac ou par une dégradation enzymatique par la flore bactérienne digestive (Reyns, et al., 2008). Cette hypothèse d'une dégradation pré-systémique de l'amoxicilline est confortée par la présence d'acide amoxicilloïque (métabolite principal de l'amoxicilline) dans les urines en quantité significativement plus importante dans le cas d'une administration par voie orale que par voie intraveineuse chez le porc (Reyns, 2006), sachant qu'il a été montré que l'amoxicilline ne subissait pas d'effet de premier passage hépatique chez le rat (Chesa-Jimenez, et al., 1994).

Ces phénomènes de dégradations semblent être limités par des formulations galéniques adaptées : des expérimentations chez le porc ont montré une exposition statistiquement supérieure lors de l'administration de 50mg/kg de poids vif d'amoxicilline sous forme de microgranules par rapport à du trihydrate d'amoxicilline sous forme de poudre (respectivement $18.90 \pm 9.18 \mu\text{g.h/mL}$ et $12.11 \pm 2.40 \mu\text{g.h/mL}$), ainsi qu'une augmentation de la biodisponibilité (biodisponibilité relative de $153.9 \pm 58.2\%$) (Anfossi, et al., 2002).

Concernant la voie intramusculaire, la biodisponibilité de l'amoxicilline a été évaluée par Agerso à $111\% \pm 23\%$ pour une formulation classique et proche de 100% pour une formulation longue action (Agerso, et al., 1998). Rappelons ici que seule la fraction libre de l'antibiotique peut agir et que les indices PK/PD sont construits en prenant en compte les concentrations libres du plasma et non les concentrations totales mesurées.

Distribution tissulaire

Le taux de liaison aux protéines de l'amoxicilline a été évalué à $24 \pm 9\%$ dans le plasma et $21 \pm 13\%$ dans les sécrétions bronchiques chez des porcs sains (Agerso, et al., 1998). Des mesures similaires ont été effectuées chez des porcs infectés expérimentalement par *Actinobacillus pleuropneumoniae* et ont révélé des taux de liaisons aux protéines respectifs dans le plasma et dans les sécrétions bronchiques de $17 \pm 8\%$ et de $13 \pm 6\%$ (Agerso, et al., 1998). Les rapports des aires sous la courbe des concentrations observées respectivement dans les sécrétions bronchiques, la muqueuse bronchique, le tissu pulmonaire et les nœuds lymphatiques sur celle des concentrations plasmatiques sont de 0.33, 0.37, 0.39 et 0.68 (Agerso, et al., 1998).

Modèles cinétiques de la disposition de l'amoxicilline

Les cinétiques des concentrations plasmatiques d'amoxicilline chez le porc après une administration par voie intraveineuse ont été décrites comme suivant un modèle bi-compartimental (Martinez-Larranaga, et al., 2004) ou tri-compartimental (Reyns, et al., 2007).

Martinez-Larranaga a analysé des données de cinétiques plasmatiques d'amoxicilline suite à une administration *per os* avec un modèle à deux compartiments et une absorption du premier ordre (Martinez-Larranaga, et al., 2004).

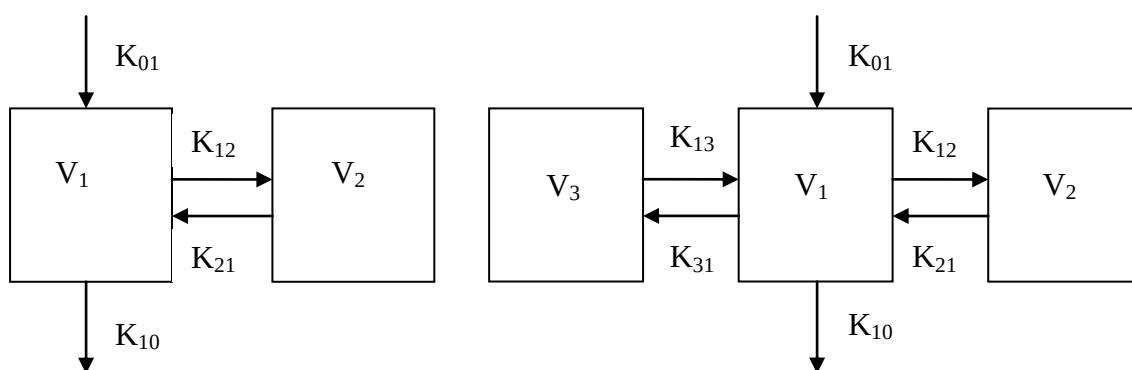


Figure 10 : Représentation schématique de modèles bi- (à gauche) et tricompartimentaux (à droite) ayant été utilisés pour décrire la disposition de l'amoxicilline chez le porc.

Dans les deux modèles il existe un compartiment central de volume noté V1 à partir duquel se fait l'élimination de la substance selon un processus de premier ordre représenté par la flèche notée K₁₀ ; l'entrée de l'antibiotique se fait dans le compartiment central à partir du site d'administration selon une cinétique de

premier ordre représentée par la flèche notée K01 ; les échanges entre le compartiment périphérique (modèle bicompartimental) ou les deux compartiments périphériques (modèle tricompartimental) se font par des processus de premier ordre représentés par les flèches K12, K21, K13 et K31. Il s'agit de modèles simples décrivant l'organisme en 2 ou 3 grands secteurs caractérisés par les vitesses d'équilibration de la substance.

L'existence de ces deux modèles pour la même substance peut s'expliquer par les différences de techniques analytiques, de modalités d'administration et de posologies réalisées, ce qui a eu des répercussions sur la durée sur laquelle les cinétiques plasmatiques sont mesurées. En effet, ces modèles sont déterminés par les données observées et ils se décrivent par des sommes d'exponentielles. Si une seule exponentielle décrit correctement les données, le modèle sera dit monoexponentiel et il sera interprété comme un modèle monocompartimental ; si 2 exponentielles sont nécessaires pour décrire les données, le modèle sera interprété comme étant à 2 compartiments et ainsi de suite. Selon les performances des techniques analytiques, la dernière phase peut ne pas être observable si la limite de quantification est trop haute ou si l'intervalle de temps sur lequel l'expérience est réalisée est insuffisant (voir Figure 2 page 47) ce qui fait que la dernière exponentielle n'est pas vue et un vrai modèle tricompartimental sera décrit comme un modèle bicompartimental. Cela peut conduire à des estimations très différentes pour certains paramètres pharmacocinétiques, en particulier pour le temps de demi-vie plasmatique qui est toujours mesuré sur la phase terminale. En revanche, d'autres paramètres comme la clairance sont robustes vis-à-vis des limites de quantification des techniques analytiques. Pour ce qui est de notre problématique des indices PK/PD, les conséquences pratiques seront différentes selon les indices ; pour l'amoxicilline le temps de demi-vie de la phase terminale peut ou non avoir un impact majeur sur le temps passé au-dessus d'une CMI notamment si les concentrations plasmatiques observées dans la phase terminale de disposition de l'antibiotique sont proches de la CMI.

Les tableaux Tableau 7 à Tableau 9 regroupent des valeurs de paramètres pharmacocinétiques déterminées chez le porc.

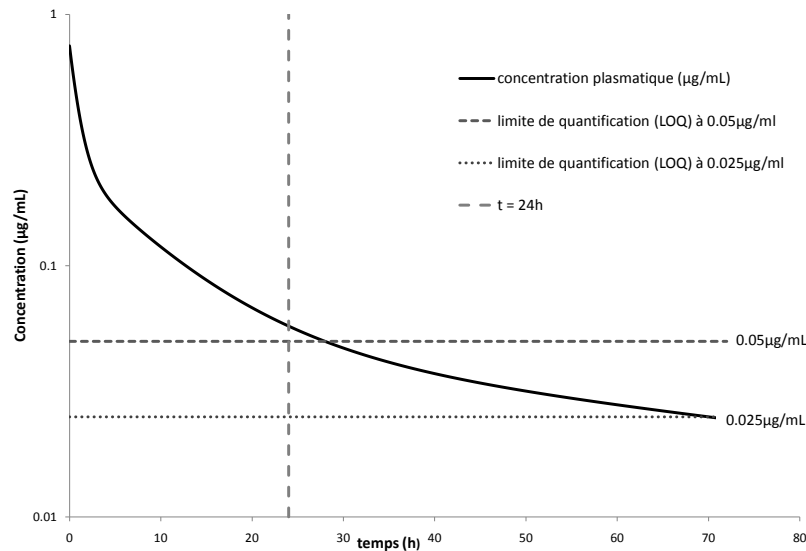


Figure 11 : Exemple de courbe de cinétique plasmatique simulée à partir d'un modèle tricompartimental.

Les deux droites symbolisant les limites de quantification montrent qu'une troisième phase est ou non observable selon que la LOQ est de 0.05 ou de 0.025 µg/mL.

La droite symbolisant le temps $t=24h$ montre que la troisième phase ne serait pas observable si le suivi des concentrations plasmatiques s'arrêtait là.

Cette courbe montre toute l'importance d'avoir une technique analytique dont les performances sont en adéquation avec les objectifs d'une étude PK/PD. C'est ainsi que la construction d'un indice PK/PD qui prendrait en compte des bactéries dont les CMI seraient très basses (0.025 µg/mL) serait totalement biaisée avec des paramètres pharmacocinétiques obtenus avec une technique analytique ayant une limite de quantification de 0.05 µg/mL.

Tableau 7 Récapitulatif des études pharmacocinétiques de l'amoxicilline administrée par voie intraveineuse chez le porc

Dose (mg/kg)	Cl (L/h/kg)	Vss (L/kg)	Varea (L/kg)	t_{1/2} (h)	MRT (h)	Etude
8.6±0.1	0.37±0.06	0.55±0.05		1.8±0.3	1.5±0.2	(Agero, et al., 1998)
8.6±0.1	0.52±0.1	0.63±0.17		3.6±0.4	1.2±0.2	(Agero, et al., 1998)
15	0.555±0.119	0.450±92	0.611±0.113	0.77±0.17		(Del Castillo, 1998)
15	0.23±0.07		0.81±0.3	1.4±0.4	1.5±0.4	(Hernandez, et al., 2005)
20	0.30±0.04	1.07±0.19	1.48±0.24		3.54±0.43	(Martinez-Larranaga, et al., 2004)
20	0.58±0.09	0.34±0.02			0.84±0.14	(Reyns, et al., 2007)

Cl est la clairance plasmatique, Vss le volume de distribution à l'équilibre ; Varea est le volume de distribution associé à la phase terminale ; t_{1/2} est le temps de demi-vie plasmatique, MRT est le temps moyen de résidence d'une molécule d'amoxicilline dans l'organisme.

On note en particulier une variabilité allant de 1 à 2 dans les valeurs moyennes de clairance et des temps de demi-vie.

Tableau 8 Récapitulatif des études pharmacocinétiques de l'amoxicilline administrée par voie orale chez le porc

Conditions expérimentales particulières	Dose (mg/kg)	F (%)	C _{max} (µg/mL)	C _{max} moyenne normalisée pour une dose de 20mg/kg	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	Etude
Animaux à jeun	10.1±1	31±15	1.6±0.9	3.17	1.9±0.9		(Agerso, et al., 1998)
Animaux après le repas	10.1±0.1	25±8	0.8±0.3	1.58	3.6±1.5		(Agerso, et al., 1998)
Formulation microgranulée (10% d'amoxicilline)	50		4.2±2.41	1.68	2.5±1.37		(Anfossi, et al., 2002)
Formulation microgranulée (30% d'amoxicilline)	50		3.36 ± 1.36	1.34	1.78 ± 0.36		(Anfossi, et al., 2002)
Amoxicilline brute	50		2.85 ± 0.74	1.14	2.06 ± 1.63		(Anfossi, et al., 2002)
Animaux à jeun	15	35.7±6.2	4.68±1.47	6.24	0.88±0.12	0.9±0.12	(Del Castillo, 1998)
Animaux après le repas	15	22.7±14.9	2.15±1.36	2.87	0.81±0.34	1.14±0.16	(Del Castillo, 1998)
Animaux à jeûn	3	25.5±4.7	0.45±0.31	3	1.04±0.49	1.66±0.85	(Del Castillo, 1998)
	15	11±5	0.758±0.054	1.01	5.8± 2.3	7.5±2.2	(Hernandez, et al., 2005)
Lot contrôle	20		7.5 (étendue 5.7)	7.5	1.5	4.2 (étendue 3.6)	(Jensen, et al., 2004)
Lot atteint de diarrhée due à <i>Escherichia coli</i> O149:F4 (infection expérimentale)	20		3.6 (étendue 4.8)	3.6	1.5	5.0 (étendue 4.8)	(Jensen, et al., 2004)
Amoxicilline administrée dans l'eau de boisson, lot contrôle	26 (étendue 9–41)		0.29 (étendue 0.14–1.03)	0.22	2 (étendue 2–6)	4.9 (étendue 4.4–7.8)	(Jensen, et al., 2006)
Amoxicilline administrée dans l'eau de boisson, lot atteint de diarrhée à <i>Escherichia coli</i> O149:F4 (infection expérimentale)	32 (étendue 11–39)		0.11 (étendue 0.04–0.38)	0.07	4 (étendue 2–6)	7.0 (étendue 2.8–8.7)	(Jensen, et al., 2006)
	20	42±10	7.37±0.42	7.37	0.97±0.29		(Martinez-Larranaga, et al., 2004)
	20	22.82 ± 5.73	3.14 ± 0.88	3.14	1.19 ± 0.22	0.73 ± 0.16	(Reyns, et al., 2007)

F est la biodisponibilité absolue, C_{max} la concentration plasmatique maximale, t_{max} le temps après administration pour atteindre la C_{max} et t_{1/2} est le temps de demi-vie plasmatique. On remarquera la très grande variabilité des concentrations plasmatiques maximales normalisées pour une même dose de 20mg/kg

Tableau 9 Récapitulatif des études pharmacocinétiques de l'amoxicilline administrée par voie intramusculaire chez le porc

Conditions expérimentales particulières	Dose (mg/kg)	F (%)	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	Etude
Formulation classique	14.7±0.1	82±8	5.1±0.8	2.0±0.7	15.5±8.3	(Agerso, et al., 1998)
Formulation longue action	14.1±1.5	111±23	1.7±1.0	1.3±0.5	42.8±22.0	(Agerso, et al., 1998)
Lot contrôle	15		4.7±.2	2.1±0.5	3.9±1.6	(Agerso, et al., 2000)
Lot atteint de diarrhée à <i>Escherichia coli</i> O149:F4 (infection expérimentale)	15		3.7±1.0	1.3±0.5	12±10	(Agerso, et al., 2000)

F est la biodisponibilité absolue, C_{max} la concentration plasmatique maximale, t_{max} le temps après administration pour atteindre la C_{max} et t_{1/2} est le temps de demi-vie plasmatique.

On remarque que les concentrations maximales sont plus faibles pour les formulations « longue action » que pour les formulations classiques. On peut également noter le temps de demi-vie plasmatique prolongé chez les animaux infectés par *Salmonella Typhimurium*.

L'inspection des tableaux 6 à 8 nous montre une grande variabilité dans les résultats publiés, ce qui rend difficile une étude méta-analytique de la pharmacocinétique de l'amoxicilline dans le but de construire des index PK/PD. Parmi les facteurs de variabilités, les modalités d'analyse peuvent également contribuer de façon significative ; cela a justifié notre approche qui a consisté à réanalyser des données brutes (concentrations plasmatiques mesurées au cours d'études que nous avons pu nous procurer) selon la même méthodologie.

1.4.3.4 Utilisations chez le porc

Chez le porc, l'amoxicilline est principalement utilisée en post-sevrage, par exemple dans les cas d'infections à *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinomyces pyogenes* (Guardabassi, et al., 2008), le plus souvent par incorporation de prémélange¹ médicamenteux dans l'aliment (voir Tableau 10 page 52).

Le schéma posologique va donc dépendre des modalités de distribution de l'aliment : en général distribution d'aliment à volonté en post-sevrage, tandis que les porcs à l'engraissement reçoivent trois repas quotidiens.

¹ On appelle prémélange médicamenteux tout médicament vétérinaire préparé à l'avance et exclusivement destiné à la fabrication ultérieure d'aliment médicamenteux.

On appelle aliment médicamenteux tout médicament vétérinaire constitué à partir d'un mélange d'aliment et de prémélange médicamenteux, présenté pour être administré aux animaux sans transformation (1. Code de la santé publique.)

Tableau 10 Posologies des spécialités à base d'amoxicilline autorisées chez le porc

AMOXICILLINE CALIER GLOBULIT 50 MG/G PREMELANGE MEDICAMENTEUX	15 mg d'amoxicilline (sous forme de trihydrate) par kg de poids vif et par jour pendant 15 jours consécutifs.
AMOXIVAL 10 % POUDRE ORALE VEAU PORC VOLAILLE	*10mg d'amoxicilline par kg de poids vif par 24h (en 2 prises) pendant 5 jours
AMOXIVAL AMOXICILLINE 100 PREMELANGE MEDICAMENTEUX PORC	20 mg d'amoxicilline par kg de poids vif et par jour pendant 5 jours, par voie orale, dans l'aliment.
COFAMIX AMOXICILLINE 100 PORC	20 mg d'amoxicilline par kg de poids vif et par jour pendant 5 jours par voie orale dans l'aliment.
COFAMOX 10	*10mg/kg toutes les 12h pendant 5 jours soit 500ppm d'amoxicilline dans l'aliment
PERLIUM AMOXIVAL AMOXICILLINE 100 PREMELANGE MEDICAMENTEUX PORC	20 mg d'amoxicilline par kg de poids vif et par jour pendant 5 jours par voie orale dans l'aliment.
SURAMOX 10 POUDRE ORALE	A diluer dans l'eau de boisson ou dans l'aliment liquide. Veaux, porc et volailles : 10 mg par kg de poids vif d'amoxcilline par jour pendant 5 jours soit 10 g du médicament pour 100 kg de poids vif par jour pendant 5 jours. Elle peut être augmentée dans les cas graves.
SURAMOX 50 POUDRE ORALE PORC	20 mg d'amoxicilline (sous forme trihydrate) par kg de poids vif, par jour, pendant 5 jours consécutifs par voie orale dans l'aliment liquide (soit 400 mg de poudre pour 10 kg de poids vif par jour).
SURAMOX 50 PRÉMÉLANGE MÉDICAMENTEUX	15 mg d'amoxicilline par kg de poids vif et par jour pendant 15 jours par voie orale dans l'aliment.
VETRIMOXIN P.O.	*10mg/kg de poids vif (en 2 prises) par jour pendant 5 jours
CLAMOXYL LA	15 mg d'amoxicilline par kg de poids vif deux fois à 48 heures d'intervalle, par voie intramusculaire, soit 1 mL de suspension pour 10 kg de poids vif deux fois à 48 heures d'intervalle.
CLAMOXYL SUSPENSION	7 mg d'amoxicilline par kg de poids vif une fois par jour pendant 3 à 5 jours ; soit 0,5 mL de suspension pour 10 kg de poids vif
DUPHAMOX LA	15 mg d'amoxicilline par kg de poids vif deux fois à 48 heures d'intervalle, par voie intramusculaire soit 1 mL de suspension pour 10 kg de poids vif deux fois à 48 heures d'intervalle.
LONGAMOX	15 mg d'amoxicilline par kg de poids vif deux fois à 48 heures d'intervalle, par voie intramusculaire soit 1 mL de suspension pour 10 kg de poids vif deux fois à 48 heures d'intervalle.
SURAMOX 15 % LA	15 mg d'amoxicilline par kg de poids vif, par voie intramusculaire, soit 1 mL pour 10 kg de poids vif, en deux injections à 48 heures d'intervalle.

Les posologies proviennent des résumés des caractéristiques du produit (AFSSA-ANMV) et du Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires (2007) si elles n'étaient pas mentionnées dans les RCP (signalé par *)

Les schémas posologiques les plus fréquents sont de 15mg/kg, deux fois à 48h d'intervalle pour la voie intramusculaire et de 10 à 20mg d'amoxicilline par kg en deux prises quotidiennes pendant 5 jours pour les spécialités orales. Toutefois, en pratique, le prémélange est incorporé à l'aliment et le schéma posologique dépend donc du schéma d'alimentation.

1.5 Conclusions

On note une grande confusion dans la terminologie et l'établissement des critères interprétatifs de l'antibiogramme, d'une part d'ordre sémantique (par exemple l'EUCAST et le CLSI donnent des sens différents aux breakpoints et aux cut-offs), mais d'autre part liée à la multiplicité de ces valeurs, souvent différentes d'un organisme normatif à l'autre. Par ailleurs, dans le cadre de la médecine vétérinaire, on soulignera l'absence de communication sur l'existence ou non de critères spécifiquement établis pour les espèces-cibles, notamment en France.

A défaut de disposer de cut-offs cliniques propres à la médecine vétérinaire, l'approche PK/PD semble être une alternative intéressante, la détermination de tels cut-off par des méthodes de Monte Carlo permettant de tirer un maximum d'informations des données pharmacocinétiques.

Le but de notre travail de thèse a été de reprendre des données pharmacocinétiques obtenues chez le porc soit dans un cadre réglementaire par des industriels soit par des laboratoires académiques, pour les rendre utilisables à l'établissement des index PK/PD et à l'établissement de cut-off PK/PD.

2 Partie expérimentale réalisée à l'UMR 181 INRA, ENVT

L'objectif de cette étude a été de déterminer un cut-off PK/PD de l'amoxicilline chez le porc par une méthode de Monte Carlo, et ce, à partir de données pharmacocinétiques brutes transmises par différents laboratoires. Ce projet vise à établir les concentrations plasmatiques critiques en amoxicilline capables d'atteindre l'objectif PK/PD de 40% du temps au-dessus de la CMI pour un pourcentage déterminé d'une population de porcs (fixé à 90%).

2.1 Matériel et méthodes

2.1.1 Collections de données pharmacocinétiques

Les données brutes concernant les cinétiques plasmatiques de l'amoxicilline ont été recueillies auprès de trois laboratoires pharmaceutiques et d'un laboratoire de recherche. Pour des raisons de confidentialité, nous ne donnons pas de détails sur l'origine de ces données mais elles ont toutes été obtenues dans des conditions de bonnes pratiques de laboratoire (études réglementaires) et avec des méthodes analytiques validées.

L'ensemble de ces données a permis de constituer une base comprenant 191 cinétiques individuelles, dont 21 pour la voie intraveineuse, 104 pour la voie intramusculaire et 66 pour la voie orale. Les cinétiques obtenues dans le cadre d'expériences de bioéquivalence ont été considérées comme indépendantes. Les données brutes sont présentées sous forme de graphiques (Figures 12 à 24) avec la limite de quantification (LOQ) ou de détection (LOD) de la méthode analytique. Le Tableau 11 donne le détail de la constitution de la base de données et le code des différentes formulations.

Tableau 11 Récapitulatif du nombre des cinétiques plasmatiques de l'amoxicilline recueillies

Origine des données	Voie intraveineuse	Voie orale	Voie intramusculaire
Site 1	8 (formulation 1)	8 ¹ (formulation 4)	
Site 2	8 (formulation 2)	8 ³ (formulation 5)	80(formulation 9)
Site 3	5 (formulation 3)	40 ³ (formulation 6) 5 ³ (formulation 7) 5 ² (formulation 8) (2 cinétiques exclues)	
Site 4			24(formulation 10)

¹ à jeun, ² bolus oral, ³ prémélange médicamenteux

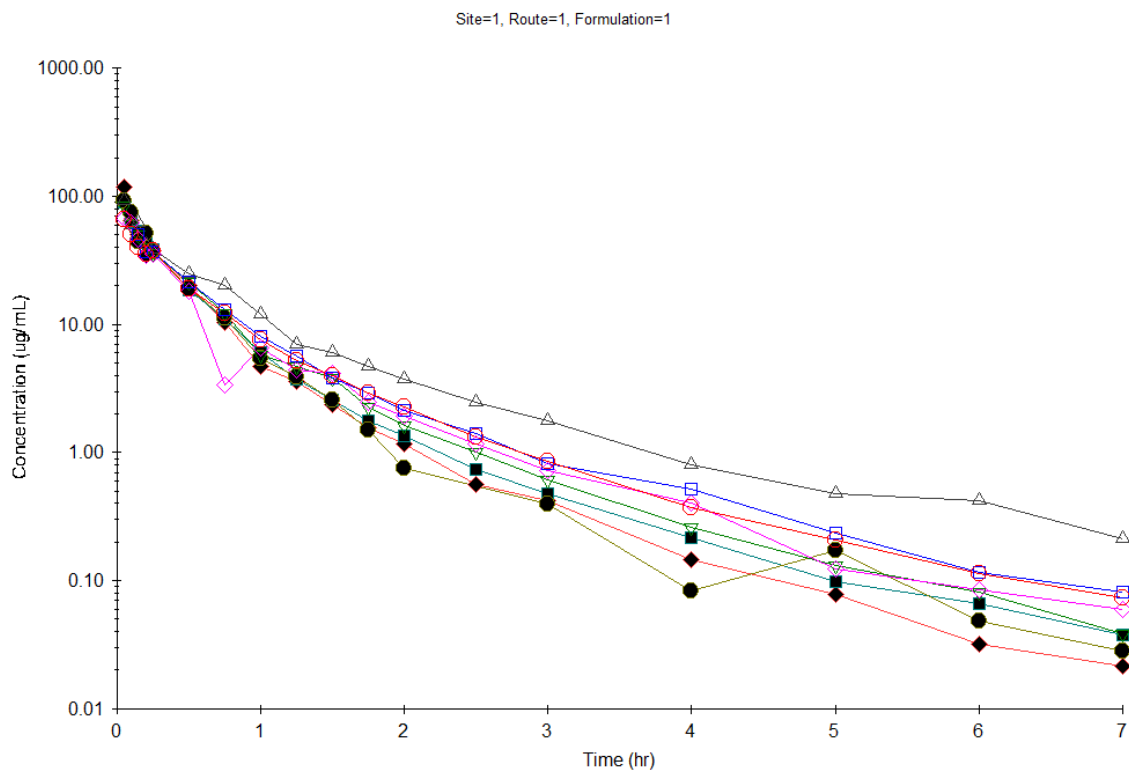


Figure 12 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie intraveineuse (site1, dose 20mg/kg, LOQ de 25ng/mL, n=8)

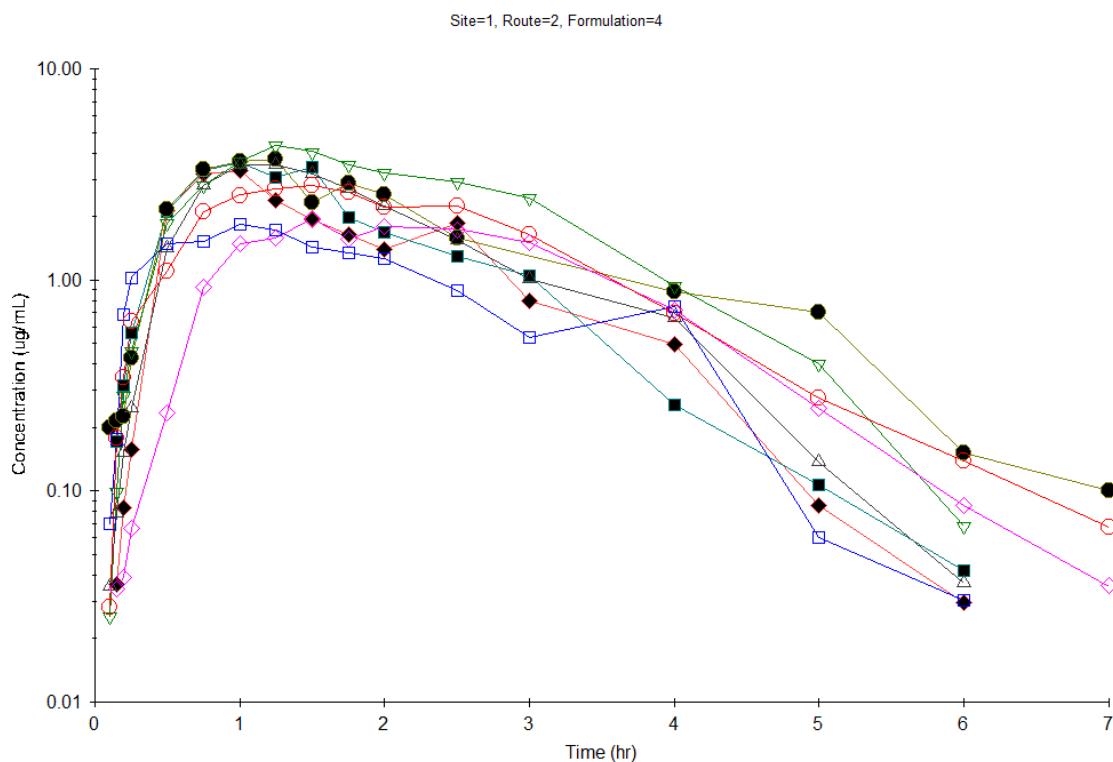


Figure 13 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale sous forme de bolus (site 1, dose 20mg/kg, LOQ 25ng/mL, n=8)

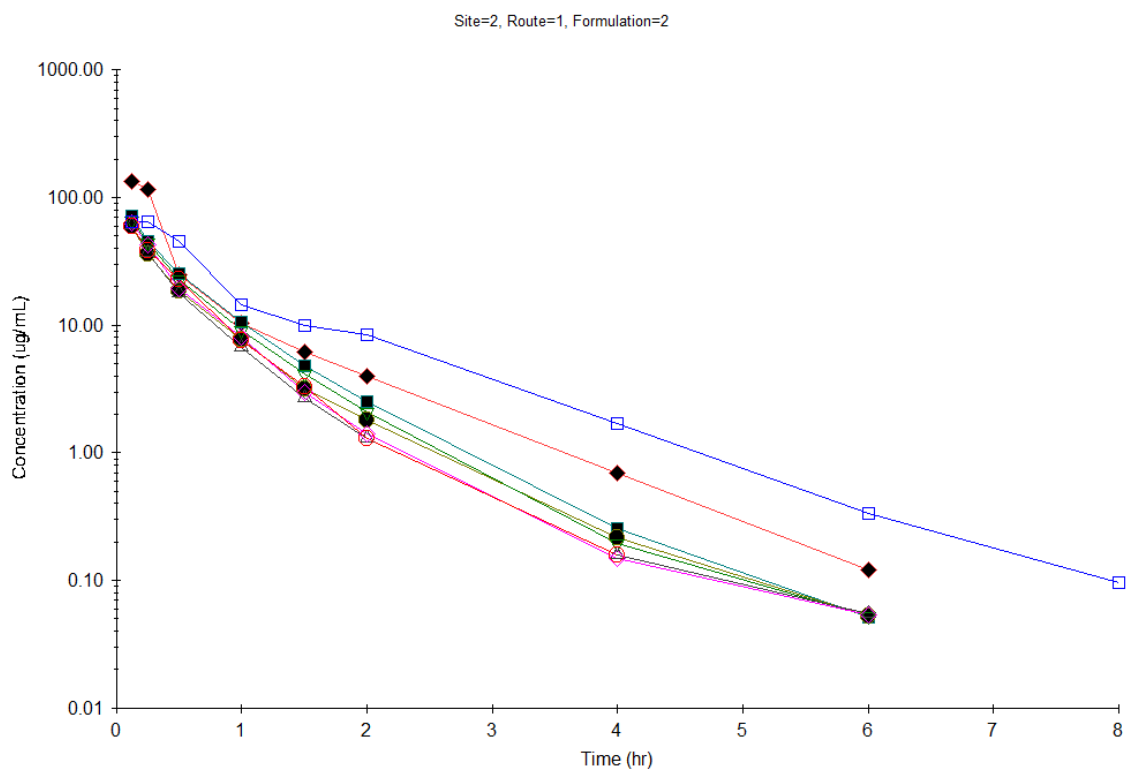


Figure 14 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie intraveineuse (site 2, dose 20mg/kg, LOQ 50ng/mL, n=8)

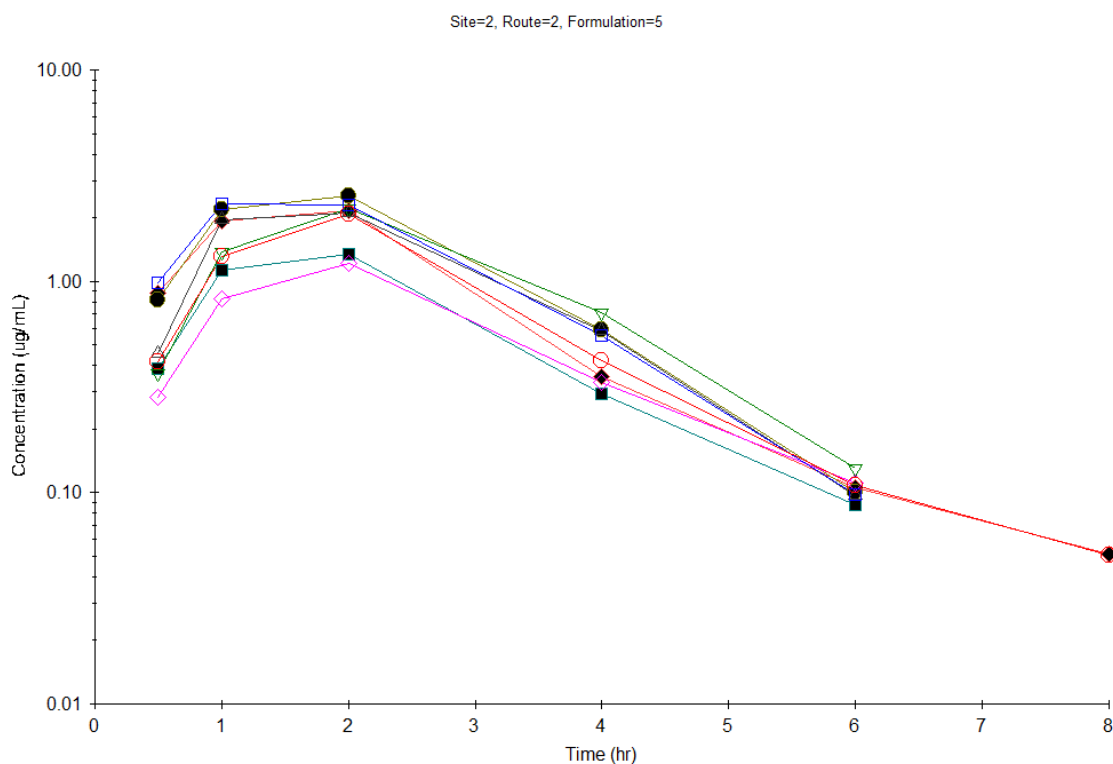


Figure 15 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (soupe) (site 2, dose 20mg/kg, LOQ 50ng/mL, n=8)

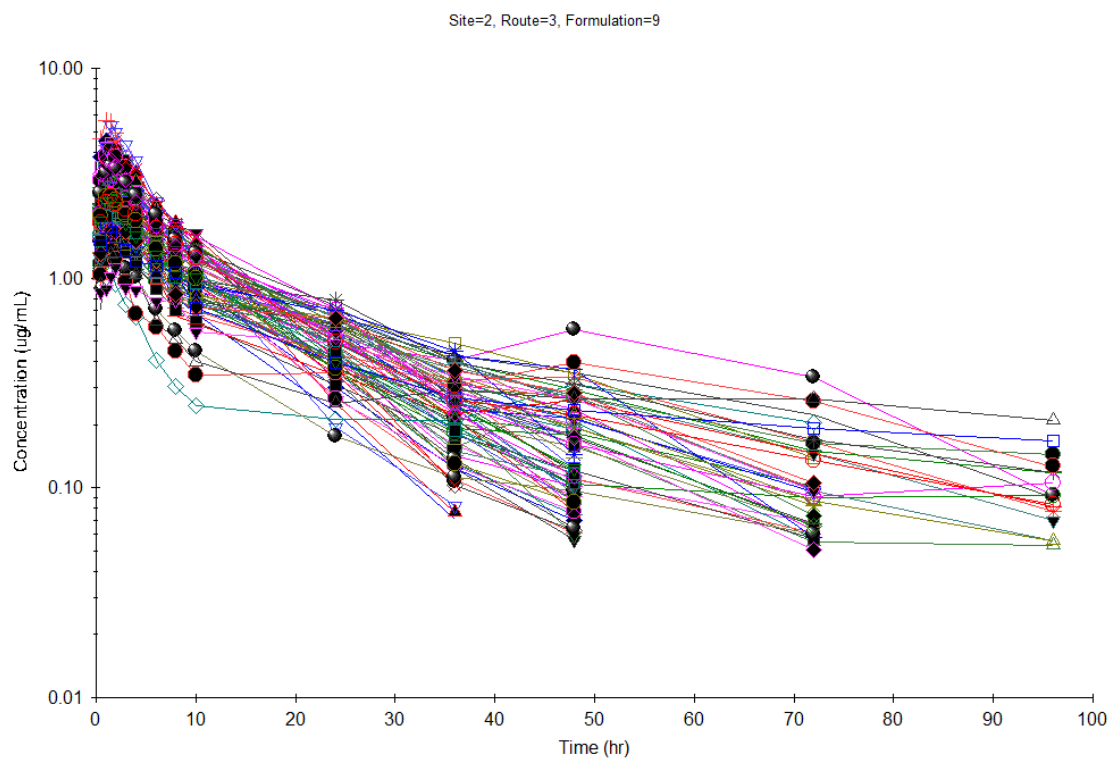


Figure 16 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline ($\mu\text{g/mL}$) en fonction du temps (h) après une administration par voie intramusculaire (site 2, dose 15mg/kg, LOQ 50ng/mL, n= 80)

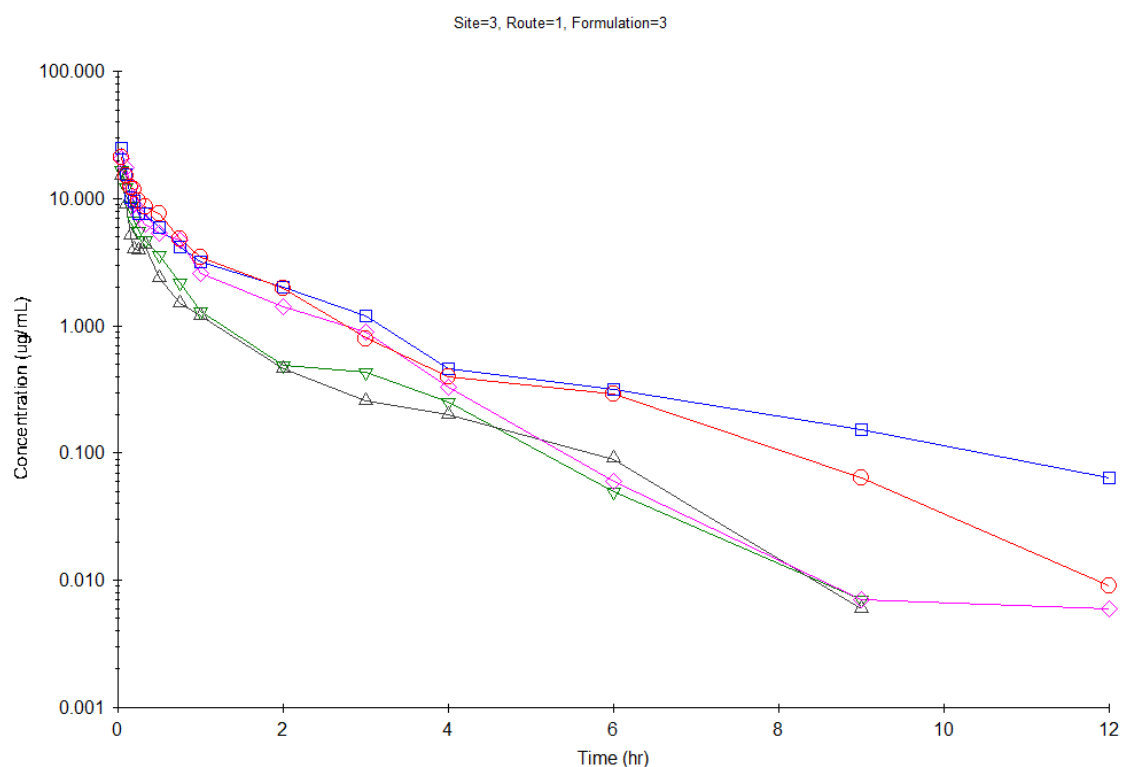


Figure 17 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline ($\mu\text{g/mL}$) en fonction du temps (h) après une administration par voie intraveineuse (site 3, dose 10mg/kg, Limite de détection de 5ng/mL, n=5)

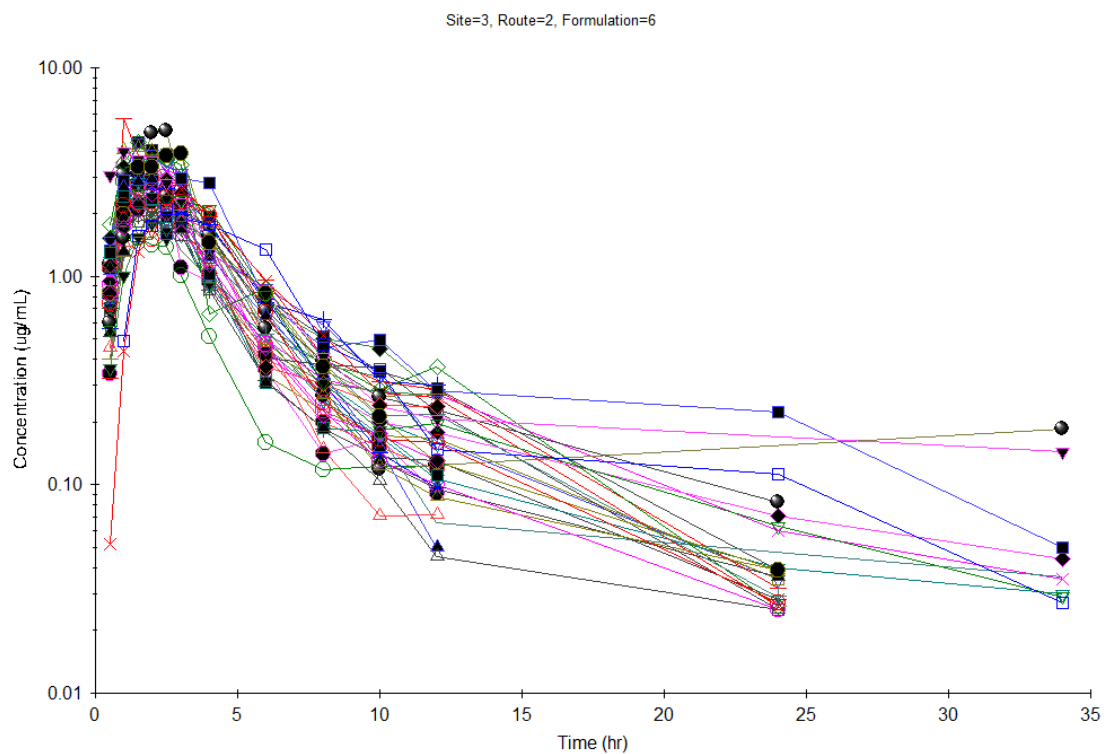


Figure 18 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (prémélange médicamenteux) (site3, dose 20mg/kg, LOQ 25ng/mL, n= 40)

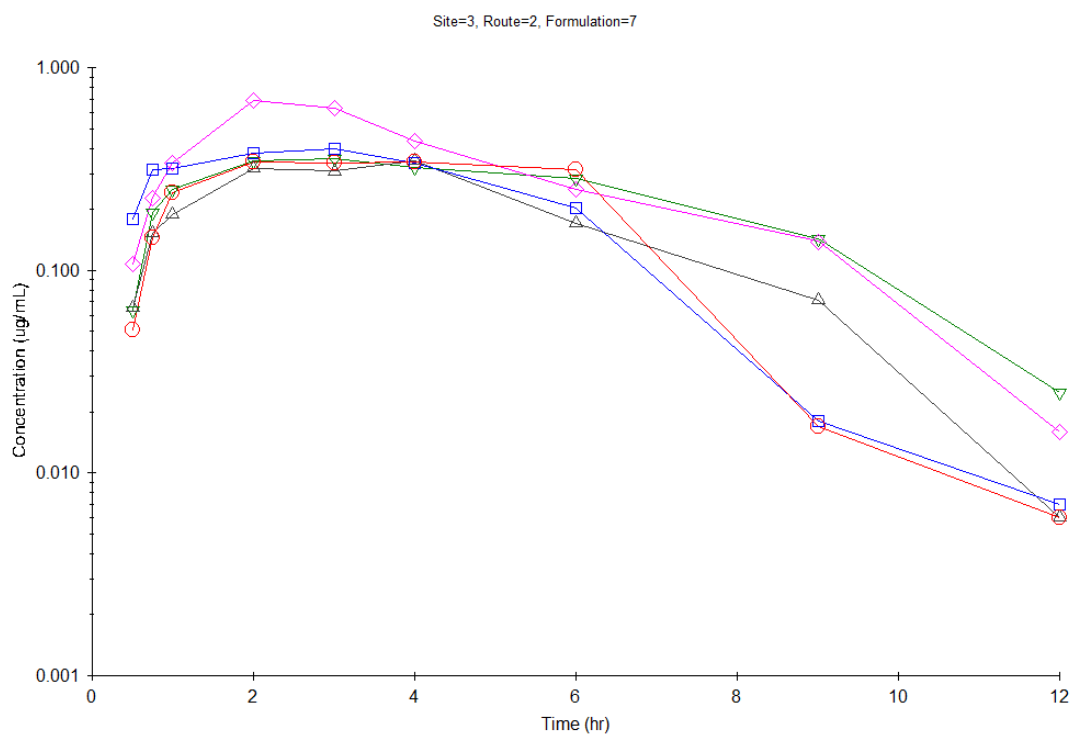


Figure 19 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (prémélange médicamenteux) (site 3, dose 9mg/kg, LOD 5ng/mL, n=5)

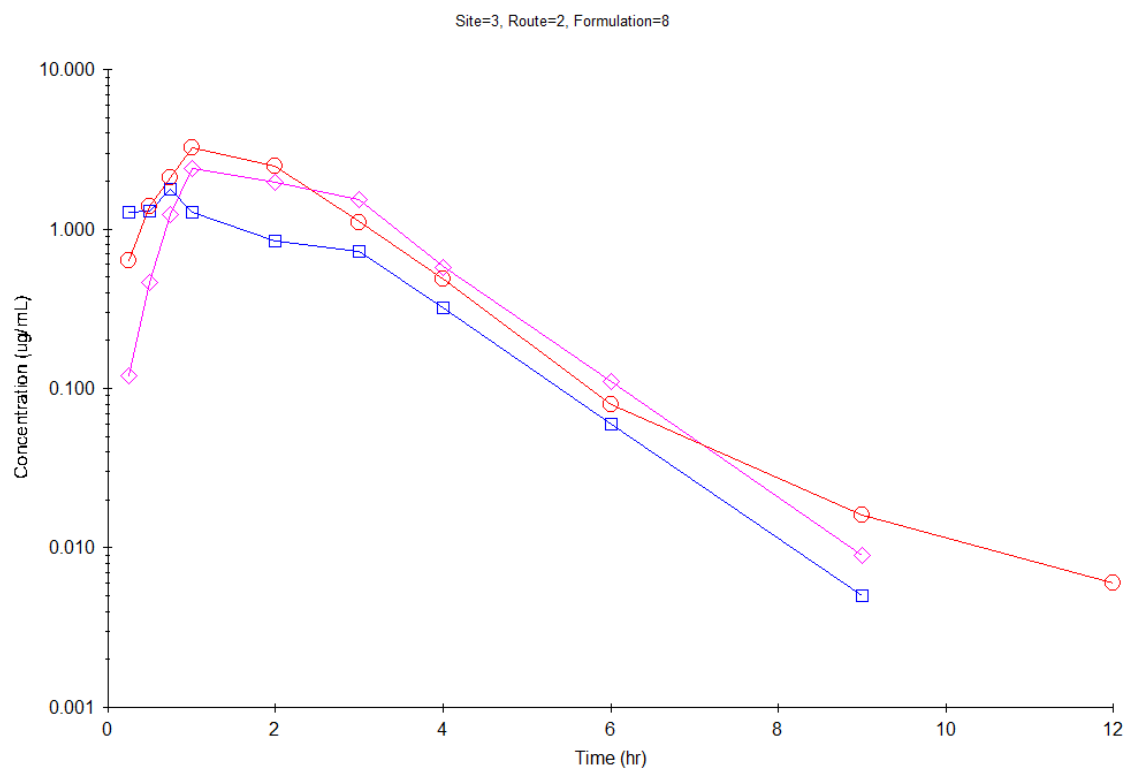


Figure 20: Cinétiques des concentrations plasmatiques (µg/mL) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (bolus) (site 3, dose 9mg/kg, LOD 5ng/mL, n=5, 2 animaux exclus)

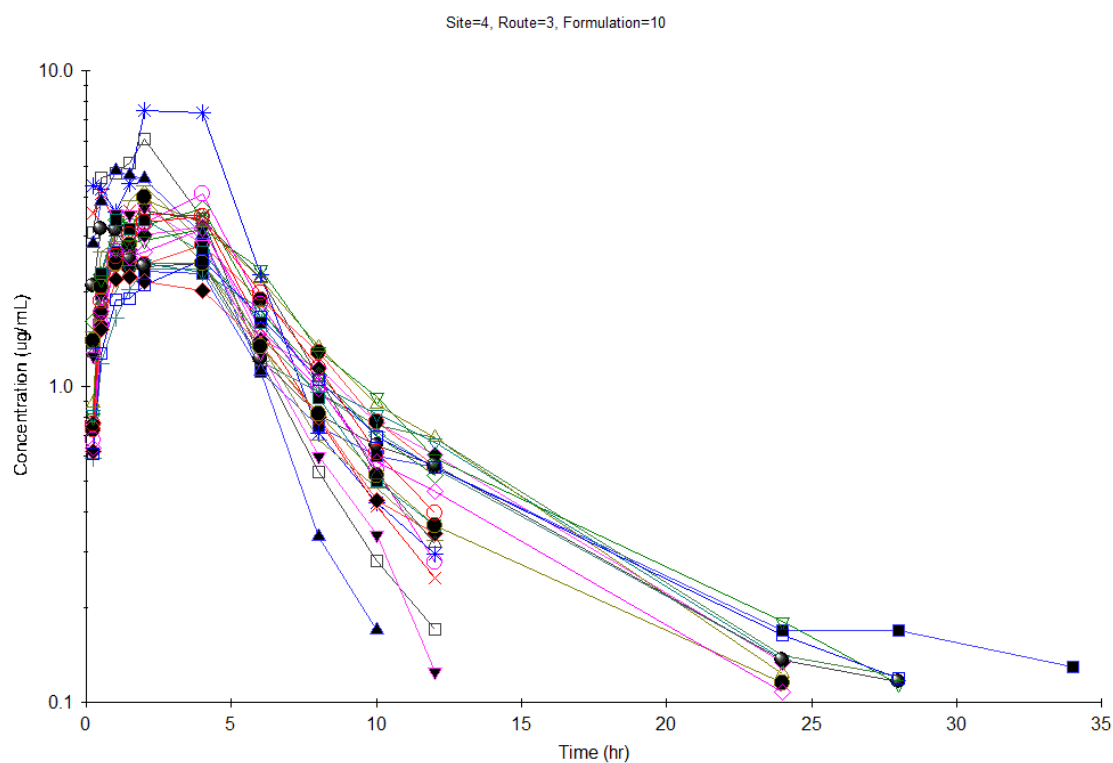


Figure 21 Cinétiques des concentrations plasmatiques (µg/mL) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après une administration par voie intramusculaire (site 4, dose 15mg/kg, LOQ 100ng/mL, n= 24)

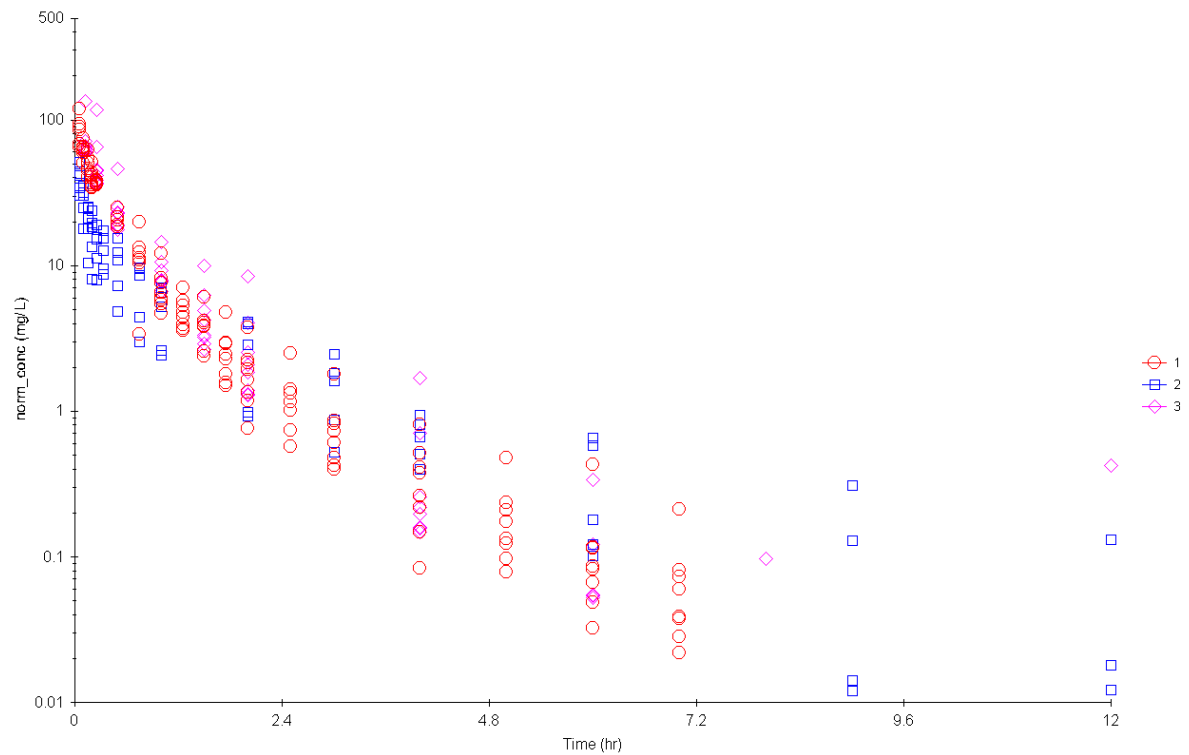


Figure 22 Cinétiques des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après administration par voie intraveineuse, tous sites confondus (valeurs normalisées pour une dose de 20mg/kg)

En rouge site 1, en bleu site 2, en mauve site 3

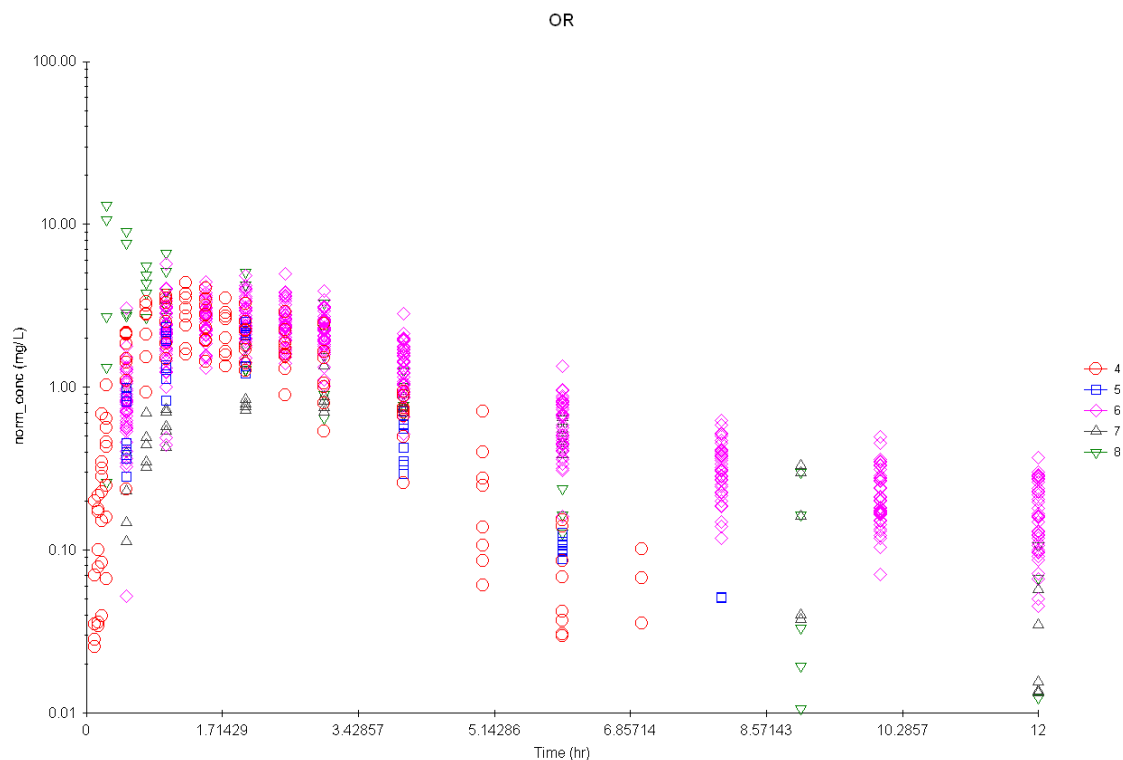


Figure 23 : Cinétiques des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après administration par voie orale, tous sites confondus (valeurs extrapolées pour une dose de 20mg/kg)

La formulation 4 (en rouge) provient du site 1, la formulation 5 (en bleu) du site 2 et les formulations 6,7 et 8 (resp. en rose, violet et vert) proviennent du site 3.

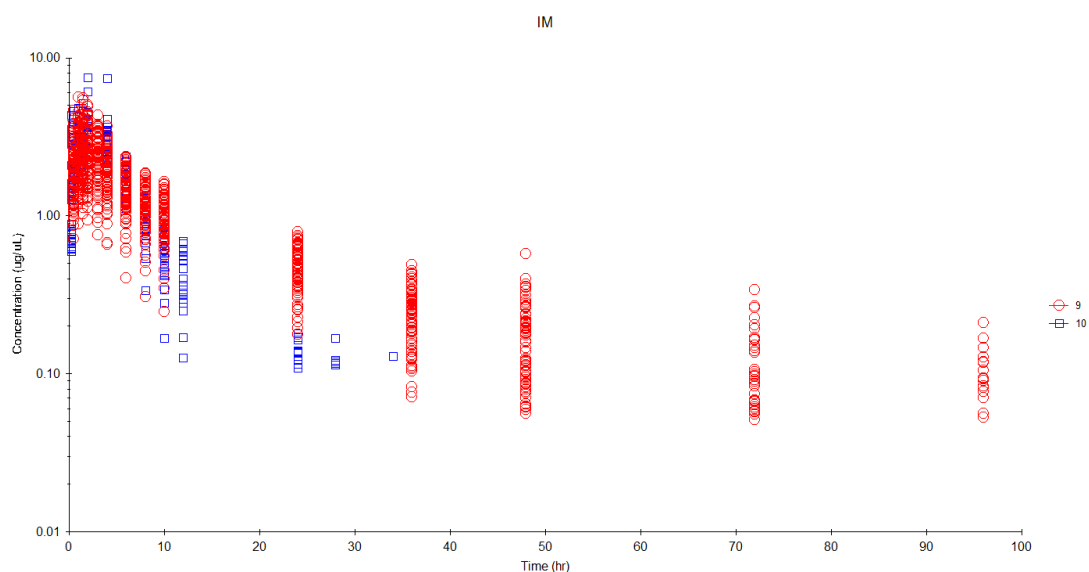


Figure 24 : Cinétiques des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après administration par voie intramusculaire, tous sites confondus (valeurs extrapolées pour une dose de 20mg/kg)

La formulation 9 (en rouge) provient du site 2, la formulation 10 (en bleu) du site 4.

L'inspection de ces différentes figures montre une relative homogénéité des données obtenues par différents sites.

2.1.2 Analyse des cinétiques plasmatiques de l'amoxicilline chez le porc par une approche conventionnelle (analyse individuelle et calcul des paramètres statistiques à partir des estimations des paramètres pharmacocinétiques individuels)

Une analyse préalable à l'analyse de population a été effectuée grâce au logiciel WinNonLin® (v5.2, Pharsight). Les données ont été analysées à l'aide d'un modèle non-compartmental afin d'obtenir une approximation des biodisponibilités pour les voies extravasculaires.

Une analyse compartimentale (modèle bicompartimental, avec une absorption du premier ordre pour les voies extravasculaire) a été testée mais il est apparu un certain nombre de problèmes liés à des données qui ont rendu difficiles certains ajustements : par exemple si on inspecte la Figure 18 on remarque que les phases terminales peuvent être relativement horizontales, ce qui peut amener à conclure à des temps de demi-vie plasmatique exagérément longs chez certains porcs. Plutôt que d'enlever ces porcs ou de tronquer leurs cinétiques afin de réaliser une analyse conventionnelle en deux étapes, nous avons préféré garder toutes les valeurs et les analyser simultanément selon une approche dite de population.

2.1.3 Analyse de population des cinétiques de l'amoxicilline chez le porc

2.1.3.1 Introduction à l'analyse de population

Contrairement à une approche classique (dite en deux étapes) où les données de cinétiques plasmatiques sont étudiées individuellement afin d'estimer les paramètres d'un modèle de structure (cf. infra) prédéterminé puis leurs moyennes et écart-types, dans le cas d'une approche de population, l'ensemble des données de tous les individus sont analysées simultanément. Cette démarche permet d'optimiser l'utilisation des données pharmacocinétiques car l'information est partagée entre les individus. Elle permet également de prendre en compte l'effet de covariables sur les cinétiques plasmatiques (exemples : effet âge, sexe, poids, clairance plasmatique de la créatinine, ...) afin d'expliquer une partie de la variabilité observée et estimée.

Un modèle pharmacocinétique de population peut être décomposé en trois sous-modèles :

- **Le modèle de structure**

Il correspond à une équation mathématique liant le temps aux concentrations plasmatiques et dont on cherche à déterminer les différents paramètres. Ces équations correspondent à des modèles décrivant la tendance générale des données. Dans le cadre de cette étude, on modélise l'organisme comme un ensemble de compartiments entre lesquels la substance étudiée est échangée suivant les gradients de concentrations. Ces échanges sont traduits mathématiquement en un système d'équations différentielles. Les paramètres de ces équations sont appelés « effets fixes » dans le cadre d'une étude pharmacocinétique de population.

A titre d'exemple, dans le cas d'un modèle monocompartimental, les concentrations plasmatiques peuvent être décrites par l'équation 1 :

$$C(t) = \frac{Dose}{V} \times \text{Exp}\left(-\frac{Cl}{V} \times t\right) \quad \text{Eq.1}$$

où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t , t le temps après l'administration, V le volume de distribution du compartiment et Cl la clairance plasmatique de la substance étudiée.

- **Le modèle statistique :**

Le modèle statistique correspond à la manière de modéliser la variabilité observée. Dans le cas d'une approche de population, ce modèle permet de distinguer deux niveaux d'effets aléatoires (par opposition aux effets fixes) : la variabilité interindividuelle et la variabilité résiduelle.

La variabilité résiduelle traduit l'écart entre les valeurs observées et les valeurs prédites par le modèle. Elle correspond à une variable aléatoire, souvent pondérée par une fonction de la concentration plasmatique (généralement proportionnelle à $C(t)$ du modèle de structure décrit précédemment).

Cette erreur résiduelle englobe les erreurs analytiques, les écarts au modèle de structure et la variabilité intra-individuelle.

Si on reprend l'exemple précédent, on a :

$$C_i(t) = \frac{Dose}{V_i} \times \text{Exp}\left(-\frac{Cl_i}{V_i} \times t\right) + \varepsilon_i \quad \text{Eq.2}$$

où la clairance et le volume de distribution sont déterminés pour l'individu i et où ε_i est une variable aléatoire suivant par exemple une loi normale de moyenne nulle et de variance notée σ^2 .

Remarque : Dans le cadre d'une approche classique en deux étapes, on chercherait à déterminer, pour chaque individu, les paramètres du modèle (V et Cl dans le cas de l'exemple) de façon à minimiser ce terme d'erreur ε_i .

La variabilité interindividuelle traduit les variations des paramètres pharmacocinétiques d'un individu à l'autre. Dans le cadre des modèles de population, ces paramètres sont des variables aléatoires.

Ainsi, si on reprend l'exemple précédent, on aura pour chaque sujet i :

$$V_i = \bar{V} + \eta_{v,i} \quad \text{Eq. 3}$$

où $\bar{V}$ est la valeur moyenne du volume de distribution dans la population étudiée et $\eta_{v,i}$ représente l'écart du volume de distribution de l'individu i à la moyenne de la population. $\eta_{v,i}$ est une variable aléatoire de moyenne 0 et de variance notée ω_v^2 qui traduit la variabilité des volumes de distribution dans la population.

De la même façon on aura pour la clairance :

$$Cl_i = \bar{Cl} + \eta_{cl,i} \quad \text{Eq. 4}$$

avec Cl_i la clairance du i^{eme} sujet, $\eta_{cl,i}$ est une variable aléatoire de moyenne 0 et de variance notée ω_{cl}^2 qui traduit la variabilité des clairance dans la population.

La figure 25 illustre ces différentes notions.

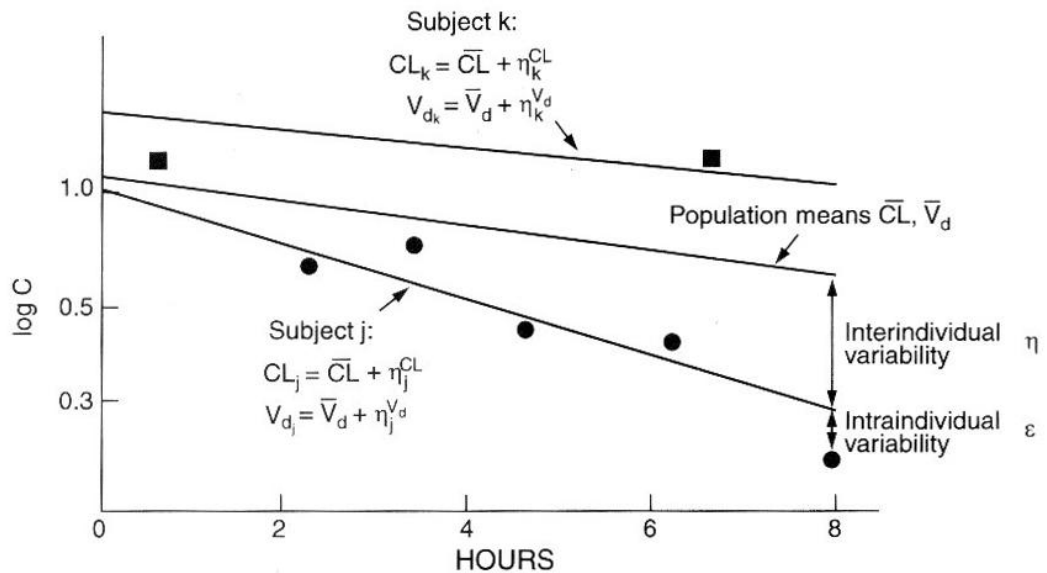


Figure 25 Exemple de cinétique plasmatique mettant en évidence les variabilités inter- et intraindividuelle (d'après (Atkinson, et al., 2001)).

La droite du milieu a été tracée avec les moyennes de population de la clairance et du volume de distribution notées $\bar{CL}$ et $\bar{V}_d$; autour de cette moyenne sont représentées les courbes de 2 sujets notés J et K. Les droites traduisant ces cinétiques individuelles ont été tracées en utilisant les clairances et volumes de distribution individuels calculés en ajoutant aux moyennes de population précitées les η propres à chacun des individus. Enfin les points observés pour chaque individu se trouvent répartis autour de chacune de ces 2 droites, et ce sont les écarts aux droites individuelles qui permettent d'estimer l'erreur résiduelles notée ϵ .

- Le modèle de covariables

Le modèle de covariables traduit l'influence de covariables catégorielles (exemples : effet du sexe, de la tranche d'âge, ...) ou quantitatives (exemple : poids, clairance de la créatinine) sur les paramètres pharmacocinétiques de population (ou effets fixes). Par exemple, dans le cas où la clairance de la substance étudiée serait fonction de la clairance de la créatinine :

$$Cl_i = \bar{Cl} + \theta_{ClCr} \cdot ClCr + \eta_{cl,i} \quad \text{Eq. 5}$$

où $ClCr$ est la clairance de la créatinine et θ_{ClCr} est un paramètre d'effet fixe dérivant de la corrélation linéaire entre la clairance de la substance étudiée et celle de la créatinine.

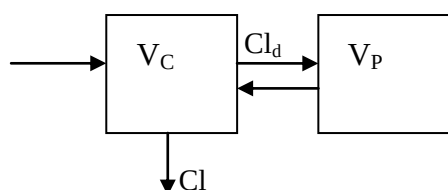
Pour être justifiée, la prise en compte d'une covariable doit s'accompagner d'une diminution des variances inter- et intraindividuelles, et répondre à des critères de vraisemblance (critère d'information d'Akaike, critère d'information Bayésien et fonction objective).

2.1.3.2 Modèles utilisés dans le cadre de l'analyse de population de l'amoxicilline chez le porc

Les données ont été modélisées avec le logiciel Monolix (version 3.1R2) et les figures obtenues avec le logiciel R (version 2.10.1)

Modèles de structure et paramétrisation des effets fixes

Concernant la voie orale, les cinétiques ont été modélisées par un modèle bicompartimental avec une absorption d'ordre 0 (l'absorption se fait alors comme si la substance était administrée sous forme de perfusion).

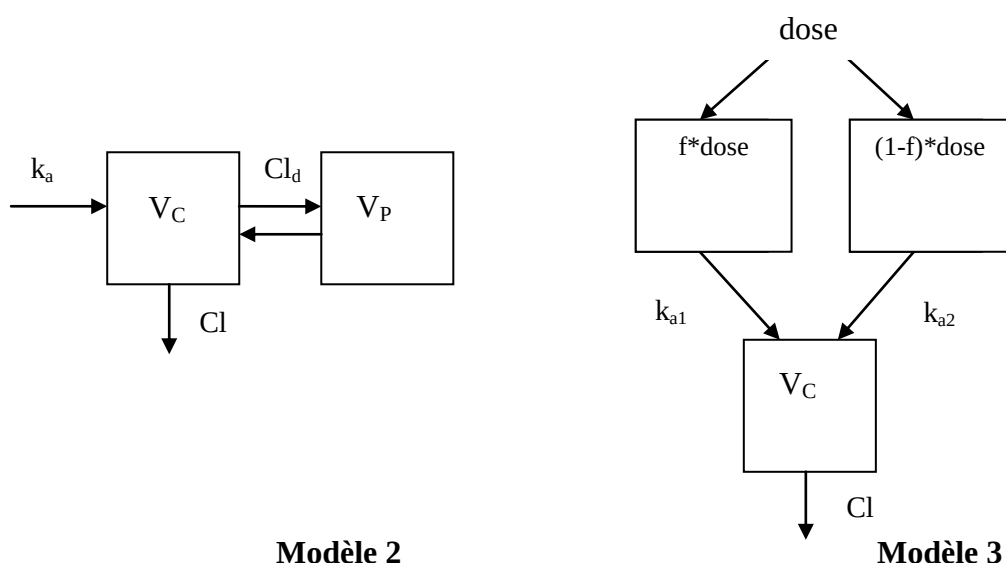


Modèle 1

Les paramètres utilisés pour cette modélisation sont :

- Un temps correspondant au délai temporel entre le temps d'administration de l'amoxicilline et le début de son apparition dans le plasma ce qui traduit un certain délai à l'absorption. il est noté Tlag
- La durée d'absorption qui dans notre étude a été modélisée par un processus d'ordre 0 qui correspond à la durée pendant laquelle la dose administrée est absorbée à un rythme constant.
- Les clairances d'élimination (Cl) et de distribution(Cl_d).
- Les volumes du compartiment central (V_C) et périphérique (V_P).

Concernant la voie intramusculaire, les cinétiques ont été modélisées par un modèle bicompartimental avec absorption d'ordre 1 et, après mise en évidence d'un phénomène de flip-flop (la comparaison avec les cinétiques plasmatiques après administration par voie intraveineuse permettant de conclure que c'est l'absorption qui est très lente et non l'élimination), par un modèle monocompartimental avec deux constantes d'absorption. Toutefois ces deux modèles sont en pratique non-distinguables à partir des données et c'est la connaissance *a priori* de la disposition de l'amoxicilline qui permet de choisir un modèle plutôt que l'autre.



Les paramètres utilisés dans le cadre du modèle bicompartimental (modèle 2) sont : la constante d'absorption (K_a), les clairances d'élimination (Cl) et de distribution (Cl_d) et les volumes du compartiment central (V_C) et périphérique (V_P). Les paramètres utilisés dans le cadre du modèle monocompartimental (modèle 3) sont : les deux constantes d'absorption (k_{a1} et k_{a2}), la fraction du médicament qui est absorbé soit selon k_{a1} soit k_{a2} , la clairance d'élimination (Cl) et le volume du compartiment central (VC) soit 5 paramètres pour ces deux modèles concurrents.

Modèle statistique des effets aléatoires

Que ce soit pour l'étude des cinétiques suite aux administrations *per os*. ou par voie intramusculaire, la variabilité interindividuelle a été modélisée par des lois log-normales, exception faite, dans le cas du modèle 3, de la fraction de doses attribuées à k_{a1} à qui a été traitée comme une variable aléatoire suivant une loi logistique (valeurs comprises entre 0 et 1).

Par exemple, dans les modèles utilisés, on a :

$$Cl_i = \theta_{Cl} \cdot \text{Exp}(\eta_i) \quad \text{Eq. 6}$$

où θ_{Cl} est la médiane des clairances et η_i suit une loi normale de moyenne 0 et de variance ω^2 .

Les variances ont été considérées égales quelles que soient les formulations et le modèle d'erreur utilisé est un modèle d'erreur dit proportionnel, les erreurs étant proportionnelles aux concentrations plasmatiques.

Dans le cas des cinétiques plasmatiques réalisées suite aux administrations *per os*, la présence de nombreuses concentrations inférieures aux limites de quantification a conduit à prendre en compte ces valeurs censurées dans le modèle.

Modèle de covariables

Les covariables ont été modélisées comme des facteurs s'ajoutant aux moyennes des η . Ainsi, dans le cas de la clairance (suivant une loi Log-normale), on a par exemple pour les cinétiques plasmatiques réalisées après injections intramusculaires (formulations 9 et 10) :

$$Cl_i = \theta_{Cl} \cdot \text{Exp}(\eta_i + \beta_{form9}) \quad \text{Eq. 7}$$

où β_{form9} traduit la différence entre les valeurs médianes des clairances de la formulation 9 par rapport à la formulation 10.

Les covariables suivantes ont été retenues pour ce modèle après vérification de l'existence d'un effet statistiquement significatif (test de Wald : $p < 0.05$) et de leurs vraisemblances (critère d'information d'Akaike, critère d'information Bayésien et fonction objective) :

- effet bolus conduisant à un tlag inférieur pour les formulations 4 et 8 ($p = 4.3 \cdot 10^{-9}$)
- effet de la formulation 7 (codé form1) se différenciant des autres formulations par un temps de l'ordre 0 supérieur ($p < 10^{-10}$)
- effet des formulations 6 et 8 : l'analyse préliminaire des données sous WinNonLin par analyse non compartimentale a mis en évidence une différence de biodisponibilité (rapports des AUC moyennes des cinétiques *per os* et intraveineuse de respectivement 0.7486 et 0.8282 contre 0.2553, 0.1638 et 0.3220 pour les formulations 4, 5 et 7). L'effet

de ces formulations a donc été testé sur les clairances et volumes apparents et s'est révélé significatif sur les clairances de distribution et d'élimination ($p < 10^{-10}$)

Concernant les spécialités administrées par voie intramusculaire, l'effet du site (confondu avec celui de la formulation) a été testé pour chacun des paramètres. Pour le premier modèle, il s'est révélé significatif pour la constante d'absorption, les clairances d'élimination et de distribution et le volume du compartiment central.

Concernant le modèle à deux constantes d'absorption, un effet site significatif a été mis en évidence pour une des constantes d'absorption, la fraction de la dose attribuée à chaque constante et la clairance d'élimination.

Contrôle de la validité du modèle de population

A chaque essai de modélisation, les courbes valeurs observées en fonction des valeurs prédites ont été tracées afin de détecter d'éventuels défauts d'ajustement.

Les VPC (Visual Predictive Check) correspondent à une surface définie par un sous-ensemble des points simulés pour chaque instant t suivant le modèle qui a servi à modéliser les cinétiques plasmatiques (par exemple comme ici l'ensemble des points situés entre le 5^{ème} et le 95^{ème} percentile). Dans cette surface, on place les points réellement observés, afin d'observer l'adéquation entre le modèle et des données expérimentales. A cela peut s'ajouter la courbe représentant les valeurs médianes simulées à chaque instant t . Ces graphiques ont été réalisés avec le logiciel R (version 2.10.1).

Après tous ces ajustements préliminaires un modèle définitif a été retenu avec ses covariables. Les tableaux 12 à 14 donnent les estimations de ces différents paramètres.

Tableau 12 Paramètres de population de l'amoxicilline obtenus pour les cinétiques réalisées suite aux administrations *per os* d'amoxicilline.

Paramètre (unité)	Groupe	Moyenne±écart-type	Valeur de <i>p</i>
Durée du « lag » (h)	bolus oral	0.0602±0.0287	4.3.10 ⁻⁹
	aliment médicamenteux	0.188±0.0897	
Durée de l'ordre 0 (h)	toutes formulations sauf la formulation 7	1.81±0.452	<10 ⁻¹⁰
	formulation 7	5.9±1.47	
Clairance d'élimination (L/kg/h)	formulations 4,5 et 7	3.15±0.7	<10 ⁻¹⁰
	formulation 6 et 8	1.61±0.358	
Volume du compartiment central (L/kg)		3.93±1.21	
Clairance de distribution (L/kg/h)	formulations 4,5 et 7	7.6.10 ⁻⁸ ±4.07.10 ⁻⁸ *	<10 ⁻¹⁰
	formulation 6 et 8	0.577±0.309	
Volume du compartiment périphérique (L/kg)		4.41±5.33	

Les écarts-types sont des estimateurs décrivant la dispersion des données autour de la moyenne.

***p* correspond à la valeur du test de Wald réalisé dans le cas où des groupes différents ont été constitués.**

***Cette valeur très faible indique que pour ces 2 formulations, il n'est pas nécessaire d'avoir un compartiment périphérique**

Les figures 26 à 30 montrent les VPC (Visual Predictive Check) qui permettent d'apprécier visuellement la qualité des ajustements des voies orales. Les surfaces en rose doivent contenir au moins 90% des valeurs observées (points bleus) pour que l'on puisse considérer que l'ajustement est satisfaisant.

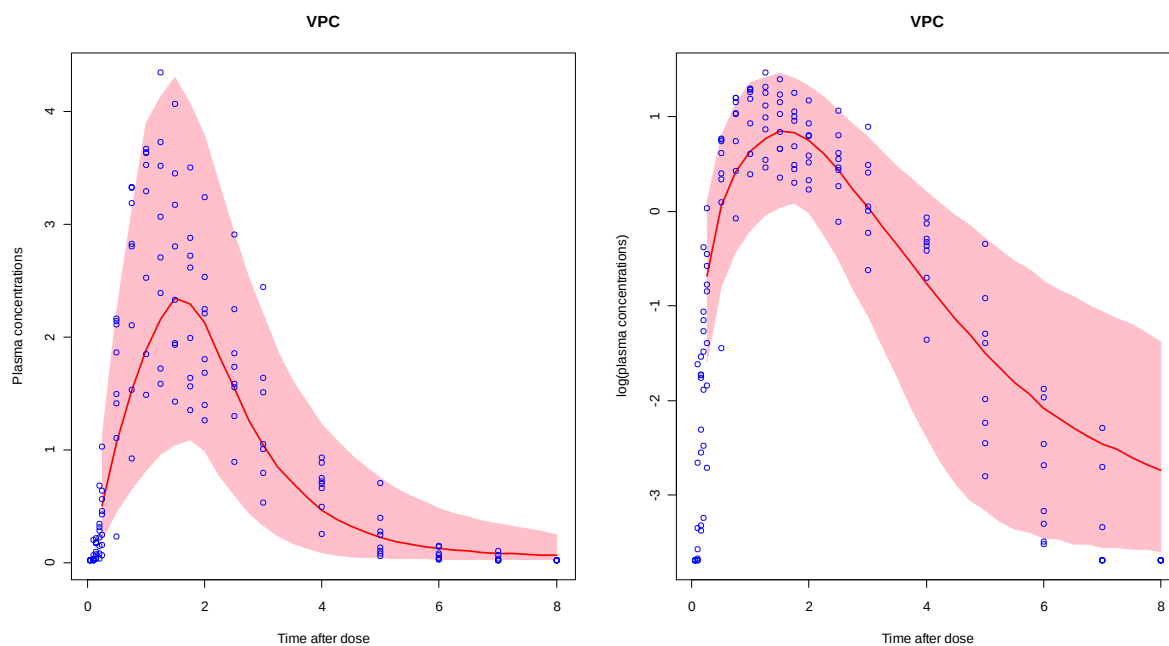


Figure 26 VPC obtenues pour la formulation 4 : bolus oral, animaux à jeun (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

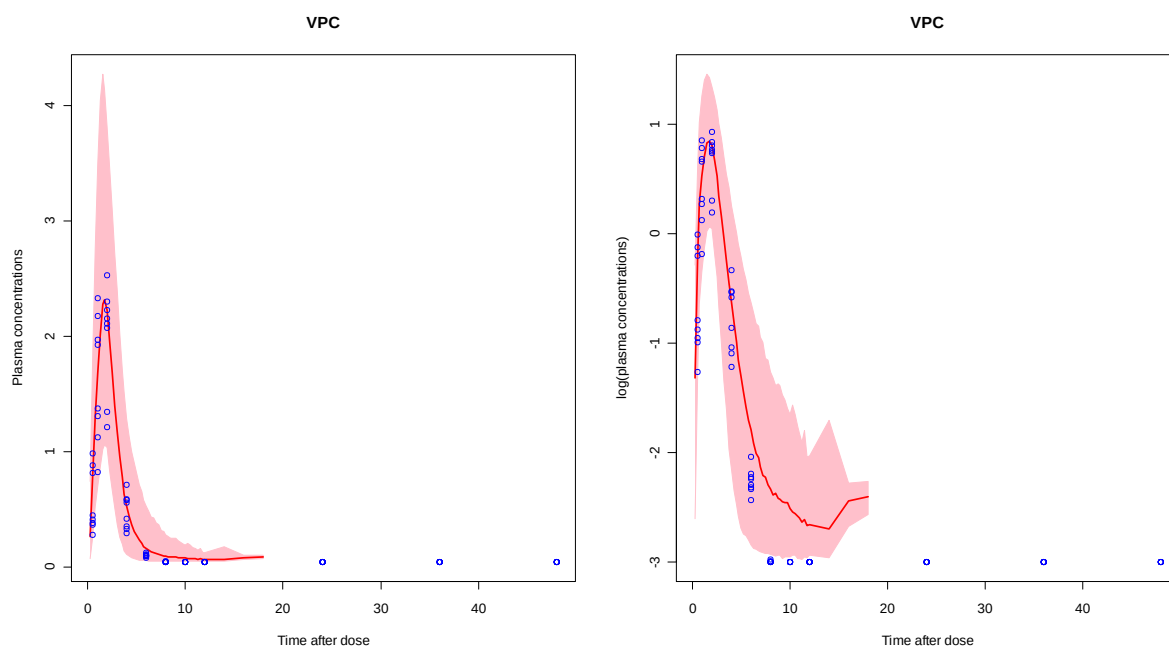


Figure 27 VPC obtenues pour la formulation 5 : aliment médicamenteux (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

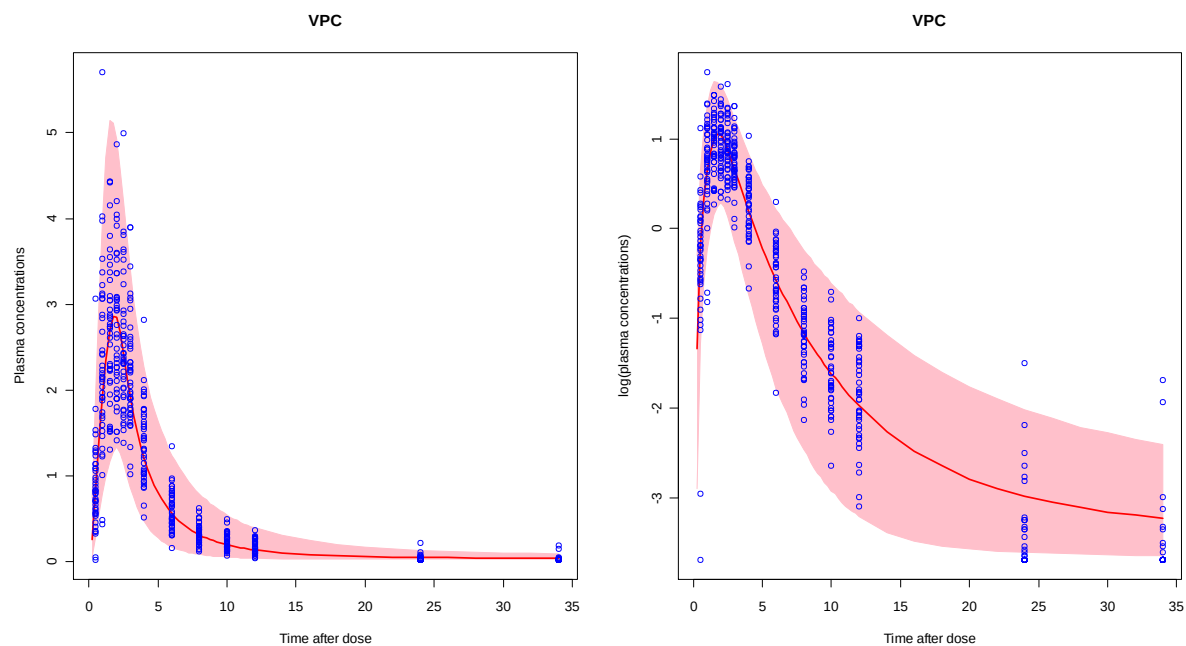


Figure 28 VPC obtenues pour la formulation 6 : aliment médicamenteux (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

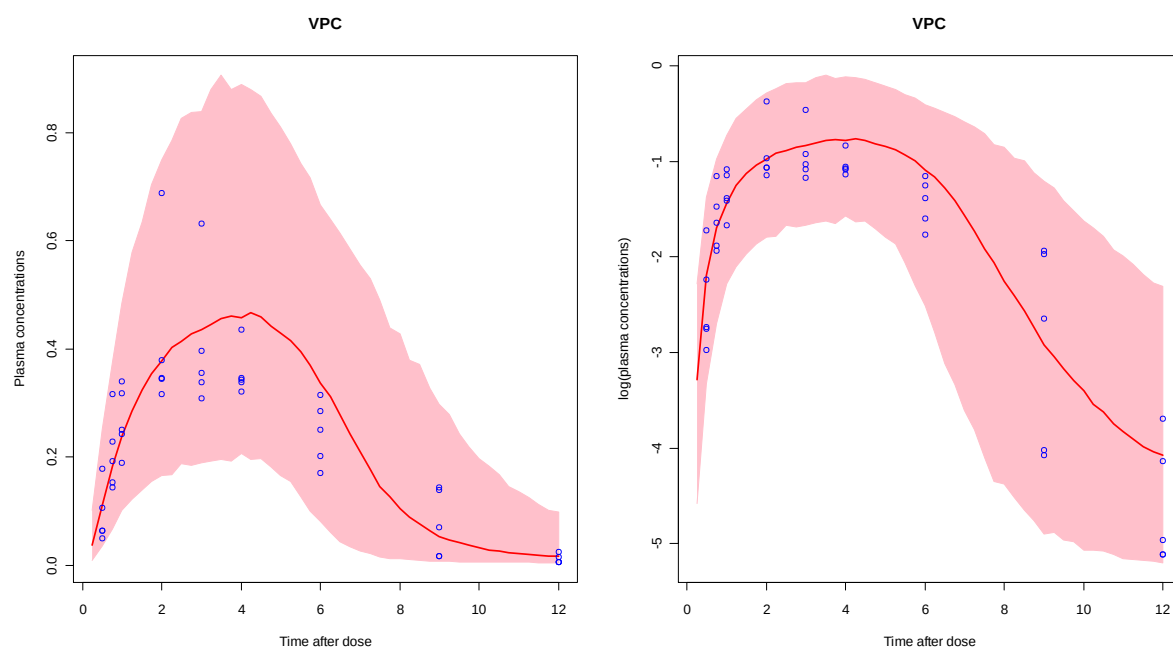


Figure 29 VPC obtenues pour la formulation 7 : aliment médicamenteux (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

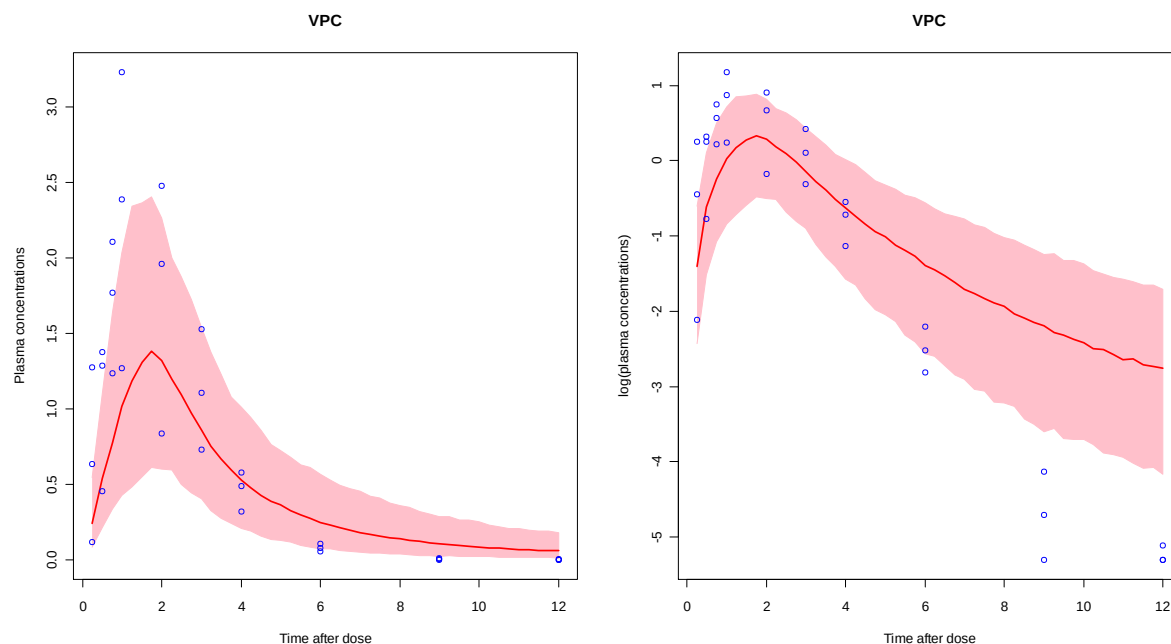


Figure 30 VPC obtenues pour la formulation 8 : bolus oral (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

Figures 26 à 30 : On remarque qu'il y a une bonne adéquation entre les valeurs prédites par le modèle et les valeurs effectivement observées, ce qui signifie que le modèle est bien adapté aux données de départ.

Tableau 13 Paramètres de population de l'amoxicilline obtenus pour les cinétiques réalisées suite aux administrations intramusculaires d'amoxicilline et modélisés avec le modèle bicompartimental.

Paramètre (unité)	Groupe	Moyenne±écart-type	Valeur de p
Constante d'absorption (h-1)	formulation 9	1.77±0.485	<10 ⁻¹⁰
	formulation 10	0.337±0.0924	
Clairance d'élimination (L/kg/h)	formulation 9	0.385±0.08	<10 ⁻¹⁰
	formulation 10	0.55±0.114	
Volume du compartiment central (L/kg)	formulation 9	4.64±1.92	<10 ⁻¹⁰
	formulation 10	0.885±0.367	
Clairance de distribution (L/kg/h)	formulation 9	0.751±0.797	6.1.10 ⁻⁷
	formulation 10	0.216±0.229	
Volume du compartiment périphérique (L/kg)		5.6±5.91	

Les écarts-types sont des estimateurs décrivant la dispersion des données autour de la moyenne.

p correspond à la valeur du test de Wald réalisé dans le cas où des groupes différents ont été constitués.

Tableau 14 Paramètres de population obtenus pour les cinétiques réalisées suite aux administrations intramusculaires avec le modèle à deux constantes d'absorption.

Paramètre (unité)	Groupe	Moyenne±écart-type	Valeur de p
Constante d'absorption 1 (h-1)		0.367±0.11	
Constante d'absorption 2 (h-1)	formulation 9	0.0449±0.0259	<10 ⁻¹⁰
	formulation 10	0.00222±0.00128	
Fraction de la dose attribuée à la constante d'absorption 1 (sans dimension)	formulation 9	0.198±0.104	2.3.10 ⁻⁵
	formulation 10	0.32±0.137	
Clairance d'élimination (L/kg/h)	formulation 9	0.391±0.0635	<10 ⁻¹⁰
	formulation 10	0.216±0.035	
Volume du compartiment central (L/kg)		0.228±0.0694	

Les écarts-types sont des estimateurs décrivant la dispersion des données autour de la moyenne.

p correspond à la valeur du test de Wald réalisé dans le cas où des groupes différents ont été constitués.

Les figures 31 et 32 montrent les VPC (Visual Predictive Check) qui permettent d'apprécier visuellement la qualité des ajustements des formulations administrées par voie intramusculaire. Les surfaces en rose doivent contenir au moins 90% des valeurs observées (points bleus) pour que l'on puisse considérer que l'ajustement est satisfaisant.

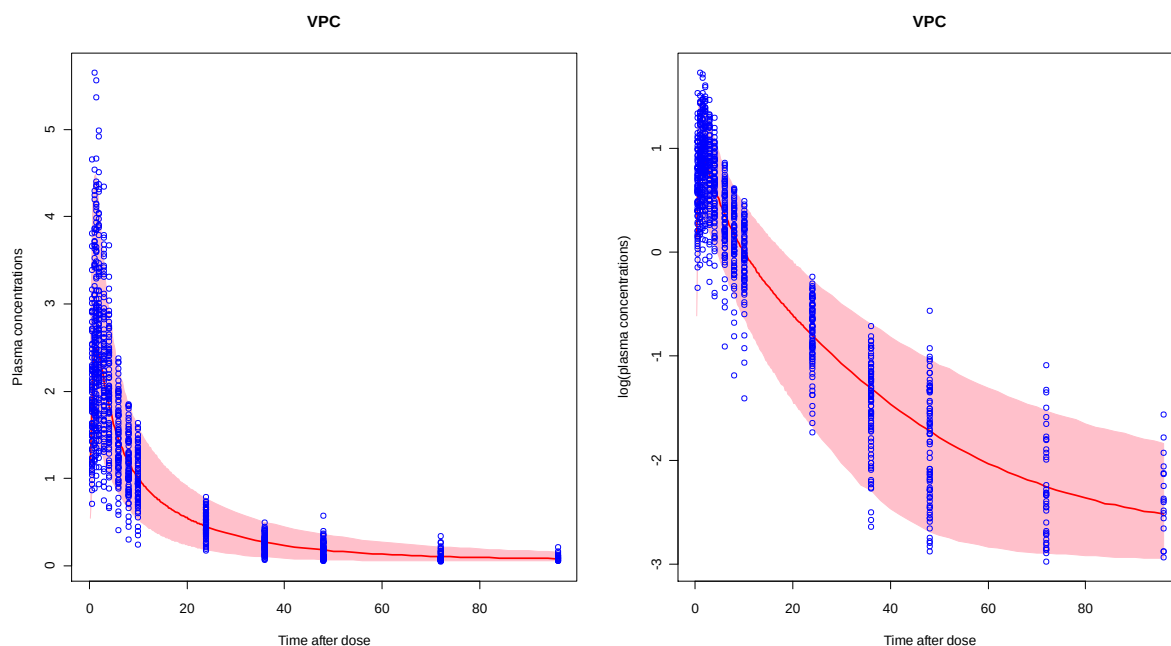


Figure 31 VPC obtenues pour la formulation 9 (formulation intramusculaire longue action) avec le modèle bicompartimental (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

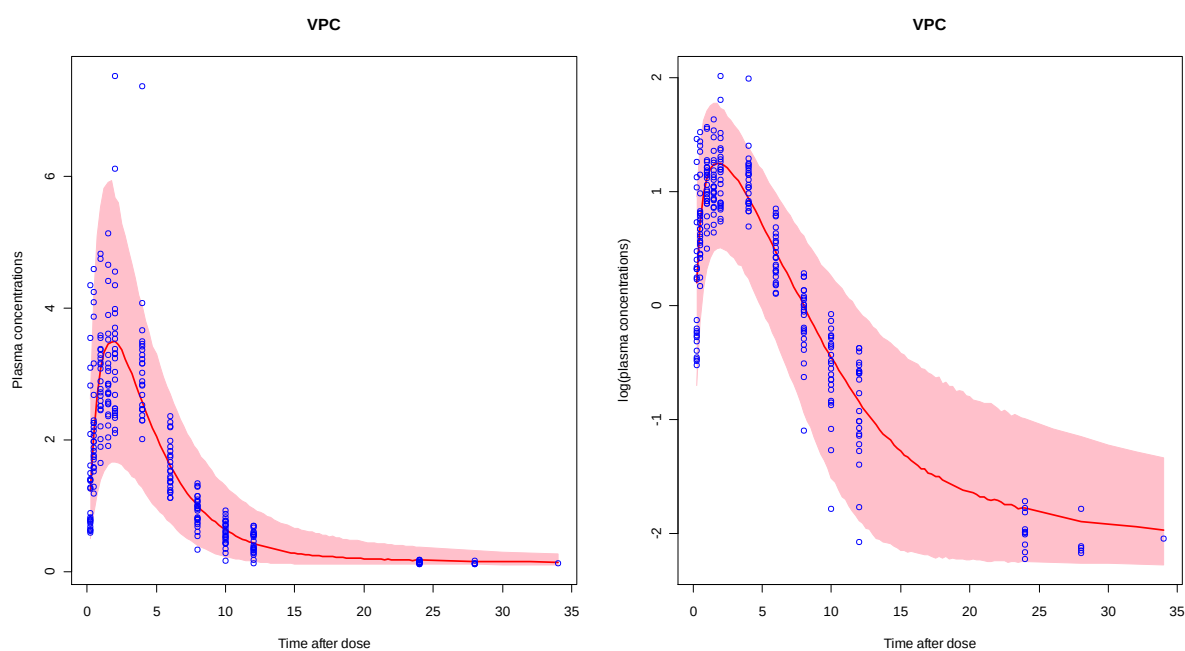


Figure 32 VPC obtenues pour la formulation 10 (formulation intramusculaire longue action) avec le modèle bicompartimental (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)

Figures 31 et 32 : on remarque la bonne adéquation entre les valeurs prédites par le modèle et les valeurs effectivement observées, ce qui plaide pour une bonne adéquation du modèle aux données observées.

2.2 Détermination des valeurs-seuils

A partir des modèles précédemment décrits, des simulations de 1000 individus pour chaque formulation ont été réalisées grâce au logiciel Monolix (version 3.1) à partir des paramètres de population précédemment estimés. L'ensemble de ces simulations a permis d'évaluer l'exposition des porcs à l'amoxicilline dans le cadre de différents schémas posologiques, en recréant des cinétiques de porcs virtuels, avec un pas entre deux concentrations simulées de 15 min. Les schémas posologiques retenus pour les simulations des voies orales correspondent à des doses quotidiennes de 10, 15, 20 ou 40mg/kg, réparties de la manière suivante :

- 2 administrations à 12h d'intervalle (correspondant à la plupart des posologies préconisées dans les AMM)
- 3 administrations réparties de façon similaire aux repas administrés à des porcs à l'engraissement (7h, 12h30 et 18h)
- 4 administrations réparties sur 4 repas à 3h d'intervalle, suivi d'une période de 12h sans repas
- Une « perfusion » durant 15h suivi d'un arrêt de la perfusion pendant 9h, correspondant à un schéma posologique optimale que l'on obtiendrait avec une prise de nourriture permanente sur 15h (maximise le temps au-dessus de la CMI).

Ces cinétiques ont été analysées sous Excel® (version 2007, Microsoft) afin de déterminer chez chaque animal le temps où la concentration plasmatique en amoxicilline libre était supérieure à différentes CMI (entre 0.0625µg/mL et 4µg/mL), le but étant de déterminer le pourcentage de porcs simulés chez lesquels ce temps est supérieur à 40% de l'intervalle de dosage. Le taux de liaison aux protéines plasmatiques a été fixé à 17%, correspondant à ce qui a été observé chez des animaux malades (Agerso, et al., 1998, Agerso, et al., 1998). Ces données ont permis de construire des abaques représentant le pourcentage de porcs au dessus d'une CMI pendant un pourcentage de l'intervalle de dosage donné, en regroupant toutes les formulations d'une même voie sans effectuer de pondération.

3 Résultats des simulations de Monte Carlo et discussion

3.1 Résultats

Tableau 15 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg par voie orale.

% de temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	99.96	99.3	79.36	8.12	0	0
20%	88.32	76.4	54.62	8.42	0	0	0
30%	61.42	43.84	15.36	0.22	0	0	0
40%	36.8	17.64	2	0	0	0	0
50%	23.96	7.18	0.24	0	0	0	0
60%	13.54	2.14	0.08	0	0	0	0
70%	7.86	0.64	0	0	0	0	0
80%	4.02	0.28	0	0	0	0	0
90%	1.94	0.12	0	0	0	0	0
100%	0.76	0.02	0	0	0	0	0

Exemple : 36.8% de la population de porc atteint des concentrations plasmatiques libres en amoxicilline au dessus de 0.0625µg/mL pendant 40% de l'intervalle de dosage

Tableau 16 : Récapitulatif des fractions de la population (%) dont les concentrations plasmatiques en amoxicilline libre dépassent la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage après administration par voie orale (par schéma posologique).

Fractionnement de la dose	Dose totale sur 24h (mg/kg)	Valeur de la CMI (µg/mL)						
		0.0625	0.125	0.025	0.5	1	2	4
1 administration	10	36.8	17.64	2	0	0	0	0
	15	45.82	30.04	9.42	0.26	0	0	0
	20	50.2	37.44	17.26	1.98	0	0	0
	40	58.66	50.2	37.44	17.26	1.98	0	0
2 administrations à 12h d'intervalle	10	76.66	55.46	11.14	0.02	0	0	0
	15	84.22	69.4	40.02	1.86	0	0	0
	20	87.78	75.68	56.54	10.5	0.04	0	0
	40	94.02	87.88	76.46	56.54	10.96	0.04	0
3 administrations à 5.5h d'intervalle	10	96.64	79.02	25.48	0.04	0	0	0
	15	98.5	91.88	58.28	5.38	0	0	0
	20	99.1	96.12	77.74	24.28	0.04	0	0
	40	99.8	99.26	96.18	78.06	24.52	0.1	0
4 administrations à 3h d'intervalle	10	80.36	69.9	16.8	0.06	0	0	0
	15	99.84	98.5	69.06	8.56	0	0	0
	20	100	99.64	89.94	30.48	0.06	0	0
	40	100	99.94	99.6	90.38	31.74	0.12	0
entrée continue sur 15h	10	100	99.98	50.52	0.48	0	0	0
	15	100	100	97.72	24.98	0	0	0
	20	100	100	99.98	60.62	0.62	0	0
	40	100	100	100	99.64	50.86	0.44	0

On remarque quela fraction de la population atteignant l'objectif « 40% du temps au dessus de la CMI » augmente avec la dose.

Tableau 17 : Récapitulatif des fractions de la population (%) dont les concentrations plasmatiques en amoxicilline libre dépassent la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage après administration par voie orale (par dose quotidienne).

Dose totale sur 24h (mg/kg)	Fractionnement de la dose	Valeur de la CMI (µg/mL)						
		0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
10	1 administration	36.8	17.64	2	0	0	0	0
	2 administrations à 12h d'intervalle	76.66	55.46	11.14	0.02	0	0	0
	3 administrations à 5.5h d'intervalle	96.64	79.02	25.48	0.04	0	0	0
	4 administrations à 3h d'intervalle	80.36	69.9	16.8	0.06	0	0	0
	Entrée continue sur 15h	100	99.98	60.52	0.48	0	0	0
15	1 administration	45.82	30.04	9.42	0.26	0	0	0
	2 administrations à 12h d'intervalle	84.22	69.4	40.02	1.86	0	0	0
	3 administrations à 5.5h d'intervalle	98.5	91.88	58.28	5.38	0	0	0
	4 administrations à 3h d'intervalle	99.84	98.5	69.06	8.56	0	0	0
	Entrée continue sur 15h	100	100	97.72	24.98	0	0	0
20	1 administration	50.2	37.44	17.26	1.98	0	0	0
	2 administrations à 12h d'intervalle	87.78	75.68	56.54	10.5	0.04	0	0
	3 administrations à 5.5h d'intervalle	99.1	96.12	77.74	24.28	0.04	0	0
	4 administrations à 3h d'intervalle	100	99.64	89.94	30.48	0.06	0	0
	Entrée continue sur 15h	100	100	99.98	60.62	0.62	0	0
40	1 administration	58.66	50.2	37.44	17.26	1.98	0	0
	2 administrations à 12h d'intervalle	94.02	87.88	76.46	56.54	10.96	0.04	0
	3 administrations à 5.5h d'intervalle	99.8	99.26	96.18	78.06	24.52	0.1	0
	4 administrations à 3h d'intervalle	100	99.94	99.6	90.38	31.74	0.12	0
	"perfusion" sur 15h	100	100	100	99.64	50.86	0.44	0

On remarque que la fraction de la population atteignant l'objectif PK/PD augmente avec le fractionnement de la dose, avec un optimum pour l'administration de type entrée continue (cas limite) ce qui veut dire que le rendement d'un dose en termes d'objectif PK/PD est d'autant plus grand que l'amoxicilline est administrée de façon continue par voie orale. On notera qu'aucun des schémas posologiques testés ne permet d'atteindre l'objectif PK/PD sur aucun porc si la CMI est de 2µg/mL c'est-à-dire à la valeur fixé pour le breakpoint utilisé en France.

Tableau 18 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 15mg/kg d'amoxicilline par voie intramusculaire.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	50	50
10%	100	100	100	100	96.4	9.75	0
20%	100	99.85	98.2	85.3	35.9	0.05	0
30%	98	92.8	77.1	50.7	6.45	0	0
40%	91.15	78.4	59.1	34.05	1	0	0
50%	83.65	67.1	49.05	20.2	0	0	0
60%	76.1	59.6	40.3	9	0	0	0
70%	70.15	53.6	32.2	3.65	0	0	0
80%	64.35	47.35	24.9	0.85	0	0	0
90%	59.9	41.45	17.5	0.2	0	0	0
100%	55.4	35.65	10.85	0	0	0	0

Tableau 19 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 30mg/kg d'amoxicilline par voie intramusculaire.

temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	50	50
10%	100	100	100	100	100	46.85	9.75
20%	100	100	99.9	98.25	85.35	27.65	0.05
30%	99.8	98.05	92.8	77.05	50.7	6.3	0
40%	97.3	91.15	78.3	59.05	34.05	1	0
50%	93.2	83.6	67.1	48.95	20.2	0	0
60%	89	76.1	59.6	40.2	9.05	0	0
70%	85.25	70.2	53.55	32.1	3.7	0	0
80%	80.85	64.35	47.25	24.8	0.85	0	0
90%	76.9	59.85	41.35	17.5	0.2	0	0
100%	72.35	55.35	35.5	10.85	0	0	0

Les tableaux Tableau 16 à Tableau 19 montrent que les concentrations plasmatiques en amoxicilline libre n'excèdent la CMI pendant 40% du temps chez 90% de la population que pour des valeurs de CMI assez faibles (voir aussi Tableau 20 à Tableau 38 en annexes).

En effet, si on devait établir un cut-off PK/PD en fonction de cet objectif pour l'amoxicilline administrée par voie orale, on obtiendrait une valeur de CMI inférieure à 0.0625µg/mL en suivant les schémas posologiques énoncés dans les résumés des caractéristiques des produits (RCP) (10, 15 et 20mg/kg à 12h d'intervalle).

Si ces mêmes doses sont fragmentées en trois, avec une répartition similaire à celle des repas des porcs à l'engraissement, on obtient un cut-off PK/PD de 0.0625µg/mL pour une dose quotidienne de 10mg/kg, et de 0.125µg/mL pour des doses quotidiennes de 15 et 20mg/kg.

Dans le cas d'une administration de ces mêmes doses en continu pendant 15h (scénario optimal et approximation grossière des modalités de consommation alimentaire des porcs en post-sevrage) on atteint l'objectif PK/PD des 90% de la population ayant une concentration plasmatique en amoxicilline libre pendant au moins 40% de l'intervalle de dosage pour une CMI limite de 0.125µg/mL pour une dose quotidienne de 10mg/kg, et de 0.25µg/mL pour 15 et 20mg/kg.

L'utilisation de l'amoxicilline à 40mg/kg (deux fois supérieure à la dose la plus élevée des résumés des caractéristiques des produits) ne permet d'atteindre l'objectif PK/PD pour une CMI de 0.5µg/mL qu'avec un fractionnement en 4 doses quotidienne ou une administration en continu pendant 15h.

De façon similaire, l'étude des l'amoxicilline administrée par voie intramusculaire conduit a des cut-off PK/PD de 0.0625 et 0.125µg/mL selon qu'elle soit utilisée à 15 ou 30mg/kg/48h (une et deux fois la dose recommandée).

3.2 Discussion

Ce travail de thèse avait pour but de démontrer la faisabilité de la détermination de valeurs de cut-off de CMI à partir d'information de type PK/PD (temps au-dessus de la CMI) par une méthode dite de Monte Carlo, les valeurs ainsi obtenues servant à alimenter la réflexion pour statuer sur les valeurs de breakpoints. L'étude, portant sur l'emploi de l'amoxicilline chez le porc, a visé à déterminer jusqu'à quel niveau de CMI, 90% de la population de porcs traités pouvait atteindre des concentrations plasmatiques supérieures à la CMI pendant plus de 40% de l'intervalle de dosage. Le choix de cette approche a permis de prendre en compte la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques, élément qui est primordiale dans le cadre de la médecine de population.

Ce travail a porté sur des données brutes de cinétiques plasmatiques afin de pouvoir analyser de façon identique des données provenant de différentes sources.

La diversité des méthodes analytiques employées dans les études, ainsi que les différences de schémas expérimentaux (durée de l'étude, gavage ou aliment médicamenteux pour les voies orales, doses utilisées) a été une des principaux problèmes de notre analyse de données. Les différences de limites de quantification se sont révélées être le facteur le plus limitant. En effet, dans l'exemple des cinétiques orales, alors que certaines études permettaient d'observer des cinétiques plasmatiques de l'amoxicilline en trois phases, certaines ne permettaient d'en observer que deux. Dans le cadre de l'étude de population, cela a conduit à n'estimer la dernière phase que sur la base d'un nombre limité de porcs.

On peut par ailleurs se demander si le nombre d'animaux et le nombre de formulations étudiées sont suffisant pour déterminer un cut-off représentatif de toutes les situations.

Les modèles de population présentés dans le cadre de cette étude n'ont chacun pris en compte que les cinétiques plasmatiques concernant une voie d'administration unique. Par ailleurs, la modélisation des cinétiques issues d'études de bioéquivalence ont conduit à ne pas tenir compte de la variabilité inter-occasion.

Dans le cadre de cette étude, les modes d'alimentation réels des porcs, en particulier en post sevrage, n'ont pu être retranscrits de façon optimale par les modèles proposés pour la voie orale. En effet, à ce poste, les porcs sont nourris à volonté et présentent des comportements alimentaires complexes, avec des animaux « picoreurs » prenant leur ration de façon très fragmentée alors que d'autres font des repas beaucoup plus conséquents. On peut également

s'attendre à ce que les animaux malades limitent leur prise alimentaire et donc aient tendance à être sous-exposés en antibiotique lors d'administration *via* l'aliment.

A cela s'ajoutent les phénomènes de compétition entre individus, entraînant au sein de la même case l'existence d'animaux sur- et sous-exposés, avec une corrélation entre eux, dépendant, entre autres, du nombre d'animaux dans la case et du nombre d'auges.

Par ailleurs, compte-tenu de l'administration de médicaments *via* l'aliment, il apparaît souhaitable de ne plus exprimer les posologies par rapport à la ration (ppm d'antibiotique d'aliment) mais directement par rapport au poids de l'animal (mg/kg de poids vif), la quantité ingérée relative au poids diminuant lorsque l'animal grossit.

Les modèles de population présentés dans le cadre de cette étude n'ont pris en compte que les cinétiques plasmatiques concernant une voie d'administration unique. Par ailleurs, la modélisation des cinétiques issues d'études de bioéquivalence ont conduit à ne pas tenir compte de la variabilité intraindividuelle. Un modèle prenant en compte l'ensemble des cinétiques plasmatiques (toutes voies confondues) ainsi que la variabilité intraindividuelle est actuellement à l'étude et sera l'objet d'une prochaine publication.

Le choix du pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques, basé sur une étude chez des porcs malades chez lesquels la liaison de l'amoxicilline aux protéines plasmatiques est inférieure à celle rencontrée chez les animaux sains (Agerso, et al., 1998, Agerso, et al., 1998), a eu possiblement pour effet de surévaluer légèrement les concentrations plasmatiques en amoxicilline libre.

Les résultats obtenus sont tous en faveur d'un cut-off PK/PD pour la CMI de l'amoxicilline entre 0.0625 et 0.25 μ g/mL selon les schémas posologiques, bien en deçà des breakpoints actuellement admis (ex. : entre 0.5 et 4 μ g/mL en France pour le CA-SFM). En effet, les valeurs de breakpoints retenues par les organismes normatifs sont presque toutes supérieures ou égales à 0.5 μ g/mL. Si le critère « 90% de la population au dessus de la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage » était retenu, seuls des schémas posologiques où l'amoxicilline est utilisée à une dose quotidienne double de celle conseillée dans les RCP arriveraient à atteindre de telles valeurs.

Les valeurs de cut-off obtenues par Schwarz (Schwarz, et al., 2008) de 0.5 μ g/mL et 1 μ g/mL semblent plus en adéquation avec ces résultats, mais sont supérieures d'un facteur supérieur à 2. Dans le cas où nous nous serions fixé un objectif de 50% de la population au-dessus de la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage, nous obtiendrions des cut-offs plus proches de ces valeurs (ex. : 0.5 μ g/mL pour une « perfusion orale » de 20mg/kg d'amoxicilline pendant 5h), ce

qui constitue une approximation des résultats qui auraient pu être obtenus avec une approche basée sur des valeurs ponctuelles moyennes ou médianes ; cela démontre donc l'intérêt de la prise en compte de la variabilité interindividuelle. De façon similaire, la détermination de cut-off PK/PD suivant des méthodes de Monte Carlo chez l'homme a conduit à des valeurs inférieures à celles couramment utilisées. Cette révision à la baisse des cut-offs a conduit des auteurs à attribuer l'apparition de résistances envers certaines céphalosporines à ces valeurs de cut-off initialement trop élevées (Dalhoff, et al., 2009).

Toutefois il faut noter dans notre étude l'existence d'une variabilité entre les formulations (non distinguable de l'effet site/expérimentation) conduisant à des différences de l'ordre d'une dilution si des cut-off PK/PD avaient été déterminés pour chaque formulation (résultats non présentés). Ainsi, dans le cadre de cette démarche PK/PD, on pourrait aisément déterminer des cut-off spécifiques pour chaque voie et pour chaque formulation, ce qui pourrait constituer un argument commercial pour les firmes pharmaceutiques, mais rendrait encore plus délicat l'établissement d'un breakpoint unique. Cette approche du breakpoint « personnalisé » a été proposée en pisciculture (Smith, 2008)

Enfin, il ne faut pas perdre de vue que cette étude est purement axée sur un objectif PK/PD validé chez l'homme et les rongeurs de laboratoire, avec un objectif d'être au dessus de la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage. Un tel objectif n'a pas été validé chez le porc. On ne peut pas exclure que pour les pathologies traitées chez le porc, notamment dans le cadre de métaphylaxie, qu'une action clinique de l'amoxicilline se voit pour des concentrations plasmatiques inférieures aux CMI et que l'objectif PK/PD chez le porc pourrait être moins contraignant que celui d'avoir des concentrations plasmatiques supérieures aux CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage. Le critère de référence qui devrait être idéalement utilisé comme critère interprétatif de l'antibiogramme pour le praticien reste le breakpoint clinique ce qui implique la réalisation d'essais cliniques randomisés contre placebo ; cela n'est actuellement pas réalisé car les autorités réglementaires se contentent d'essais de non infériorité contre des substances dont on ignore ce qu'elles-mêmes donneraient contre un placebo.

A partir de notre étude il serait logique de proposer une révision à la baisse des breakpoints actuels ; cela aurait pour conséquence directe de déclarer un plus grand nombre de pathogènes comme étant cliniquement résistants et indirectement d'encourager le prescripteur vers d'autres familles d'antibiotiques (ex. : céphalosporines), avec le risque d'émergence de nouvelles résistances encore plus préoccupantes en termes de santé publique.

L'établissement d'un breakpoint ne peut donc être que le fruit d'une expertise partagée entre bactériologistes, cliniciens et pharmacologues portant sur tous les aspects de l'antibiothérapie avec pour objectif de minimiser les problèmes de santé publique.

Références

1. Code de la santé publique.
2. Guide de bonnes pratiques de l'antibiothérapie vétérinaire à l'usage des vétérinaires. GTV.
3. *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires*. Editions du Point Vétérinaire, 2007.
4. AFSSA-ANMV.
Index des Médicaments vétérinaires autorisés en France.
<http://www.anmv.afssa.fr/ircpweb/>, date last accessed).
5. Agerso H., Friis C.
Bioavailability of amoxycillin in pigs.
J Vet Pharmacol Ther, 1998, **21**: 41-46.
6. Agerso H., Friis C.
Penetration of amoxycillin into the respiratory tract tissues and secretions in pigs.
Res Vet Sci, 1998, **64**: 245-250.
7. Agerso H., Friis C., Haugegaard J.
Water medication of a swine herd with amoxycillin.
J Vet Pharmacol Ther, 1998, **21**: 199-202.
8. Agerso H., Friis C., Nielsen J.P.
Penetration of amoxycillin to the respiratory tract tissues and secretions in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs.
Res Vet Sci, 1998, **64**: 251-257.
9. Agerso H., Friis C., Nielsen J.P.
Pharmacokinetics and tissue distribution of amoxicillin in healthy and *Salmonella Typhimurium*-inoculated pigs.
Am J Vet Res, 2000, **61**: 992-996.
10. AgriMer F.
Filière porcine. <http://www.franceagrimer.fr/informations/publications/F-elevage/09-09-15/porcs-96B.pdf>
11. Ambrose P.G., Meagher A.K., Passarell J.A., Van Wart S.A., Cirincione B.B., Rubino C.M., Korth-Bradley J.M., Babinchak T., Ellis-Grosse E.
Use of a clinically derived exposure-response relationship to evaluate potential tigecycline-Enterobacteriaceae susceptibility breakpoints.
Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, **63**: 38-42.
12. Andrews J.M.
Determination of minimum inhibitory concentrations.
J Antimicrob Chemother, 2001, **48**: 5-16.
13. Anfossi P., Zaghini A., Grassigli G., Menotta S., Fedrizzi G.
Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs.

- J Vet Pharmacol Ther*, 2002, **25**: 329-334.
14. Atkinson A.J., Daniels C.E., Dedrick R.L., Grudzinskas C.V., Markey S.P.
Principles of Clinical Pharmacology. 2001.
 15. Aubry A., Fablet C., Correge I.
Incidence technico-économique des maladies pulmonaires. *Journées Recherche Porcine*, 2010.
 16. Barr W.H., Zola E.M., Candler E.L., Hwang S.-M., Tendolkar A.V., Shamburek R., Parker B., Hilty M.D.
Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine.
Clin Pharm Ther, 1994, **56**: 279-285.
 17. Bonate P.L.
Clinical trial simulation in drug development.
Pharm Res, 2000, **17**: 252-256.
 18. Bonate P.L.
A brief introduction to Monte Carlo simulation.
Clin Pharmacokinet, 2001, **40**: 15-22.
 19. Bryskier A.
Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. 1999.
 20. BSAC.
BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2009.
 21. Bywater R., Silley P., Simjee S.
Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements.
Vet Microbiol, 2006, **118**: 158-159.
 22. CA-SFM.
Recommandations 2010. Société Française de Microbiologie, 2010.
 23. CA-SFM.
Communiqué 2010 (Janvier) du Groupe de travail : AntibioGramme Vétérinaire du Comité de l'AntibioGramme de la Société Française de Microbiologie. 2010.
 24. Chesa-Jimenez J., Peris J.E., Torres-Molina F., Granero L.
Low bioavailability of amoxicillin in rats as a consequence of presystemic degradation in the intestine.
Antimicrob Agents Chemother, 1994, **38**: 842-847.
 25. Chevance, Moulin.
Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008. AFSSA-ANMV, 2009.
 26. CLSI.
Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinaria Antimicrobial Agents; Approved Guideline. 2006.

27. Craig W.A.
Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men.
Clin Infect Dis, 1998, **26**: 1-10.
28. Dalhoff A., Ambrose P., Mouton J.
A Long Journey from Minimum Inhibitory Concentration Testing to Clinically Predictive Breakpoints: Deterministic and Probabilistic Approaches in Deriving Breakpoints.
Infection, 2009, **37**: 296-305.
29. Del Castillo J., Julie J. Roy, S. Messier, R. Higgins, J.-G.Besner, G.-P Martineau.
Métaphylaxie de Streptococcus suis chez le porcelet sevré avec l'amoxicilline orale.
Journées de la Recherche Porcine en France, 1998, 411-416.
30. EUCAST.
Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.
Clin Microbiol Infect, 2000, **6**: 6.
31. EUCAST
Antimicrobial wild type distributions of microorganisms.
<http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Mcidif=mic&NumberIndex=50&Antib=315&Specium=-1>, (2010: date last accessed).
32. EUCAST
Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2010.
33. Frimodt-Møller N.
How predictive is PK/PD for antibacterial agents?
Int J Antimicrob Agents, 2002, **19**: 333-339.
34. Gilbert P., Collier P.J., Brown M.R.W.
Influence of Growth-Rate on Susceptibility to Antimicrobial Agents - Biofilms, Cell-Cycle, Dormancy, and Stringent Response.
Antimicrob Agents Chemother, 1990, **34**: 1865-1868.
35. Guardabassi L., Jensen L.B., Kruse H.
Guide to Antimicrobial Use in Animal. 2008.
36. Hammersley J.M.
Monte Carlo methods for solving multivariable problems.
Ann New York Acad Sci, 1960, **86**: 844-874.
37. Hernandez E., Rey R., Puig M., Garcia M.A., Solans C., Bregante M.A.
Pharmacokinetics and residues of a new oral amoxicillin formulation in piglets: a preliminary study.
Vet J, 2005, **170**: 237-242.
38. Hubschwerlen C., John B.T., David J.T.
[beta]-Lactam Antibiotics. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier, 2007, 479-518.

39. Jensen G.M., Lykkesfeldt J., Frydendahl K., Moller K., Svendsen O.
Pharmacokinetics of amoxicillin after oral administration in recently weaned piglets with experimentally induced *Escherichia coli* subtype O149:F4 diarrhea.
Am J Vet Res, 2004, **65**: 992-995.
40. Jensen G.M., Lykkesfeldt J., Frydendahl K., Moller K., Svendsen O.
Pharmacokinetics of amoxicillin administered in drinking water to recently weaned 3- to 4-week-old pigs with diarrhea experimentally induced by *Escherichia coli* O149:F4.
Am J Vet Res, 2006, **67**: 648-653.
41. Kahlmeter G., Brown Derek EJ.
Harmonization of Antimicrobial Breakpoints
in Europe- Can It Be Achieved?
Clin Microbiol Newsl, 2004, **26**: 6.
42. Kahlmeter G., Brown D.F., Goldstein F.W., MacGowan A.P., Mouton J.W., Odenholt I., Rodloff A., Soussy C.J., Steinbakk M., Soriano F., Stetsiouk O.
European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing.
Clin Microbiol Infect, 2006, **12**: 501-503.
43. Labroue F., Guéblez R., Meunier-Salaün M.-C., Sellier P.
Alimentation électronique dans les stations publiques de contrôle des performances : paramètres descriptif du comportement alimentaire. *Journées de la recherche porcine en France*, 1993.
44. Lees P., Concordet D., Aliabadi F.S., Toutain P.-L.
Drug Selection and Optimization of Dosage Schedules To Minimize Antimicrobial Resistance.
In: Aarestrup F.M., ed. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origins*, 2006.
45. Levison M.E.
Pharmacodynamics of antimicrobial drugs.
Infect Dis Clin North Am, 2004, **18**: 451-465, vii.
46. Li J., Petit-Jette C.E., Gohore Bi D., Fenneteau F., Del Castillo J.R., Nekka F.
Assessing pharmacokinetic variability directly induced by drug intake behaviour through development of a feeding behaviour-pharmacokinetic model.
J Theor Biol, 2008, **251**: 468-479.
47. Martineau G.-P.
Maladies d'élevage des porcs. 1997.
48. Martinez-Larranaga M.R., Anadon A., Martinez M.A., Diaz M.J., Frejo M.T., Castellano V.J., Isea G., De la Cruz C.O.
Pharmacokinetics of amoxycillin and the rate of depletion of its residues in pigs.
Vet Rec, 2004, **154**: 627-632.
49. Metropolis N.
The beginning of the Monte Carlo method.
Los Alamos Science, 1987: 5.

50. Metropolis N., Ulam S.
The Monte Carlo method.
J Am Stat Assoc, 1949, **44**: 335-341.
51. Metzler C.M., DeHaan R.M.
Susceptibility Tests of Anaerobic Bacteria: Statistical and Clinical Considerations.
J Infect Dis, 1974, **130**: 588-594.
52. Montgomery M.J., Beringer P.M., Aminimanizani A., Louie S.G., Shapiro B.J., Jelliffe R., Gill M.A.
Population pharmacokinetics and use of Monte Carlo simulation to evaluate currently recommended dosing regimens of ciprofloxacin in adult patients with cystic fibrosis.
Antimicrob Agents Chemother, 2001, **45**: 3468-3473.
53. Morthorst D.
Bioavailability of Amoxicillin in Weaning Piglets After Oral and Parenteral Administration by Feed and Water under Different Conditions. *Tierärztliche Hochschule*. Hanover, 2002.
54. Mouton J.W.
Breakpoints: current practice and future perspectives.
Int J Antimicrob Agents, 2002, **19**: 323-331.
55. Paintaud G., Alván G., Dahl M., Grahnén A., Sjövall J., Svensson J.
Nonlinearity of amoxicillin absorption kinetics in human.
Eur J Clin Pharmacol, 1992, **43**: 283-288.
56. Pankey G.Â A., Sabath L.Â D.
Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gramâ€• Positive Bacterial Infections.
Clin Infect Dis, 2004, **38**: 864-870.
57. Penel N., Yazdanpanah Y.
Vancomycin flush as antibiotic prophylaxis for early catheter-related infections: a cost-effectiveness analysis.
Support Care Cancer, 2009, **17**: 285-293.
58. Pijpers A., Van K., B., Schoevers E.J., Verheijden J.H.M., Van Miert A.S.J.P.A.M.
In vitro activity of five tetracyclines and some other antimicrobial agents against four porcine respiratory tract pathogens.
J Vet Pharmacol Ther, 1989, **12**: 267-276.
59. Reyns T., De Boever S., Baert K., Croubels S., Schauvliege S., Gasthuys F., De Backer P.
Disposition and oral bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid in pigs.
J Vet Pharmacol Ther, 2007, **30**: 550-555.
60. Reyns T., De Boever S., De Baere S., De Backer P., Croubels S.
Tissue depletion of amoxicillin and its major metabolites in pigs: influence of the administration route and the simultaneous dosage of clavulanic acid.
J Agric Food Chem, 2008, **56**: 448-454.

61. Reyns T.D.B., S.; De Baere, S.; Croubels, S.; De Backer, P.
Influence of the administration route and simultaneous administration dosage of clavulanic acid on the biotransformation of amoxicillin in pigs. *3rd International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine*. Orlando, 2006.
62. Riviere J.E., Papich M.G.
Veterinary Pharmacology & Therapeutics. 2009.
63. Sanchez-Recio M.M., Colino C.-I., Sanchez-Navarro A.
A retrospective analysis of pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as indicators of the clinical efficacy of ciprofloxacin.
J Antimicrob Chemother, 2000, **45**: 321-328.
64. Schwarz S., Bottner A., Goossens L., Hafez H.M., Hartmann K., Kaske M., Kehrenberg C., Kietzmann M., Klarmann D., Klein G., Krabisch P., Luhofer G., Richter A., Schulz B., Sigge C., Waldmann K.H., Wallmann J., Werckenthin C.
A proposal of clinical breakpoints for amoxicillin applicable to porcine respiratory tract pathogens.
Vet Microbiol, 2008, **126**: 178-188.
65. Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., van Duijkeren E., Johnson A.P., Gaastra W.
Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals.
Veterinary Microbiology, 2010, **141**: 1-4.
66. Smith H.J., Nichol K.A., Hoban D.J., Zhanel G.G.
Stretching the mutant prevention concentration (MPC) beyond its limits.
J Antimicrob Chemother, 2003, **51**: 1323-1325.
67. Smith P.
A cost-benefit analysis of the application of pharmacokinetic/pharmacodynamic-based approaches to setting disc diffusion breakpoints in aquaculture: A case study of oxolinic acid and *Aeromonas salmonicida*.
Aquaculture, 2008, **284**: 2-18.
68. Tanigawa M., Sawada T.
Exposure time-dependent bactericidal activities of amoxicillin against *Actinobacillus pleuropneumoniae*; an in vitro and in vivo pharmacodynamic model.
J Vet Med, 2003, **50**: 436-442.
69. Torres-Molina F., Peris-Ribera J.E., García-Carbonell M.C., Aristorena J.C., Plá-Delfina J.M.
Nonlinearities in amoxycillin pharmacokinetics II. Absorption studies in the rat.
Biopharm Drug Dispos, 1992, **13**: 39-53.
70. Toutain P.-L., Bousquet-Melou A., Martinez M.
AUC/MIC: a PK/PD index for antibiotics with a time dimension or simply a dimensionless scoring factor?
J Antimicrob Chemother, 2007, **60**: 1185-1188.
71. Turnidge J., Paterson D.L.
Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints.
Clin Microbiol Rev, 2007, **20**: 391-408, table of contents.

72. Turnidge J.D.
The Pharmacodynamics of β -Lactams.
Clin Infect Dis, 1998, **27**: 10-22.
73. Walker R.D.
Antimicrobial susceptibility testing methods and interpretation of results.
In: Gigère S., Prescott J.F., Baggot J.D. et al., eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 2006.
74. Washington J.A., II.
The Effects and Significance of Subminimal Inhibitory Concentrations of Antibiotics.
Rev Infect Dis, 1979, **1**: 781-786.
75. Woodnutt G., Berry V.
Two Pharmacodynamic Models for Assessing the Efficacy of Amoxicillin-Clavulanate against Experimental Respiratory Tract Infections Caused by Strains of *Streptococcus pneumoniae*.
Antimicrob Agents Chemother, 1999, **43**: 29-34.

Annexes

Tableau 20 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 15mg/kg par voie orale

% temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	99.98	99.94	97.2	49.16	0.26	0
20%	92.14	84	68.66	37.68	0.78	0	0
30%	67.82	55.42	33.38	5.3	0	0	0
40%	45.82	30.04	9.42	0.26	0	0	0
50%	32.96	16.34	2.9	0	0	0	0
60%	23.62	7.94	0.58	0	0	0	0
70%	16.04	3.68	0.14	0	0	0	0
80%	10.82	1.62	0.02	0	0	0	0
90%	6.64	0.62	0	0	0	0	0
100%	3.64	0.16	0	0	0	0	0

Tableau 21 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 20mg/kg par voie orale

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	99.98	99.98	99.44	78.82	7.94	0
20%	93.94	87.8	76.24	54.86	8.38	0	0
30%	72.14	61.1	44.14	15.84	0.24	0	0
40%	50.2	37.44	17.26	1.98	0	0	0
50%	37.7	23.6	6.6	0.24	0	0	0
60%	29.36	13.84	1.92	0	0	0	0
70%	21.96	7.16	0.52	0	0	0	0
80%	16.12	3.44	0.18	0	0	0	0
90%	10.94	1.72	0.04	0	0	0	0
100%	6.42	0.76	0	0	0	0	0

Tableau 22 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 40mg/kg par voie orale

temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	99.98	99.98	99.44	78.82	7.94
20%	97.46	93.94	87.8	76.24	54.86	8.38	0
30%	80.14	72.14	61.1	44.14	15.84	0.24	0
40%	58.66	50.2	37.44	17.26	1.98	0	0
50%	45.5	37.7	23.6	6.6	0.24	0	0
60%	38.08	29.36	13.84	1.92	0	0	0
70%	33.1	21.96	7.16	0.52	0	0	0
80%	29.02	16.12	3.44	0.18	0	0	0
90%	24.14	10.94	1.72	0.04	0	0	0
100%	17.88	6.42	0.76	0	0	0	0

Tableau 23 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 5mg/kg à 12 h d'intervalle par voie orale.

temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	99.86	92.7	58.04	0.3	0	0
20%	99.94	99.4	79.44	9.22	0	0	0
30%	95.18	81.98	37.34	0.38	0	0	0
40%	76.66	55.46	11.14	0.02	0	0	0
50%	60.94	35.3	2.62	0	0	0	0
60%	43.94	16.68	0.42	0	0	0	0
70%	30.58	7.14	0.06	0	0	0	0
80%	20.54	3.42	0.02	0	0	0	0
90%	12.6	1.4	0	0	0	0	0
100%	4.22	0.06	0	0	0	0	0

Tableau 24 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 7.5 mg/kg 2 fois à 12 h d'intervalle par voie orale

temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	98.78	84.16	19.62	0	0
20%	99.98	99.86	96.94	50.3	0.48	0	0
30%	97.44	91.4	68.48	13.5	0	0	0
40%	84.22	69.4	40.02	1.86	0	0	0
50%	70.14	53.32	17.86	0.18	0	0	0
60%	55.22	34.74	6.28	0.04	0	0	0
70%	42.14	19.18	2.02	0	0	0	0
80%	32.08	11.66	0.74	0	0	0	0
90%	23.28	6.26	0.12	0	0	0	0
100%	11.44	1.3	0	0	0	0	0

Tableau 25 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg 2 fois à 12 h d'intervalle par voie orale

temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	99.84	92.3	58.36	0.42	0
20%	100	99.86	99.24	79.64	9.1	0	0
30%	98.34	94.78	80.92	38.22	0.46	0	0
40%	87.78	75.68	56.54	10.5	0.04	0	0
50%	75.04	61.76	36.58	2.68	0	0	0
60%	61.52	45.48	16.9	0.56	0	0	0
70%	49.5	30.68	6.86	0.12	0	0	0
80%	39.78	20.68	3	0.04	0	0	0
90%	30.8	13.12	1.16	0	0	0	0
100%	18.96	4.38	0.14	0	0	0	0

Tableau 26 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 20 mg/kg 2 fois à 12 h d'intervalle par voie orale

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	100	99.84	92.52	58.18	0.34
20%	100	100	99.96	99.4	79.38	9.48	0
30%	99.54	98.44	94.76	81.98	37.96	0.3	0
40%	94.02	87.88	76.46	56.54	10.96	0.04	0
50%	85.08	75.62	62.14	36.24	2.32	0	0
60%	72.58	61.28	44.88	16.86	0.32	0	0
70%	60.42	48.88	30.36	7.04	0.04	0	0
80%	51.06	39.3	20.06	2.78	0	0	0
90%	43.4	30.94	12.64	1.1	0	0	0
100%	30.86	18.06	3.74	0	0	0	0

Tableau 27 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 3.4mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	99.96	85.94	29.2	0	0	0
20%	100	99.8	75.72	6.7	0	0	0
30%	99.84	97.24	48.74	0.72	0	0	0
40%	96.64	79.02	25.48	0.04	0	0	0
50%	84.54	60.3	12.08	0	0	0	0
60%	69.34	44.58	3.56	0	0	0	0
70%	54.1	21.56	0.68	0	0	0	0
80%	28.88	6.66	0.1	0	0	0	0
90%	14.14	1.54	0	0	0	0	0
100%	3.4	0	0	0	0	0	0

Tableau 28 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 5mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	97.98	70.22	3.7	0	0
20%	100	100	96.16	44.66	0.12	0	0
30%	99.92	99.42	83.88	21.56	0	0	0
40%	98.5	91.88	58.28	5.38	0	0	0
50%	91.3	75.94	41.16	1.36	0	0	0
60%	77.12	61.94	24.56	0.3	0	0	0
70%	64.34	43.28	7.56	0.04	0	0	0
80%	39.68	17.58	1.98	0	0	0	0
90%	24	6.84	0.3	0	0	0	0
100%	9.78	0.46	0	0	0	0	0

Tableau 29 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 6.7mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	99.88	85.16	27.18	0.02	0
20%	100	100	99.48	74.12	6.44	0	0
30%	100	99.86	96.08	46.84	0.58	0	0
40%	99.1	96.12	77.74	24.28	0.04	0	0
50%	94.8	84.48	59.12	10.82	0	0	0
60%	82.4	68.3	44.28	3.6	0	0	0
70%	68.5	53.78	20.54	0.66	0	0	0
80%	46.58	27.2	6.22	0.08	0	0	0
90%	30.66	13.48	1.6	0	0	0	0
100%	16.44	3.2	0.02	0	0	0	0

Tableau 30 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 13.4mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	100	99.84	85.2	26.94	0
20%	100	100	100	99.66	73.54	5.98	0
30%	100	100	99.84	95.94	46.74	0.68	0
40%	99.8	99.26	96.18	78.06	24.52	0.1	0
50%	98.32	94.64	84.68	59.18	11.68	0.02	0
60%	90.7	82.86	69	44.86	3.7	0	0
70%	80.36	69.18	53.58	21.06	0.56	0	0
80%	57.7	46.16	28.64	7.08	0.08	0	0
90%	41.64	31.56	13.94	1.9	0	0	0
100%	28.94	17.12	3.04	0.02	0	0	0

Tableau 31 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 2.5mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	99.54	63.66	6.74	0	0	0
20%	96.24	82.8	47.76	1.68	0	0	0
30%	85.32	78.68	29.04	0.38	0	0	0
40%	80.36	69.9	16.8	0.06	0	0	0
50%	76.28	52.16	9.72	0	0	0	0
60%	64.78	37	4.08	0	0	0	0
70%	42.08	12.96	0.6	0	0	0	0
80%	17.74	4.1	0.02	0	0	0	0
90%	7.84	1.06	0	0	0	0	0
100%	0.3	0	0	0	0	0	0

Tableau 32 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 3.75mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h ↓	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	98.06	54	0.48	0	0
20%	100	100	96.3	36.46	0.06	0	0
30%	99.98	99.92	87.66	21.28	0.02	0	0
40%	99.84	98.5	69.06	8.56	0	0	0
50%	98.66	90.72	49.88	3.12	0	0	0
60%	92.5	77.92	32.86	0.46	0	0	0
70%	72.22	48.76	11.08	0.02	0	0	0
80%	44.16	19.74	2.26	0	0	0	0
90%	25.66	7.78	0.42	0	0	0	0
100%	9.14	0.34	0	0	0	0	0

Tableau 33 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 5mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	100	79.96	12.72	0	0
20%	100	100	99.92	67.44	3	0	0
30%	100	100	98.52	47.14	0.58	0	0
40%	100	99.64	89.94	30.48	0.06	0	0
50%	99.32	96.22	71.34	18.78	0.02	0	0
60%	95.26	84.18	54.36	7.48	0.02	0	0
70%	77.06	60.5	25.16	0.9	0	0	0
80%	51.3	31.8	7.74	0.12	0	0	0
90%	32.92	15.38	1.92	0.04	0	0	0
100%	15.78	2	0	0	0	0	0

Tableau 34 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	100	99.94	80.58	13.24	0
20%	100	100	100	99.88	67.94	3.24	0
30%	100	100	99.98	98.2	48.02	0.84	0
40%	100	99.94	99.6	90.38	31.74	0.12	0
50%	99.9	99.5	96.32	71.78	19.5	0.02	0
60%	98.62	95.44	85.68	54.84	8.2	0	0
70%	88.32	77.5	60.74	25.86	1.22	0	0
80%	62.94	51.52	32.28	8.42	0.12	0	0
90%	44.64	33.68	15.98	2.18	0	0	0
100%	29.02	16.86	2.2	0	0	0	0

Tableau 35 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg d'amoxicilline sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation où les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	77.88	13.26	0	0	0
20%	100	100	77.58	9.22	0	0	0
30%	100	100	75.6	4.46	0	0	0
40%	100	99.98	60.52	0.48	0	0	0
50%	100	83.6	19.32	0	0	0	0
60%	49.8	26.86	1.72	0	0	0	0
70%	29.34	8.86	0.12	0	0	0	0
80%	18.36	2.52	0	0	0	0	0
90%	9.24	0.66	0	0	0	0	0
100%	0.08	0	0	0	0	0	0

Tableau 36 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 15mg/kg sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation où les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	99.02	48.74	1.02	0	0
20%	100	100	99.02	47.04	0.38	0	0
30%	100	100	99.02	42.12	0.08	0	0
40%	100	100	97.72	24.98	0	0	0
50%	100	99.72	53.7	2.74	0	0	0
60%	63.3	41.18	13.6	0.12	0	0	0
70%	37.44	21.26	2.86	0	0	0	0
80%	27.98	10.2	0.54	0	0	0	0
90%	18.64	4.14	0.1	0	0	0	0
100%	2.12	0	0	0	0	0	0

Tableau 37 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 20 mg/kg sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation où les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	100	78.76	13.5	0	0
20%	100	100	100	78.24	9.34	0	0
30%	100	100	100	76.04	4.58	0	0
40%	100	100	99.98	60.62	0.62	0	0
50%	100	100	84.46	19.36	0	0	0
60%	72.56	49.22	26.9	1.6	0	0	0
70%	41.76	29.16	8.78	0.1	0	0	0
80%	33.08	17.96	2.66	0	0	0	0
90%	25.3	9.82	0.66	0	0	0	0
100%	7.74	0.1	0	0	0	0	0

Tableau 38 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 40 mg/kg sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation où les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h.

Temps au-dessus de la CMI sur 24h	Valeur de la CMI (µg/mL)						
	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4
0%	100	100	100	100	100	100	100
10%	100	100	100	99.66	55.44	3.5	0
20%	100	100	100	99.66	55.28	2.44	0
30%	100	100	100	99.66	54.24	1.36	0
40%	100	100	100	99.64	50.86	0.44	0
50%	100	100	100	99.5	40.16	0.04	0
60%	100	100	100	80.8	10.48	0	0
70%	92.44	76.58	50.46	24.36	0.58	0	0
80%	55.78	43.88	29.42	7.24	0.08	0	0
90%	41.36	32.26	15.84	1.78	0	0	0
100%	24.44	6.92	0	0	0	0	0

Table des illustrations

Figure 1 Schéma de la méthode de détermination de la CMI en milieu liquide	15
Figure 2 Photographie d'un antibiogramme réalisée par mesure des cercles d'inhibition (source : Wikipedia).....	17
Figure 3 Interprétation qualitative des résultats d'un antibiogramme (Metzler, et al., 1974).....	17
Figure 4 Histogramme des CMI observées chez <i>Staphylococcus aureus</i> pour la doxycycline (EUCAST) et exemple de cut-off épidémiologique.....	23
Figure 5 : Exemple fictif de relation entre la probabilité de guérison et la CMI du ou des agents pathogènes incriminés ; dans cet exemple fictif des germes responsables de l'infection étudiée ont été collectés et leurs CMI ont été comprises entre 0.0625 et 64µG/mL.	24
Figure 6 Illustration des indices PK/PD utilisés couramment pour les antibiotiques	26
Figure 7 Exemple fictif de relation entre la probabilité de guérison et le temps pour lequel les concentrations plasmatiques de l'antibiotique sont au-dessus de la CMI.	28
Figure 8 Arbre décisionnel proposé par le VAST du CLSI pour la détermination des breakpoints (CLSI 2006).....	31
Figure 9 : Schéma de l'approche générale des méthodes Monte Carlo	37
Figure 10 : Représentation schématique de modèles bi- (à gauche) et tricompartimentaux (à droite) ayant été utilisés pour décrire la disposition de l'amoxicilline chez le porc.	45
Figure 11 : Exemple de courbe de cinétique plasmatique simulée à partir d'un modèle tricompartimental.	47
Figure 12 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie intraveineuse (site1, dose 20mg/kg, LOQ de 25ng/mL, n=8).....	55
Figure 13 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale sous forme de bolus (site 1, dose 20mg/kg, LOQ 25ng/mL, n=8)	55
Figure 14 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie intraveineuse (site 2, dose 20mg/kg, LOQ 50ng/mL, n=8)	56
Figure 15 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (soupe) (site 2, dose 20mg/kg, LOQ 50ng/mL, n=8)	56
Figure 16 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie intramusculaire (site 2, dose 15mg/kg, LOQ 50ng/mL, n= 80).....	57
Figure 17 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie intraveineuse (site 3, dose 10mg/kg, Limite de détection de 5ng/mL, n=5)	57
Figure 18 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (prémélange médicamenteux) (site3, dose 20mg/kg, LOQ 25ng/mL, n= 40)	58
Figure 19 Cinétique des concentrations plasmatiques en amoxicilline (µg/mL) en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (prémélange médicamenteux) (site 3, dose 9mg/kg, LOD 5ng/mL, n=5)	58
Figure 20: Cinétiques des concentrations plasmatiques (µg/mL) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après une administration par voie orale (bolus) (site 3, dose 9mg/kg, LOD 5ng/mL, n=5, 2 animaux exclus)	59
Figure 21 Cinétiques des concentrations plasmatiques (µg/mL) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après une administration par voie intramusculaire (site 4, dose 15mg/kg, LOQ 100ng/mL, n= 24).....	59

Figure 22 Cinétiques des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après administration par voie intraveineuse, tous sites confondus (valeurs normalisées pour une dose de 20mg/kg)	60
Figure 23 : Cinétiques des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après administration par voie orale, tous sites confondus (valeurs extrapolées pour une dose de 20mg/kg)	61
Figure 24 : Cinétiques des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de l'amoxicilline en fonction du temps (h) après administration par voie intramusculaire, tous sites confondus (valeurs extrapolées pour une dose de 20mg/kg)	61
Figure 25 Exemple de cinétique plasmatique mettant en évidence les variabilités inter- et intraindividuelle (d'après (Atkinson, et al., 2001).	65
Figure 26 VPC obtenues pour la formulation 4 : bolus oral, animaux à jeun (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite).....	71
Figure 27 VPC obtenues pour la formulation 5 : aliment médicamenteux (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite).....	71
Figure 28 VPC obtenues pour la formulation 6 : aliment médicamenteux (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite).....	72
Figure 29 VPC obtenues pour la formulation 7 : aliment médicamenteux (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite).....	72
Figure 30 VPC obtenues pour la formulation 8 : bolus oral (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite).....	73
Figure 31 VPC obtenues pour la formulation 9 (formulation intramusculaire longue action) avec le modèle bicompartimental (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)	75
Figure 32 VPC obtenues pour la formulation 10 (formulation intramusculaire longue action) avec le modèle bicompartimental (échelle naturelle à gauche et logarithmique à droite)	75
Tableau 1 Récapitulatif de valeurs de breakpoints utilisées en Belgique	32
Tableau 2 Récapitulatif de valeurs de breakpoints retenues par l'EUCAST	32
Tableau 3 Récapitulatif de valeurs de breakpoints retenues par le CA-SFM	33
Tableau 4 Récapitulatif de valeurs de breakpoints retenues par le BSAC.....	33
Tableau 5 Exemple de breakpoints retenus pour <i>Enterococcus spp.</i> par différents organismes normatifs européens	33
Tableau 6 Récapitulatif de CMI d'amoxicilline observées chez le porc (d'après Schwarz (Schwarz, et al., 2008))	42
Tableau 7 Récapitulatif des études pharmacocinétiques de l'amoxicilline administrée par voie intraveineuse chez le porc	48
Tableau 8 Récapitulatif des études pharmacocinétiques de l'amoxicilline administrée par voie orale chez le porc.....	49
Tableau 9 Récapitulatif des études pharmacocinétiques de l'amoxicilline administrée par voie intramusculaire chez le porc.....	50
Tableau 10 Posologies des spécialités à base d'amoxicilline autorisées chez le porc.....	52
Tableau 11 Récapitulatif du nombre des cinétiques plasmatiques de l'amoxicilline recueillies...	54
Tableau 12 Paramètres de population de l'amoxicilline obtenus pour les cinétiques réalisées suite aux administrations <i>per os</i> d'amoxicilline.	70
Tableau 13 Paramètres de population de l'amoxicilline obtenus pour les cinétiques réalisées suite aux administrations intramusculaires d'amoxicilline et modélisés avec le modèle bicompartimental.....	74
Tableau 14 Paramètres de population obtenus pour les cinétiques réalisées suite aux administrations intramusculaires avec le modèle à deux constantes d'absorption.	74

Tableau 15 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg par voie orale.	77
Tableau 16 : Récapitulatif des fractions de la population (%) dont les concentrations plasmatiques en amoxicilline libre dépassent la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage après administration par voie orale (par schéma posologique).	78
Tableau 17 : Récapitulatif des fractions de la population (%) dont les concentrations plasmatiques en amoxicilline libre dépassent la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage après administration par voie orale (par dose quotidienne).	79
Tableau 18 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 15mg/kg d'amoxicilline par voie intramusculaire.	80
Tableau 19 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 30mg/kg d'amoxicilline par voie intramusculaire.	81
Tableau 20 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 15mg/kg par voie orale	97
Tableau 21 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 20mg/kg par voie orale	98
Tableau 22 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 40mg/kg par voie orale	99
Tableau 23 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 5mg/kg à 12 h d'intervalle par voie orale.	100
Tableau 24 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 7.5 mg/kg 2 fois à 12 h d'intervalle par voie orale.	101
Tableau 25 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg 2 fois à 12 h d'intervalle par voie orale.	102
Tableau 26 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 20 mg/kg 2 fois à 12 h d'intervalle par voie orale.	103
Tableau 27 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 3.4mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.	104
Tableau 28 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 5mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.	105
Tableau 29 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 6.7mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.	106
Tableau 30 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 13.4mg/kg 3 fois à 5.5 h d'intervalle par voie orale.	107
Tableau 31 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 2.5mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.	108

Tableau 32 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 3.75mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.....	109
Tableau 33 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 5mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.....	110
Tableau 34 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg 4 fois à 3h d'intervalle par voie orale.....	111
Tableau 35 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 10mg/kg d'amoxicilline sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation ou les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h.	112
Tableau 36 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 15mg/kg sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation ou les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h	113
Tableau 37 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 20 mg/kg sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation ou les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h.	114
Tableau 38 : Pourcentages de porcs pour lesquels le temps passé au-dessus de différentes CMI (de 0.0625 à 4µg/mL) va de 0 à 100% de l'intervalle de dosage par pas de 10% obtenus après une administration d'amoxicilline de 40 mg/kg sous la forme d'une entrée continue par voie orale dans l'organisme pendant 15h ce qui mime une situation ou les porcs auraient un accès continu à l'aliment médicamenteux pendant 15h.	115

NOM : Rey

Prénom : Julien, François, Germain, Sylvain

TITRE : Détermination des valeurs critiques pour l'antibiogramme vétérinaire par une approche de type Monte Carlo

RESUME : Les valeurs seuils de l'antibiogramme sont des critères interprétatifs permettant de classer un pathogène comme cliniquement sensible, intermédiaire ou résistant en fonction de sa concentration minimale inhibitrice. En médecine humaine, ces valeurs (breakpoints) ont été fixées par les organismes normatifs à partir de différentes valeurs de cut-off reflétant des aspects épidémiologiques, cliniques ou PK/PD. La multiplicité des organismes normatifs a conduit à l'existence en parallèle de nombreuses valeurs différentes pour un même antibiotique. Par ailleurs, peu de ces breakpoints ont été déterminées chez l'animal, et, à défaut, les valeurs utilisées chez l'homme sont reprises en médecine vétérinaire.

L'objectif de cette thèse est de démontrer la faisabilité de la détermination d'un cut-off PK/PD de l'amoxicilline chez le porc par une approche de Monte Carlo. Cette méthode permet de prendre en compte la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques dans l'établissement du cut-off PK/PD.

Les valeurs obtenues varient, selon le schéma posologique, de 0.0625µg/mL à 0.25µg/mL pour un objectif de 90% de porcs au-dessus de la CMI pendant 40% de l'intervalle de dosage.

MOTS-CLES : valeur seuil, valeur critique, antibiogramme, antibiothérapie, amoxicilline, porc, PK/PD, méthode de Monte Carlo, simulation

ENGLISH TITLE : Determination of the cut-off values for the veterinary antibiogram using a Monte Carlo approach

ABSTRACT : Antibiogram breakpoints values are interpretative criteria allowing to classify a pathogen as clinically susceptible, intermediate or resistant. In human medicine, these values are fixed by normative organisms using several cut-off values reflecting epidemiological, clinical or PK/PD aspects. The large number of normative organisms leads to the existence of many different values for a single antibiotic. In addition, few of these breakpoints have been determined on animal, and, consequently, the values used in veterinary medicine come from human medicine.

The objective of this thesis is to demonstrate the ability to determine PK/PD cut-off value for amoxicillin in swine, using a Monte Carlo approach. This method allows considering interindividual variability of pharmacokinetic parameters in PK/PD cut-off determination. The results values are between 0.0625 and 0.25µg/mL, depending on posology scheme with the objective "90% of swines above MIC during 40% of the dosage interval".

KEYWORDS : cut-off value, breakpoint value, antibiogram, antibiotherapy, amoxicillin, swine, PK/PD, Monte Carlo method, simulation