



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 13509

To cite this version :

Cazajoux, Lorelei. *Usage prudent d'une fluoroquinolone de troisième génération dans le cadre de la cascade : le cas de la marbofloxacin chez le cheval documenté par un modèle de population et des simulations de Monte Carlo*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 97 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

USAGE PRUDENT D'UNE FLUOROQUINOLONE DE TROISIEME GENERATION DANS LE CADRE DE LA CASCADE : LE CAS DE LA MARBOFLOXACINE CHEZ LE CHEVAL DOCUMENTE PAR UN MODELE DE POPULATION ET DES SIMULATIONS DE MONTE CARLO

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

CAZAJEUX Lorelei, Fabienne
Née, le 21 juin 1990 à Annecy (74)

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

JURY

PRESIDENT :

M. Etienne CHATELUT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Pierre-Louis TOUTAIN

M. Alain BOUSQUET-MELOU

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Didier CONCORDET

M. Alain COSNIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Directeur Vétérinaire France

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

**MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS
CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

A Monsieur le Professeur Etienne CHATELUT,
Professeur à l'Université Paul Sabatier Toulouse III,
Faculté des sciences pharmacologiques,
pour nous faire l'honneur de présider ce jury.

A Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN,
Professeur émérite de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Physiologie et Thérapeutique,
pour nous avoir accompagnée tout au long de ce travail et pour nous avoir permis de
découvrir la pharmacocinétique de population.

A Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU,
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Physiologie et Thérapeutique
qui a initié ce travail et pour nous avoir offert l'opportunité de participer à l'étude dans le
cadre de la thèse de Diane Pacalin.

A Monsieur le Professeur Didier CONCORDET,
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Mathématiques, Statistiques, Modélisation
pour avoir accepté de se joindre à notre jury.

A Monsieur le Docteur Alain COSNIER,
Directeur Vétoquinol France,
pour avoir soutenu ce projet et accepté de faire partie de notre jury.

A ma famille, pour m'avoir soutenue toutes ces années et avoir eu la patience de m'accompagner tout au long de mon cursus.

Au GDB, sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes. A Tataa pour m'avoir suivie dans mes projets les plus absurdes. A Camille pour les Délifrap Cookies du Dimanche. A Katia, félicitations pour avoir trouvé un nom. A Véro, merci d'être mon amie. A Lucie, pour nous avoir vendu du rêve en toute situation. A Damien, pour m'avoir supportée deux ans en colocation, et pour un superbe 4L Trophy !

A Diane, pour m'avoir conseillé ce sujet de thèse, tu es cordialement invitée à venir regarder Coyote Girls chez moi quand tu veux.

Aux Kids des Etoiles, pour m'avoir montré que les projets les plus fous peuvent être réalisés à partir de rien, et pour m'avoir permis de toujours rêver ma vie en couleurs.

A Kelly, sans qui le paragraphe précédent n'aurait pas lieu d'être, merci d'avoir toujours cru en moi, et vivement qu'on adopte Freddy !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	- 9 -
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	- 11 -
TABLE DES ANNEXES	- 14 -
LISTE DES ABBREVIATIONS ET NOTATIONS.....	- 14 -
INTRODUCTION	- 17 -
PARTIE 1 : LA MARBOFLOXACINE, ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE.....	- 20 -
1. Les fluoroquinolones : historique	- 20 -
1.1 Quinolones de 1 ^{ère} génération	- 20 -
1.2 Fluoroquinolones de 2 ^e et 3 ^e génération	- 21 -
1.3 Fluoroquinolones de 4 ^e génération.....	- 22 -
2. La marbofloxacin, particularités structurales et propriétés physico-chimiques	- 22 -
3. Pharmacocinétique de la marbofloxacin	- 23 -
3.1 Absorption et biodisponibilité.....	- 23 -
3.2 Distribution.....	- 23 -
3.3 Métabolisme.....	- 24 -
3.4 Élimination.....	- 24 -
4. Pharmacodynamique	- 24 -
4.1 Cibles et mécanisme d'action.....	- 24 -
4.2 Effets.....	- 25 -
5. Phénomènes de résistance	- 26 -
6. Utilisation chez les chevaux	- 28 -
PARTIE 2 : ADAPTATION DE POSOLOGIE PAR L'APPROCHE PHARMACOCINÉTIQUE-PHARMACODYNAMIQUE	- 30 -
1. Paramètres pharmacodynamiques	- 30 -
1.1 Concentration Minimale Inhibitrice	- 30 -
1.2 Concentration Minimale Bactéricide.....	- 33 -
1.3 Concentration Préventive de Mutants.....	- 34 -
1.4 Fenêtre de sélection.....	- 34 -
1.5 Vitesse de bactéricidie.....	- 35 -
1.6 Effet post-antibiotique	- 35 -
2. Indices d'efficacité	- 36 -
2.1 Quotient inhibiteur.....	- 36 -
2.2 T>CMI	- 36 -
2.3 ASC/CMI.....	- 37 -
2.4 De nouveaux indices pour prévenir les phénomènes de résistance.....	- 38 -
3. Détermination du schéma posologique	- 38 -
4. Application à l'échelle d'une population	- 39 -
4.1 Principe des analyses pharmacocinétiques de population	- 39 -
4.2 Apport des simulations de Monte-Carlo	- 40 -

4.3	Etat actuel des données	- 41 -
PARTIE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE : ETUDE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION DE LA MARBOFLOXACINE CHEZ LE		
CHEVAL		
		- 44 -
1.	Intérêt de l'étude	- 44 -
2.	Matériel et méthode	- 44 -
2.1	Sites d'investigations et caractéristiques des chevaux enrôlés	- 44 -
2.2	Formulation utilisée et dose.....	- 45 -
2.3	Administration.....	- 45 -
2.4	Prélèvements et traitement des échantillons	- 46 -
2.5	Analyse des échantillons	- 46 -
4.4	Analyse des données, effectuée par le Pr. Toutain	- 46 -
a.	<i>Données considérées</i>	- 47 -
b.	<i>Logiciels utilisés</i>	- 47 -
c.	<i>Analyse non-compartmentale (NCA)</i>	- 47 -
d.	<i>La modèle structural</i>	- 48 -
e.	<i>Modélisation de la variabilité interindividuelle</i>	- 49 -
f.	<i>La notion de Shrinkage</i>	- 51 -
g.	<i>Modélisation de l'erreur résiduelle</i>	- 53 -
h.	<i>Influence des covariables : détermination du modèle final</i>	- 54 -
3.	Résultats	- 57 -
3.1	Analyse non-compartmentale	- 57 -
a.	<i>Effet site</i>	- 57 -
b.	<i>Effet sexe</i>	- 59 -
c.	<i>Effet statut : témoin vs. hospitalisé</i>	- 60 -
d.	<i>Etude de régression entre le poids corporel et les paramètres PK</i>	- 61 -
e.	<i>Etude de régression entre l'âge et les paramètres PK</i>	- 63 -
3.2	Résultats de l'analyse pharmacocinétique de population	- 65 -
a.	<i>Modèle structural</i>	- 65 -
3.3	Simulations de Monte-Carlo.....	- 71 -
4.	Discussion	- 75 -
4.1	Base de données.....	- 76 -
4.2	Dose et tolérance	- 76 -
4.3	Pharmacocinétique	- 77 -
4.4	Pharmacodynamique	- 78 -
4.5	Détermination des cut-off.....	- 79 -
4.6	Recommandations.....	- 80 -
CONCLUSION		- 81 -
BIBLIOGRAPHIE.....		- 82 -
ANNEXES.....		- 87 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Formule développée de l'acide nalidixique.	- 20 -
Figure 2 : Norfloxacin.	- 21 -
Figure 3 : Enrofloxacin.	- 21 -
Figure 4 : Gatifloxacin.	- 22 -
Figure 5 : Marbofloxacin.	- 23 -
Figure 6 : Structure de l'ADN gyrase.	- 25 -
Figure 7 : Effets de la formation des complexes clivés entre la marbofloxacin et l'ADN gyrase.	- 26 -
Figure 8 : Principaux mécanismes de résistance aux fluoroquinolones.	- 27 -
Figure 9 : Détermination de la CMI par méthode de dilution en milieu liquide.	- 31 -
Figure 10 : Détermination de la CMI par méthode de diffusion sur disque.	- 31 -
Figure 11 : Détermination de la CMI par E-test.	- 32 -
Figure 12 : Intérêt de la fenêtre de sélection.	- 34 -
Figure 13 : Représentation schématique des deux modes de comportement des antibiotiques.	- 35 -
Figure 14 : Principaux indices pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sur la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps.	- 37 -
Figure 15 : Variation des concentrations plasmatiques d'un médicament administré bi-quotidiennement et en perfusion intraveineuse.	- 39 -
Figure 16 : Prélèvements chez plusieurs individus pour une analyse pharmacocinétique de population.	- 40 -
Figure 17 : Distribution des probabilités des ASC de la gatifloxacin dans la population et des CMI de la gatifloxacin contre <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 41 -
Figure 18 : Modèle bicompartimental avec ses paramétrisations en termes physiologiques ou avec des constantes de temps.	- 49 -
Figure 19 : Modèles de la variabilité interindividuelle.	- 50 -
Figure 20 : Modèles de l'erreur résiduelle.	- 53 -
Figure 21 : Moyennes des moindres carrés pour la clairance plasmatique pour les 5 sites.	- 58 -
Figure 22 : Moyennes des moindres carrés pour le temps de demi-vie pour chacun des 5 sites.	- 58 -
Figure 23 : Moyennes des moindres carrés pour le temps moyen de résidence pour chacun des 5 sites.	- 58 -
Figure 24 : Moyennes des moindres carrés pour le volume de distribution à l'équilibre pour chacun des 5 sites.	- 58 -

Figure 25 : Moyennes des moindres carrés pour le temps de demi-vie plasmatique pour chacun des 3 sexes.....	- 59 -
Figure 26 : Moyennes des moindres carrés pour la clairance plasmatique pour les 3 sexes.....	- 59 -
Figure 27 : Moyennes des moindres carrés pour le volume de distribution à l'équilibre pour chacun des 3 sexes.....	- 59 -
Figure 28 : Moyennes des moindres carrés pour le temps moyen de résidence pour chacun des 3 sexes.....	- 59 -
Figure 29 : Moyennes des moindres carrés pour le temps de demi-vie plasmatique pour chacun des 2 statuts.....	- 60 -
Figure 30 : Moyennes des moindres carrés pour la clairance plasmatique en pour chacun des 2 statuts.....	- 60 -
Figure 31 : Moyennes des moindres carrés pour le temps moyen de résidence pour chacun des 2 statuts.....	- 60 -
Figure 32 : Moyennes des moindres carrés pour le volume de distribution à l'équilibre pour chacun des 2 statuts.....	- 60 -
Figure 33 : Relation entre le poids corporel et le temps de demi-vie plasmatique explorée par régression linéaire.....	- 61 -
Figure 34 : Relation entre le poids corporel et clairance plasmatique explorée par régression linéaire.....	- 61 -
Figure 35 : Relation entre le poids corporel et le temps moyen de résidence explorée par régression linéaire.....	- 62 -
Figure 36 : Relation entre le poids corporel et le volume de distribution à l'équilibre explorée par régression linéaire.....	- 62 -
Figure 37 : Relation entre l'âge et le temps de demi-vie plasmatique explorée par régression linéaire.....	- 63 -
Figure 38 : Relation entre l'âge et la clairance plasmatique explorée par régression linéaire.....	- 63 -
Figure 39 : Relation entre l'âge et le temps moyen de résidence explorée par régression linéaire.....	- 64 -
Figure 40 : Relation entre l'âge et le volume de distribution à l'équilibre explorée par régression linéaire.....	- 64 -
Figure 41 : Diagramme de dispersion des concentrations prédites par le modèle de population en fixant les éta à 0 (PRED) vs. la variable dépendante.....	- 67 -
Figure 42 : Diagramme de dispersion des concentrations individuelles prédites par estimation Bayésienne (IPRED) vs. la variable dépendante.....	- 67 -
Figure 43 : Vérification visuelle des prédictions ou Visual Predictive Check de la variable dépendante vs. la variable indépendante (IVAR).....	- 68 -
Figure 44 : Analyse statistique de la distribution Log-normale des 1965 ASC générées par une méthode de Monte-Carlo à partir du modèle de base.....	- 72 -

Figure 45 : Distribution des doses pour les germes Gram-négatif pour obtenir une valeur de 72h de l'indice PK/PD (ASC/CMI).....	- 74 -
Figure 46 : Distribution des doses pour les germes à Gram-positif pour obtenir une valeur de 72h de l'indice PK/PD (ASC/CMI)	- 75 -
Tableau 1 : Principaux gènes équiins et leur sensibilité à la marbofloxacine.....	- 28 -
Tableau 2 : Critères de classification des souches bactériennes.	- 33 -
Tableau 3 : Principales caractéristiques démographiques des chevaux étudiés pour les cinq sites d'investigation.....	- 45 -
Tableau 4 : signification statistique des covariables étudiées sur les paramètres pharmacocinétiques estimés par l'analyse non-compartmentale.....	- 55 -
Tableau 5 : Codage pour la covariable « sexe ».....	- 56 -
Tableau 6 : Codage pour les covariables « site d'investigation »	- 57 -
Tableau 7 : Paramètres fixes du modèle de base sans covariable et SD de la résiduelle.....	- 66 -
Tableau 8 : Paramètres aléatoires du modèle de base sans covariable et valeurs des shrinkages..	- 66 -
Tableau 9 : comparaison du modèle de base avec des modèles incluant chacune des covariables.....	- 69 -
Tableau 10 : Comparaison du modèle de base avec le modèle l'âge comme covariable.	- 69 -
Tableau 11 : Modèle final avec 2 covariables significatives (statut sanitaire Hospitalisé vs. Témoin et sexe).....	- 70 -
Tableau 12 : Statistiques descriptives des ASC générées par une méthode de Monte-Carlo à partir du modèle de base	- 71 -
Tableau 13 : Pourcentages de chevaux atteignant les valeurs critiques de l'index PK/PD pour différentes CMI.....	- 72 -
Tableau 14 : Valeur des CMI de la marbofloxacine pour une série de germes Gram positif et Gram négatif.....	- 73 -
Tableau 15 : CMI et probabilité d'occurrence pour les germes Gram positif.....	- 74 -
Tableau 16 : CMI et probabilité d'occurrence pour les germes Gram négatif	- 74 -

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques démographiques des chevaux détaillées pour chacun des 5 sites d'investigation	- 89 -
Annexe 1.1 : Caractéristiques démographiques des 44 chevaux du site de Montréal	- 89 -
Annexe 1.2 : Caractéristiques démographiques des 58 chevaux du site de Toulouse1	- 89 -
Annexe 1.3 : Caractéristiques démographiques des 9 chevaux du site d'Utrecht	- 90 -
Annexe 1.4 : Caractéristiques démographiques des 8 chevaux du site de Vienne	- 90 -
Annexe 1.5 : Caractéristiques démographiques des 12 chevaux du site de Toulouse2	- 90 -
Annexe 2 : Descriptions statistiques de l'âge (ans) et du poids corporel (kg) des 131 chevaux étudiés.	- 91 -
Annexe 3 : Temps nominaux et réels des prélèvements sanguins pour les quatre sites ayant eu une flexibilité potentielle quant aux temps de prélèvement	- 91 -
Annexe 4 : Définition des différents paramètres de structure à effets fixes du modèle de base avec leur notation dans Phoenix.	- 92 -
Annexe 5 : Statistiques descriptives pour les 4 paramètres pharmacocinétiques estimés par une analyse non compartimentale en fonction du site d'investigation	- 92 -
Annexe 6 : Statistiques descriptives pour les 4 paramètres pharmacocinétiques estimés par une analyse non compartimentale en fonction du sexe.	- 93 -
Annexe 7 : Statistiques descriptives pour les 4 paramètres pharmacocinétiques estimés par une analyse non compartimentale en fonction du statut	- 93 -
Annexe 8 : Histogramme de distribution des étas individuels prédits par le modèle	- 94 -
Annexe 9 : Diagramme des Quantile-Quantile (ou Q-Q plot) des étas	- 95 -
Annexe 10 : Histogramme des résidus pondérés conditionnels (CWRES)	- 96 -
Annexe 11 : Diagramme de la dispersion des résidus pondérés conditionnels (CWRES) vs. la variable indépendante (IVAR)	- 96 -
Annexe 12 : Diagramme de la dispersion des résidus pondérés conditionnels (CWRES) vs. Les valeurs de concentrations prédites par le modèle de population (PRED)	- 97 -

LISTE DES ABBREVIATIONS ET NOTATIONS

-2LL :	-2 fois le Logarithme de maximum de vraisemblance
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADME :	Absorption Distribution Métabolisme et Elimination
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOVA :	Analyse de la Variance (ANalysis Of Variance)
ARN :	Acide Ribonucléique
ASC :	Aire Sous la Courbe
BP :	Breakpoint
BSV :	Variabilité interindividuelle (Between-Subject Variability)
CASFM :	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
Cl :	Clairance plasmatique
Cl _d :	Clairance de distribution
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
C _{max} :	Concentration plasmatique maximale
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CPM :	Concentration Préventive de Mutants
CPRED :	Concentration prédites de population, aussi notées Y
CV :	Coefficient de Variation
CWRES :	Résidus Conditionnels Pondérés (Conditionnal Weighted RESidual)
DV :	Variable Dépendante
EBE :	Estimées Empiriques Bayésiennes
EPA :	Effet Post-Antibiotique
EUCAST :	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F% :	Biodisponibilité
f _u :	Fraction libre
HL :	Temps de demi-vie (Half-life)
HPLC :	Chromatographie à Haute Performance en phase Liquide (High-Performance Liquid Chromatography)
IPRED :	Concentrations individuelles prédites, aussi notées \hat{Y}
IVAR :	Variable indépendante

IWRES :	Résidus individuels prédits pondérés (Individual Wheighted RESiduals)
LOQ :	Limit Of Quantification (Limite de quantification)
MRT :	Temps moyen de résidence (Mean Residence Time)
NCA :	Analyse non-compartmentale (Non Compartmental Analysis)
NS :	Non Significatif
OBJ :	Fonction objective utilisée pour l'ajout des covariables au modèle
OFV :	Fonction objective utilisée pour la prédiction des valeurs individuelles
PD :	Pharmacodynamique
PK :	Pharmacocinétique
SISAAB :	Single Injection Short-Acting AntiBiotic (Injection unique d'un antibiotique à courte durée d'action)
SD :	Ecart-type (Standard Deviation)
T :	Temps
Tv :	Valeur typique d'un paramètre dans la population, aussi noté θ
V _c :	Volume central
V _p :	Volume périphérique
VetCAST :	Groupe Vétérinaire de l'EUCAST
VIPER :	Visual Predictive Extended Residuals
VPC :	Visual Predictive Check
Vss :	Volume de distribution à l'équilibre
ε :	Terme décrivant la variabilité résiduelle
τ :	Intervalle d'administration
η :	Terme décrivant la composante aléatoire d'un paramètre pharmacocinétique
θ :	Valeur typique d'un paramètre dans la population, aussi noté tv
σ^2 :	Variance de la variabilité résiduelle
ω^2 :	Variance de la composante aléatoire d'un paramètre pharmacocinétique
Ω :	Matrice variance-covariance

INTRODUCTION

A l'heure où l'antibiorésistance est devenu l'un des problèmes majeurs en santé à la fois humaine et animale, l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire est de plus en plus controversée. Il est donc du devoir du vétérinaire de lutter contre ces résistances, notamment en adoptant **une antibiothérapie raisonnée et prudente**. Ainsi, lors de la mise en place d'une thérapeutique antibiotique, le choix de la molécule mais aussi la décision d'une posologie adaptée s'imposent. Le choix de cette posologie présente plusieurs enjeux. Le premier est médical, il faut **traiter efficacement** sans effets adverses et ne pas sélectionner de résistances chez les pathogènes, afin que nos antibiotiques restent efficaces le plus longtemps possible. Mais il y a aussi **un enjeu de santé publique**, il faut limiter les résistances chez les pathogènes zoonotiques et chez les bactéries commensales afin d'empêcher le développement de ces résistances chez l'homme, particulièrement pour les molécules les plus récentes, aussi appelées « antibiotiques critiques », encore peu touchés par ces résistances. L'antibiothérapie raisonnée passe notamment par un traitement précoce et efficace. Ainsi, depuis quelques années se développent de nouveaux schémas thérapeutiques visant à optimiser l'activité des antibiotiques.

La marbofloxacin est un antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolones, considérées comme antibiotiques critiques. Les fluoroquinolones ont été développées dès les années 70 et forment aujourd'hui une famille d'antibiotiques très répandue. La bonne biodisponibilité de la marbofloxacin et son large spectre d'action en font une molécule de choix dans le traitement des infections chez de nombreuses espèces. Il n'existe à l'heure actuelle pas d'autorisation de mise sur le marché pour les chevaux, cependant la molécule étant bien tolérée dans l'espèce, elle est déjà utilisée sur le terrain dans le traitement de certaines infections bactériennes. Vétoquinol, souhaitant adopter une démarche responsable, aimerait savoir si les posologies utilisées sont adaptées pour cette espèce.

L'objet de cette thèse est d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de population de la marbofloxacin et d'identifier les caractéristiques individuelles influençant le profil des concentrations plasmatiques en marbofloxacin chez le cheval. Cette étude nous permettra de vérifier si les posologies utilisées sur le terrain sont adaptées pour cette espèce et d'évaluer l'efficacité des schémas thérapeutiques étudiés face aux principaux germes équin.

Dans une première partie, après un bref historique du développement de la famille des quinolones, nous décrirons les propriétés pharmacologiques de la marbofloxacin. Dans une seconde partie, nous nous intéresserons à l'approche pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK/PD) et aux études de population, ainsi qu'à leur intérêt dans le choix d'une posologie adaptée. Enfin, dans la troisième partie, nous exposerons les résultats de l'analyse pharmacocinétique de population de la marbofloxacin chez le cheval.

PARTIE 1 :
LA MARBOFLOXACINE, ETUDE
PHARMACOLOGIQUE

PARTIE 1 : LA MARBOFLOXACINE, ETUDE PHARMACOLOGIQUE

1. Les fluoroquinolones : historique

Les quinolones sont des composés de synthèse aux propriétés antibactériennes dont l'utilisation est aujourd'hui très répandue. On distingue habituellement quatre générations de quinolones, mais les auteurs ne s'accordent pas tous sur cette classification. Nous nous intéresserons donc à celle basée sur les propriétés pharmacodynamiques des différents composés (Owens Jr, Ambrose 2002; King, Malone, Lilley 2000).

1.1 Quinolones de 1^{ère} génération

La découverte en 1962 de l'acide nalidixique, produit dérivé de la synthèse de chloroquine, un antipaludéen, marquera le début du développement d'une nouvelle famille d'antibactériens, les quinolones (Emmerson 2003). Rapidement, son mode d'action est mis en évidence. L'activité bactéricide de l'acide nalidixique réside dans l'inhibition d'une protéine bactérienne, l'ADN gyrase, nécessaire à la réplication et à la transcription du chromosome bactérien. Plus tard, dans les années 1990, est découverte la topoisomérase IV, un homologue de l'ADN gyrase, qui est aussi la seconde cible des quinolones. Le mécanisme d'action sera détaillé dans le chapitre 4.

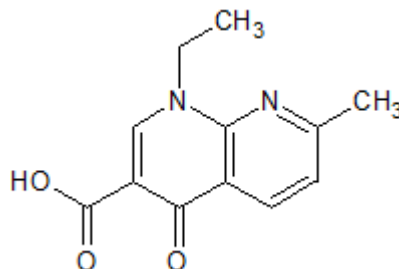


Figure 1 : Formule développée de l'acide nalidixique.

L'utilisation de l'acide nalidixique en médecine humaine débute en 1967, mais se limite alors au traitement des infections du tractus urinaire non compliquées causées par des bactéries à Gram négatif, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* (Emmerson 2003; Martinez, McDermott, Walker 2006). En effet, les bactéries à Gram positif, les anaérobies et *Pseudomonas aeruginosa* sont résistants à cette molécule.

Au début des années 70, des dérivés de l'acide nalidixique, tels que l'acide pipémidique ou l'acide oxolinique sont développés. Cependant, ils ne présentent que peu d'amélioration par rapport à la première molécule, et leur utilisation restera limitée.

En 1976, l'ajout d'un atome de fluor en position 6 permet d'élargir le spectre d'action des quinolones aux bactéries à Gram positif, et relance les recherches et le développement des quinolones.

1.2 Fluoroquinolones de 2^e et 3^e génération

L'ajout d'un cycle pipéridinique en septième position fut à l'origine du développement de la norfloxacine, première fluoroquinolone utilisée en médecine humaine (Martinez, McDermott, Walker 2006; Emmerson 2003; Scholar 2002). Cette nouvelle molécule présente un spectre élargi à *Pseudomonas aeruginosa* et à certaines bactéries à Gram positif et une activité plus importante contre les bactéries à Gram négatif. Elle est peu liée aux protéines plasmatiques, offre une meilleure absorption ainsi qu'une excellente distribution tissulaire. Cette structure servira de base pour les autres fluoroquinolones de cette génération.

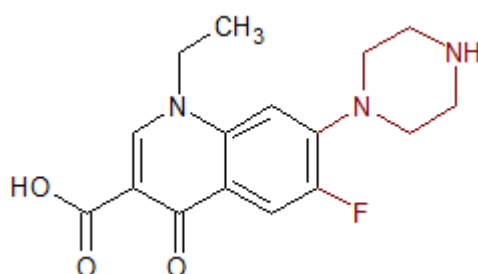


Figure 2 : Norfloxacine. Le Fluor en position 6 permet un spectre élargi aux bactéries à Gram positif. Le cycle pipéridinique en position 7 permet un spectre élargi à *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que de meilleures absorption et diffusion.

La 3^e génération de fluoroquinolones est caractérisée par son spectre élargi aux Streptocoques. On y trouve notamment la première fluoroquinolone développée pour la médecine vétérinaire à la fin des années 80 : l'enrofloxacin (Martinez, McDermott, Walker 2006). Elle est aujourd'hui utilisée chez de nombreuses espèces. La marbofloxacine fait elle aussi partie de cette troisième génération de quinolones. Ses propriétés seront développées dans le chapitre 2.

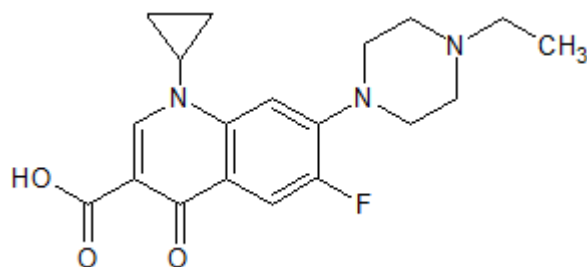


Figure 3 : Enrofloxacin. Première fluoroquinolone spécifiquement développée pour la médecine vétérinaire.

1.3 Fluoroquinolones de 4^e génération

Les fluoroquinolones de quatrième génération ont été développées dans les années 1990. Elles conservent les caractéristiques des fluoroquinolones de 2^e et 3^e génération tout en présentant un spectre élargi aux anaérobies grâce à l'ajout d'un groupe méthoxyl en huitième position (Scholar 2002).

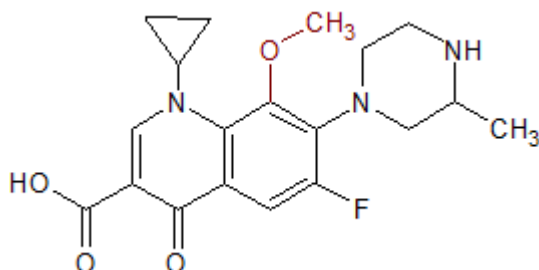


Figure 4 : Gatifloxacin. Le groupement méthoxyl en position 8 permet un spectre élargi aux anaérobies.

2. La marbofloxacin, particularités structurales et propriétés physico-chimiques

La marbofloxacin est le nom commun de l'acide 9-fluoro-2,3-dihydro-3-méthyl-10-(4-méthyl-1-pipérazinyl)-7-oxo-7H-pyridol(3,2,1-ij)(4,2,1)benzoxadiazin-6 carboxylique. Sa structure est présentée sur la figure 5.

Elle présente plusieurs groupements d'intérêts. Les deux oxygènes, communs à toutes les quinolones, permettent la liaison à la cible bactérienne. Le fluor permet une activité sur les bactéries à Gram positif car il facilite le passage de la membrane de ces bactéries. La présence du cycle pipéridinique et du groupement méthyl sur celui-ci permettent d'élargir son activité aux *Pseudomonas*, Streptocoques ainsi qu'aux Mycoplasmes (Ferran 2009; Scholar 2002; Martinez, McDermott, Walker 2006). Le cycle oxadiazine permet quant à lui d'allonger la demi-vie de la molécule et d'augmenter sa biodisponibilité. (Chastagnol 2006). La marbofloxacin possède un caractère amphotère qui lui confère une bonne solubilité dans les milieux basiques et acides (pKa1 = 5.69 ; pKa2 = 8.02) (Martinez, McDermott, Walker 2006). Le pKa faible est permis par le groupement carboxylique, alors que le pKa élevé est conféré par le cycle pipérazinique. A pH physiologique elle reste neutre, ce qui lui confère une bonne liposolubilité, permettant sa diffusion dans les tissus biologiques.

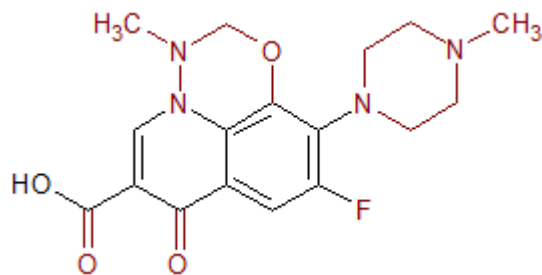


Figure 5 : Marbofloxacin. Les deux oxygènes en positions 1 et 3 permettent la liaison à la cible moléculaire. Le Fluor en position 6 permet un spectre élargi aux bactéries à Gram positif. Le cycle pipéridinique en position 7 et son groupement méthyl permettent un spectre élargi à *Pseudomonas aeruginosa*, aux mycoplasmes et aux Streptocoques ainsi que de meilleures absorption et diffusion. Le cycle oxadiazine en position 8 allonge la demi-vie de la molécule et sa biodisponibilité.

3. Pharmacocinétique de la marbofloxacin

La pharmacocinétique étudie l'effet de l'organisme sur le médicament. Plusieurs publications se sont intéressées à la pharmacocinétique de la marbofloxacin chez le cheval.

3.1 Absorption et biodisponibilité

L'absorption est l'étape au cours de laquelle la marbofloxacin pénètre dans la circulation générale depuis son site d'administration. Celle-ci est pratiquement complète lors d'administration par voies intramusculaire et sous-cutanée, où l'on obtient respectivement une biodisponibilité de 88% et 98%. Lors d'une administration par voie orale, la biodisponibilité est plus faible, environ 60% mais reste tout à fait adaptée à une utilisation clinique. L'absorption est rapide quelle que soit la voie d'administration, avec un temps pour atteindre le pic de concentration plasmatique de l'ordre de 30 minutes par voie orale à environ une heure par voie intramusculaire (Bousquet-mélou et al. 2002; Peyrou et al. 2006; Carretero et al. 2002).

3.2 Distribution

La distribution correspond à l'étape du passage du médicament du sang vers les tissus. Seule la forme libre de l'antibiotique peut diffuser à travers les membranes et donc rejoindre son site d'action, la concentration plasmatique libre reflète donc la concentration dans la biophase. Chez la plupart des espèces, la fraction de marbofloxacin liée aux protéines plasmatiques est faible, de l'ordre de 30% chez les bovins, encore plus faible chez le porc (10%) (Ismail, El-Kattan 2007; Ferran et al. 2013; Potter et al. 2013). Chez les équidés, une étude chez le poulain rapporte une fraction liée de 27,5% (Tohamy, El-Gendy 2013), donc similaire à celle observée chez les autres espèces. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, la marbofloxacin possède un caractère amphotère lui permettant une

bonne diffusion dans les tissus biologiques. Le volume de distribution à l'équilibre permet d'évaluer cette diffusion, il est élevé chez le cheval, de 1,18L/kg à 1,6L/kg selon les études, reflet d'une bonne diffusion tissulaire (Carretero et al. 2002; Bousquet-mélou et al. 2002; Peyrou et al. 2006).

3.3 Métabolisme

Deux métabolites hépatiques inactifs ont été mis en évidence chez le chien, la marbofloxacin N-déméthyl et la marbofloxacin N-oxyde (Lefebvre et al. 1998). Cependant, la marbofloxacin présente un métabolisme limité, car moins de 5% de la marbofloxacin administrée est transformée.

3.4 Elimination

La marbofloxacin est essentiellement éliminée sous forme active et son excrétion est à 40% rénale et 60% fécale chez le cheval. (Peyrou et al. 2006). La clairance plasmatique est faible, 0,23 à 0,28 L/kg/h en moyenne selon les études chez les chevaux sains, et traduit la faible capacité des chevaux à éliminer cette molécule. Une étude de pharmacocinétique de population a montré que cette clairance est encore plus faible chez les chevaux malades (0,21 L/kg/h) (Peyrou et al. 2004; Tétot 2004; Bousquet-mélou et al. 2002; Peyrou et al. 2006)

4. Pharmacodynamique

La pharmacodynamique est la science qui décrit les effets d'un principe actif sur l'organisme. Nous décrirons ici le mécanisme d'action et les effets des fluoroquinolones, ainsi que la mise en place de phénomènes de résistances.

4.1 Cibles et mécanisme d'action

Les quinolones présentent un mécanisme d'action unique, en effet il s'agit de la seule classe d'antibactériens à agir directement sur la synthèse de l'ADN bactérien. Elles présentent deux cibles intracellulaires, qui sont deux ADN topoisomérases : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Pour les bactéries à Gram négatif, l'ADN gyrase semble être la cible principale, tandis que pour les bactéries à Gram positif, c'est la topoisomérase IV qui semble être la cible préférentielle des quinolones (Drlica et al. 2007).

L'ADN gyrase permet le surenroulement négatif de l'ADN en amont de la réplication. Cette étape facilite ensuite le déroulement local de l'ADN nécessaire à sa réplication. La topoisomérase IV, quant à elle, a pour rôle principal la décaténation, c'est-à-dire la séparation des deux brins d'ADN fils en fin de réplication. Ces deux enzymes possèdent une structure tétramérique et agissent sur l'ADN double-brin par clivage transitoire de celui-ci, l'action des quinolones sur ces deux cibles est similaire. La formation d'un complexe ADN-topoisomérase-quinolone empêche la religation des brins d'ADN suite au clivage, la liaison covalente entre l'ADN et l'enzyme devient donc permanente, à l'origine des « complexes clivés » (Drlica et al. 2007; Ferran 2009).

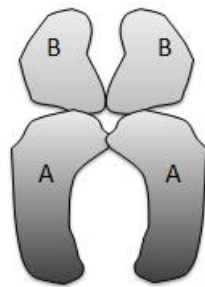


Figure 6 : Structure de l'ADN gyrase. Les deux sous-unités A sont codées par le gène *gyrA* et les deux sous-unités B sont codées par le gène *gyrB*.

4.2 Effets

Les quinolones sont bactéricides et agissent rapidement. Cependant, le blocage de la réplication de l'ADN est réversible et n'explique pas la mort bactérienne. Il induit une réponse SOS à l'origine d'une filamentation bactérienne (élongation cellulaire sans division) qui expliquerait plutôt une activité bactériostatique. La présence de nombreux « complexes clivés » tout au long de l'ADN pourrait bloquer la transcription en gênant l'ARN polymérase, mais là encore, ce mécanisme n'explique pas la mort cellulaire rapide observée après un traitement par les quinolones.

D'autres mécanismes entrent donc en jeu. Une hypothèse serait que la présence des « complexes clivés » entraîne une fragmentation du chromosome bactérien, par déclenchement d'un phénomène d'apoptose. Ce mécanisme peut expliquer partiellement l'activité bactéricide, mais les fluoroquinolones récentes, et notamment la marbofloxacin, ont aussi une activité en dehors des phases de synthèse protéique. Un second mécanisme n'impliquant toutefois pas la synthèse protéique, serait donc aussi à l'origine d'une fragmentation chromosomique, induisant une mort cellulaire rapide (Drlica et al. 2007).

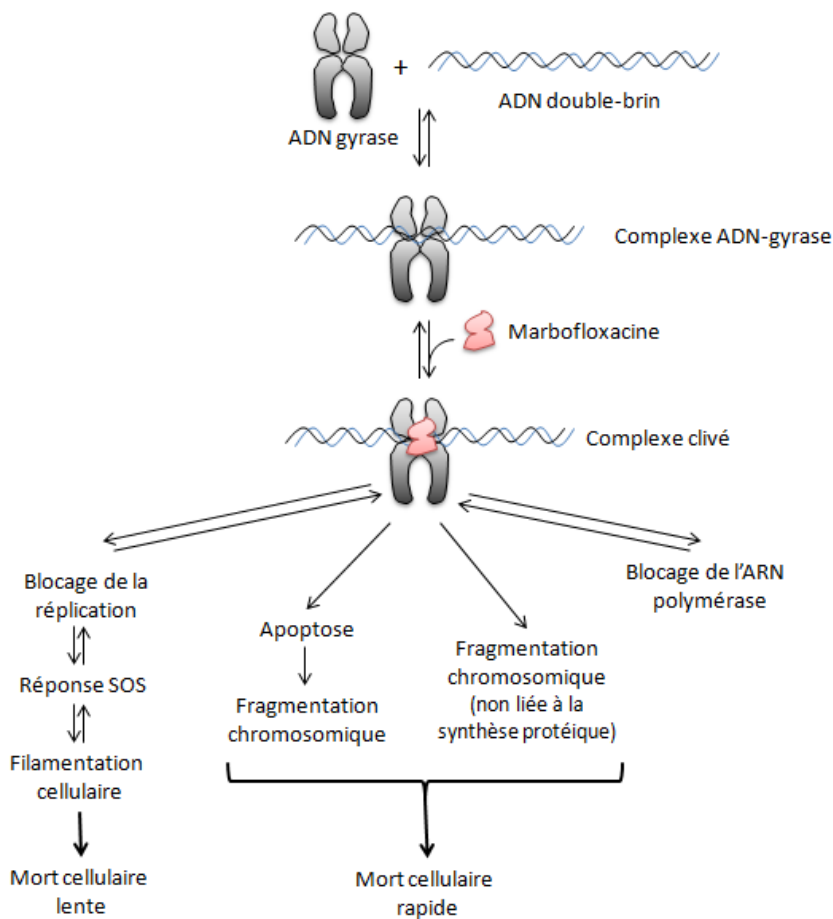


Figure 7 : Effets de la formation des complexes clivés entre la marbofloxacine et l'ADN gyrase.

5. Phénomènes de résistance

Rapidement après la découverte des quinolones, des phénomènes de résistance ont été observés. Aujourd'hui, plusieurs pathogènes présentent des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones, compromettant leur utilisation en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Ces mécanismes développés par les bactéries sont nombreux et complexes, mais il est possible de les classer en deux catégories. La première correspond à des altérations de la cible moléculaire, la seconde aux mécanismes visant à réduire l'accumulation des fluoroquinolones dans la cellule.

Des mutations dans le gène *gyrA* codant pour la sous-unité A de l'ADN gyrase ont été mises en évidence chez plusieurs familles de bactéries présentant des résistances (Niwa, Hobo, Anzai 2006; Niwa, Lasker 2010). Cette mutation empêche la formation du complexe gyrase-quinolone, et donc la formation des « complexes clivés » à l'origine de l'activité bactéricide de la quinolone. Des mutations sur le gène *parC*, codant pour la sous-unité A de la topoisomérase IV, ont aussi été observées, mais n'entraînent de résistance élevée que

chez les bactéries présentant déjà une mutation sur le gène *gyrA* (Lim et al. 2003; Heisig 1996). Les mutations sur les gènes *gyrB* et *parE* codant respectivement pour les sous-unités B de la gyrase et de la topoisomérase IV existent, mais ne confèrent pas aux bactéries de résistance élevée (Niwa, Lasker 2010; Madaras-Kelly et al. 2002).

Les phénomènes de résistance observés chez les bactéries ne présentant pas d'altération de la cible peuvent s'expliquer par une surexpression des pompes à efflux qui permettent la sortie de la fluoroquinolone par un transport actif. Ce mécanisme est non-spécifique et est notamment observé chez les bactéries dites multi-résistantes, c'est-à-dire résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. Une diminution de l'expression des porines sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif, limitant ainsi l'entrée de la molécule, peut aussi expliquer ces phénomènes de résistance, mais ce mécanisme semble jouer un rôle moins important que les pompes à efflux (Kaatz, Seo, Ruble 1993; Hooper 2001; Madaras-Kelly et al. 2002).

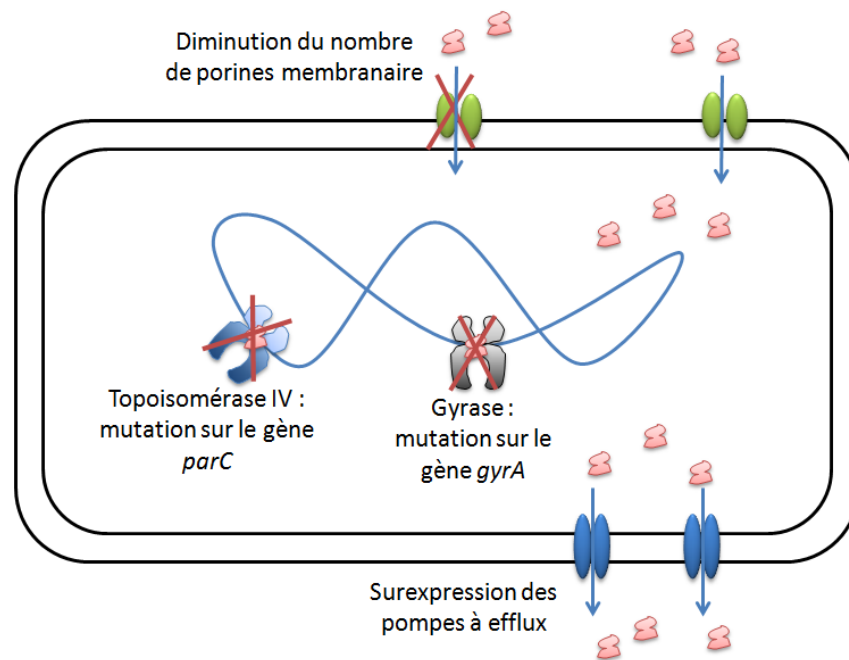


Figure 8 : Principaux mécanismes de résistance aux fluoroquinolones. Les mutations modifiant la cible moléculaire sont spécifiques de la marbofloxacine ; la surexpression des pompes à efflux et, dans une moindre mesure, la diminution de porines membranaires sont à l'origine de multi-résistances aux antibiotiques.

A l'heure actuelle, les mécanismes de résistances aux fluoroquinolones sont principalement transmis verticalement. Cependant, des plasmides mis en évidence chez des souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* seraient à l'origine de la transmission horizontale de certains mécanismes de multi-résistance, et notamment de résistance aux fluoroquinolones. (Martínez-Martínez, Pascual, Jacoby 1998)

6. Utilisation chez les chevaux

Bien que ne disposant pas d'autorisation de mise sur le marché pour les équidés, la marbofloxacin est déjà utilisée par les vétérinaires dans le traitement des infections bactériennes chez le cheval. Son large spectre d'action et sa bonne diffusion tissulaire en font un antibiotique potentiel dans le traitement de nombreuses maladies infectieuses. La molécule semble de plus bien tolérée dans l'espèce, présentant peu d'effets indésirables. Son utilisation est cependant proscrite chez les chevaux en croissance, des phénomènes d'arthropathie ayant été décrits suite à l'utilisation de certaines fluoroquinolones chez les jeunes dans plusieurs espèces, et notamment le poulain. (Vivrette et al. 2001)

Par ailleurs, les fluoroquinolones entrant dans la catégorie des « antibiotiques critiques » (DGAI 2012), leur utilisation ne devrait se faire qu'en seconde intention après antibiogramme. Cependant, il n'existe actuellement pas de valeurs critiques pour l'espèce équine pour les antibiogrammes utilisés en médecine vétérinaire en Europe, cette étape semble donc difficile à mettre en pratique sur le terrain. Les principaux pathogènes équins et leur Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour la marbofloxacin sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Principaux gènes équins et leur sensibilité à la marbofloxacin. CMI₉₀ calculées pour des souches équines par régression linéaire.

Bactérie	Principales pathologies	CMI ₉₀ (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	Entérite, métrites, infections urinaires, avortements, méningo-encéphalites, arthrites	0,038
<i>Enterobacter sp.</i>	Infections des plaies, infections cutanées, mammites, infection du tractus urinaire	<i>Pantoea agglomerans</i> : 0,029 Enterobacteriaceae : 0,027 (Bousquet-mélou et al. 2002)
<i>Rhodococcus equi</i>	Infections respiratoires (rhodococcose du poulain), métrites	0,922
<i>Streptococcus equi</i>	Infections respiratoires, gourme, avortements, infections des plaies, métrites, arthrites	Pour : <i>Streptococcus zooepidemicus</i> : 1,714
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infections cutanées, infections des plaies, métrites, avortements, arthrite	0,210 (Bousquet-mélou et al. 2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Métrites, infections respiratoires, kératite ulcéralive	CMI entre 0,12 et 2,0 µg/mL pour les souches testées. (Bousquet-mélou et al. 2002)
<i>Clostridium sp</i>	Entérites, infections respiratoires, tétanos	

PARTIE 2 :

**ADAPTATION DE POSOLOGIE PAR L'APPROCHE
PHARMACOCINETIQUE-PHARMACODYNAMIQUE**

PARTIE 2 : ADAPTATION DE POSOLOGIE PAR L'APPROCHE PHARMACOCINETIQUE- PHARMACODYNAMIQUE

Une mauvaise posologie lors de la mise en place d'un traitement antibiotique peut avoir plusieurs conséquences : un échec thérapeutique si les concentrations plasmatiques restent trop faible ou des effets indésirables si celles-ci sont trop élevées, mais aussi la sélection de résistances chez les pathogènes et les bactéries de la flore commensale. L'approche pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) nous permet de décrire et de prédire les effets de l'antibiotique dans l'organisme, et ainsi d'adopter un schéma posologique adapté.

La pharmacocinétique décrit la cinétique d'absorption, de distribution, du métabolisme et de l'élimination du principe actif (ADME) et permet de prédire ses concentrations plasmatiques au cours du temps. Les mécanismes pharmacocinétiques de la marbofloxacin (ADME) ont été vus dans la partie 1. La pharmacodynamique décrit la relation entre la concentration du médicament et ses effets sur les bactéries. Le mécanisme d'action et les effets de la marbofloxacin ont été décrits dans la partie précédente. Nous étudierons dans cette partie les différents paramètres pharmacodynamiques permettant d'évaluer l'activité d'un antibiotique contre les bactéries, leur relation à la pharmacocinétique et leur intérêt dans le choix d'un schéma posologique efficace et dans la prévention de l'apparition de résistance. Nous nous intéresserons aussi aux informations qu'ont permis d'apporter les études de populations et les simulations de Monte-Carlo.

1. Paramètres pharmacodynamiques

1.1 Concentration Minimale Inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus petite concentration capable, *in vitro*, d'empêcher pendant 18 à 24h la croissance macroscopique d'un inoculum standard de 10^4 à 10^6 bactéries/mL. Elle est donc spécifique d'un couple bactérie-antibiotique. On définit aussi les CMI₅₀, CMI₇₅ et la CMI₉₀ correspondant aux concentrations pour lesquelles 50, 75 et 90% des souches testées ne se développent pas.

Il existe trois techniques expérimentales pour la détermination des CMI (Baker et al. 1991) :

- **Méthode de dilution de milieu liquide ou solide** (cf. figure 9) (Andrews 2001) : on dispose d'une série de tubes contenant des concentrations décroissantes d'antibiotique (dilution par deux) et un milieu de culture. Ces tubes sontensemencés avec un inoculum standard (10^4 à 10^6 bactéries/mL), et mis en culture à 37°C pendant 18 à 24h. La CMI correspondant à la concentration dans le dernier tube où l'on ne peut observer à l'œil nu de croissance bactérienne.

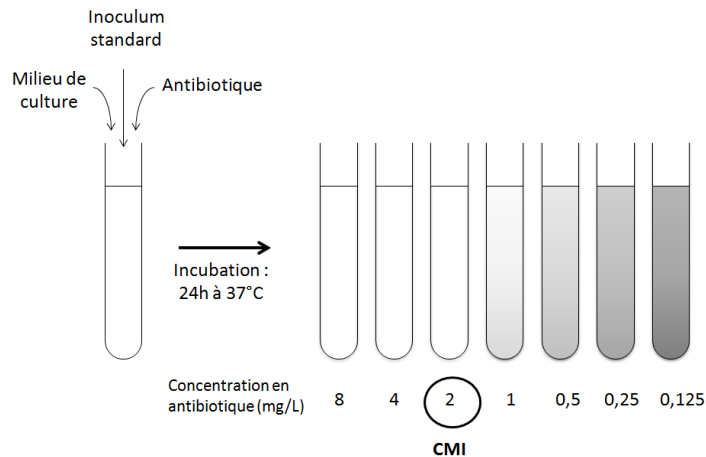


Figure 9 : Détermination de la CMI par méthode de dilution en milieu liquide.

- **Méthode de diffusion sur disque** (cf. figure 10) : dans une boîte de pétri, une gélose estensemencée avec le germe d'intérêt. Des disques imprégnés de diverses concentrations d'antibiotiques, connues, y sont répartis. Les géloses sont incubées pendant 24h à 37°C . On observe alors un disque d'inhibition de la croissance bactérienne. Le diamètre de ce disque doit être mis en relation avec les CMI obtenues par dilution grâce à une courbe de concordance définie pour une concentration en antibiotique donnée.

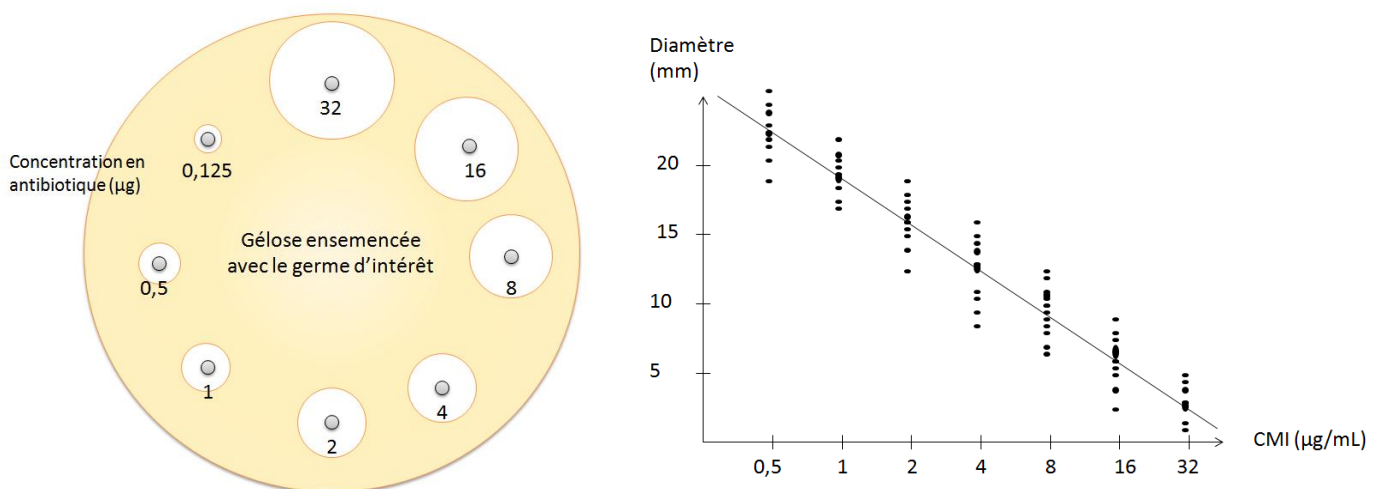


Figure 10 : Détermination de la CMI par méthode de diffusion sur disque. A gauche la gélose ensemencée : on observe les disques d'inhibition dont le diamètre varie avec la concentration en antibiotique. A droite, la courbe de concordance permet l'interprétation des diamètres d'inhibition observés.

- **L'E-test** (cf. figure 11) : on dispose d'une boîte de pétri gélosée que l'on ensemence avec le germe d'intérêt. On y dépose une bandelette imprégnée d'un gradient de concentrations d'antibiotique. Le tout est incubé pendant 24h à 37°C. Il suffit alors de lire sur la bandelette la CMI.

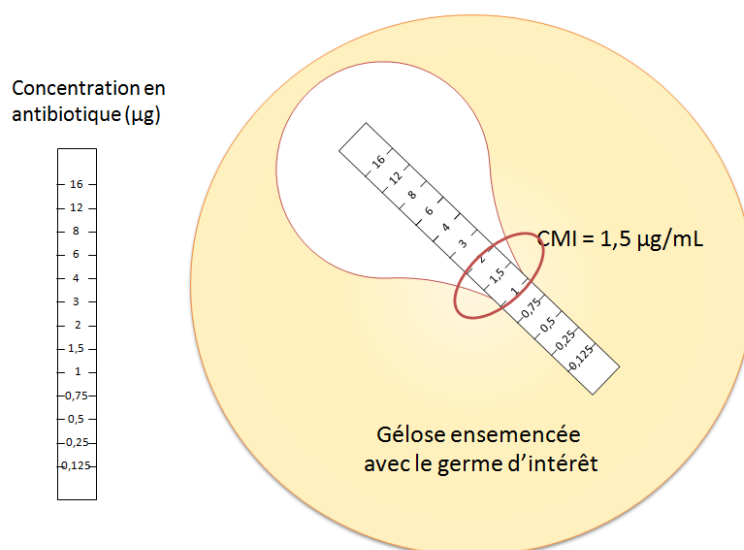


Figure 11 : Détermination de la CMI par E-test. La CMI correspond à la première graduation appartenant à l'ellipse d'inhibition.

La CMI est le paramètre roi de la pharmacodynamie antibactérienne, elle donne une bonne approximation de la concentration libre d'antibiotique qu'il est nécessaire d'obtenir dans la biophase.

A partir des CMI, il est possible de classer les bactéries en trois catégories, sensible, intermédiaire ou résistante. Dans une première classification, épidémiologique, une bactérie est définie comme résistante si sa CMI est largement supérieure à celle des souches sauvages de son espèce. On définit alors deux concentrations critiques, ou **cut-off épidémiologique** : la concentration critique supérieure C et la concentration critique inférieure c . Si, pour une bactérie donnée $CMI < c$, celle-ci est dite sensible et si $CMI > C$, elle est dite résistante. Entre les deux elle est de sensibilité intermédiaire.

Ces concentrations critiques sont déterminés en France par le CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) pour la médecine humaine, mais aussi pour les antibiotiques et les espèces bactériennes d'intérêt vétérinaire (CASFM 2013). La connaissance des CMI permet ainsi une surveillance épidémiologique de l'apparition des résistances dans les populations bactériennes, en étudiant la distribution des CMI et son évolution au cours du temps.

Tableau 2 : Critères de classification des souches bactériennes. C est la concentration critique supérieure et c la concentration critique inférieure définies par le CASFM.

Critères de classification des souches bactériennes	
$CMI < c$	Sensible
$c < CMI < C$	Intermédiaire
$CMI > C$	Résistante

Cette classification basée uniquement sur des données épidémiologiques est à distinguer de la classification à caractère clinique prenant en compte les données des études pharmacocinétiques (dose d'antibiotique cliniquement acceptable) et pharmacodynamiques, permettant d'identifier des **cutoffs PK/PD**, ainsi que le succès clinique des traitements étudiés permettant d'identifier les **cutoffs cliniques**. On définit ensuite des concentrations critiques (**breakpoints**) inférieure et supérieure. Si, pour une bactérie donnée la CMI est plus faible que la concentration critique inférieure, celle-ci est dite cliniquement sensible, le pronostic clinique est alors très favorable avec une probabilité de succès d'environ 90%. Si sa CMI est plus élevée que la concentration critique supérieure, elle est dite cliniquement résistante, et la probabilité de succès clinique est moindre, mais reste de l'ordre de 60% (Pacanowski 2005).

En humaine, ces **breakpoints** sont établis et régulièrement mis à jour par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) situé aux Etats-Unis ou par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe. En médecine vétérinaire, seul le CLSI propose des **breakpoints** spécifiques aux différentes espèces animales pour les germes d'intérêt vétérinaire. Ces **breakpoints** ne sont à l'heure actuelle pas utilisés par les laboratoires européens, ainsi les critères de sensibilité proposés sur le terrain sont erronés et expliquent la faible valeur prédictive des antibiogrammes vétérinaires. La mise en place de concentrations critiques vétérinaires à un niveau européen par le groupe VetCAST est actuellement en discussion et pourrait voir le jour prochainement.

1.2 Concentration Minimale Bactéricide

La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la plus petite concentration capable, *in vitro*, d'entraîner la mort d'un pathogène. En pratique, il s'agit de la concentration capable de réduire le 3 log un inoculum standard de 10^6 bactéries en 18 à 24h. Pour les antibiotiques bactéricides, comme la marbofloxacin, la CMI et la CMB sont proches. Pour les antibiotiques bactériostatiques, elle est en général trop élevée, et ne serait pas atteignable *in vivo*. Elle est au final peu utilisée.

1.3 Concentration Préventive de Mutants

La concentration préventive de mutants (CPM) est la concentration d'antibiotique capable d'empêcher la sélection de la sous-population résistante dans un inoculum. Il s'agit en fait de la CMI des mutants de premier ordre (bactéries qui ne possèdent qu'un seul mécanisme de résistance). En pratique, elle se mesure de la même manière qu'une CMI, mais l'inoculum initial est plus important ($>10^9$ bactéries). Son intérêt réside dans le fait que la probabilité d'apparition d'un double mécanisme de résistance dans une population sauvage est très faible. Ainsi, en éliminant les mutants de premier ordre, on empêche l'apparition de bactéries hautement résistantes (présentant plusieurs mécanismes de résistance) (Mouton 2005; Toutain, del Castillo, Bousquet-Mélou 2002).

1.4 Fenêtre de sélection

Les CPM permettent d'introduire une notion supplémentaire, celle de fenêtre de sélection. Il s'agit de la fenêtre de concentration située entre la CMI et la CPM (cf. figure 12). C'est la zone dangereuse où sont sélectionnées les résistances. En effet, dans un inoculum, il existe toujours des sous-populations résistantes (de l'ordre de 10^{-8}). Ainsi, en exposant une population bactérienne à une concentration d'antibiotique située dans cette fenêtre de sélection, on va tuer les bactéries sensibles mais pas les mutants de premier ordre, augmentant ainsi leur proportion dans la population, ainsi que la probabilité d'apparition de bactéries hautement résistantes.

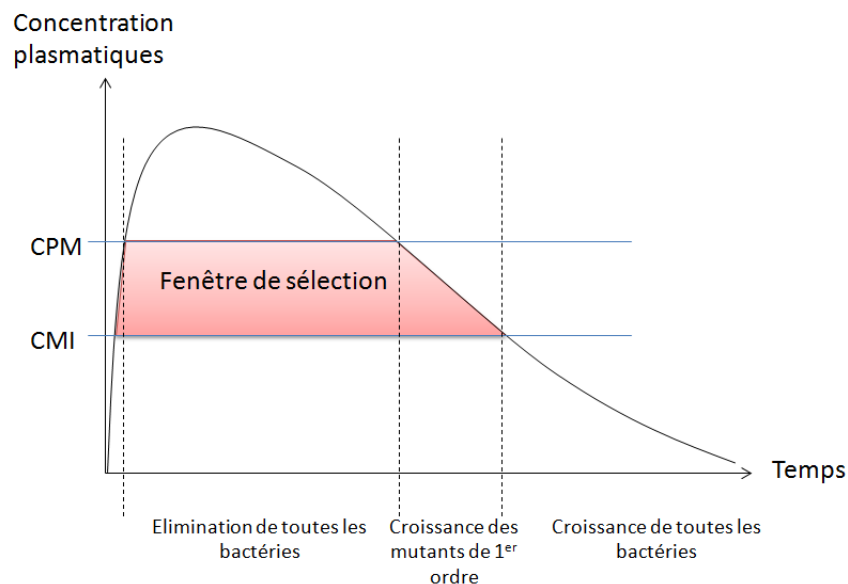


Figure 12 : Intérêt de la fenêtre de sélection. Une concentration d'antibiotique située entre la CMI et la CPM élimine les souches sauvages et permet la croissance des mutants de premier ordre.

1.5 Vitesse de bactéricidie

Les courbes de bactéricidies sont obtenues par dénombrement bactériens successifs après exposition à une concentration d'antibiotique connue. Elles ont permis de classer les antibiotiques selon deux modes d'action : temps-dépendant et concentration-dépendants.

Ainsi, pour les antibiotiques concentration-dépendants, la vitesse de bactéricidie augmente avec la concentration en antibiotique. Il s'agira donc lors de la mise en place d'une thérapeutique avec ces antibiotiques d'atteindre rapidement une forte concentration plasmatique afin d'éliminer les pathogènes. Dans le cas des antibiotiques temps-dépendants, il existe une concentration seuil au-delà de laquelle la vitesse de bactéricidie n'augmente plus. Il s'agira lors de leur utilisation d'atteindre ce seuil et de maintenir les concentrations en antibiotique au dessus de ce seuil le plus longtemps possible.

La marbofloxacin a un comportement concentration-dépendant contre les bactéries à Gram négatif et un comportement temps-dépendant vis-à-vis de certaines bactéries à Gram positif.

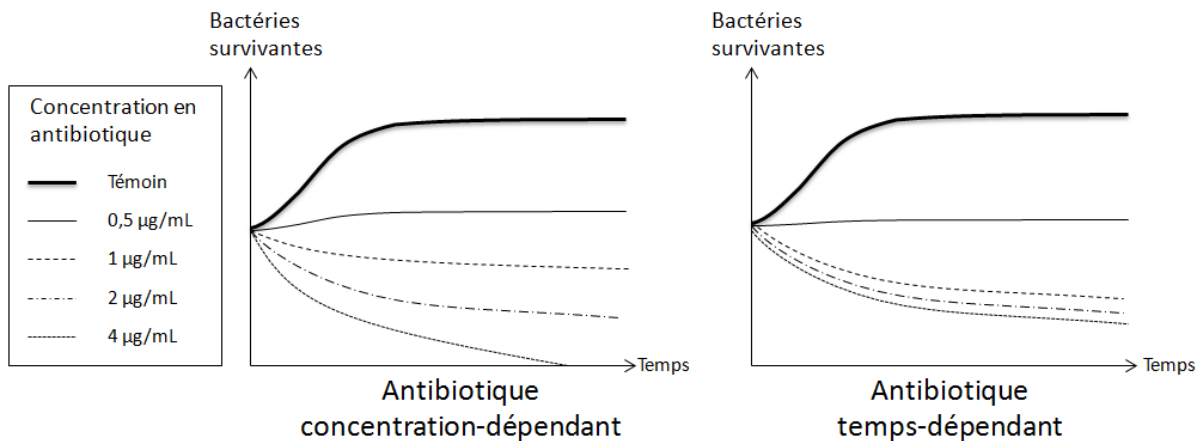


Figure 13 : Représentation schématique des deux modes de comportement des antibiotiques. A gauche, un antibiotique concentration-dépendant, son activité augmente avec sa concentration. A droite, un antibiotique temps-dépendant : la concentration plasmatique seuil à atteindre est de 1µg/mL.

1.6 Effet post-antibiotique

Les antibiotiques peuvent avoir un effet sur les bactéries, même lorsqu'ils ne sont plus présents dans le milieu, c'est l'effet post-antibiotique (EPA). En pratique, il s'évalue *in vitro* et correspond au temps d'inhibition de la croissance bactérienne après un court temps d'exposition à un antibiotique. Cependant, certains phénomènes observés *in vitro* ne sont pas retrouvés *in vivo*, mais seulement peu d'études sont disponibles à ce sujet. La marbofloxacin, comme la plupart des fluoroquinolones présente un effet post-antibiotique contre la majorité des bactéries (Spreng et al. 1995).

L'EPA est à distinguer de l'effet sub-inhibiteur qui évalue l'activité d'un antibiotique une fois les concentrations plasmatiques passées en dessous de la CMI. Il se mesure *in vivo* par la différence entre temps que met une colonie bactérienne pour augmenter d'un log chez un témoin non traité et chez un animal traité après que la concentration plasmatique en antibiotique soit passée sous la CMI (Mouton 2005).

2. Indices d'efficacité

Les caractéristiques pharmacodynamiques évoquées précédemment sont de bons indicateurs pour prévoir l'efficacité d'un antibiotique. Cependant un animal n'est pas un tube à essai, les concentrations plasmatiques observées *in vivo* dépendent des paramètres pharmacocinétiques, il est donc important de mettre en relation ces concentrations plasmatiques avec les paramètres pharmacodynamiques. Cela a donné naissance aux indices PK/PD, ou indices d'efficacité. La CMI est le paramètre pharmacodynamique utilisé, et on la retrouve dans les trois indices PK/PD principaux. D'autre part, des récentes études ont proposé des indices qui permettraient d'évaluer plus précisément la sélection de résistance, prenant ainsi en compte la CPM et la fenêtre de sélection.

2.1 Quotient inhibiteur

Il s'agit du rapport entre la concentration plasmatique en antibiotique maximale obtenue (C_{max}) et la CMI de la bactérie d'intérêt, noté C_{max}/CMI . C'est un bon indicateur de l'efficacité des antibiotiques concentration-dépendant, notamment les aminoglycosides pour lesquels un ratio de 12 permet une réponse clinique chez 90% de patients humains atteints d'infections par des bactéries à Gram négatif (Moore, Lietman, Smith 1987). Pour les fluoroquinolones, un **quotient inhibiteur d'au moins 8** est recommandé pour éliminer les pathogènes et prévenir l'apparition de résistances (McKellar, Sanchez Bruni, Jones 2004; Wright et al. 2000).

2.2 Temps au dessus de la CMI ($T > CMI$)

L'indice d'efficacité $T > CMI$ représente le pourcentage de temps où la concentration plasmatique est plus importante que la CMI du pathogène d'intérêt, il se calcule sur une période de 24h, à l'équilibre, dans le cadre d'une administration quotidienne. C'est un bon prédicteur de l'efficacité des antibiotiques temps-dépendant, notamment les bêta-lactamines. Une étude a montré que $T > CMI$ pourrait servir à comparer l'activité de différentes fluoroquinolones, permettant notamment d'extrapoler les données obtenues pour une substance afin de prédire l'efficacité d'une autre (Firsov et al. 1998), cependant ces

résultats furent contredits plus tard par le même laboratoire. Cet indice est donc peu utilisé pour les fluoroquinolones. (McKellar, Sanchez Bruni, Jones 2004)

2.3 ASC/CMI

Il s'agit du rapport de l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps (ASC) sur la CMI du pathogène d'intérêt. Il est plus souvent noté AUC/MIC, comme retrouvé dans la littérature anglophone. Cet indice se calcule à l'équilibre sur 24h et s'exprime en heures. C'est un très bon indice de l'efficacité des antibiotiques concentration-dépendants tels que les fluoroquinolones, mais aussi pour certains antibiotiques temps-dépendants, notamment les macrolides et les tétracyclines. La signification d'un indice en heures n'est pas forcément évidente à interpréter, ainsi on le divise généralement par 24h pour obtenir le coefficient multiplicateur de la CMI à obtenir en moyenne sur 24h. (Toutain, Bousquet-Melou, Martinez 2007)

Pour les fluoroquinolones, il existe une très bonne corrélation entre le ratio ASC/CMI et la bactéricidie, c'est le meilleur indice pour prédire leur efficacité. Ainsi il a été déterminé qu'un **ASC/CMI > 125h** permet d'éliminer les pathogènes, la concentration plasmatique en antibiotique devrait alors être en moyenne 5 fois supérieure à la CMI du pathogène d'intérêt. (McKellar, Sanchez Bruni, Jones 2004)

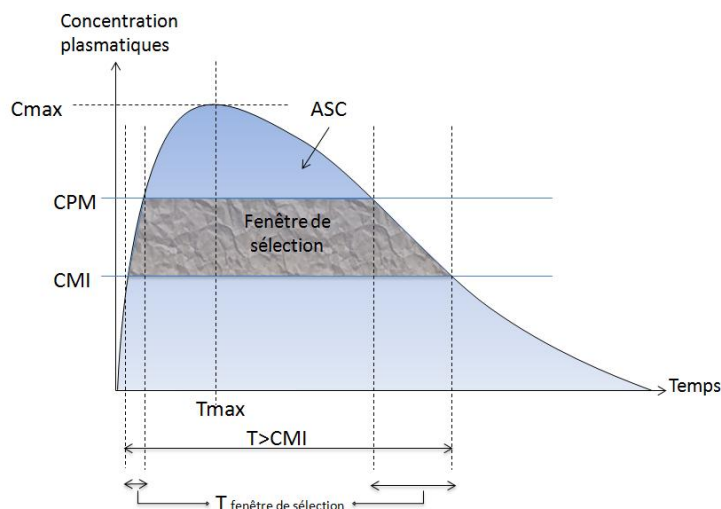


Figure 14 : Principaux indices pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sur la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps. L'ASC est ici extrapolée à l'infini suite à une injection unique, elle est équivalente à l'ASC à l'équilibre sur 24h.

Les indices présentés précédemment servent principalement à prédire l'efficacité d'un antibiotique. Ils permettent aussi de prévenir la sélection de résistances, notamment un ratio ASC/CMI > 250h a été proposé pour les fluoroquinolones afin de limiter le développement des mutants de premier ordre. En médecine vétérinaire, le concept de SISAAB (Single Injection Short-Acting AntiBiotic), plus couramment appelé « one-shot », a été

développé. Il vise à obtenir en une seule injection un ratio ASC/CMI de 250h, permettant ainsi d'éliminer le pathogène rapidement et d'empêcher le développement de résistance chez le pathogène mais aussi chez les bactéries de la flore commensale, le temps d'exposition à l'antibiotique restant très court. (Toutain 2007)

2.4 De nouveaux indices pour prévenir les phénomènes de résistance

Récemment d'autres indices s'intéressant spécifiquement au développement des résistances ont été proposés. Ainsi, le temps passé dans la fenêtre de sélection ($T_{\text{fenêtre de sélection}}$), l'indice de prévention des mutants ($C_{\text{max}}/\text{CPM}$) ou encore l'aire de la fenêtre de sélection ($\text{ASC}_{\text{fenêtre de sélection}}$) seraient des bons indicateurs pour prévenir la sélection des mutants de premier ordre. Cependant peu d'études ont encore été effectuées à ce sujet, il est donc pour l'instant difficile de voir comment ces différents indices pourront être utilisés en pratique.

3. Détermination du schéma posologique

Mettre en place un schéma posologique, c'est d'abord choisir une substance adaptée, puis déterminer la dose, l'intervalle entre deux administrations ainsi que la durée du traitement. Les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques apportent des informations qui vont aider au choix de la dose et de l'intervalle d'administration. Ils ne donnent par contre aucune information sur la durée du traitement, celle-ci sera définie par le praticien en fonction du tableau clinique. La relation qui lie la pharmacocinétique à la pharmacodynamique est la suivante :

$$\text{Dose (mg/kg/24h)} = \frac{\text{Cl (L/kg/24h)} \times [\text{C}]_{\text{thérap}} \text{ (mg/L)}}{\text{F}\% \times \text{f}_u} \quad (\text{Eq. 1})$$

Cl représente la clairance plasmatique du principe actif sur 24h, $[\text{C}]_{\text{thérap}}$ la concentration moyenne sur 24h que l'on vise à obtenir, elle est équivalente à la concentration obtenue à l'équilibre lors de perfusion intraveineuse (cf figure 15). F% représente la biodisponibilité et f_u la fraction d'antibiotique non liée aux protéines plasmatiques.

Nous avons vu précédemment qu'un ratio ASC/CMI d'au moins 125h, soit une concentration moyenne sur 24h d'environ 5 fois la CMI, permet d'éliminer le pathogène. Ainsi si l'on connaît la CMI de la bactérie à éradiquer (en pratique, on prend la CMI_{90} de l'espèce), on peut résoudre l'équation suivante :

$$\text{Dose (mg/kg/24h)} = \frac{\text{Cl (L/kg/24h)}}{\text{F}\% \times \text{f}_u} \times \text{BP} \times \text{CMI (mg/L)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Avec BP le breakpoint, c'est-à-dire la valeur seuil du ratio ASC/CMI que l'on souhaite obtenir. Cette équation décrit le cas d'une administration quotidienne, il est possible de l'adapter pour différents intervalles d'administration ou dans le cadre d'une administration unique. La connaissance de la clairance plasmatique d'un principe actif, de sa fraction libre et de sa biodisponibilité chez l'individu que l'on veut traiter est donc nécessaire à l'élaboration d'un schéma posologique. Les études populationnelles ont permis d'étudier plus précisément la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques, et notamment de la clairance plasmatique, dans une population.

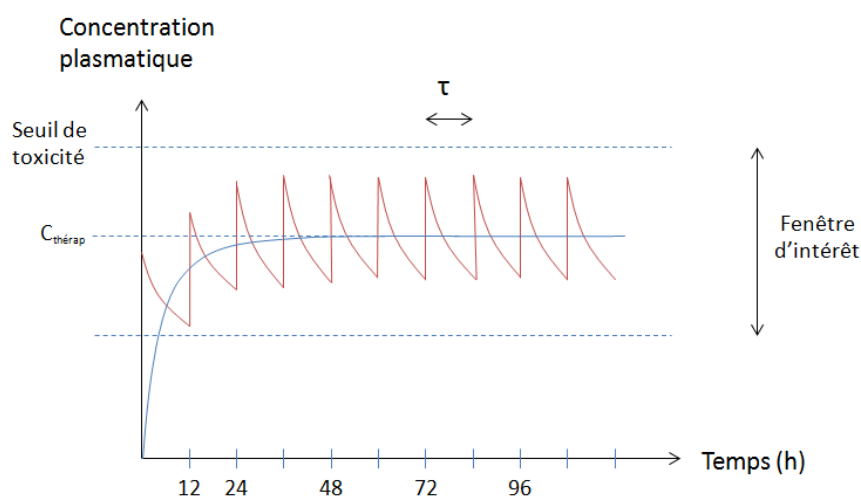


Figure 15 : Variation des concentrations plasmatiques d'un médicament administré bi-quotidiennement (rouge) et en perfusion intraveineuse (bleu). τ représente l'intervalle d'administration, ici 12h. $C_{\text{thérap}}$ est la concentration que l'on souhaite obtenir à l'équilibre, elle est située dans la fenêtre d'intérêt, fenêtre des concentrations pour lesquelles le médicament est actif mais non toxique.

4. Application à l'échelle d'une population

4.1 Principe des analyses pharmacocinétiques de population

Les études pharmacocinétiques classiques ont permis de déterminer des clairances et biodisponibilités moyennes par espèce pour une substance d'intérêt, et ainsi de définir la posologie du médicament. Cependant, il existe des variations d'un individu à l'autre, et on risque d'aboutir à un sous-dosage ou un surdosage chez certains patients. Les études classiques peuvent apporter des informations pour des sous-populations définies a priori (insuffisant rénaux, classe d'âge), à condition de réaliser une étude pour chacune de ces sous-populations.

Les études populationnelles, dont l'outil d'analyse est la régression non linéaire à effet mixte, permettent de déterminer *a priori* la posologie optimale pour un patient donné, en liant les paramètres pharmacocinétiques (clairance, volume de distribution) à ses caractéristiques démographiques, physiologiques et cliniques (poids, sexe, insuffisant rénal...) aussi appelées covariables. Elles ont ainsi permis de quantifier et de comprendre la variabilité interindividuelle à l'échelle de la population en prenant en compte la variabilité

des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ces études ont aussi apporté des informations sur les interactions médicamenteuses.

Les études populationnelles permettent aussi de traiter des données éparses. Elles ont ainsi rendues possibles les études chez des sous-populations sur lesquelles il ne serait pas éthique de réaliser de nombreux prélèvements (nouveau-nés, personnes âgées...). L'important est que l'ensemble des prélèvements réalisés dans la population reflète le profil des concentrations plasmatiques en fonction du temps. (Simon, Le Guellec, Laporte 2005)

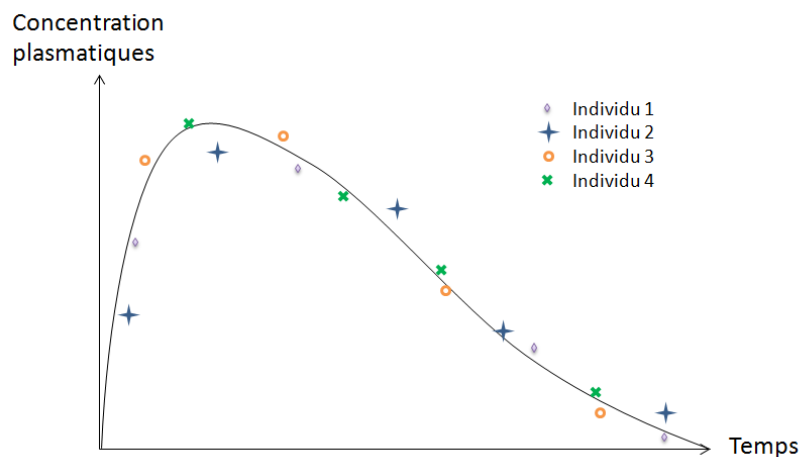


Figure 16 : Prélèvements chez plusieurs individus pour une analyse pharmacocinétique de population. L'ensemble des prélèvements permet de décrire le profil des concentrations en fonction du temps. Chaque individu a des temps de prélèvement différents.

On comprend ainsi pourquoi les études populationnelles, de plus en plus utilisées en médecine humaine, se développent aujourd'hui en médecine vétérinaire. La méthodologie de l'analyse pharmacocinétique de population sera développée dans la partie III.

4.2 Apport des simulations de Monte-Carlo

Les analyses de population apportent de nombreuses informations sur la pharmacocinétique d'un médicament et les paramètres qui la régissent, cependant elles ne prennent pas en compte la variabilité au sein des populations bactériennes. Les simulations de Monte-Carlo permettent de rendre compte de ce qu'il est probable de rencontrer sur le terrain, en s'intéressant à la fois à la variabilité pharmacocinétique observée entre les individus d'une population et à la variabilité de la sensibilité aux antibiotiques dans les populations bactériennes.

Dans le cas des fluoroquinolones, nous avons vu que l'indice d'efficacité le plus corrélé à l'éradication bactérienne était le ratio ASC/CMI. Ainsi, les simulations de Monte-Carlo nous permettent de générer aléatoirement un grand nombre de valeur d'ASC et de CMI, utilisant les fonctions de densité de probabilité des ASC dans la population pour une dose donnée et des CMI trouvées dans la littérature.

Ainsi, si l'on reprend l'équation 2, on peut calculer la dose à administrer pour que 90% des individus d'une population atteignent un certain ratio ASC/CMI pour une CMI donnée (empirique ou connue). Ainsi, Potter et al (Potter et al. 2013) ont montré chez le veau qu'une dose journalière de marbofloxacin de 1,9 mg/kg était nécessaire pour éradiquer (en pratique diminuer de 4 logarithmes l'inoculum) *Pasteurella multocida* contre une dose journalière de 8,5 mg/kg pour *Mannheimia haemolytica*. Ainsi, la dose de 10mg/kg recommandée en injection unique dans cette espèce pourrait permettre d'éliminer les deux bactéries.

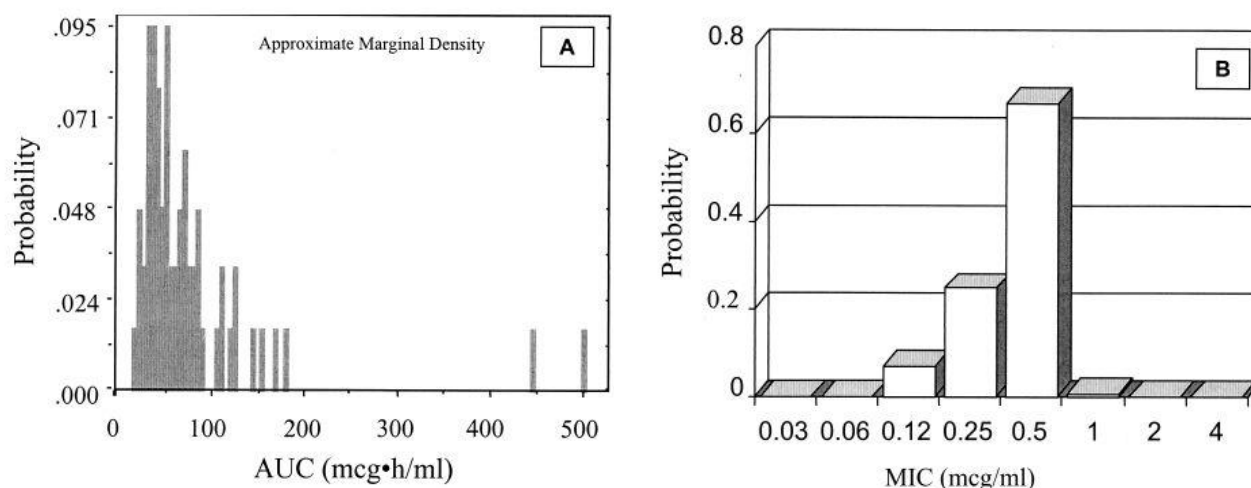


Figure 17 : Distribution des probabilités des ASC de la gatifloxacin dans la population (à gauche) et des CMI de la gatifloxacin contre *Streptococcus pneumoniae* (à droite) obtenues dans le SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. (Source : Ambrose, Grasela 2000)

4.3 Etat actuel des données

Seulement deux études pharmacocinétiques de population existent à l'heure actuelle pour la marbofloxacin chez le cheval. La première a montré que seule la covariable *poids corporel* influe sur la clairance plasmatique de la marbofloxacin (Tétot 2004) :

$$\log Cl_i = -2,3097 + 0,0021 \text{ Poids corporel}_i \quad (\text{Eq. 3})$$

Une deuxième étude, a montré une forte influence de l'état de santé (CS=0 pour un cheval sain et CS=1 pour un cheval malade) sur la clairance plasmatique (Peyrou et al. 2004) :

$$Cl_i = 0,284 + 0,075 CS_i \quad (\text{Eq. 4})$$

La première étude avait aussi montré une tendance à l'influence de l'état de santé, mais celle-ci n'était pas significative. Dans l'analyse de population suivante, nous reprendrons les données issues des deux études précédentes ainsi que de nouvelles données afin de vérifier l'adéquation des posologies utilisées sur le terrain et de déterminer des *cutoffs* PK/PD pour cette substance dans l'espèce équine.

PARTIE 3 :

**ÉTUDE EXPERIMENTALE : ÉTUDE
PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION DE LA
MARBOFLOXACINE CHEZ LE CHEVAL**

PARTIE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE : ETUDE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION DE LA MARBOFLOXACINE CHEZ LE CHEVAL

1. Intérêt de l'étude

La marbofloxacin est une substance utilisée sur le terrain dans l'espèce équine mais n'ayant pas d'AMM. On ne dispose à l'heure actuelle que de peu d'informations sur l'efficacité réelle des traitements mis en place. Ainsi Vétoquinol, commercialisant déjà cette molécule pour d'autres espèces, aimerait mettre en place des recommandations d'usage pour les vétérinaires qui souhaiteraient utiliser cette substance chez le cheval dans le cadre de la cascade¹.

Notre étude multicentrique devrait permettre de mettre en évidence les éventuelles caractéristiques individuelles qui influencent chez le cheval les concentrations plasmatiques de la marbofloxacin au cours du temps, et de vérifier la pertinence ou non de la posologie actuellement utilisée sur le terrain (2mg/kg). Une dose de 10mg/kg a également été testée chez certains sujets afin de savoir si une utilisation en « one-shot » ou SISAAB pourrait être envisageable chez le cheval pour cette substance. De plus, cette étude a eu pour objectif d'identifier les *cutoffs* épidémiologiques et PK/PD pour cette substance qui serviront par la suite au groupe européen VetCAST (dépendant de EUCAST) à définir les *breakpoints* de la marbofloxacin chez le cheval.

2. Matériel et méthode

2.1 Sites d'investigations et caractéristiques des chevaux enrôlés

La partie expérimentale de notre thèse a consisté en l'analyse pharmacocinétique de la marbofloxacin chez 131 chevaux. Une analyse préliminaire portant sur 40 de ces chevaux a été publiée en 2004 (Peyrou, Doucet et al. 2004). Ces 40 chevaux venaient du Canada alors que la présente analyse porte sur des chevaux localisés dans quatre pays différents : Canada (Université de Montréal), France (Ecole Vétérinaire de Toulouse), Pays-Bas (Université d'Utrecht) et Autriche (Université de Vienne).

Pour le site français, les chevaux ont été prélevés à deux périodes différentes : entre 2001 et 2002 pour un premier sous-groupe de 58 chevaux et en 2013 pour un second sous-groupe de 12 autres chevaux. Le premier sous-groupe (appelé Toulouse1) a fait l'objet d'une

¹ La cascade de prescription hors-AMM correspond à la chaîne décisionnelle que doit respecter le praticien vétérinaire lorsqu'aucun médicament vétérinaire autorisé pour l'espèce considérée et pour l'indication thérapeutique visée n'est disponible. (DGAI, SDSPA 2004)

analyse préliminaire qui a été présentée dans la thèse vétérinaire de Caroline Tétot (Tétot 2004). Le second sous-groupe (appelé Toulouse2) a participé à un essai de tolérance de la marbofloxacin par voie IV à la dose de 10mg/kg alors que tous les autres chevaux ont été étudiés à la dose standard de 2mg/kg. Compte tenu du décalage des dates par rapport au premier sous-groupe, de la dose plus élevée utilisée dans cet essai et des effets secondaires observés, ces 12 chevaux ont été analysés dans un sous-groupe individualisé noté Toulouse2. Les concentrations mesurées dans cet essai ont été normalisées pour une dose de 2mg/kg en les divisant par 5. Au total, nous avons considéré cinq groupes de chevaux pour l'analyse populationnelle, notés Montréal, Toulouse1, Toulouse2, Utrecht et Vienne.

Pour tous ces chevaux des fiches individuelles ont été remplies pour documenter le sexe (mâle, hongre ou femelle), le poids corporel (kg), l'âge (année) et le statut physiologique (chevaux témoins en bonne santé vs. chevaux étudiés dans un cadre hospitalier). Le tableau 3 récapitule les principales caractéristiques démographiques des chevaux analysés. Ces mêmes caractéristiques ont été détaillées pour chacun des 5 sites d'investigation est sont disponibles en annexe.

Tableau 3 : Principales caractéristiques démographiques des chevaux étudiés pour les cinq sites d'investigation (moyenne)

Caractéristiques		Montréal	Toulouse1	Utrecht	Vienne	Toulouse2
Population étudiée (n=131)		44	58	9	8	12
Sexe	Femelle (n=68)	31	23	3	4	7
	Hongre (n=48)	11	25	6	1	5
	Mâle (n=13)	2	8	0	3	0
Statut	Témoin (n=60)	21	18	9	1	12
	Hospitalisé (n=70)	23	40	0	7	0
Age (ans) (n=97)		9.9	10.5	12.9	8.1	15.8
Poids corporel (kg) (n=127)		482	397	596	401	564

2.2 Formulation utilisée et dose

La marbofloxacin (Marbocyl® 10% Solution injectable; Vétoquinol, Lure, France) a été utilisée à la dose de 2mg/kg pour tous les sites sauf pour le site Toulouse2. Pour le site Toulouse2 une formulation plus concentrée a été utilisée (Forcyl® 16% solution injectable; Vétoquinol, Lure, France) à la dose de 10mg/kg.

2.3 Administration

L'administration de la marbofloxacin et les prélèvements sanguins ont été réalisés selon un protocole unique pour les 5 sites. Pour garantir l'exactitude de la dose administrée, tous les chevaux ont été pesés avec une bascule et la dose a été administrée via un cathéter placé dans la veine jugulaire droite.

2.4 Prélèvements et traitement des échantillons

Les prélèvements sanguins (5 ou 10mL) ont été réalisés dans la veine jugulaire gauche. Le sang a été placé dans un tube hépariné et centrifugé (10 min, 10–12°C) moins d'une heure après le prélèvement. Le plasma a été stocké à -20°C jusqu'à l'analyse des échantillons.

Les temps de prélèvements ont été optimisés afin de minimiser la variance de l'estimation de l'aire sous la courbe (ASC) et améliorer au maximum l'estimation des clairances. Cette optimisation a été permise grâce aux données apportées par les précédentes études de la pharmacocinétique de la marbofloxacin chez le cheval (Bousquet-Mélou, Bernard et al., 2002). Un plan optimal avec 6 temps de prélèvements a donc été retenu pour tous les sites (sauf Toulouse2) à savoir 0h (prélèvement témoin), 1h30, 3h, 5h, 7h et 19h30 après l'administration de la marbofloxacin. Pour Toulouse2, un prélèvement supplémentaire a été réalisé et tous les chevaux ont été exactement prélevés à 0h (prélèvement témoin) et 0h30, 1h, 3h, 5h, 7h et 24h.

Une certaine flexibilité quant à ces temps de prélèvement était donnée aux investigateurs mais il leur a été recommandé de ne pas aller au-delà de ± 30 min des temps nominaux de prélèvement. Les statistiques des temps de prélèvement effectifs pour les quatre autres sites est donné en annexe et montre l'excellente observance quant aux temps de prélèvement, seuls 6 chevaux de Toulouse1 n'ayant pas eu le dernier prélèvement.

2.5 Analyse des échantillons

Toutes les concentrations plasmatiques en marbofloxacin ont été mesurées avec la même technique analytique par le laboratoire Vétoquinol, la méthode HPLC (Chromatographie à Haute Performance en phase Liquide) décrite par Schneider et al (Schneider et al. 1996). Pour les données de Montréal, Toulouse1, Utrecht et Vienne, la limite de quantification (LOQ) a été de 0,01 μ g/mL. Pour le dosage des prélèvements de Toulouse2, la technique analytique a subi quelques modifications mineures ; la LOQ en a été améliorée (0,002 μ g/mL). Toutes les concentrations mesurées ont été supérieures à la LOQ et aucune donnée censurée n'a eu à être considérée dans cette analyse (Ahn, Karlsson et al. 2008).

4.4 Analyse des données (effectuée par le Pr. Toutain)

Nous développerons dans cette partie les différentes étapes de l'analyse pharmacocinétique de population. La première consiste dans le choix des patients, décrits dans le paragraphe précédent, ceux-ci doivent être représentatifs de la population à étudier.

a. Données considérées

Il est important de relever pour chaque individu les valeurs de toutes les covariables pertinentes. Ainsi, 6 covariables d'intérêt ont été prises en compte :

- Le site d'étude (Montréal, Toulouse1, Utrecht, Vienne et Toulouse2)
- Le statut (Témoin vs. Hospitalisé)
- Le sexe (Femelle, Hongre, Mâle)
- Le niveau de la dose administrée (2 vs 10mg/kg)
- L'âge (an)
- Le poids corporel (kg).

Les données brutes individuelles considérées ont donc été ces 6 covariables et les concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$). Pour Toulouse2, les concentrations observées ont été divisées par 5 pour l'analyse de population pour les normaliser à une dose de 2mg/kg.

b. Logiciels utilisés

Les analyses statistiques descriptives (moyennes, écarts-types (SD), minimum, maximum) ont été réalisées avec Excel (tableaux dynamiques croisés), Systat 12® (Systat Software, INC San Jose CA USA) pour les analyses de variance (ANOVA) et de régression ou par Phoenix®WinNonlin®6.3 ; Pharsight corporation St Louis MO USA. Les analyses pharmacocinétiques ont été réalisées avec Phoenix®WinNonlin®6.3 avec le module d'analyse non-compartmentale (NCA) et celui de l'analyse de population. Le calcul des doses pour couvrir différents percentiles de la population a été réalisé avec un logiciel dédié aux simulations de Monte-Carlo (Oracle Crystal Ball ; 500 Oracle Parkway Redwood Shores, CA).

c. Analyse non-compartmentale (NCA)

Une première étape a consisté en une analyse non-compartmentale des données par la méthode des trapèzes log-linéaires avec extrapolation au temps 0 et à l'infini. L'option *best-fit* de Phoenix a été utilisée pour calculer les pentes nécessaires aux extrapolations.

Une série d'ANOVA à un facteur a été réalisée pour chacun des 4 principaux paramètres pharmacocinétiques estimés (temps de demi-vie, clairance, temps moyen de résidence (MRT) et volume de distribution à l'équilibre (V_{ss}) pour mettre en évidence un éventuel effet site (Montréal, Toulouse1, Toulouse2, Utrecht et Vienne), un effet sexe (Mâle, Femelle, Hongre) ou un effet statut (Témoin, Hospitalisé). Lorsqu'un effet a été significatif ($p < 0.05$), un test *Post Hoc* de Bonferroni a été réalisé pour identifier les paires qui différaient entre elles pour les facteurs site et sexe. Le test de Bonferroni corrige le risque nominal de signification pour tenir compte de la multiplicité des hypothèses.

Une éventuelle association entre la valeur de ces 4 paramètres soit avec l'âge soit avec le poids corporel a été recherchée par régression linéaire simple. Un effet a été considéré comme significatif pour $p < 0.05$.

d. La modèle structural

Pour l'analyse de population, un modèle non-linéaire à effets mixtes a été développé. Un modèle à effets mixtes consiste en deux composantes : un modèle de structure (avec ou sans covariables) pour estimer les effets fixes et un modèle statistique (de variance) pour estimer les effets aléatoires.

Dans un premier temps nous avons développé le modèle structural de base, permettant de décrire la cinétique moyenne des concentrations dans la population, sans prendre en compte les covariables. Ce modèle dépend notamment de la voie d'administration. Ainsi, chez le cheval, les études pharmacocinétiques de la marbofloxacin (Bousquet-mélou et al. 2002; Peyrou et al. 2004; Tétot 2004; Carretero et al. 2002) ont proposé un modèle à 2 ou 3 compartiments pour expliquer la cinétique des concentrations plasmatiques suite à une injection intraveineuse. Cependant la première phase est très rapide et elle n'influe que peu sur l'ASC. De plus, en appliquant le principe de parcimonie, le modèle le plus simple doit être choisi ; ainsi un modèle bicompartmental paramétré en termes de clairances et de volumes de distribution a été retenu.

Un modèle à deux compartiments a aussi servi à décrire le profil des concentrations plasmatiques en marbofloxacin suite à une injection en sous-cutané. Une étude chez le poulain (Tohamy, El-Gendy 2013) a proposé un modèle mono-compartmental pour décrire la cinétique de la marbofloxacin suite à une injection intramusculaire.

Suite à une injection intraveineuse unique, on observe deux phases de décroissance des concentrations plasmatiques, une première phase à décroissance rapide et une seconde phase à décroissance lente. Physiologiquement, la première phase correspond à la distribution du principe actif dans l'organisme jusqu'à ce que soit atteint le pseudo-équilibre de distribution. Ensuite, seule l'élimination du principe actif explique la décroissance. Le modèle bicompartmental traduit ces événements en représentant l'organisme par un compartiment central V_c et un compartiment périphérique V_p . Les échanges sont exprimés sous forme de clairance de distribution Cl_d et d'élimination Cl . Le compartiment central correspond ainsi au secteur intra-vasculaire auquel on ajoute le foie, les reins et les poumons, organes très irrigués et donc rapidement en équilibre avec le secteur intra-vasculaire. Le foie et le rein étant les principaux organes épurateurs, l'élimination se fait depuis le compartiment central. Les autres organes forment le compartiment périphérique, et la distribution dans ce modèle bicompartmental correspond à la phase d'équilibration entre ces différents organes. Un tel modèle peut être paramétré de différentes manières. La

figure 18 rappelle la structure du modèle bicompartimental avec ses deux paramétrisations les plus fréquentes.

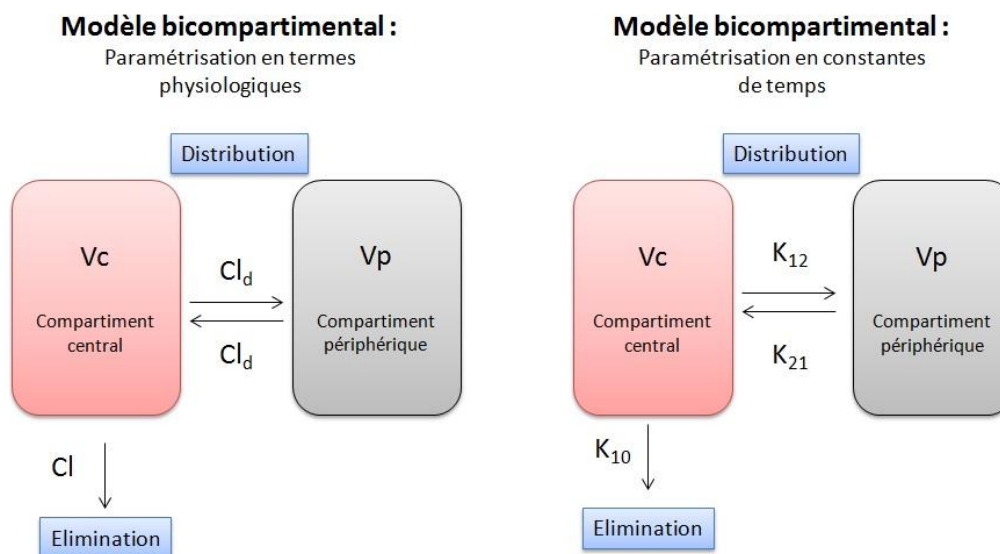


Figure 18 : Modèle bicompartimental avec ses paramétrisations en termes physiologiques (à gauche) ou avec des constantes de temps (à droite). Cl correspond à la clairance plasmatique, Cl_d à la clairance de distribution. Les K_{xy} correspondent aux constantes de temps.

Les paramètres structuraux décrivant le modèle bicompartimental sont dits à effets fixes (*fixed effect*). Ces différents paramètres et leur notation dans Phoenix sont présentés dans l'annexe 4. Leurs valeurs de population sont notées par la lettre grecque thêta (θ) avec $Cl_{pop} = \theta_1$; $Vc_{pop} = \theta_2$; etc. La collection des thêtas est nommée vecteur des Thêtas. Utilisés pour résoudre le modèle structural, les thêtas donneront la réponse moyenne de la population c'est-à-dire la concentration plasmatique moyenne attendue à un temps donné avec :

$$Y = f(\theta, Temps) \quad (Eq.5)$$

Ces données prédites de population sont notées « PRED ».

e. Modélisation de la variabilité interindividuelle

La seconde composante d'un modèle à effets mixtes est la composante dite aléatoire (*random effect*). Il y a deux sources principales de variabilité dans notre modèle : une variabilité inter-sujet ou variabilité interindividuelle (notée selon la terminologie anglaise *between-subject variability* ou BSV) d'origine biologique et que l'on cherche à estimer (par des termes de variance) et à expliquer avec des covariables ; à cette variabilité biologique s'ajoute une variabilité résiduelle qui est considérée comme du bruit et que l'on cherche à minimiser lors de l'expérimentation. Dans le cas d'administrations multiples, il est aussi possible de définir une variabilité inter-occasion. Cette thèse portant sur une injection unique de marbofloxacin, ce point ne sera pas développé.

La première source de variabilité s'intéresse à l'écart entre les valeurs des paramètres pharmacocinétiques observés chez les différents individus et la valeur moyenne de ce paramètre dans la population. Cette variabilité prend en compte le fait que chaque cheval a son propre vecteur de paramètres structuraux dont chacun diffère des thêtas de population par une quantité (différence) que l'on note de la lettre grecque êta (η). On peut définir la variabilité interindividuelle selon différents modèles. Les modèles les plus classiques décrivent une variabilité interindividuelle additive ou proportionnelle, selon que celle-ci dépend ou non de la valeur du thêta (cf. figure 19).

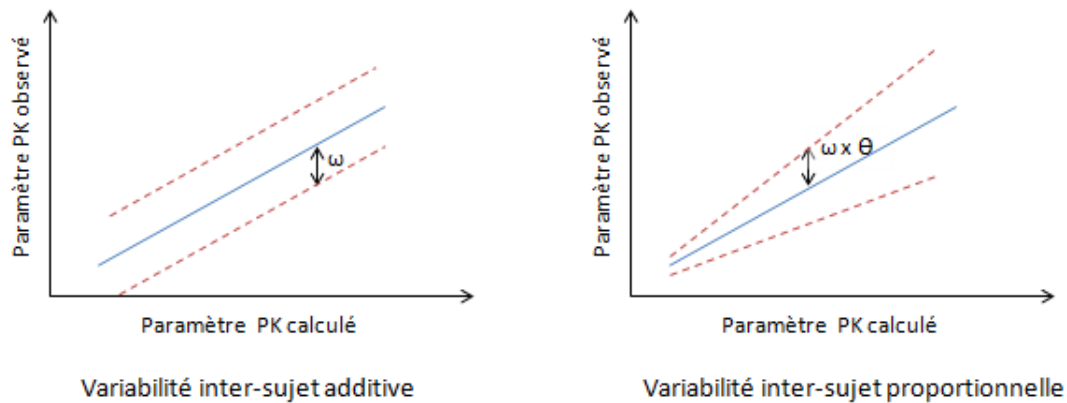


Figure 19 : Modèles de la variabilité interindividuelle. A gauche, la variance ω^2 de η est indépendante de la valeur du θ , on parle de variabilité interindividuelle additive. A droite, la variance est proportionnelle à la valeur du θ , on parle de variabilité interindividuelle proportionnelle.

Dans notre modèle, nous avons utilisé la relation suivante pour décrire la clairance du $i^{\text{ème}}$ cheval :

$$Cl_i = \theta_1 \times \exp(\eta_i) \quad (\text{Eq. 6})$$

Avec θ_1 la valeur de population de la clairance et η_i la déviation de la valeur de la clairance de cet $i^{\text{ème}}$ cheval de la valeur unique de population. Un modèle exponentiel a été choisi car les paramètres structuraux estimés (clairances, volumes) sont toujours positifs et leurs distributions sont généralement asymétriques sur la droite ; il existe donc une variabilité des êtas entre les chevaux que l'on souhaite estimer. η suit, dans le domaine logarithmique, une loi normale centrée sur 0 et de variance ω^2 .

$$\eta \approx N(0, \omega^2)$$

Chaque variance est propre à un êta, cependant les paramètres structuraux peuvent ne pas être indépendants les uns des autres, ainsi des corrélations entre les êtas peuvent exister. Elles seront décrites par des termes de covariance. La collection des variances des êtas et de leurs covariances est présentée sous la forme d'une matrice dite matrice de variance-covariance (ou plus simplement matrice de covariance) notée dans la terminologie de la pharmacocinétique de population lettre Ω . On trouve ainsi sur la diagonale les variances ω propres à chaque paramètre et autour les covariances.

$$\Omega = \begin{matrix} \omega_{11}^2 & \omega_{21} & \omega_{31} \\ \omega_{12} & \omega_{22}^2 & \omega_{32} \\ \omega_{13} & \omega_{32} & \omega_{33}^2 \end{matrix}$$

On remarque que la matrice est symétrique de part et d'autre de la diagonale ; en effet, pour chaque couple de paramètres i et j on a $\omega_{ij} = \omega_{ji}$.

La variabilité interindividuelle ou BSV est alors estimée à partir des ω^2 (variance) ou de ω (SD). Avec le modèle exponentiel que nous avons utilisé pour les êtas, ω est la SD dans le domaine logarithmique et elle n'est pas d'une grandeur directement comparable au thème correspondant ; pour cette raison on préfère présenter les résultats sous la forme de coefficients de variation dans l'échelle d'origine des mesures avec l'équation suivante :

$$CV(\%) = 100 \times \sqrt{\exp(\omega^2) - 1} \quad (\text{Eq.7})$$

D'autre part, pour estimer la force des corrélations entre les éléments aléatoires du modèle, on calcule le coefficient de corrélation correspondant. Par exemple, pour ceux de la clairance (Cl) et du volume du compartiment central (Vc), le coefficient de corrélation se calcule ainsi :

$$r = \frac{\omega_{Cl,Vc}}{\sqrt{\omega_{Cl}^2 \times \omega_{Vc}^2}} \quad (\text{Eq.8})$$

Avec au numérateur le terme de covariance entre la Cl et Vc et au dénominateur les variances respectives de Cl et de Vc. On déduit ainsi de la matrice des covariances la matrice des corrélations, permettant notamment d'identifier d'éventuels problèmes de colinéarité statistique (c'est-à-dire des corrélations très élevées entre les estimations des termes de variance avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0.8 résultant de compensation entre les coefficients) ; cela signifierait qu'une estimation indépendante de ces termes est impossible et non qu'il existe une réelle association à caractère biologique entre les paramètres estimés. Cette situation conduit à des problèmes majeurs dans l'estimation des paramètres ; la colinéarité peut avoir pour origine un modèle surparamétré ou à une paramétrisation inadéquate. L'inclusion des covariances dans le modèle aléatoire est recommandée pour éviter des biais dans l'estimation des variances ce qui est problématique si l'on souhaite notamment réaliser ultérieurement des simulations.

f. La notion de Shrinkage

Phoenix présente avec la matrice variance-covariance une estimation du *shrinkage* (retrait vers la moyenne) pour chaque composante aléatoire. Cette statistique permet de détecter d'éventuelles surparamétrisations par rapport au contenu informatif des données. Le concept de shrinkage a été introduit par Savic et Karlsson. (Savic, Karlsson 2009)

Pour comprendre ce concept, il convient de prendre en compte le fait que les méthodes d'estimation des paramètres portent dans une première étape sur les paramètres de population et c'est à partir de ces paramètres de population que l'on va prédire des concentrations et des résiduelles de population. Dans une seconde étape on va estimer les valeurs des paramètres individuels ainsi que les concentrations et les résiduelles individuelles prédites ; ces estimations individuelles se font par une approche bayésienne qui utilise une fonction objective (notée ici OFV) : on parle de l'étape d'estimation conditionnelle ou encore d'estimation bayésienne empirique *post hoc* (*post hoc, empirical Bayes*).

L'inspection de l'OFV utilisée dans cette seconde étape permet de comprendre les rôles respectifs joués par les données propres à chaque individu et celui des paramètres de population dans l'estimation des paramètres individuels :

$$OFV = Posterior + Prior$$

$$OFV = \sum_{j=1}^n \frac{(C_{obsj} - C_{estj})^2}{\sigma^2} + \sum_{k=1}^m \frac{(\theta_k - \theta_{k,pop})^2}{\omega_{k,pop}^2} \quad (Eq.9)$$

Avec une OFV pour un individu ayant j concentrations observées (C_{obsj}) et estimées (C_{estj}) et un modèle avec k paramètres θ . Cette OFV peut être utilisée pour estimer les meilleurs paramètres du modèle pour chaque individu de la population en prenant en compte simultanément et en les pondérant (avec σ^2 et ω^2) les déviations entre les données individuelles observées et prédites par le modèle en question (*posterior*) et les déviations de l'estimation des paramètres individuels (θ_k) de leurs valeurs de population $\theta_{k,pop}$ (*Prior*).

On comprend que pour un sujet qui n'aurait pas de données individuelles observées, l'estimation de ses paramètres individuels serait celle de la population et qu'inversement, le poids relatif des paramètres de population dans l'estimation des paramètres individuels sera d'autant moins grand que le sujet est riche avec de nombreuses concentrations observées qui pèseront beaucoup plus sur l'OFV que la différence d'avec les paramètres de population.

On dit qu'il y a du shrinkage lorsque l'estimation d'un paramètre individuel tend vers sa valeur de population et il sera de 100% s'il n'y a aucune donnée individuelle observée. Un shrinkage faible atteste ainsi d'un nombre suffisant de données pour estimer le modèle et prédire les concentrations individuelles sans que celles-ci ne se rapprochent des paramètres de population. Lorsque le shrinkage est élevé (>20-30%), l'interprétation des différents graphiques diagnostiques est faussée car l'estimation des paramètres pharmacocinétiques est mauvaise. Par exemple, un shrinkage élevé sur la clairance peut interdire d'étudier une relation ASC/effet car $ASC = Dose / Clairance$ et les clairances individuelles sont alors mal estimées. De même, les graphiques de diagnostic fondés sur des concentrations individuelles prédites ou des résiduelles individuelles peuvent induire en erreur. En pratique l'importance du shrinkage des étas (η) s'évalue avec l'équation suivante :

$$Shrinkage = 1 - \frac{SD(EBE\eta)}{\omega} \quad (\text{Eq.10})$$

Avec ω une estimation de la variabilité populationnelle et SD , la SD des valeurs individuelles des estimées empiriques bayésiennes (EBE ou *empirical Bayes estimates*) des états. Si les EBE sont essentiellement générées par les paramètres de population et ne tiennent pas compte de données observées, leur SD sera très faible et le shrinkage très élevé.

g. Modélisation de l'erreur résiduelle (Jullien 2006; Laffont 2008)

Le modèle structural permet de prédire des concentrations pour chaque individu, mais ces concentrations diffèrent des concentrations observées. Cette part de variabilité non expliquée par le modèle a pour origine notamment les imprécisions expérimentales et analytiques mais également les écarts au modèle. On la décrit par le terme ε tel que :

$$Y = f(\theta, Temps) + g \times \varepsilon \quad (\text{Eq. 11})$$

ε suit une loi normale centrée sur 0 et de variance σ^2 , et g une fonction que l'on cherche à estimer. Si la variance de l'erreur résiduelle est indépendante de la concentration, g est une constante égale à 1, on parle alors d'erreur résiduelle additive. Si la variance de l'erreur est proportionnelle à la concentration, alors $g = f(\theta, Temps)$ et on parle d'erreur résiduelle proportionnelle (cf figure 20).

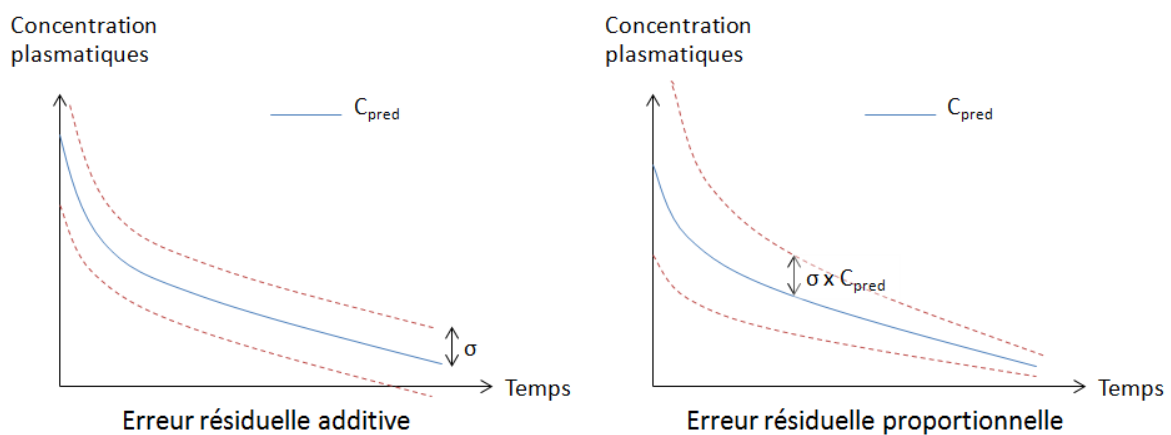


Figure 20 : Modèles de l'erreur résiduelle. A gauche, la variance de l'erreur résiduelle est indépendante de la concentration, on parle d'erreur résiduelle additive. A droite, la variance de l'erreur résiduelle est proportionnelle à la concentration, on parle d'erreur résiduelle proportionnelle.

Le modèle d'erreur retenu initialement a été un modèle combinant les deux modèles évoqués précédemment.

$$Y = f(\theta, Temps) \times (1 + \varepsilon_2) + \varepsilon_1 \quad (\text{Eq.12})$$

Avec ε_1 et ε_2 les deux termes à évaluer pour respectivement la composante additive et la composante proportionnelle.

La notion de shrinkage s'applique également aux termes résiduels ; ce shrinkage est calculé avec l'équation suivante :

$$\epsilon_shrinkage = 1 - SD(IWRES) \quad (\text{Eq.13})$$

Avec *IWRES* les résiduelles pondérées, calculés avec l'équation suivante :

$$IWRES = \frac{Y_{ij} - \widehat{Y}_{ij}}{\sigma} \in N(0,1) \quad (\text{Eq.14})$$

Avec les \widehat{Y}_{ij} les prédictions individuelles (*IPRED*) et σ la SD des résiduelles comme facteur de pondération. La distribution des *IWRES* est donc standardisée pour avoir une moyenne attendue de 0 et une variance égale à l'unité lorsque le modèle et ses paramètres sont correctement spécifiés au niveau individuel (Hooker, Staats et al., 2007).

Le ϵ -shrinkage tend vers 0 lorsque les données sont très informatives et il tend vers 1 lorsque les données sont moins informatives. Un ϵ -shrinkage trop important (>20-30%) nous empêche de détecter les écarts au modèle, les valeurs prédites se rapprochant des valeurs observées. Il est de plus difficile de juger de l'adéquation du modèle de structure (les *IPRED* et *IWRES* se rapprochent de la moyenne et sont donc erronés) et du modèle de l'erreur résiduelle choisi.

h. Influence des covariables : détermination du modèle final

Après cette première étape de construction d'un modèle structural de base, on va tenter d'expliquer la variabilité interindividuelle grâce à des covariables explicatives. Soit *P* un paramètre pharmacocinétique, on définit alors :

$$P_i = \theta_1 + \theta_2 \times cov_{2,i} + \theta_3 \times cov_{3,i} + \dots + \theta_n \times cov_{n,i} + \eta_i \quad (\text{Eq. 15})$$

Les θ sont les paramètres d'effets fixes et quantifient l'impact de la covariable *cov* correspondante sur le paramètre pharmacocinétique *P* chez l'individu *i*.

Dans notre étude 5 covariables ont été documentées : le site de l'étude (5 niveaux), le sexe (3 niveaux), le statut sanitaire (2 niveaux), le niveau de la dose administrée (2 niveaux) et 2 variables quantitatives : le poids corporel (kg) et l'âge (ans). Une analyse statistique préliminaire utilisant les paramètres estimés par l'analyse non-compartmentale a permis de dégager des tendances ; le tableau 10 récapitule la signification statistique ou non des principaux paramètres pharmacocinétiques évalués par la NCA et ces facteurs. On cherche ensuite à identifier les covariables qu'il est pertinent d'inclure dans le modèle.

Tableau 4 : signification statistique des covariables étudiées sur les paramètres pharmacocinétiques estimés par l'analyse non-compartimentale. MRT : temps moyen de résidence ; Vss volume de distribution à l'équilibre ; NS : non significatif ; les valeurs de P ont été obtenues avec des ANOVA.

Covariables	Paramètres pharmacocinétiques			
	Temps de demi-vie	Clairance plasmatique	MRT	Vss
Site (5 niveaux)	NS	P=0.026	NS	P=0.012
Sexe (3 niveaux)	NS	NS	P=0.037	NS
Statut sanitaire (2 niveaux)	P=0.001	P=0.037	P<0.001	NS
Age	NS	NS	NS	NS
Poids corporel	NS	NS	NS	NS

Il est à noter qu'en médecine vétérinaire les doses sont toujours exprimées et administrées par kg de poids vif ce qui explique que le facteur poids corporel, qui est très souvent une covariable d'intérêt chez l'homme, l'est plus rarement en médecine vétérinaire.

La première phase de l'élaboration du modèle final avec covariables, dite ascendante, consiste en l'ajout au modèle d'une covariable pertinente sur le plan clinique. L'ajout de cette covariable doit diminuer significativement la valeur d'une fonction objective (OBJ), différente de l'OFV évoquée précédemment. Phoenix estime l'OBJ, notée -2LL (-2 fois le logarithme du maximum de vraisemblance). Un test du χ^2 a été utilisé pour évaluer la signification des différences observées entre les -2LL. En pratique, nous avons calculé avec Excel la valeur des risques nominaux (p) pour ces différences et le nombre de degrés de liberté approprié avec la fonction LOI.KHIDEUX.DROITE. Un test identique (test du maximum de vraisemblance) a été utilisé pour sélectionner le modèle de l'erreur résiduelle et pour l'incorporation des covariables au modèle de base.

- Covariables quantitatives

Nous avons vérifié avec Phoenix que le poids corporel et l'âge n'étaient pas des covariables pertinentes en les incluant dans le modèle de structure de la clairance plasmatique, la clairance plasmatique étant le paramètre que nous cherchons à estimer et expliquer pour simuler dans la dernière partie de notre thèse des doses capables d'atteindre les objectifs PK/PD explicités dans notre partie bibliographique, c'est-à-dire des ASC/CMI atteignant certaines valeurs critiques.

Le modèle utilisé pour la clairance plasmatique avec le poids comme covariable est donné par l'équation suivante :

$$Cl = \theta_1 \left(\frac{\text{Poids corporel}}{500} \right)^{\theta_2} \times e^{\eta_i} \quad (\text{Eq.16})$$

Avec le poids corporel normalisé à 500 kg, et θ_1 et θ_2 les valeurs de population des paramètres de structure du modèle de la clairance (une fonction puissance). Cela veut dire que θ_1 est la valeur typique de la clairance pour un cheval de 500Kg.

Un modèle puissance identique a été utilisé pour l'âge car il a l'avantage de ne pas prédire des clairances négatives (intercept toujours positive) avec un âge normalisé de 7 ans ce qui veut dire que θ_1 est la clairance typique d'un cheval de 7 ans.

- Covariables catégorielles

Les covariables catégorielles explorées avec Phoenix ont été au nombre de 4 : le site d'investigation (5 niveaux), le sexe (3 niveaux), le statut de Témoin ou d'Hospitalisé (2 niveaux) et la dose administrée de 2 ou 10mg/kg (2 niveaux). Pour les variables catégorielles ayant plus de 2 niveaux c'est-à-dire pour les sites d'investigation et pour le sexe, il a été nécessaire de convertir ces n niveaux en n-1 variables muettes ou encore nommées variables indicatrices (dummy variable) ; pour le sexe le codage a été le suivant :

Tableau 5 : Codage pour la covariable « sexe »

Sexe	Variable muette (X1)	Variable muette (X2)
Femelle	0	0
Hongre	1	0
Mâle	0	1

Cela veut dire que le sexe Femelle sera la référence. Ensuite un paramètre comme la clairance peut être modélisée de la façon suivante :

$$Cl = \theta_1(1 + \theta_2X_1 + \theta_3X_2) \quad (\text{Eq.17})$$

Ou encore pour prendre en compte à la fois une variable quantitative comme l'âge et le sexe :

$$Cl = (\theta_1 + \theta_2Age)(1 + \theta_3X_1 + \theta_4X_2) \quad (\text{Eq.18})$$

Avec le codage retenu on aura :

$$Cl = \theta_1 + \theta_2Age \quad \text{si le sexe est Femelle (codage 0,0)}$$

$$Cl = (\theta_1 + \theta_2Age)(1 + \theta_3X_1) \quad \text{si le sexe est Hongre (codage 1,0)}$$

$$Cl = (\theta_1 + \theta_2Age)(1 + \theta_4X_2) \quad \text{si le sexe est Mâle (codage 0,1)}$$

Si θ_3 est différent de 0, on peut en conclure qu'il existe une différence entre les sexes *femelle* et *hongre* et si θ_4 est différent de 0, il existe une différence entre les sexes *femelle* et *mâle*.

Pour le site d'investigation le codage a été le suivant :

Tableau 6 : Codage pour les covariables « site d'investigation »

Site	Variable muette X1	Variable muette X2	Variable muette X3	Variable muette X4
Montréal	0	0	0	0
Toulouse 1	1	0	0	0
Vienne	0	1	0	0
Utrecht	0	0	1	0
Toulouse2	0	0	0	1

Pour le statut sanitaire (Témoin/Hospitalisé) le code a été de 0 pour les chevaux « Hospitalisés » (groupe de référence) et 1 pour les « Témoins » ; pour le niveau de la dose administrée, le code a été de 0 pour les chevaux ayant reçu 2mg/kg et de 1 pour les chevaux ayant reçu la dose de 10mg/kg ; rappelons que les concentrations ont été normalisées pour une dose de 2mg/kg chez tous les chevaux et qu'un éventuel effet *dose* traduirait soit un effet propre au site Toulouse2 (qui seul correspond à la dose de 10mg/kg) soit à une possible non-linéarité dans la disposition de la marbofloxacin. Ici les deux effets (dose et site) sont confondus.

3. Résultats

3.1 Analyse non-compartimentale

a. Effet site

Les valeurs moyennes des 4 principaux paramètres pharmacocinétiques obtenus par l'analyse non compartimentale et pour chacun des 5 sites sont données dans l'annexe 5. Une série d'ANOVA a été réalisée pour chacun de ces paramètres pharmacocinétiques pour mettre en évidence un éventuel effet site. En cas de signification globale ($p < 0.05$), un test de comparaisons multiples de Bonferroni a été réalisé pour identifier les paires différant entre-elles.

Les figures 21 à 24 donnent les valeurs des moyennes des moindres carrés pour chaque site pour les 4 paramètres pharmacocinétiques obtenus par l'analyse non compartimentale et la signification statistique des différences observées. Un effet *site* est présent pour la Clairance entre les sites Toulouse1 et Utrecht, ainsi que sur le Volume de distribution entre les sites Toulouse1 et Toulouse2. On rappelle que ce dernier effet *site* peut aussi être lié à la dose de marbofloxacin utilisée, Toulouse2 étant le seul site où une posologie différente (10mg/kg) a été utilisée, ainsi cet effet site pourrait traduire une non-linéarité dans la disposition de la marbofloxacin.

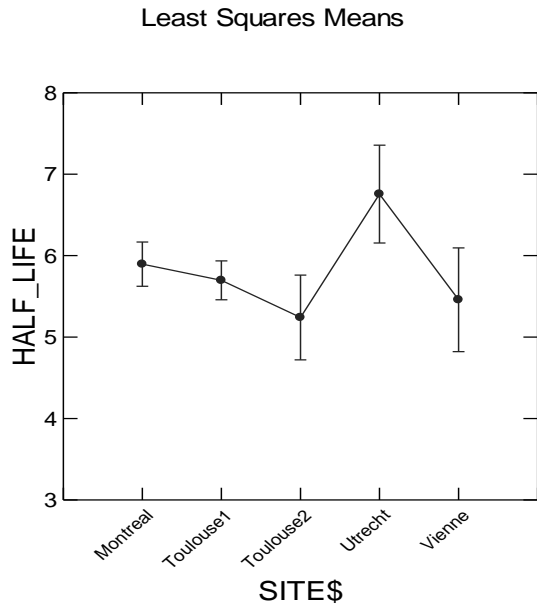


Figure 21 : Moyennes des moindres carrés pour le temps de demi-vie (h) pour chacun des 5 sites.
Aucune des différences n'a été significatives ($P>0.05$)

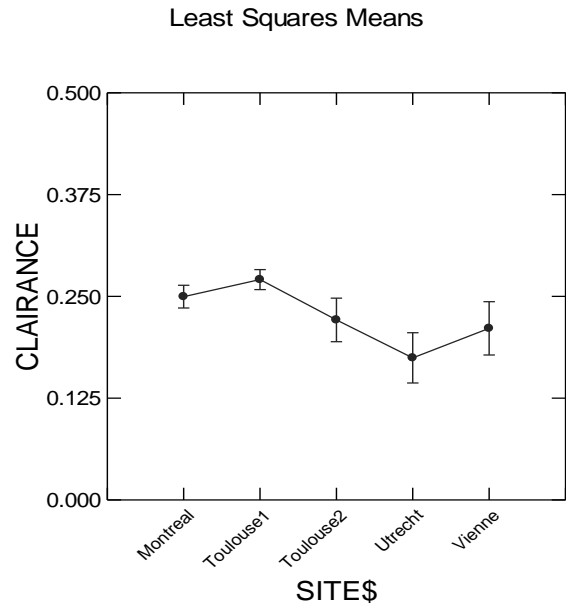


Figure 22 : Moyennes des moindres carrés pour la clairance plasmatique (L/kg/h) pour chacun des 5 sites.
Toulouse1 a été significativement différent d'Utrecht ($P=0.045$, Test de Bonferroni) ; les autres différences n'ont pas été significatives ($P>0.05$)

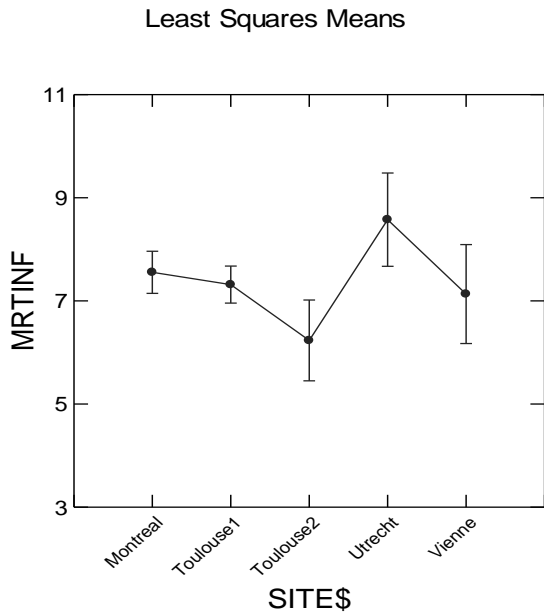


Figure 23 : Moyennes des moindres carrés pour le temps moyen de résidence (MRT) en h pour chacun des 5 sites. Aucune des différences n'a été significatives (ANOVA, $P>0.05$)

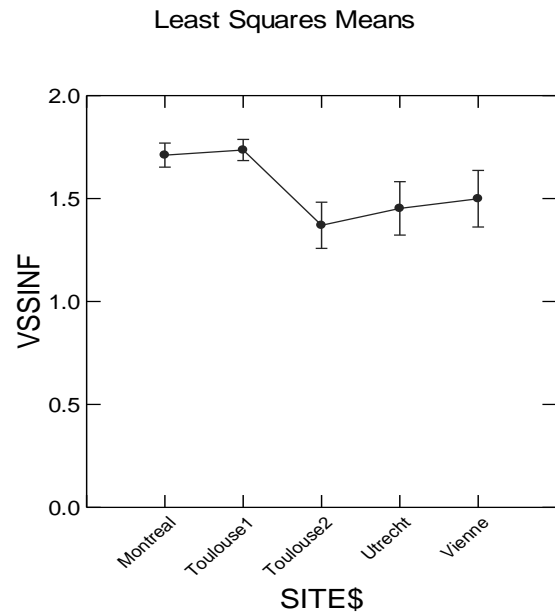


Figure 24 : Moyennes des moindres carrés pour le volume de distribution à l'équilibre (Vss) en L/kg pour chacun des 5 sites. Toulouse1 a été significativement différent de Toulouse2 ($P=0.037$ - Test de Bonferroni) ; les autres différences n'ont pas été significatives ($P>0.05$)

b. Effet sexe

Les valeurs moyennes des 4 principaux paramètres pharmacocinétiques obtenus par l'analyse non compartimentale et pour chacun des 3 sexes (Femelle, Hongre et Mâle) sont données dans l'annexe 6. De même que pour l'effet site, une série d'ANOVA a été réalisée pour chacun de ces paramètres pharmacocinétiques pour mettre en évidence un éventuel effet sexe. En cas de signification globale ($p < 0.05$), un test de comparaisons multiples de Bonferroni a été réalisé pour identifier les paires différant entre-elles. Les figures 25 à 28 donnent les valeurs des moyennes des moindres carrés pour chaque sexe pour les 4 paramètres pharmacocinétiques obtenus par l'analyse non compartimentale et la signification statistique des différences observées. Seule une différence sur le temps moyen de résidence a été significative entre les mâles et les femelles.

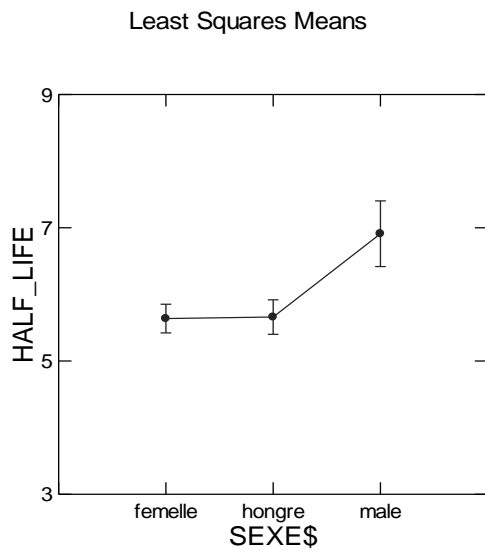


Figure 25 : Moyennes des moindres carrés pour le temps de demi-vie plasmatique (h) pour chacun des 3 sexes. Aucune des différences n'a été significative (ANOVA, $P > 0.05$)

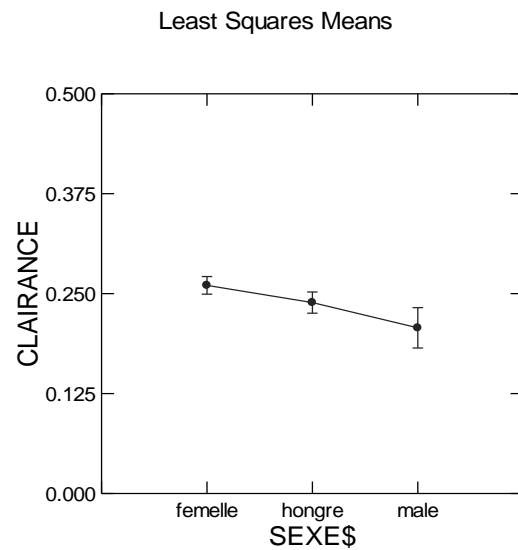


Figure 26 : Moyennes des moindres carrés pour la clairance plasmatique (L/kg/h) pour chacun des 3 sexes. Aucune des différences n'a été significative (ANOVA, $P > 0.05$)

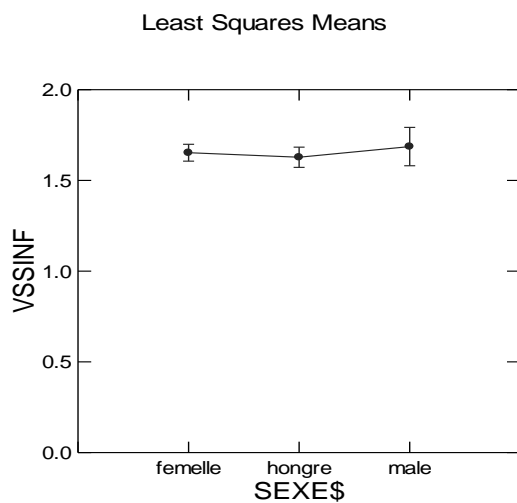


Figure 27 : Moyennes des moindres carrés pour le volume de distribution à l'équilibre (Vss) en L/kg pour chacun des 3 sexes. Aucune des différences n'a été significative (ANOVA, $P > 0.05$)

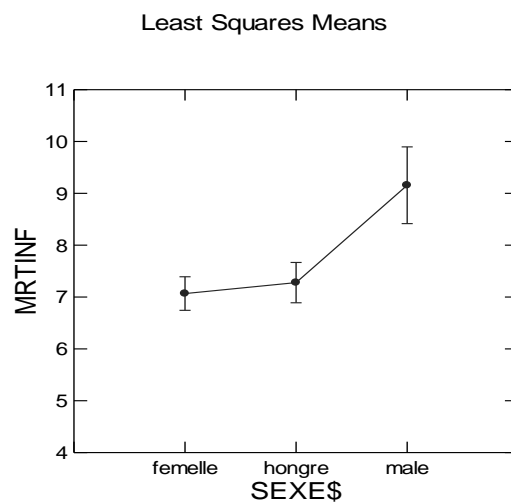


Figure 28 : Moyennes des moindres carrés pour le temps moyen de résidence (MRT) en h pour chacun des 3 sexes. La différence entre les femelles et les mâles a été significative ($P = 0.033$, Test de Bonferroni) ; les autres différences n'ont pas été significativement différentes ($P > 0.05$)

c. Effet statut : témoin vs. hospitalisé

Les valeurs moyennes des 4 principaux paramètres pharmacocinétiques obtenus par l'analyse non compartimentale et pour chacun des 2 statuts observés (Témoin vs. Hospitalisé) sont données dans l'annexe 7. De même que pour l'effet site, une série d'ANOVA a été réalisée pour chacun de ces paramètres pharmacocinétiques pour mettre en évidence un éventuel effet statut. Les temps de demi-vies et les temps moyens de résidence sont significativement plus élevés chez les animaux hospitalisés, la clairance est quant à elle significativement plus basse chez ces derniers.

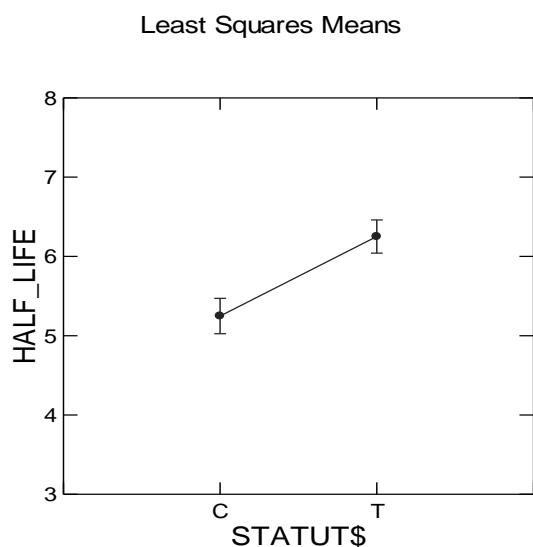


Figure 29 : Moyennes des moindres carrés pour le temps de demi-vie plasmatique (h) pour chacun des 2 statuts (Témoin vs. Hospitalisé). Les temps de demi-vies ont été significativement plus longs chez les chevaux hospitalisés (codés par la lettre T) que chez les chevaux servant de témoins (codés par la lettre C)(ANOVA,P=0.001)

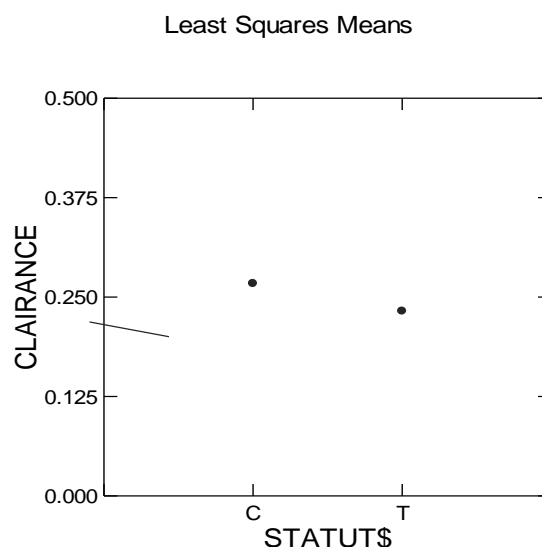


Figure 30 : Moyennes des moindres carrés pour la clairance plasmatique (Cl) en L/kg/h pour chacun des 2 statuts (Témoin vs. Hospitalisé). Les clairances ont été significativement plus basses chez les chevaux hospitalisés (codés par la lettre T) que chez les chevaux servant de témoins (codés par la lettre C)(ANOVA, P=0.037)

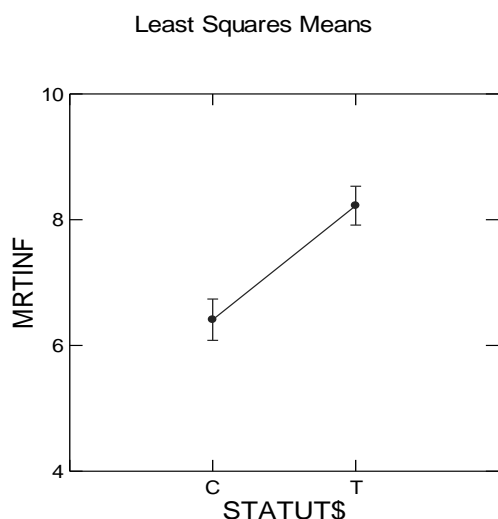


Figure 31 : Moyennes des moindres carrés pour le temps moyen de résidence (MRT) en h pour chacun des 2 statuts (Témoin vs. Hospitalisé). Les temps moyens de résidence (MRT) ont été significativement plus longs chez les chevaux hospitalisés (codés par la lettre T) que chez les chevaux servant de témoins (codés par la lettre C)(ANOVA, P<0.0001)

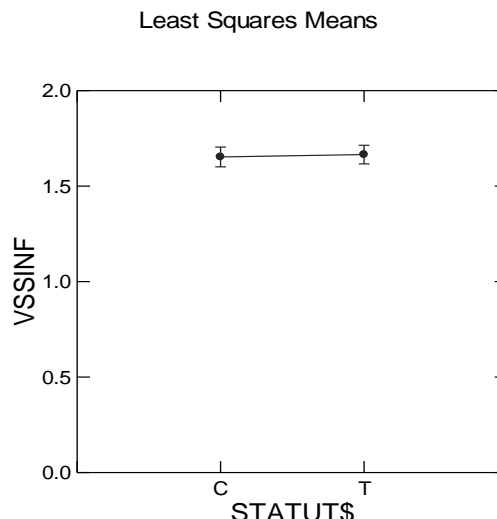


Figure 32 : Moyennes des moindres carrés pour le volume de distribution à l'équilibre (Vss) en L/kg pour chacun des 2 statuts (Témoin vs. Hospitalisé). Aucune des différences n'a été significative (ANOVA, P>0.05)

d. Etude de régression entre le poids corporel et les paramètres PK

L'étude de régression linéaire n'a pas montré d'effet significatif du poids corporel sur les 4 paramètres PK étudiés.

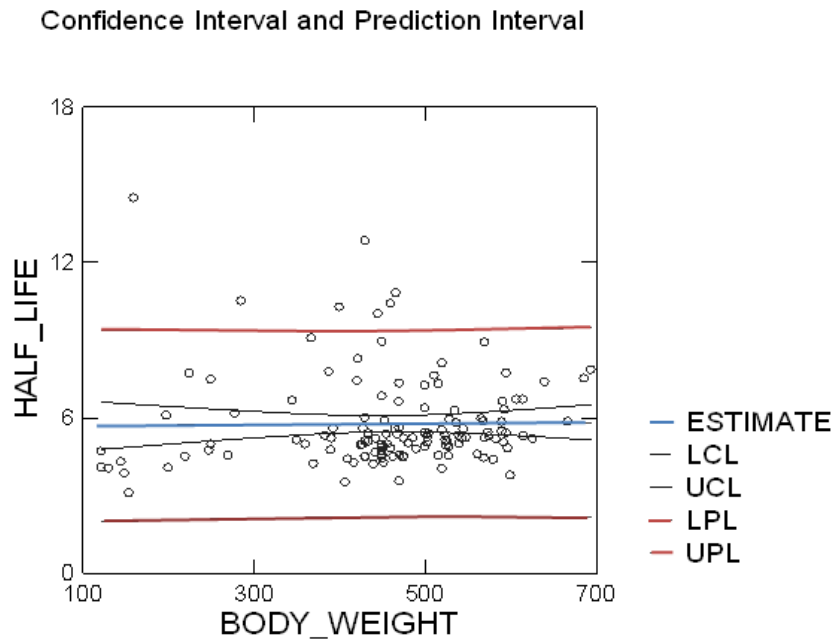


Figure 33 : Relation entre le poids corporel (kg) et le temps de demi-vie plasmatique explorée par régression linéaire. Le poids corporel du cheval (kg) n'a pas eu d'effet significatif sur le temps de demi-vie plasmatique (ANOVA, $P > 0.05$)

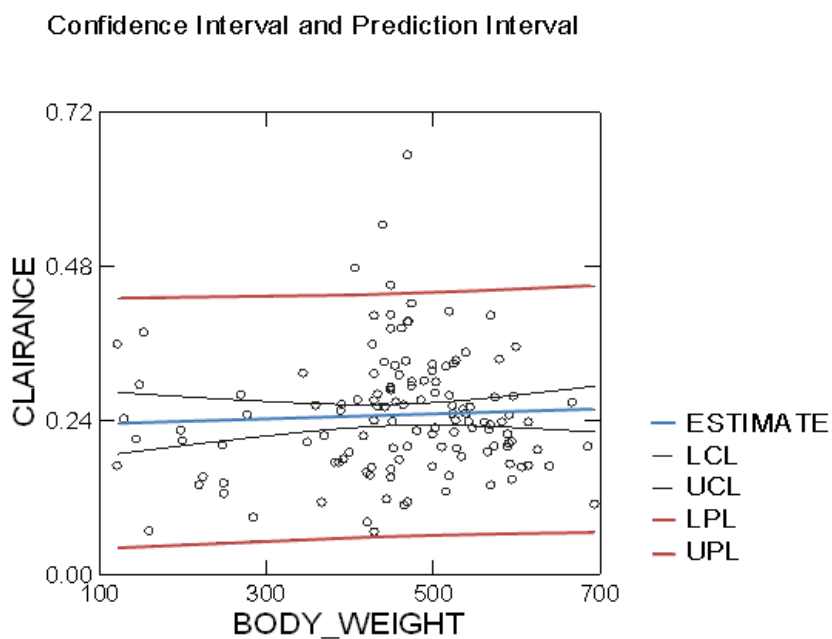


Figure 34 : Relation entre le poids corporel (kg) et clairance plasmatique (L/kg/h) explorée par régression linéaire. Le poids corporel du cheval (kg) n'a pas eu d'effet significatif sur la clairance plasmatique (ANOVA, $P > 0.05$)

Confidence Interval and Prediction Interval

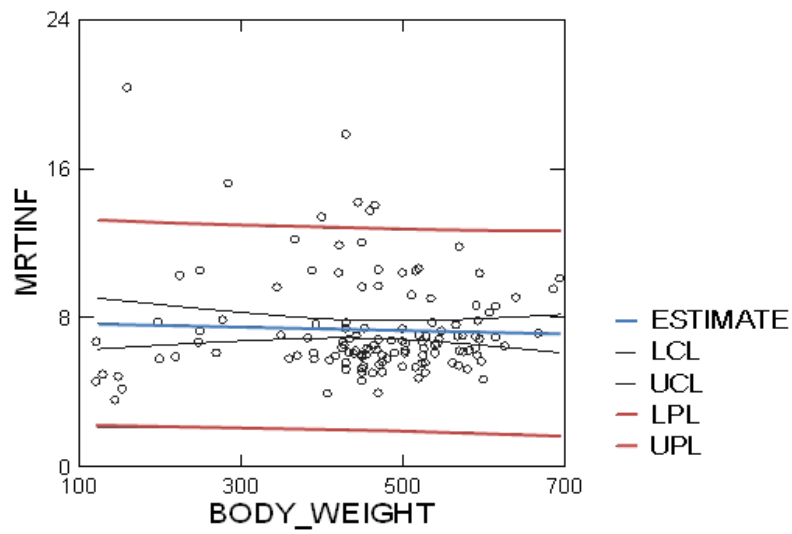


Figure 35 : Relation entre le poids corporel (kg) et le temps moyen de résidence (MRT) en h explorée par régression linéaire. Le poids corporel du cheval (kg) n'a pas eu d'effet significatif sur le temps moyen de résidence (MRTinf, h) ; (ANOVA, $P > 0.05$)

Confidence Interval and Prediction Interval

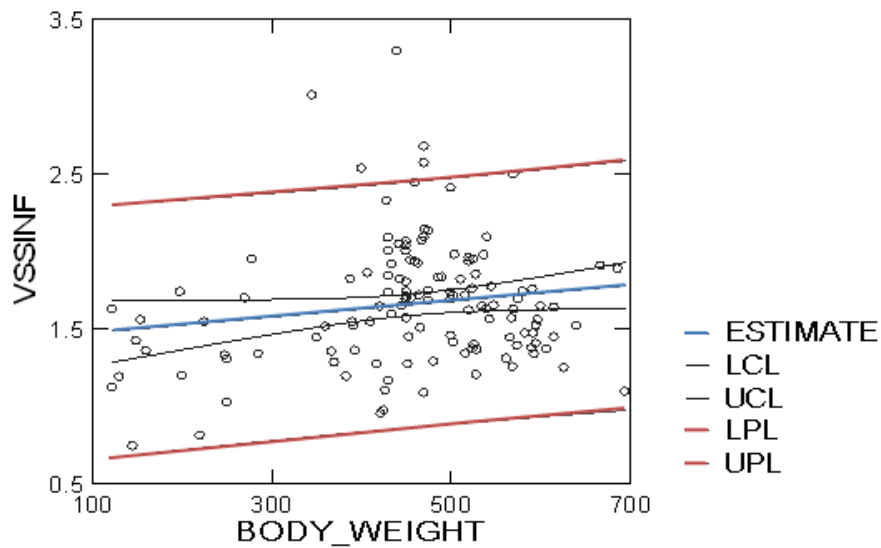


Figure 36 : Relation entre le poids corporel (kg) et le volume de distribution à l'équilibre explorée par régression linéaire. Le poids corporel du cheval (kg) n'a pas eu d'effet significatif sur le volume de distribution à l'équilibre (Vssinf) (ANOVA, $P > 0.05$)

e. Etude de régression entre l'âge et les paramètres PK

L'étude de régression linéaire n'a pas montré d'effet significatif de l'âge sur les 4 paramètres PK étudiés.

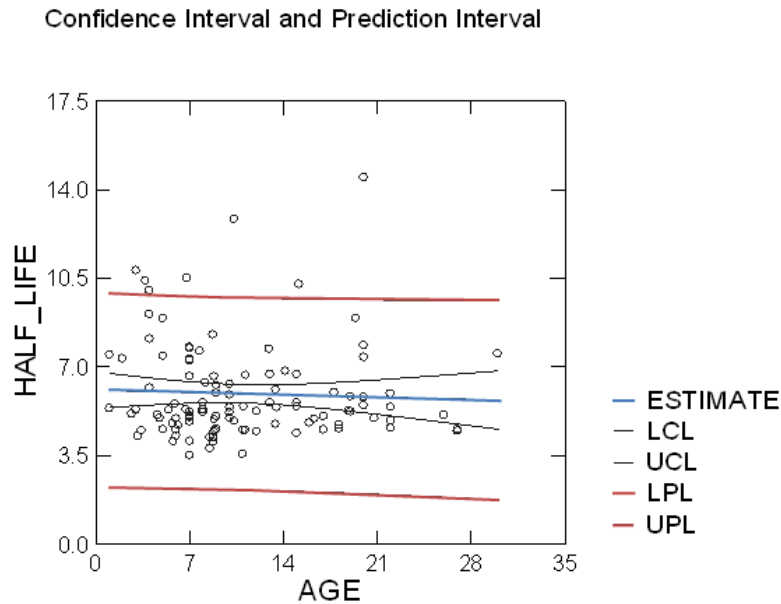


Figure 37 : Relation entre l'âge (ans) et le temps de demi-vie plasmatique explorée par régression linéaire. L'âge du cheval n'a pas eu d'effet significatif sur les temps de demi-vie (ANOVA, $P>0.05$)

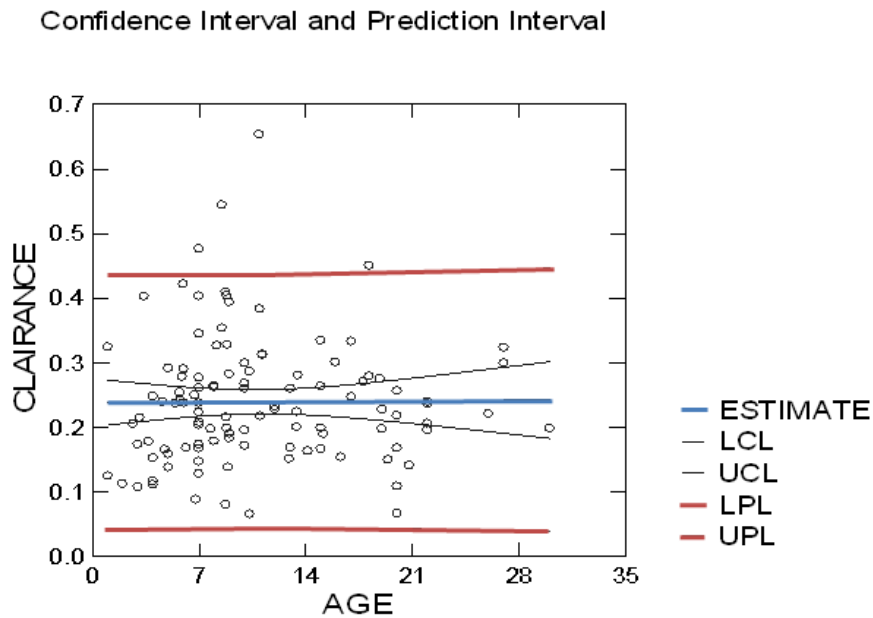


Figure 38 : Relation entre l'âge (ans) et la clairance plasmatique (L/kg/h) explorée par régression linéaire. L'âge du cheval n'a pas eu d'effet significatif sur les temps de demi-vie (ANOVA, $P>0.05$)

Confidence Interval and Prediction Interval

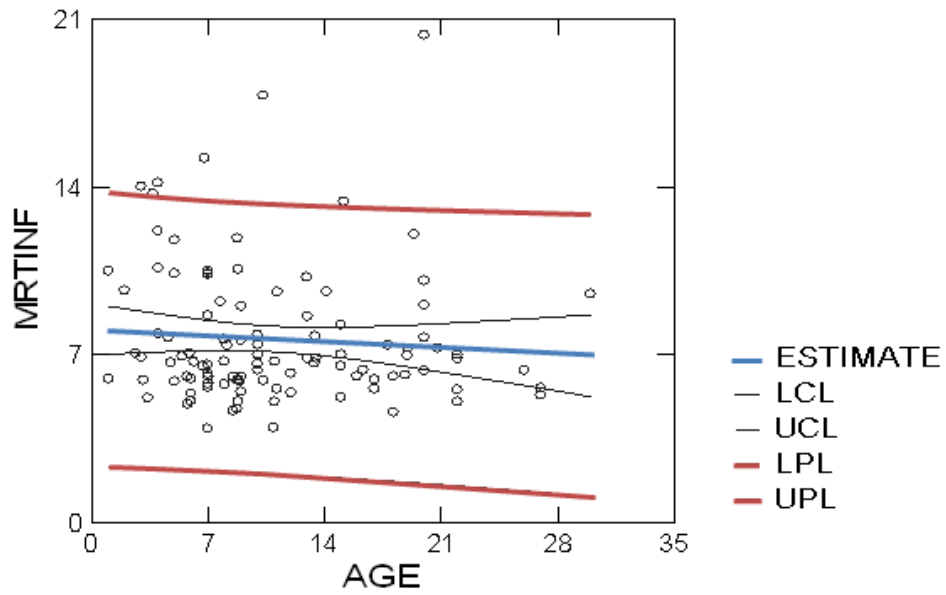


Figure 39 : Relation entre l'âge (ans) et le temps moyen de résidence (MRT) en h explorée par régression linéaire. L'âge du cheval n'a pas eu d'effet significatif sur le temps moyen de résidence (ANOVA, $P > 0.05$)

Confidence Interval and Prediction Interval

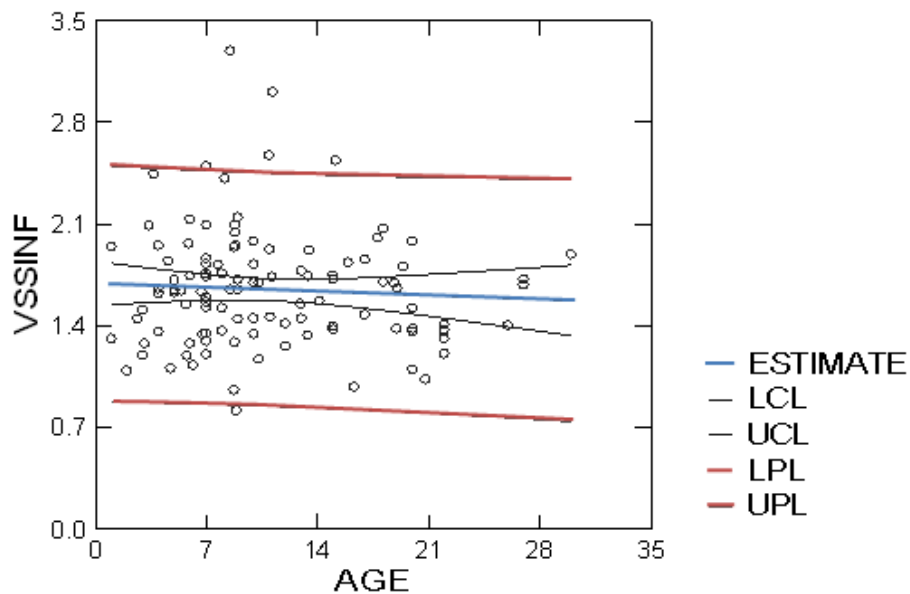


Figure 40 : Relation entre l'âge (ans) et le volume de distribution à l'équilibre (Vss) explorée par régression linéaire. L'âge du cheval n'a pas eu d'effet significatif sur le volume de distribution à l'équilibre (ANOVA, $P > 0.05$).

3.2 Résultats de l'analyse pharmacocinétique de population

a. *Modèle structural*

Le modèle pharmacocinétique sélectionné a été un modèle bicompartimental qui avait déjà été retenu dans les analyses préliminaires et à partir duquel les temps de prélèvement avaient été calculés pour optimiser l'estimation des paramètres. Ce modèle a été paramétré en termes de clairances et de volumes de distribution comme indiqué sur la figure 18.

Pour l'erreur résiduelle, un modèle exhaustif de départ a été considéré ; il a inclus les composantes aléatoires pour les 4 paramètres pharmacocinétiques et un modèle d'erreur résiduelle mixte avec une composante additive et une composante multiplicative paramétré dans Phoenix selon l'équation 12. Les techniques analytiques ayant évoluées au cours du temps nous avons également inclus une composante aléatoire sur ce modèle d'erreur résiduelle.

L'étape suivante a consisté en la construction de la matrice Ω ; dans Phoenix on peut construire cette matrice de façon personnalisée pour inclure ou ignorer certains termes de covariance. Une matrice complète pour les 4 paramètres structuraux étudiés a été choisie, soit 10 termes à étudier. La composante aléatoire a été considérée indépendante et donc isolée de la matrice, on avait donc au final 11 termes à étudier. Nous avons comparé les résultats obtenus avec cette matrice complète avec ceux qui sont obtenus en réduisant Ω à sa diagonale (pas de covariances) en prenant en compte un *test du maximum de vraisemblance* comme suggéré par Mould et Upton 2013 pour juger de l'intérêt on non de garder les termes de covariance. (Mould, Upton 2013). La fonction objective était significativement plus basse pour le modèle associé à la matrice complète (χ^2 , $p < 10^{-7}$), celle-ci a donc été conservée. En outre, notre objectif ultime de réaliser des simulations plaideait en faveur de ce modèle complet quant à la matrice Ω et à la possibilité de calculer la matrice des corrélations pour détecter d'éventuelles colinéarités entre les paramètres estimés.

Selon la même approche, le modèle de l'erreur résiduelle le plus simple (multiplicatif) a été préféré au modèle mixte car la réduction de la fonction objective n'a pas atteint la valeur critique de la distribution du χ^2 pour un $p < 0.05$ et pour 2 degrés de liberté en moins (valeur critique de 5.99).

Dans un second temps, une méthode d'estimation adaptée a été utilisée pour estimer les paramètres du modèle de base. Pour le modèle de base et tous les modèles avec covariables les 4 paramètres du modèle de disposition ont été estimés donnant les valeurs typiques (tv) c'est-à-dire les thêtas, la variabilité inter-sujet associée à chacun de ces thêta c'est-à-dire la variance des êtas ($n=4$) donnée sous la forme d'un coefficient de variation (voir l'équation 7), les différents termes de covariance entre les êtas ($n=6$), et la SD de la résiduelle pour un modèle multiplicatif soit au total 15 paramètres.

Le tableau 7 donne la valeur des paramètres de population (thêtas) c'est-à-dire les valeurs typiques (tv) du modèle avec la précision de leurs estimateurs.

Tableau 7 : Paramètres fixes (thêtas) du modèle de base sans covariable et SD de la résiduelle. La précision des estimateurs est donnée par les SE, le coefficient de variation correspondant (%RSE) et l'intervalle de confiance (CI) qui est l'intervalle de confiance 2.5-97.5% de l'estimateur.

Parameter	Estimate	Units	SE	%RSE	2.5% CI	97.5% CI
tvV	1.156	L/kg	0.0262	2.269	1.104	1.207
tvV2	0.543	L/kg	0.0143	2.640	0.515	0.571
tvCl	0.230	L/kg/h	0.0063	2.734	0.218	0.242
tvCl2	0.122	L/kg/h	0.0043	3.504	0.113	0.130
SD (eps)	0.139	µg/mL	0.0051	3.644	0.129	0.149

Le tableau 8 donne les valeurs des composantes aléatoires du modèle (sous la forme d'un coefficient de variation) qui traduit la variabilité interindividuelle (BSV) pour les paramètres estimés du modèle pharmacocinétique, la précision de ces estimations (SE, %RSE qui est le coefficient de variation de l'estimateur) et les valeurs de shrinkage.

Tableau 8 : Paramètres aléatoires (Omega) du modèle de base sans covariable et valeurs des shrinkages. La variabilité interindividuelle (BSV) a été estimée pour chaque éta par un terme de variance et exprimée par un coefficient de variation (CV%) avec l'équation 7 ; la précision des estimateurs est donnée par les SE et le coefficient de variation correspondant (%RSE).

Etas	Variance	BSV (CV%)	SE	%RSE	shrinkage
η_V	0.074	27.69	0.0119	16.11	0.113
η_{Cl}	0.178	44.11	0.0161	9.06	0.021
η_{V2}	0.034	18.71	0.0031	8.90	0.186
η_{Cl2}	0.415	71.69	0.0401	9.68	0.282

Des graphiques diagnostiques permettant de juger de la normalité des êtas et des résidus conditionnels sont donnés dans les annexes 8 à 12.

La figure 41 montre la dispersion des concentrations prédites par le modèle de population contre les concentrations observées, les êtas sont alors fixés à 0. La figure 42 montre la dispersion les concentrations estimées bayésiennes contre les concentrations observées. La comparaison avec la figure 41 montre une réduction très importante de la dispersion des points suggérant l'adéquation du modèle.

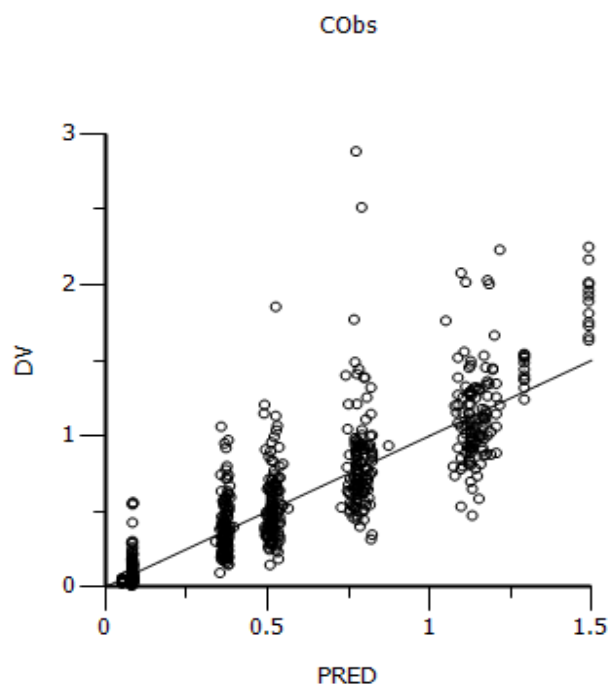


Figure 41 : Diagramme de dispersion des concentrations prédites par le modèle de population en fixant les éta à 0 (PRED) vs. la variable dépendante (DV) c'est-à-dire les concentrations observées. Les points sont globalement bien alignés sur droite d'identité ($X=Y$) suggérant un bon ajustement.

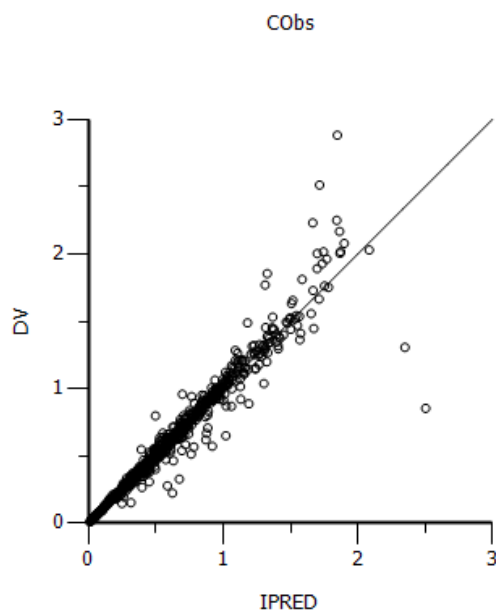


Figure 42 : Diagramme de dispersion des concentrations individuelles prédites par estimation Bayésienne (IPRED) vs. la variable dépendante (DV) c'est-à-dire les concentrations observées. Les IPRED sont calculées en prenant en compte les effets aléatoires ; il s'agit d'estimations post-hoc ou bayésiennes encore nommées selon la terminologie anglaise d'Empirical Bayesian Estimates ou EBE. Idéalement les valeurs prédites doivent être les plus proches possible de la ligne d'identité ($X=Y$).

Avant d'incorporer les covariables, une dernière étape de validation du modèle par Visual Predictive Check (VPC) permet de juger graphiquement de l'adéquation du modèle en comparant les quantiles des concentrations observées et les quantiles de concentrations prédites simulées selon le modèle, comme montré sur la figure 43. Cette analyse visuelle permet de détecter d'éventuelles déficiences du modèle.

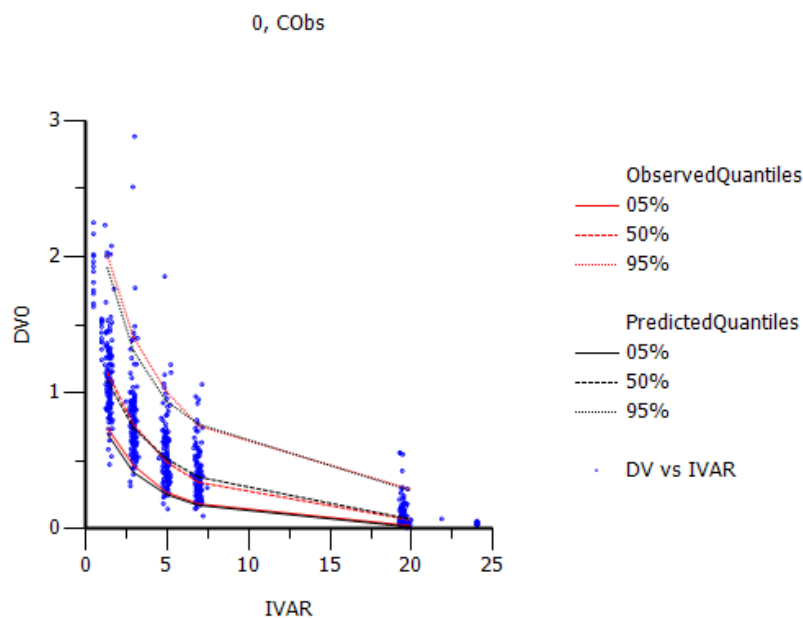


Figure 43 : Vérification visuelle des prédictions ou Visual Predictive Check (VPC) de la variable dépendante (les concentrations plasmatiques observées) vs. la variable indépendante (IVAR) qui ici est le temps (h). Cette figure montre les quantiles observés (en rouge) c'est-à-dire les quantiles 5, 50 (la médiane) et 95% et les quantiles correspondant prédits par le modèle. Les concentrations observées sont les points bleus.

b. Incorporation des covariables dans le modèle de base

Les différentes covariables (sites d'études, statut sanitaire, sexe, niveau de dose administrée, poids corporel et âge) ont été incluses chacune leur tour dans le modèle de base pour la seule clairance plasmatique et elles ont été considérées comme significatives si le test du rapport de maximum de vraisemblance était significatif pour $p < 0.001$. Le tableau 9 donne pour les modèles testés le critère du maximum de vraisemblance (-2LL) et la signification ou non du test du rapport de maximum de vraisemblance entre les modèles concurrents. Les quatre covariables catégorielles (sites d'études, statut sanitaire, sexe et niveau de dose administrée) ont significativement diminué la valeur de la fonction objective, ce qui n'était pas le cas pour la covariable poids corporel.

Tableau 9 : comparaison du modèle de base avec des modèles incluant chacune des covariables (sauf l'âge qui est présenté dans le tableau 10). Base : modèle de base ; -2LL : moins deux fois le logarithme du maximum de vraisemblance ; Tv : valeur typique ; Thêtas covariable : valeurs des thêtas estimés par Phoenix pour chaque niveau de la covariable ; Êta CV% : variabilité interindividuelle sur la clairance exprimée par un coefficient de variation ; Moyenne NCA : moyenne calculée à partir de l'analyse non-compartimentale ; Différence NCA/Pop% : différence entre l'analyse non compartimentale et l'analyse de population en %.

Modèle de base (659 concentrations) et covariables introduites (nombre de niveaux)	-2LL	Nombre de paramètres dans le modèle	valeur de P (CHI2)	Covariables (niveaux)	Tv clairance (L/Kg/h)	Thêtas covariables	Eta cv%	moyenne NCA	Différence NCA/Pop %
Base	-1112.3	15			0.230		44.1		
Base & Statut (n=2)	-1125.4	16	<0.001	Hospitalisé	0.208	0	41.5	0.232	10.217
				Témoins	0.256	0.2287		0.267	4.157
Base & Sexe (n=3)	-1133.7	17	<0.001	Femelle	0.240	0	40.5	0.26	7.592
				Hongre	0.222	-0.0761		0.239	7.123
				Mâle	0.189	-0.2140		0.207	8.766
Base & Dose (n=2)	-1134.9	16	<0.001	2mg/kg	0.229	0	42.6		
				10mg/kg	0.301	0.3146			
Base & Sites (n=5)	-1130.0	19	<0.001	Montréal	0.222	0	43.0	0.250	11.200
				Toulouse1	0.239	0.0784		0.271	11.662
				Utrecht	0.183	-0.1739		0.170	-7.879
				Vienne	0.176	-0.2057		0.211	16.429
				Toulouse2	0.224	0.0102		0.224	-0.118
Base & Poids	-1114.0	16	NS				43.4		

Pour l'âge, il y avait un certain nombre de données manquantes et la signification de la covariable âge a été évaluée en comparant le modèle de base avec celui incluant l'âge avec les mêmes données c'est-à-dire en supprimant tous les sujets n'ayant pas été documentés pour cette covariable. Le tableau 10 donne les résultats obtenus. L'âge n'ayant pas été significatif même si une certaine tendance a été observée avec des clairances plus faibles chez les animaux les plus jeunes.

Tableau 10 : Comparaison du modèle de base avec le modèle l'âge comme covariable. Base : modèle de base ; -2LL : moins deux fois le logarithme du maximum de vraisemblance ; Tv : valeur typique ; Thêtas covariable : valeurs de thêta estimés par Phoenix pour le facteur âge et pour un modèle puissance centré sur un âge de 7 ans ; Êta CV% : variabilité interindividuelle sur la clairance exprimée par un coefficient de variation.

Modèle de Base avec données manquantes pour l'âge (496 concentrations) et covariables introduites	-2LL	Nombre de paramètres	valeur de P (CHI2)	Tv clairance (L/Kg/h)	Thêtas covariable	Eta cv%
Base	-808.4	15				
Base & âge	-811.8	16	0.0657 (NS)	0.2065 âge-7ans	0.1073	44.2

Nous avons ensuite testé si un modèle incluant le sexe et le statut sanitaire était supérieur à un modèle n'ayant que l'une de ces 2 covariables ; nous n'avons pas pris en compte la covariable site car elle serait sans intérêt pour une majorité de prescripteurs (voir la discussion). De même nous n'avons pas retenu le niveau de dose (2 ou 10mg/kg) car la dose de 10mg/kg ne peut pas être administrée au cheval à cause de ses effets secondaires (voir la section 4.2).

c. Modèle final avec covariables

Le tableau 11 donne les résultats obtenus avec le modèle final. Le modèle incluant à la fois les covariables sexe et le statut a significativement amélioré le maximum de vraisemblance par rapport au meilleur des modèles à une seule covariable (modèle de base et covariable sexe).

Tableau 11 : Modèle final avec 2 covariables significatives (statut sanitaire Hospitalisé vs. Témoin) et sexe (Femelle, Hongre et Mâle). -2LL : moins deux fois le logarithme du maximum de vraisemblance ; Tv : valeur typique ; Êta CV% : variabilité interindividuelle sur la clairance exprimée par un coefficient de variation.

-2LL	Nombre de paramètres	Valeur de p (χ^2) par rapport au meilleur modèle n'ayant que l'une de ces 2 covariables	Covariables (niveaux)	Tv clairance (L/Kg/h)	Eta CV%
-1147.7	18	<0.001	Femelle, hospitalisée	0.2200	41.1
			Femelle, témoin	0.2699	
			Hongre, hospitalisé	0.2020	
			Hongre, Témoin	0.2520	
			Mâle, Hospitalisé	0.1886	
			Mâle, Témoin	0.2272	

Le modèle final pour la clairance a été le suivant :

$$Cl = tvCl * (1 + \theta_1 \times codesex1 = 0 \text{ ou } 1) * (1 + \theta_2 \times codesex2 = 0 \text{ ou } 1) * (1 + \theta_3 \times codestatut = 0 \text{ ou } 1) * e^{\eta_{Cl}} \quad (\text{Eq.18})$$

Avec la valeur typique de la clairance qui, compte tenu de notre codage, correspond à celui des femelles hospitalisées (codesex1=codesex2=codestatut=0 dans cette équation). Les valeurs des thêtas ont été respectivement de $\theta_1=-0.08151$, $\theta_2=-0.19426$ et $\theta_3=0.2271$.

Compte tenu de notre codage pour les covariables sexe et statut, la clairance attendue pour un mâle témoin s'obtiendra en résolvant cette équation avec $\theta_1=0$, $\theta_2=-0.19425$ et $\theta_3=0.2271$ soit 0.2272L/kg/h. Les autres valeurs stratifiées par cofacteurs sont données dans le tableau 11.

Il apparait que les différences entre ces clairances restent relativement modestes, ce qui nous a conduit à réaliser les simulations de Monte-Carlo avec les paramètres obtenus avec le modèle de base sans covariable c'est-à-dire avec les paramètres donnés dans les tableaux 7 et 8 (avec une clairance typique de 0.230L/kg/h).

3.3 Simulations de Monte-Carlo

Afin de calculer des valeurs critiques de l'indice PK/PD, c'est-à-dire le rapport (ASC/CMI) utilisé pour les quinolones, nous avons réalisé des simulations de Monte-Carlo à partir du modèle de base et sans covariable ; nous avons ainsi généré les cinétiques plasmatiques de 1965 chevaux fictifs pour les temps d'observation de nos 131 chevaux (Phoenix réalise un nombre réplifications demandées soit ici 15 fois 131).

Ces données ont été analysées par une analyse non compartimentale ; le tableau 22 donne les valeurs des paramètres obtenus ; on notera pour la clairance la valeur positive du coefficient de dissymétrie (skewness) indiquant la présence d'une distribution asymétrique avec une queue à droite (le coefficient de dissymétrie est nul en cas de distribution symétrique). La valeur de la moyenne géométrique de la clairance (0.236L/kg/h) est pratiquement égale à la valeur typique de population (0.230L/Kg/h) ; de même le coefficient de variation associé à cette moyenne géométrique (46.1%) est très similaire au coefficient de variation de Cl (η) soit 44.1%.

Tableau 12 : Statistiques descriptives des ASC générées par une méthode de Monte-Carlo à partir du modèle de base

Variable	Mean	SD	Min	Median	Max	Geometric Mean	CV% Geometric Mean	Skewness	Kurtosis
AUCINF_obs	9.330	4.253	2.095	8.568	47.815	8.479	46.1	1.49	5.116
Cl_obs	0.260	0.121	0.042	0.233	0.955	0.236	46.1	1.42	2.912
Lambda_z	0.136	0.040	0.014	0.132	0.354	0.130	30.8	0.75	1.675
MRTINF_obs	7.266	2.962	2.203	6.738	72.78	6.851	34.2	6.54	124
Vss_obs	1.684	0.492	0.556	1.611	3.957	1.616	29.4	0.81	0.891

Une analyse de cette distribution des ASC dans Systat a montré que la distribution était de type Log-normal. Dans le domaine logarithmique, la distribution des ASC suit une loi normale d'une espérance de 2.138, ce qui correspond à 8.48 μ g*h/mL dans le domaine arithmétique, et d'un écart-type de 0.439, ce qui correspond à un coefficient de variation de 46.1%.

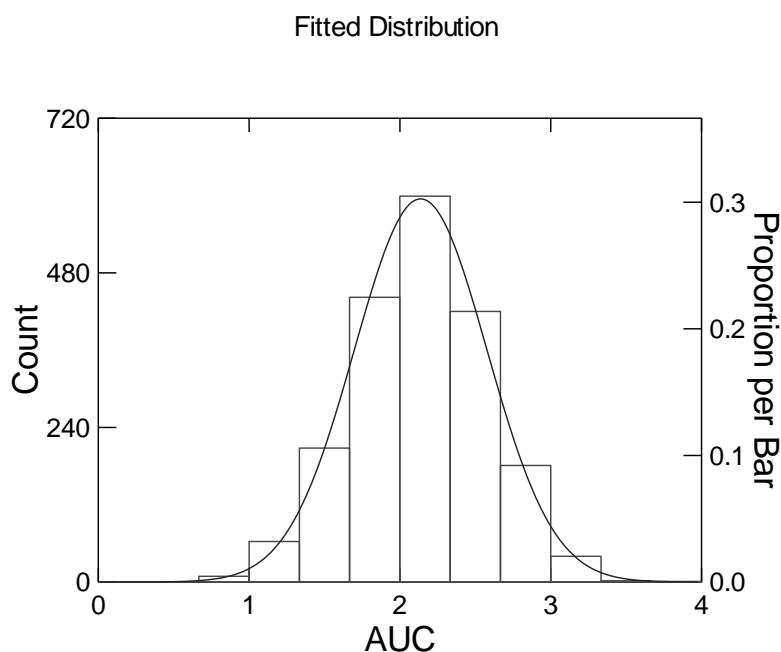


Figure 44 : Analyse statistique de la distribution Log-normale des 1965 ASC générées par une méthode de Monte-Carlo à partir du modèle de base.

A partir des ASC individuelles calculées pour chacun de ces 1965 chevaux nous avons calculé les valeurs numériques des ASC/CMI (h) pour différentes CMI (allant de 0.03125 à 2 μ g/mL) et nous avons directement repéré à partir des vecteurs ainsi obtenus les pourcentages de chevaux ayant des ASC/CMI égales ou supérieures à 24, 48, 72, 96, 125 et 250h. Rappelons qu'une ASC/CMI de 24h veut dire que la concentration plasmatique, dans les conditions d'équilibre, est égale à la CMI et qu'une ASC/CMI de 125h veut dire que cette concentration moyenne est égale à 5.2 fois la CMI.

Le tableau 13 donne pour les valeurs critiques de l'indice PK/PD (24 à 250) les pourcentages de chevaux atteignant cette valeur.

Tableau 13 : Pourcentages (0-100%) de chevaux atteignant les valeurs critiques de l'index PK/PD (de 24 à 250h) pour différentes CMI (de 0.03125 à 2 μ g/mL). Pourcentages obtenus à partir de données (concentrations plasmatiques) générées par simulation de Monte-Carlo avec le modèle de base de la marbofloxacin sans covariable.

CMI (μ g/mL)	ASC/CMI (h)					
	24	48	72	96	125	250
2	0	0	0	0	0	0
1	0.712	0	0	0	0	0
0.5	21.1	0.712	0	0	0	0
0.25	78.2	21.1	4.2	0.712	0	0
0.125	98.8	78.2	44.9	21.1	8.4	0.051
0.0625	100	98.8	92.3	78.2	58.6	8.4
0.03125	100	100	99.8	98.8	95.6	58.6

L'inspection du tableau 13 montre que pour atteindre chez au moins 90% des chevaux, une AUC/CMI de 24h, il faut une CMI $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ et pour atteindre une AUC/CMI de 125h chez 90% des chevaux, il faut un germe dont la CMI soit $\leq 0.03125\mu\text{g/mL}$. Cela veut dire que certains germes sont hors d'atteinte pour la marbofloxacin comme *Streptococcus zooepidemicus* dont la CMI est de l'ordre de $1-2\mu\text{g/mL}$; par ailleurs, l'usage de la marbofloxacin dans le cadre d'une antibiothérapie probabiliste (c'est-à-dire a priori et sans antibiogramme) paraît tout à fait impossible pour les germes à Gram positif pour la posologie généralement utilisée de 2mg/kg .

Ces résultats nous ont conduit à explorer quelles seraient les doses de marbofloxacin qu'il conviendrait d'utiliser pour traiter un cheval pour les germes classiquement isolés ; pour répondre à cette question, des CMI de germes collectés chez le cheval nous ont été transmises par Vétoquinol (tableau 14). On remarque qu'il existe de grandes différences de sensibilité à la marbofloxacin entre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia Coli* et *Pantoea agglomerans*) qui sont sensibles et les bactéries à Gram positif (*Rhodococcus equi* et *Streptococcus zooepidemicus*) qui seront cliniquement résistantes à la marbofloxacin pour la dose de 2mg/kg .

Tableau 14 : Valeur des CMI de la marbofloxacin pour une série de germes Gram positif et Gram négatif.

Strains	MIC values ($\mu\text{g/mL}$)														MIC50 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC90 ($\mu\text{g/mL}$)	
	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32			
<i>Escherichia coli</i>			2	15	1									2		0,022	0,038
<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Enterobacter agglomerans</i>)				37	3											0,022	0,029
<i>Rhodococcus equi</i>								3	17							0,665	0,922
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>									29	9	2					0,806	1,714

Nous allons ainsi pouvoir calculer la dose de marbofloxacin qu'il faudrait utiliser pour ces différents germes, ainsi en adaptant l'équation 2 on trouve l'équation suivante :

$$Dose = \frac{2}{ASC} \times 24h \times BP \times CMI \quad (\text{Eq. 19})$$

Avec une Dose en mg/kg/jour , $2/ASC$ est la clairance car les ASC ont été obtenues avec la dose de 2mg/kg ; cette clairance (L/kg/h) doit être multipliée par 24h pour obtenir une clairance journalière (sur 24h) ; BP est la valeur du breakpoint (de 1 à 5 selon que l'on veut obtenir une valeur de l'ASC/CMI allant de 24 à 125h) ; nous avons sélectionné une valeur intermédiaire à atteindre pour l'ASC/CMI de 72h soit un BP de 3 ; la CMI est celle du germe responsable du processus infectieux.

Cette équation a été résolue non pas avec des estimateurs ponctuels (moyennes, médianes...) des ASC et des CMI mais avec les distributions des ASC générées grâce aux simulations de Monte-Carlo et des CMI du tableau 14. La distribution des ASC était de type Log-normale, avec une moyenne et un écart-type dans le domaine logarithmique de respectivement de 2.138 et 0.439. Pour les CMI, nous avons utilisé la distribution empirique des CMI en regroupant les données des germes Gram-négatif et des germes Gram-positif (tableaux 15 et 16).

Tableau 15 : CMI et probabilité d'occurrence pour les germes Gram positif

CMI (µg/mL) Gram-positif	0.5	1	2	4	total
Effectif	3	46	9	2	60
Fractiles	0.050	0.7666	0.15	0.0333	1

Tableau 16 : CMI et probabilité d'occurrence pour les germes Gram négatif

CMI (µg/mL) Gram-négatif	0.015625	0.03125	0.0625	Total
Effectif (sensibles)	2	52	4	58
Fractiles	0.03448	0.8965	0.0589	1

Les distributions des doses ainsi calculées et les résultats sont donnés dans les figures 45 et 46.

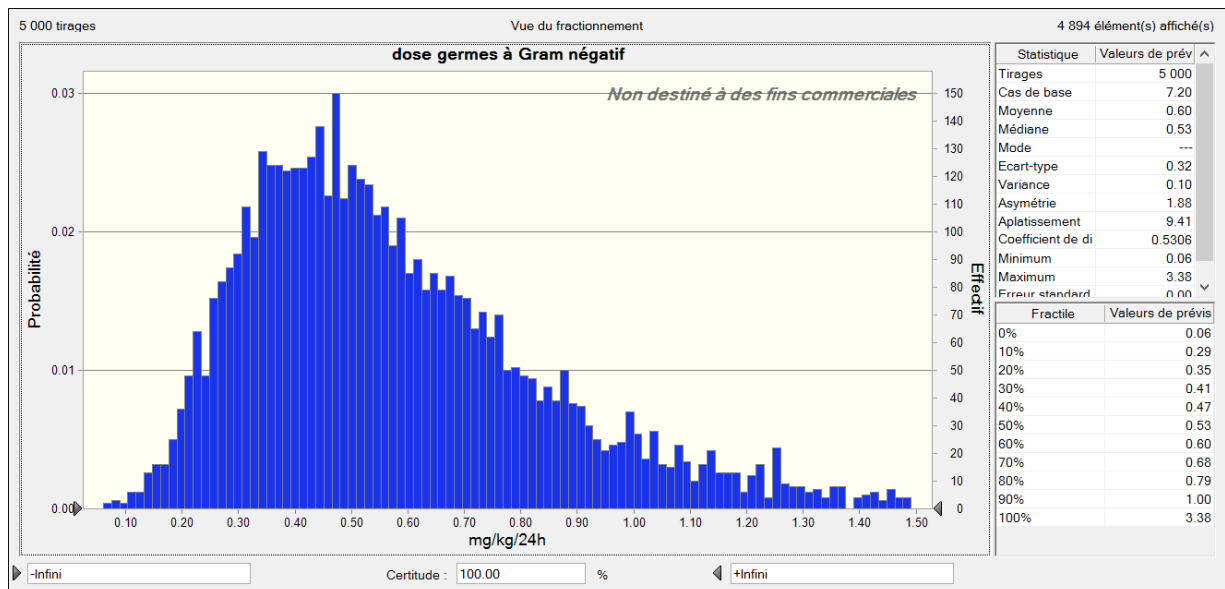


Figure 45 : Distribution des doses (mg/kg/24h) pour les germes Gram-négatif pour obtenir une valeur de 72h de l'indice PK/PD (ASC/CMI). Distribution obtenue par une simulation de Monte-Carlo en résolvant l'équation 19 avec une loi Log-normale pour les AUC et une distribution empirique (observée) pour les CMI.

On remarque qu'une dose de 1mg/kg permet de couvrir 90% des cas pour les bactéries à Gram négatif.

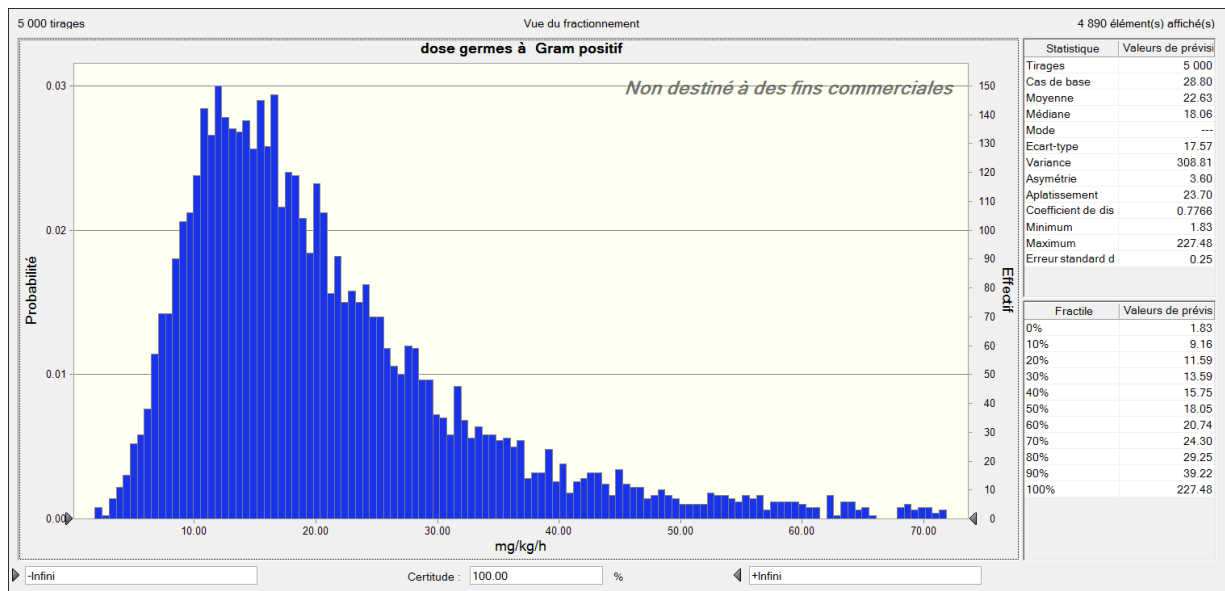


Figure 46 : Distribution des doses (mg/kg/24h) pour les germes à Gram-positif pour obtenir une valeur de 72h de l'indice PK/PD (ASC/CMI). Distribution obtenue par une simulation de Monte-Carlo en résolvant l'équation 19 avec une loi Log-normale pour les AUC et une distribution empirique (observée) pour les CMI.

Il apparaît qu'une dose de 39mg/kg serait nécessaire pour couvrir 90% des cas pour les germes à Gram-positif. Une telle dose est impossible à administrer au cheval dans la mesure où des effets adverses sont déjà vus pour une dose de 10mg/kg.

4. Discussion

Le but de cette thèse était de vérifier si la posologie de marbofloxacin habituellement utilisée sur le terrain dans le cadre de la cascade (2mg/kg) est adaptée pour cette espèce. Plusieurs études se sont intéressées à la pharmacocinétique de la marbofloxacin dans l'espèce équine, ayant permis d'en dégager les principales caractéristiques pharmacocinétiques (ADME), mais peu d'informations étaient disponibles quant à son efficacité face aux germes équins aux doses usuellement utilisées.

Vétoquinol, bien que ne disposant pas d'AMM pour cette molécule chez le cheval, commercialise plusieurs formulations de cette substance chez d'autres espèces et souhaite avoir une démarche responsable vis à vis des vétérinaires prescrivant leurs produits pour des chevaux dans le cadre de la cascade.

4.1 Base de données

Un échantillon comprenant 131 chevaux a été utilisé, ce qui en fait le plus large échantillon utilisé dans le cadre d'une étude sur la marbofloxacin dans l'espèce équine. L'échantillon comprenait des chevaux des trois sexes (mâle, femelle, hongre), d'âge variable, malades ou en bonne santé (animal hospitalisé ou témoin) et étaient répartis sur 4 sites (Montréal, Utrecht, Vienne et Toulouse).

Cependant deux sites différents ont été considérés pour le site Français car les prélèvements pour les deux sous-groupes n'ont pas eu lieu à la même période (2002 et 2013 respectivement pour Toulouse1 et Toulouse2) et la posologie utilisée était différente (2mg/kg et 10mg/kg respectivement) ; de plus, seuls des chevaux en bonne santé ont été utilisés pour le site Toulouse2. Les concentrations mesurées ont été standardisées pour une dose de 2mg/kg, ainsi un éventuel effet du site entre Toulouse1 et Toulouse2 pourrait traduire une non-linéarité des concentrations plasmatiques par rapport à la dose administrée, ou éventuellement un effet du statut de l'animal.

4.2 Dose et tolérance

La dose utilisée de 2mg/kg correspond à la dose proposée dans l'AMM du Marbocyl® 10% pour l'espèce bovine, qui est aussi la dose habituellement utilisée par les vétérinaires pour l'espèce équine dans le cadre de la cascade et celle qu'on retrouve dans les différentes études pharmacocinétique de la marbofloxacin chez le cheval.

La dose utilisée pour le site Toulouse2 de 10mg/kg correspond à la dose utilisée chez les bovins dans le cadre d'un traitement « one-shot », c'est-à-dire une injection unique à dose plus élevée d'un produit généralement plus concentré (Forcyl® 16%). Cette approche est utilisée en routine dans l'espèce bovine, mais peu connue chez le cheval, Vétoquinol souhaitait donc explorer cette approche dans l'espèce équine. Cependant, l'étude de tolérance effectuée sur le site Toulouse2 a révélé que 6 des 12 chevaux utilisés ont présenté des réactions d'urticaire 5 à 10 minutes après l'injection, plus de détails sur ces effets secondaires sont rapportés dans l'annexe 1.5. Il n'est pas encore déterminé si ces réactions ont pour origine le principe actif ou les excipients, mais à l'heure actuelle, l'utilisation de ce produit à une telle dose n'est pas envisageable.

Il serait envisageable d'effectuer d'autres essais avec une autre formulation de marbofloxacin afin de vérifier si les effets secondaires observés suite à l'injection de Forcyl® sont les faits du principe actif ou des excipients. Cependant nous avons montré qu'une dose de 39mg/kg serait nécessaire pour éliminer les germes à Gram positif ; il est quasiment certain qu'une telle dose ait des effets néfastes chez le cheval, espèce réputée sensible aux antibiotiques. De plus, un traitement à une dose aussi élevée impliquerait d'injecter un grand volume de produit et serait particulièrement coûteux. L'intérêt d'effectuer d'autres essais semble donc très limité.

4.3 Pharmacocinétique

Les résultats de l'analyse non-compartimentale ont montré différents effets des covariables documentées sur les paramètres pharmacocinétique étudiés, mais la plupart ne concernaient que 2 sites ou 2 sexes entre eux, ne permettant pas de dégager de tendance globale pour ces covariables. Seul le statut a un effet sur 3 des 4 paramètres pharmacocinétiques étudiés et notamment la clairance, celle-ci étant plus faible chez le cheval malade. Cette tendance, déjà observée dans l'analyse préliminaire du site de Montréal (Peyrou et al. 2004), a été confirmée par la suite par notre analyse globale de population.

Le modèle final sans covariable retenu semble fiable, en effet le shrinkage reste faible pour les paramètres pharmacocinétiques étudiés, inférieur à 20% sauf pour la clairance de distribution où il atteint 28%. Ces valeurs attestent d'un nombre suffisant de données pour estimer le modèle et prédire les paramètres et concentrations individuels, il est ainsi possible d'interpréter les différents graphiques diagnostiques. Ceux-ci montrent une bonne adéquation entre les concentrations observées et prédites par le modèle. Le Visual Predictive Check montre une quasi-superposition des courbes des quantiles (5, 50 et 95%), attestant une fois de plus de la bonne adéquation du modèle. Cependant, il s'agit uniquement d'un diagnostic graphique. Notre base de donnée, bien qu'importante par rapport à ce qu'on retrouve habituellement dans ce type d'études, ne permet de vérification du modèle avec des données externes, que ce soit en séparant la base de données initiale en deux sous-groupes, l'un pour l'élaboration du modèle et l'autre pour la validation de celui-ci, ou en ajoutant de nouvelles données. Ceci soulève le problème des validations de modèle en pharmacocinétique de population. D'autres méthodes ont été proposées, notamment la méthode VIPER (Visual Predictive Extended Residuals) permettant une évaluation moins subjective du modèle, mais cette méthode reste encore peu connue et peu utilisée. (Khachman, 2012).

Dans notre étude de population, seule la variabilité interindividuelle de la clairance plasmatique a été expliquée par des covariables. Un modèle final des concentrations plasmatiques en marbofloxacin en fonction du temps plus précis aurait pu être établi en tentant d'expliquer la variabilité interindividuelle des autres paramètres pharmacocinétiques. Cependant l'intérêt d'un modèle réside dans l'utilisation que l'on veut en faire, or la clairance plasmatique est le seul paramètre à être en relation directe avec le schéma posologique (cf Eq. 1 et 2), et donc le seul que nous avons utilisé pour les simulations de Monte-Carlo. Ainsi, expliquer la variabilité des autres paramètres présentait, pour notre thèse, peu d'intérêt.

Plusieurs des covariables étudiées diminuent significativement la fonction objective du modèle de la clairance (statut, sexe, dose et site), mais seules les covariables *sexe* et *statut* ont été retenues. En effet, l'un des buts de cette thèse est de pouvoir donner des recommandations d'usage aux prescripteurs pour la marbofloxacin dans l'espèce équine.

Ainsi, la covariable *site* n'a pas été retenue, car il semble à la fois compliqué et peu rationnel d'adapter une posologie en fonction de la région géographique. De plus, comme expliqué dans la section 4.1, l'effet *site* dans notre étude est potentiellement lié aux différentes doses utilisées entre Toulouse2 et les autres sites. La covariable *dose* n'a quant à elle pas été retenue car, pour les raisons évoquées dans la section 4.2 de cette partie, la dose de 10mg/kg ne devra pas être utilisée du fait des effets secondaires trop importants.

Notre modèle final de la clairance incluait donc deux covariables, le sexe et le statut sanitaire de l'animal, cependant pour les simulations de Monte-Carlo, le modèle de base sans covariables a été retenu. En effet, les différences obtenues entre les clairances typiques, bien que significatives, restent relativement faibles, avec la clairance typique la plus basse de 0,1886L/kg/h pour un mâle hospitalisé et la clairance typique la plus élevée de 0,2699L/kg/h pour une femelle témoin. Ainsi, les valeurs de clairance des sous-catégories proposées restent proche de la clairance typique moyenne dans la population (0,230L/kg/h), ne nécessitant pas de mettre en place des recommandations spécifiques à ces sous-catégories. De plus, les *breakpoints* fixés pour les antibiogrammes sont uniques pour une substance et ne prennent pas en compte de covariables, ainsi l'utilisation du modèle final de la clairance pour nos simulations de Monte-Carlo n'aurait pas été justifiée.

Une possibilité aurait été de prendre en compte pour la suite de notre étude la clairance typique d'un animal hospitalisé (0,208L/kg/h), plus faible, car on traite généralement un animal déjà infecté et présentant des signes. Une fois de plus, l'ordre de grandeur reste le même et le choix de l'une ou l'autre de ces clairances n'aurait eu que peu d'influence sur le résultat final.

4.4 Pharmacodynamique

Seuls 4 espèces bactériennes ont été étudiées ici, il aurait été possible d'étudier un plus grand nombre de germes mais on couvre ici la majorité des infections retrouvées dans l'espèce équine. De plus, en regardant les CMI retrouvées dans la littérature, par exemple pour *S. aureus* dont la CMI₉₀ est de 0,210µg/mL (Bousquet-mélou et al. 2002), on remarque que les tendances dégagées dans notre étude de Monte-Carlo peuvent être extrapolée aux autres germes. En effet, pour cette espèce, en reprenant le tableau 13, on remarque que le Breakpoint de 72h ne peut être atteint que chez 4% des individus, la marbofloxacin est donc inefficace face à ce germe à la dose de 2mg/kg, comme pour les germes à Gram positif étudiés.

Les simulations de Monte-Carlo montrent que le spectre de la marbofloxacin est finalement étroit chez le cheval, contrairement à l'utilisation qui en est faite notamment chez les carnivores domestiques, où son spectre d'action est très large. La marbofloxacin semble cependant couvrir tous les cas d'infections à germes à Gram négatif, une dose de 1mg/kg étant suffisante pour atteindre un ASC/CMI de 72h chez 90% des individus. Une

exception doit cependant être faite à cette règle, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont légèrement moins sensibles que les autres bactéries à Gram négatif à la marbofloxacin. En effet, les CMI rapportées dans la littérature pour des *Pseudomonas* retrouvés dans l'espèce équine allant de 0,12 à 2,0 µg/mL (Bousquet-mélou et al. 2002), les concentrations atteignables ne permettent pas d'assurer l'élimination de ce genre bactérien.

On retiendra donc que la marbofloxacin présente un spectre étroit chez le cheval, elle est efficace contre la plupart des bactéries à Gram négatif, dont les CMI ne dépassent pas 0,0625 µg/mL. Pour les bactéries à Gram positif, dont les CMI sont comprises entre 0,5 et 4 µg/mL, la dose usuelle ne couvre pas 10% des cas. La CMI observée chez les souches résistantes de *E.coli* est de 16 µg/mL. Ainsi, la marbofloxacin, aux doses acceptables cliniquement, ne permet pas d'éliminer les souches résistantes et pourrait même favoriser la sélection de celles-ci.

4.5 Détermination des *cutoffs*

Les CMI présentées ici permettent d'identifier de façon approximative les *cutoffs* épidémiologique des germes équins pour la marbofloxacin. En effet, il est demandé de connaître les valeurs des CMI pour 400 souches bactériennes pour déterminer ces *cutoffs*, ce qui n'est pas notre cas. Ainsi, pour les germes à Gram négatif étudiés on peut placer le *cutoff* épidémiologique à 0,0625 µg/mL ; les deux souches d'*E. coli* dont la CMI est du 2µg/mL présentent donc un ou plusieurs mécanismes de résistances. On remarque par ailleurs que tous les germes à Gram positif étudiés se situent bien au dessus de ce seuil.

Les *cutoffs* PK/PD nécessaires à la mise en place des *breakpoints* correspondent à la CMI seuil pour laquelle 90% des individus atteignent l'indice PK/PD cible, dans notre cas un rapport ASC/CMI de 72h. Ainsi, d'après le tableau 13, on a un *cutoff* PK/PD de 0,0625 µg/mL, équivalent au *cutoff* épidémiologique des germes à Gram négatif.

Des essais cliniques seraient nécessaires pour évaluer la réussite clinique des traitements mis en place et définir les *breakpoints* de la marbofloxacin dans l'espèce équine. Ces *breakpoints* pourraient ensuite être utilisés pour les antibiogrammes par les laboratoires européens. Il serait de plus intéressant de disposer d'un plus grand nombre de CMI de germes équins pour vérifier si les distributions rapportées ici sont bien représentatives des germes équins retrouvés sur le terrain. Notre thèse est donc une première étape pour la mise en place de ces *breakpoints*, mais certaines informations sont encore manquantes.

4.6 Recommandations

Compte tenu des résultats obtenus dans notre thèse, on peut donc conclure que la marbofloxacin est une quinolone à spectre étroit chez le cheval et elle doit être exclusivement réservée pour les infections à germes à Gram négatif. L'analyse de population n'a pas permis de mettre en évidence de covariable influant suffisamment sur les concentrations plasmatiques en marbofloxacin pour ajuster les posologies en fonction des caractéristiques du patient. Ainsi, pour les germes à Gram négatif, une antibiothérapie empirique (sans recours à un antibiogramme) est possible dans la mesure où la dose de 2mg/kg couvre tous les cas de figure pour cette catégorie de germes.

CONCLUSION

La marbofloxacin est un antibiotique de la famille des quinolones aujourd'hui couramment utilisé chez de nombreuses espèces. Il n'existe cependant pas d'AMM pour cette substance dans l'espèce équine, mais elle est parfois utilisée sur le terrain par les vétérinaires dans le cadre de la cascade. L'objet de cette thèse était de vérifier si les posologies utilisées sur le terrain (2mg/kg) sont adaptées et d'envisager un traitement en « one-shot » à une posologie plus élevée (10mg/kg) à travers une étude de population sur 131 chevaux.

Les résultats ont montré que, chez le cheval, la marbofloxacin est un antibiotique à spectre étroit dont l'utilisation doit être réservée aux infections à germes à Gram-négatif. La posologie habituelle de 2mg/kg est adaptée à cette indication dans le cadre d'une antibiothérapie empirique car elle couvre tous les cas.

Pour les bactéries à Gram positif, une dose de 39mg/kg serait nécessaire pour couvrir 90% des cas, or une utilisation de la marbofloxacin à une dose plus élevée n'est pas envisageable car des effets secondaires importants sont apparus à la dose de 10mg/kg.

Notre étude a de plus permis d'identifier le *cutoff* PK/PD de la marbofloxacin, qui est, pour le dose de 2mg/kg, de 0,0625 µg/mL. Cette valeur pourrait servir à la mise en place de *breakpoints* vétérinaires pour la marbofloxacin chez le cheval par le groupe VetCAST dans les années à venir. Ces *breakpoints* pourraient ainsi permettre d'ajuster les seuils utilisés par les laboratoires pour les antibiogrammes et ainsi favoriser une meilleure utilisation de cette substance dans l'espèce équine.

AGREMENT SCIENTIFIQUE


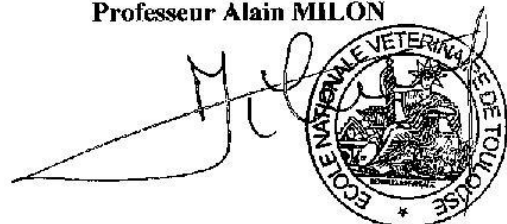
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Pierre-Louis TOUTAIN**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CAZAJEUX Lorelei** intitulée « *Usage prudent d'une fluoroquinolone de troisième génération dans le cadre de la cascade : le cas de la marbofloxaciné chez le cheval documenté par un modèle de population et des simulations de Monte Carlo* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18 décembre 2014
Professeur Pierre-Louis TOUTAIN
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse




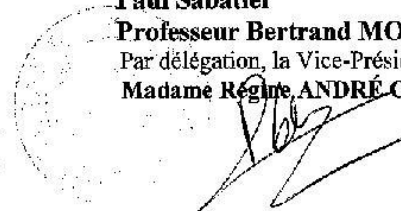
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Etienne CHATELUT



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ-OBRECHT



Melle CAZAJEUX Lorelei
a été admis(e) sur concours en : 2009
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013
a validé son année d'approfondissement le : 23/10/2014
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

- AMBROSE, Paul G. et GRASELA, Dennis M., 2000. The use of Monte Carlo simulation to examine pharmacodynamic variance of drugs: fluoroquinolone pharmacodynamics against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2000. Vol. 38, n° 3, pp. 151–157.
- ANDREWS, Jennifer M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001. Vol. 48, n° Suppl. S1, pp. 5-16.
- BAKER, C N, STOCKER, S A, CULVER, D H et THORNSBERRY, C, 1991. Comparison of the E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. mars 1991. Vol. 29, n° 3, pp. 553-558.
- BOUSQUET-MÉLOU, A., BERNARD, S., SCHNEIDER, M. et TOUTAIN, P.L., 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. *Equine veterinary journal*. 2002. Vol. 34, n° 4, pp. 366-372.
- CARRETERO, M., RODRIGUEZ, C., ANDRÉS, MI SAN, FORES, P., LUCAS, JJ de, NIETO, J., WAXMAN, S., ANDRÉS, MD SAN et GONZALEZ, F., 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine veterinary journal*. 2002. Vol. 34, n° 4, pp. 360–365.
- CASFM, 2013. *Proposition de seuils critiques*. Société Française de Microbiologie.
- CHASTAGNOL, Elsa, 2006. *Etude du passage de la marbofloxacin à travers la barrière utérine de la jument*. Thèse de Doctorat Vétérinaire.
- DGAL et SDSPA, 2004. *Note de Service N2004-8185*. 16 juillet 2004.
- DGAL, 2012. *Fiche d'action n° 25 : Établir la liste des antibiotiques « critiques » dont il faut prioritairement préserver l'efficacité pour l'homme*. août 2012. EcoAntibio 2017 - Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire.
- DRLICA, K., MALIK, M., KERNS, R. J. et ZHAO, X., 2007. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27 août 2007. Vol. 52, n° 2, pp. 385-392.
- EMMERSON, A. M., 2003. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 mai 2003. Vol. 51, n° 90001, pp. 13-20.
- FERRAN, Aude A., BIBBAL, Delphine, PELLET, Terence, LAURENTIE, Michel, GICQUEL-BRUNEAU, Mireille, SANDERS, Pascal, SCHNEIDER, Marc, TOUTAIN, Pierre-Louis et BOUSQUET-MELOU, Alain, 2013. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the effects of parenteral administration of a fluoroquinolone on the intestinal microbiota: Comparison of bactericidal activity at the gut versus the systemic level in a pig model. *International Journal of Antimicrobial Agents*. novembre 2013. Vol. 42, n° 5, pp. 429-435.
- FERRAN, Aude, 2009. *Impact de l'administration précoce d'une fluoroquinolone sur l'éradication bactérienne et sur la sélection de résistances: approche PK/PD in vitro et in vivo*. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

FIRSOV, Alexander A., SHEVCHENKO, Alexander A., VOSTROV, Sergey N. et ZINNER, Stephen H., 1998. Inter-and intraquinolone predictors of antimicrobial effect in an in vitro dynamic model: new insight into a widely used concept. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998. Vol. 42, n° 3, pp. 659–665.

GUNARATNA, Chandrani, 2001. Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery : A Primer for Bioanalytical Chemistry Part II. *Current Separation*. Juin 2001. Vol. 19, n° 3.

HEISIG, Peter, 1996. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996. Vol. 40, n° 4, pp. 879–885.

HOOPER, David C., 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases*. 2001. Vol. 7, n° 2, pp. 337.

ISMAIL, M. et EL-KATTAN, Y.A., 2007. Comparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and Mannheimia haemolytica infected calves. *Research in Veterinary Science*. juin 2007. Vol. 82, n° 3, pp. 398-404.

JULLIEN, Vincent, 2006. Principes de l'approche de Population et applications à l'adaptation de posologie individualisée. 2006.

KAATZ, G W, SEO, S M et RUBLE, C A, 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 mai 1993. Vol. 37, n° 5, pp. 1086-1094.

KHACHMAN, Dalia, 2012. *Adaptation de posologie des quinolones en réanimation par approche de population*. Thèse universitaire. Université Toulouse III Paul Sabatier.

KING, Dana E, MALONE, Robb et LILLEY, Sandra H, 2000. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *American Family Physician*. 5 janvier 2000. Vol. 61, n° 9, pp. 2741-2748.

LAFFONT, C., 2008. Approche de population en utilisant des modèles non-linéaires à effets mixtes. janvier 2008.

LEFEBVRE, SCHNEIDER, M., DUPOUY, LAROUTE, Valérie, COSTES, DELESALLE et TOUTAIN, P.L., 1998. Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. décembre 1998. Vol. 21, n° 6, pp. 453-461.

LIM, Sue, BAST, Darrin, MCGEER, Allison, DE AZAVEDO, Joyce et LOW, Donald E., 2003. Antimicrobial susceptibility breakpoints and first-step parC mutations in Streptococcus pneumoniae: redefining fluoroquinolone resistance. *Emerging infectious diseases*. 2003. Vol. 9, n° 7, pp. 833.

MADARAS-KELLY, Karl J., DANIELS, Christopher, HEGBLOOM, Marissa et THOMPSON, Michelle, 2002. Pharmacodynamic characterization of efflux and topoisomerase IV-mediated fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002. Vol. 50, pp. 211-218.

MARTINEZ, Marilyn, MCDERMOTT, Patrick et WALKER, Robert, 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*. juillet 2006. Vol. 172, n° 1, pp. 10-28.

- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Luis, PASCUAL, Alvaro et JACOBY, George A, 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*. mars 1998. Vol. 351, n° 9105, pp. 797-799.
- MCKELLAR, Q. A., SANCHEZ BRUNI, S. F. et JONES, D. G., 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2004. Vol. 27, n° 6, pp. 503-514.
- MOORE, Richard D., LIETMAN, Paul S. et SMITH, Craig R., 1987. Clinical Response to Aminoglycoside Therapy: Importance of the Ratio of Peak Concentration to Minimal Inhibitory Concentration. *Journal of Infectious Diseases*. 1 janvier 1987. Vol. 155, n° 1, pp. 93-99. PMID: 3540140
- MOULD, D R et UPTON, R N, 2013. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. avril 2013. Vol. 2, n° 4, pp. e38.
- MOUTON, J. W., 2005. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 8 avril 2005. Vol. 55, n° 5, pp. 601-607.
- NIWA, H, HOBBO, S et ANZAI, T, 2006. A nucleotide mutation associated with fluoroquinolone resistance observed in *gyrA* of in vitro obtained *Rhodococcus equi* mutants. *Veterinary Microbiology*. 15 juin 2006. Vol. 115, n° 1-3, pp. 264-268.
- NIWA, H. et LASKER, B. A., 2010. Mutant Selection Window and Characterization of Allelic Diversity for Ciprofloxacin-Resistant Mutants of *Rhodococcus equi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 24 mai 2010. Vol. 54, n° 8, pp. 3520-3523.
- OWENS JR, R.C. et AMBROSE, T., 2002. Pharmacodynamic of quinolones. *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. 2002. pp. 155-176.
- PACANOWSKI, Jérôme, 2005. Antibiothérapie. 2005.
- PEYROU, Mathieu, BOUSQUET-MELOU, Alain, LAROUTE, Valérie, VRINS, André et DOUCET, Michèle Y., 2006. Enrofloxacin and marbofloxacin in horses: comparison of pharmacokinetic parameters, use of urinary and metabolite data to estimate first-pass effect and absorbed fraction. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2006. Vol. 29, n° 5, pp. 337-344.
- PEYROU, Mathieu, DOUCET, Michèle Y., VRINS, André, CONCORDET, Didier, SCHNEIDER, Marc et BOUSQUET-MÉLOU, Alain, 2004. Population pharmacokinetics of marbofloxacin in horses: preliminary analysis. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2004. Vol. 27, n° 5, pp. 283-288.
- POTTER, T., ILLAMBAS, J., PELLIGAND, L., RYCROFT, A. et LEES, P., 2013. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *The Veterinary Journal*. janvier 2013. Vol. 195, n° 1, pp. 53-58.
- SAVIC, Radojka M. et KARLSSON, Mats O., 2009. Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions. *The AAPS Journal*. septembre 2009. Vol. 11, n° 3, pp. 558-569.
- SCHNEIDER, M., THOMAS, V, BOISRAMÉ, B et DELEFORGE, J, 1996. Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1996. Vol. 19, n° 1, pp. 56-61.

- SCHOLAR, Eric M., 2002. Fluoroquinolones: past, present and future of a novel group of antibacterial agents. *American Journal of Pharmaceutical Education*. 2002. Vol. 66, n° 2, pp. 164–171.
- SIMON, Nicolas, LE GUELLEC, Chantal et LAPORTE, Silvy, 2005. Analyse pharmacocinétique de population. *Médecine thérapeutique*. 2005. Vol. 11, n° 3, pp. 212–218.
- SPRENG, M, DELEFORGE, J, THOMAS, V, BOISRAMÉ, B et DRUGEON, H, 1995. Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. août 1995. Vol. 18, n° 4, pp. 284-289.
- TÉTOT, Caroline, 2004. *Etude de pharmacocinétique de population de la marbofloxacin chez le cheval: analyse préliminaire*. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- TOHAMY, M.A. et EL-GENDY, A.A.M., 2013. Some pharmacokinetic aspects and bioavailability of marbofloxacin in foals. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. septembre 2013.
- TOUTAIN, P.L, DEL CASTILLO, J.R.E et BOUSQUET-MÉLOU, A, 2002. The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*. octobre 2002. Vol. 73, n° 2, pp. 105-114.
- TOUTAIN, P.L, 2007. Schéma posologique pour les antibiotiques: _Apport des approches PK-PD et minimisation de la résistance. Nantes. décembre 2007.
- TOUTAIN, P.-L., BOUSQUET-MELOU, A. et MARTINEZ, M., 2007. AUC/MIC: a PK/PD index for antibiotics with a time dimension or simply a dimensionless scoring factor? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 3 octobre 2007. Vol. 60, n° 6, pp. 1185-1188.
- VIVRETTE, S. L., BOSTIAN, A., BERMINGHAM, E. et PAPICH, M. G., 2001. Quinolone-induced arthropathy in neonatal foals. In : *AAEP Proceedings*. 2001. pp. 376–377.
- WRIGHT, David H., BROWN, Gigi H., PETERSON, Marnie L. et ROTSCHAFER, John C., 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000. Vol. 46, pp. 669-683.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques démographiques des chevaux détaillées pour chacun des 5 sites d'investigation.

Statut	Sexe	Poids corporel (Kg)	Age (ans)	Effectif
Témoin	Femelle	481	13.0	16
	Hongre	519	13.1	5
<i>Total Témoin</i>		490	13.1	21
Hospitalisés	Femelle	489	10.4	15
	Hongre	450	6.3	6
	Mâle	425	3.0	2
<i>Total Hospitalisé</i>		473	8.6	23
Moyenne générale		482	9.9	44

Annexe 1.1 : Caractéristiques démographiques des 44 chevaux du site de Montréal (moyenne). La description des chevaux canadiens est donnée en détail dans la publication de (Peyrou, Doucet et al., 2004). Les chevaux témoins ont été fournis par une ferme expérimentale (Centre de Bioévaluation, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal). Les chevaux hospitalisés sont issus du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) de la Faculté de Montréal ; ils souffraient d'infections musculosquelettiques (n=7), de maladies respiratoires (n=5) ou digestives (n=5) et une jument avait une mammite aiguë.

Statut	Sexe	Poids corporel (Kg)	Age (ans)	Effectif
Témoin	Femelle	373	13.7	12
	Hongre	400	10.0	4
	Mâle	450		1
	non documenté	440		1
<i>Total Témoin</i>		387	11.5	18
Hospitalisé	Femelle	414	12.1	11
	Hongre	416	10.5	21
	Hâle	353	7.4	7
	Non documenté	520		1
<i>Total Hospitalisé</i>		407	10.4	40
Moyenne générale		401	10.5	58

Annexe 1.2 : Caractéristiques démographiques des 58 chevaux du site de Toulouse1 (moyenne). La plupart des chevaux de ce groupe ont été prélevés en 2001 et 2002 ; les chevaux du groupe hospitalisé l'ont été dans le cadre de la clinique équine de l'École vétérinaire de Toulouse et les chevaux témoins appartenaient au centre équestre de l'École vétérinaire de Toulouse. Les indications de l'antibiothérapie pour les chevaux hospitalisés étaient soit de l'antibioprévention (dose unique avant une intervention chirurgicale) soit des traitements antibactériens justifiant le recours à une quinolone.

Statut	Sexe	Poids corporel (Kg)	Age (ans)	Effectif
Témoin	Femelle	555	8.0	3
	Hongre	616	15.3	6
<i>Total Témoin</i>		596	12.9	9

Annexe 1.3 : Caractéristiques démographiques des 9 chevaux du site d'Utrecht (moyenne). Tous ces chevaux étaient en bonne santé.

Statut	Sexe	Poids corporel (Kg)	Age (ans)	Effectif
Témoin	Femelle	593	10.0	1
<i>Total Témoin</i>		593	10	1
Hospitalisé	Femelle	533	11.2	3
	Hongre	122	6.2	1
	Mâle	298	4.7	3
<i>Total Hospitalisé</i>		374	7.7	7
Moyenne générale		401	8.0	8

Annexe 1.4 : Caractéristiques démographiques des 8 chevaux du site de Vienne (moyenne).

Statut	Sexe	Poids corporel (Kg)	Age (ans)	Effectif
Témoin	Femelle	552	13.7	7
	Hongre	582	17.0	5
<i>Total Témoin</i>		564	15.75	12

Annexe 1.5 : Caractéristiques démographiques des 12 chevaux du site de Toulouse2 (moyenne).

Les 12 chevaux de Toulouse2 appartenaient au centre équestre de l'Ecole vétérinaire de Toulouse ; cet essai a été mené en 2013 pour tester la tolérance générale d'une formulation plus concentrée de marbofloxaxine (Forcyl® Vétoquinol, Lure) à une dose plus élevée (10mg/kg) que celle des autres groupes (2mg/kg). L'objectif de cette étude était d'apprécier la possibilité d'utiliser ou non la marbofloxacin à une dose élevée chez le cheval pour en étendre les indications. En fait cet essai a montré que la marbofloxacin ne pouvait pas être utilisée à cette dose, la moitié des chevaux ayant présenté une réaction urticarienne dans les 5 minutes qui ont suivi la fin de l'administration de la formulation testée. Cette urticaire localisée sur l'encolure et les flancs et parfois au-delà a entièrement disparu en 24 heures après l'injection.

Annexe 2 : Descriptions statistiques de l'âge (ans) et du poids corporel (kg) des 131 chevaux étudiés.

	Age (ans)	Poids corporel (Kg)
Effectif documenté	99	131
Moyenne	10.8	456
Erreur-type	0.609	10.80
Médiane	8.9	468
Mode	7	450
Écart-type	6.06	124
Minimum	1.03	122
Maximum	30.0	694

Annexe 3 : Temps nominaux et réels des prélèvements sanguins pour les quatre sites ayant eu une flexibilité potentielle quant aux temps de prélèvement.

Sites	Prélèvements	Temps nominaux des prélèvements (h)	Temps réels des prélèvements (h)		
			Moyenne	Minimum	Maximum
Montréal	1	0	0.00	0.00	0.00
	2	1.5	1.48	1.25	1.67
	3	3.0	2.97	2.75	3.18
	4	5.0	4.98	4.75	5.25
	5	7.0	6.94	6.73	7.47
	6	19.5	19.46	19.25	19.75
Toulouse1	1	0	0.00	0.00	0.00
	2	1.5	1.46	1.22	1.77
	3	3.0	2.95	2.75	3.28
	4	5.0	4.96	4.65	5.23
	5	7.0	6.94	6.65	7.22
	6	19.5	19.52	19.25	19.95
Utrecht	1	0	0.00	0.00	0.00
	2	1.5	1.38	1.28	1.47
	3	3.0	2.90	2.78	2.98
	4	5.0	4.95	4.83	5.08
	5	7.0	6.91	6.78	7.05
	6	19.5	19.36	19.28	19.47
Vienne	1	0	0.00	0.00	0.00
	2	1.5	1.48	1.25	1.58
	3	3.0	2.83	2.50	3.03
	4	5.0	4.84	4.50	5.13
	5	7.0	6.84	6.50	7.10
	6	19.5	19.83	19.50	21.83

Annexe 4 : Définition des différents paramètres de structure à effets fixes du modèle de base avec leur notation dans Phoenix.

Paramétrisation	Notations usuelles	Notations Phoenix	Relations entre les paramètres
Macroconstantes	$Y_1, \lambda_1, Y_2, \lambda_2$ ou A, α, B, β		
Microconstantes	$V_c, K_{10}, K_{12}, K_{21}$		
Physiologiques	Cl, Cl_d, V_c, V_p Cl_d est souvent noté Q_{12}	$Cl, Cl2, V, V2$	$Cl_d=(K_{12}*V_c)=(K_{21}*V_p)$ $Cl=K_{10}*V_c$

Annexe 5 : Statistiques descriptives pour les 4 paramètres pharmacocinétiques estimés par une analyse non compartimentale en fonction du site d'investigation.

Variable	Centers	N	Mean	SD	Min	Median	Max	CVPercent
Cl_obs	Montréal	44	0.250	0.091	0.081	0.262	0.477	36.3
Cl_obs	Toulouse1	58	0.267	0.115	0.035	0.271	0.653	43.1
Cl_obs	Toulouse2	12	0.221	0.019	0.194	0.224	0.247	8.5
Cl_obs	Utrecht	9	0.174	0.036	0.109	0.169	0.228	20.6
Cl_obs	Vienne	8	0.211	0.031	0.168	0.211	0.250	14.7
HL_Lambda_z	Montréal	44	5.895	1.556	3.510	5.328	10.807	26.4
HL_Lambda_z	Toulouse1	58	6.639	7.515	3.094	4.967	60.393	113.2
HL_Lambda_z	Toulouse2	12	5.241	0.485	4.451	5.193	5.940	9.3
HL_Lambda_z	Utrecht	9	6.756	1.167	5.246	6.700	8.908	17.3
HL_Lambda_z	Vienne	8	5.458	1.190	4.071	5.273	7.618	21.8
MRTINF_obs	Montréal	44	7.553	2.417	3.904	6.663	14.168	32.0
MRTINF_obs	Toulouse1	58	8.758	11.481	3.557	6.080	90.989	131.1
MRTINF_obs	Toulouse2	12	6.232	0.679	5.030	6.381	6.988	10.9
MRTINF_obs	Utrecht	9	8.575	1.657	6.210	8.591	11.780	19.3
MRTINF_obs	Vienne	8	7.132	1.144	5.777	6.975	9.199	16.0
Vss_obs	Montréal	44	1.711	0.344	0.955	1.712	2.676	20.1
Vss_obs	Toulouse1	58	1.761	0.511	0.746	1.716	3.292	29.0
Vss_obs	Toulouse2	12	1.370	0.118	1.205	1.371	1.568	8.6
Vss_obs	Utrecht	9	1.452	0.182	1.097	1.443	1.756	12.5
Vss_obs	Vienne	8	1.499	0.305	1.126	1.484	1.950	20.4

Cl_Obs : clairance plasmatique ; HL : temps de demi-vie plasmatique ; MRT : temps moyen de résidence ; Vss : volume de distribution à l'équilibre ; Cl, MRT et Vss ont été calculés du temps 0 à l'infini.

Annexe 6 : Statistiques descriptives pour les 4 paramètres pharmacocinétiques estimés par une analyse non compartimentale en fonction du sexe.

Variable	Sex	N	Mean	SD	Min	Median	Max	CVPercent
Cl_obs	ND	2	0.348	0.277	0.153	0.348	0.544	79.5
Cl_obs	Femelle	68	0.260	0.091	0.065	0.261	0.477	34.8
Cl_obs	Hongre	48	0.235	0.096	0.035	0.227	0.653	41.1
Cl_obs	Mâle	13	0.207	0.086	0.088	0.205	0.404	41.4
HL_Lambda_z	ND	2	6.156	2.754	4.208	6.156	8.103	44.7
HL_Lambda_z	Femelle	68	5.637	1.928	3.094	5.178	14.479	34.2
HL_Lambda_z	Hongre	48	6.800	7.982	3.556	5.420	60.393	117.4
HL_Lambda_z	Mâle	13	6.910	2.643	4.071	6.091	10.807	38.3
MRTINF_obs	ND	2	8.332	3.228	6.050	8.332	10.615	38.7
MRTINF_obs	Femelle	68	7.067	2.955	3.557	6.203	20.329	41.8
MRTINF_obs	Hongre	48	9.022	12.207	3.935	6.884	90.989	135.3
MRTINF_obs	Mâle	13	9.156	3.682	5.046	7.763	15.194	40.2
Vss_obs	ND	2	2.456	1.182	1.620	2.456	3.292	48.1
Vss_obs	Femelle	68	1.652	0.389	0.746	1.646	3.007	23.5
Vss_obs	Hongre	48	1.660	0.412	1.027	1.616	3.211	24.8
Vss_obs	Mâle	13	1.686	0.462	1.194	1.508	2.536	27.4

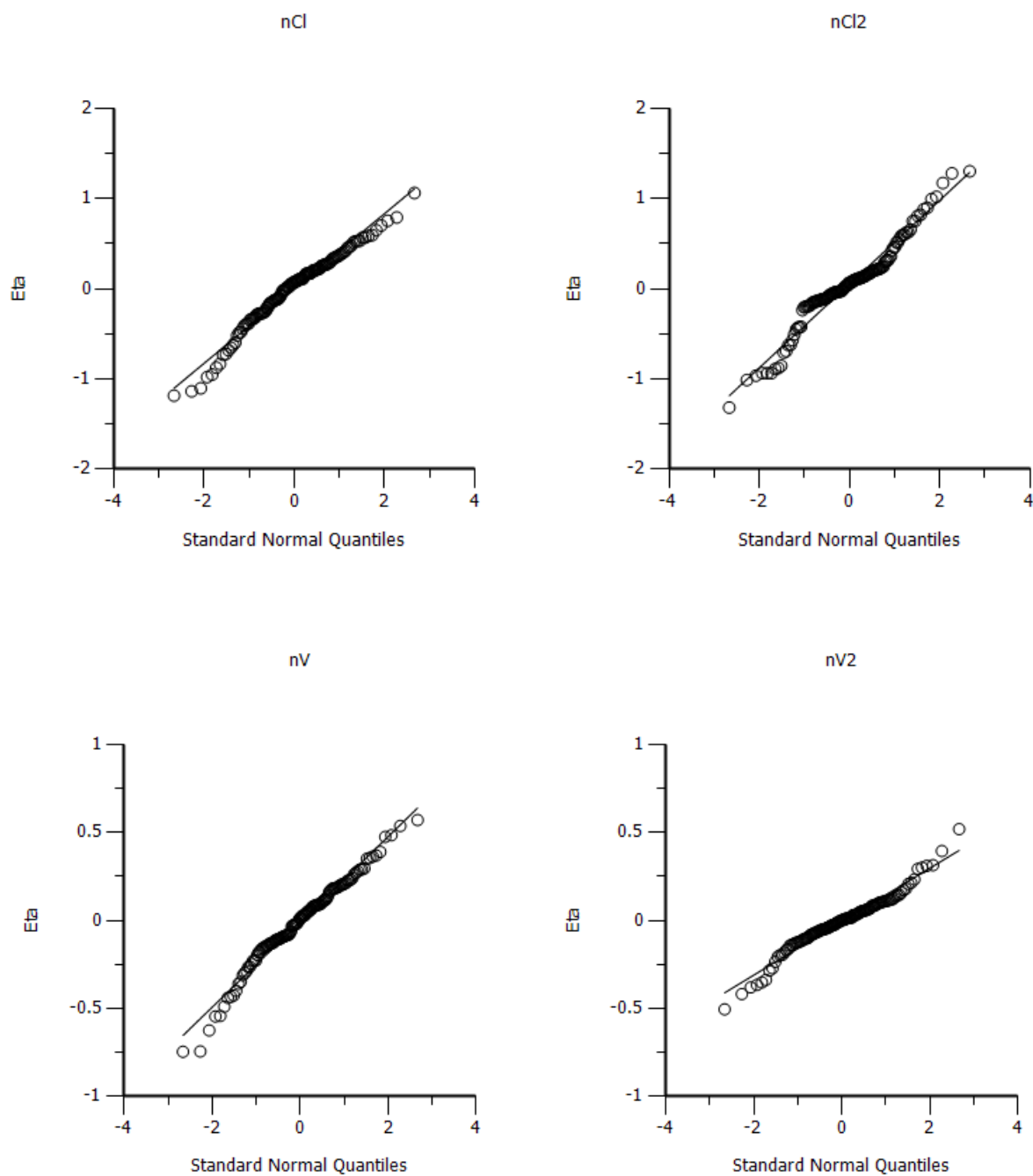
Cl_Obs : clairance plasmatique ; HL : temps de demi-vie plasmatique ; MRT : temps moyen de résidence ; Vss : volume de distribution à l'équilibre ; Cl, MRT et Vss ont été calculés du temps 0 à l'infini

Annexe 7 : Statistiques descriptives pour les 4 paramètres pharmacocinétiques estimés par une analyse non compartimentale en fonction du statut.

Variable	Statut	N	Mean	SD	Min	Median	Max	CVPercent
Cl_obs	Témoin	61	0.267	0.076	0.109	0.263	0.544	28.5
Cl_obs	Hospitalisé	70	0.229	0.109	0.035	0.207	0.653	47.5
HL_Lambda_z	Témoin	61	5.248	0.949	3.094	5.182	8.908	18.1
HL_Lambda_z	Hospitalisé	70	7.024	6.835	3.510	5.342	60.393	97.3
MRTINF_obs	Témoin	61	6.409	1.355	3.557	6.244	11.780	21.1
MRTINF_obs	Hospitalisé	70	9.405	10.416	3.904	7.152	90.989	110.7
Vss_obs	Témoin	61	1.653	0.380	0.746	1.628	3.292	23.0
Vss_obs	Hospitalisé	70	1.687	0.460	0.813	1.646	3.211	27.3

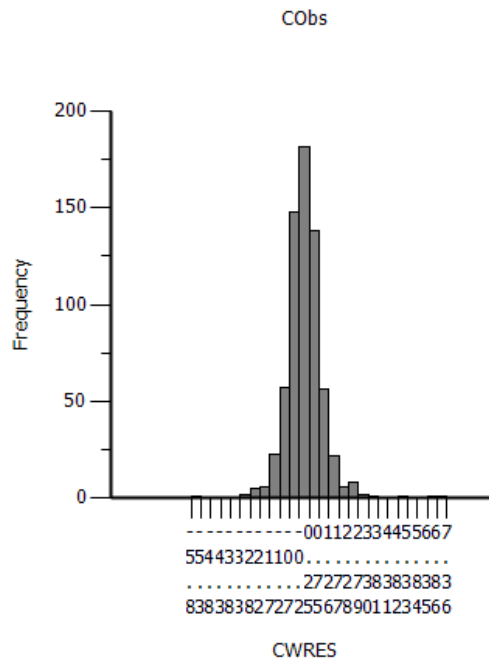
Cl_Obs : clairance plasmatique ; HL : temps de demi-vie plasmatique ; MRT : temps moyen de résidence ; Vss : volume de distribution à l'équilibre ; Cl, MRT et Vss ont été calculés du temps 0 à l'infini.

Annexe 9 : Diagramme des Quantile-Quantile (ou Q-Q plot) des étas.



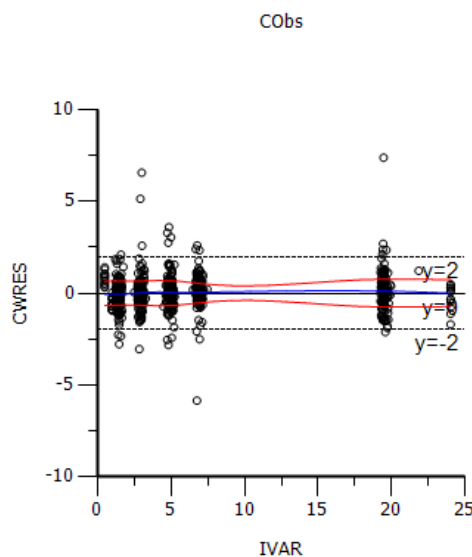
Ces graphiques permettent d'évaluer la pertinence de l'ajustement des distributions des étas à une distribution normale en comparant les quantiles dans la population observée avec leur position dans la population théorique.

Annexe 10 : Histogramme des résidus pondérés conditionnels (CWRES) (Conditional weighted residual)



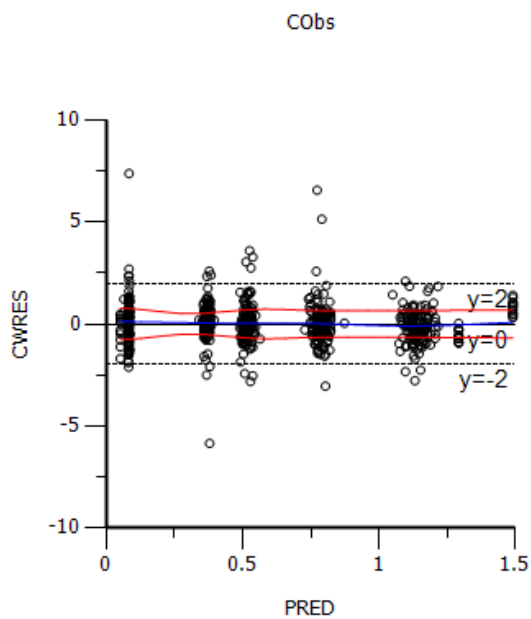
Les CWRE doivent suivre la loi normale centrée réduite $N(0,1)$. Les CWRES sont calculés lorsque la méthode d'optimisation est de type FOCE (first-order with conditional estimation) comme étant la différence entre une concentration observée et sa valeur prédite sous le modèle divisée par la racine de la covariance des données (c'est-à-dire la SD des données).

Annexe 11 : Diagramme de la dispersion des résidus pondérés conditionnels (CWRES) vs. la variable indépendante (IVAR) i.e. le temps.



Les valeurs attendues des CWRES sont $N(0,1)$ et doivent se trouver majoritairement situées entre les lignes $Y= +2/-2$; ce diagramme permet de juger de l'adéquation du modèle de structure et du modèle de l'erreur résiduelle.

Annexe 12 : Diagramme de la dispersion des résidus pondérés conditionnels (CWRES) vs. Les valeurs de concentrations prédites par le modèle de population (PRED) c'est à dire en fixant les étas à 0.



Les valeurs attendues des CWRE sont $N(0,1)$ et partant elles doivent se trouver majoritairement et harmonieusement réparties entre les lignes $Y=+2/-2$. Ce diagramme permet de juger de l'adéquation du modèle de structure et du modèle de l'erreur résiduelle.

Toulouse, 2014

NOM : CAZAJEUX

PRENOM : Lorelei

TITRE : Usage prudent d'une fluoroquinolone de troisième génération dans le cadre de la cascade : le cas de la marbofloxacin chez le cheval documenté par un modèle de population et des simulations de Monte Carlo

RESUME : La marbofloxacin est un antibiotique de la famille des quinolones, déjà utilisé par les vétérinaires dans le traitement de diverses infections chez le cheval, mais il ne dispose pas d'AMM pour cette espèce. L'objet de cette thèse était de vérifier l'efficacité des posologies utilisées sur le terrain et d'identifier les cutoffs pharmacocinétiques-pharmacodynamiques pour cette substance.

Dans une première partie bibliographique, nous avons fait état des connaissances sur la cinétique et les effets de la marbofloxacin chez le cheval. Nous avons de plus présenté l'intérêt des études pharmacocinétiques de population dans l'adaptation de posologie.

Dans une partie expérimentale, une étude pharmacocinétique de population a été réalisée sur 131 chevaux afin d'identifier les caractéristiques individuelles influençant les concentrations plasmatiques en marbofloxacin. Une simulation de Monte Carlo a ensuite permis d'évaluer l'efficacité des traitements mis en place face aux germes équin.

Il a ainsi été montré que la posologie utilisée sur le terrain de 2mg/kg permet de couvrir tous les cas d'infections par des bactéries à Gram négatif. En effet, tous les chevaux atteignent pour ces germe un rapport ASC/CMI cible de 72h. Pour les bactéries à Gram positif, une dose journalière de 39mg/kg serait nécessaire pour couvrir 90% des cas, dose non envisageable car d'importants effets secondaires sont déjà observés à la dose de 10mg/kg. Ainsi une antibiothérapie empirique à la dose de 2mg/kg est envisageable uniquement dans le cas où l'implication d'un germe à Gram négatif est suspectée.

MOTS CLES : CHEVAL, MARBOFLOXACINE, PHARMACOCINETIQUE, PHARMACODYNAMIQUE, POPULATION

ENGLISH TITLE : Wise use of a third-generation fluoroquinolone in the prescribing cascade : the case of marbofloxacin in horses documented with a population pharmacokinetics model and Monte Carlo simulations.

ABSTRACT : Marbofloxacin is a fluoroquinolone antibiotic drug, already used by veterinarians to treat several type of infections in horses, but it is not yet approved for use in horses. The aim of this study was to verify whether the dosage regimen used in the field is effective against bacteria found in horses and to identify pharmacokinetic-pharmacodynamic cutoffs for marbofloxacin in horses.

Based on review of literature, kinetics and effects of marbofloxacin in horses have been reported. Usefulness of population pharmacokinetics in dosage regimen design was also presented.

In an experimental study, Population pharmacokinetic of marbofloxacin was investigated on 131 horses to identify individual characteristics that influence plasmatic concentrations in marbofloxacin. A Monte Carlo simulation was then performed to assess treatments efficiency against bacteria found in horses.

The study brought out that a dosage regimen of 2mg/kg, as used in the field, is adequate against Gram-negative bacteria. Indeed, 100% of horses reached an AUC/MIC ratio of 72h. As for Gram-positive bacteria, a dosage regimen of 39mg/kg would be required to cure 90% of the horses. Such a dose can't be used, as important toxic effects were observed on horses that received 10mg/kg. Therefore, empirical antibiotherapy can be performed with a dosage regimen of 2mg/kg only in case of an infection where a Gram-negative bacterium is suspected.

KEY-WORDS : HORSE, MARBOFLOXACIN, PHARMACOKINETICS, PHARMACODYNAMICS, POPULATION