
ÉVALUATION EXPÉRIMENTALE CHEZ LA BREBIS DES QUALITÉS MÉTROLOGIQUES DES MÉTHODES ÉCHOGRAPHIQUE ET ANATOMOPATHOLOGIQUE MACROSCOPIQUE POUR LA QUANTIFICATION DES LÉSIONS MUSCULAIRES IATROGÈNES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Jean-François VACHER

Né, le 21 avril 1975 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Hervé LEFEBVRE**

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Jacques RAILHAC

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Hervé LEFEBVRE
Mlle Armelle DIQUELOU

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

MEMBRE INVITE :

M. Pierre FERRÉ

Docteur vétérinaire

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	: M.	G. BONNES
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	R. LAUTIE
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **HAY Magali**, *Zootchnie*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **MARENDI Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A notre jury,

Monsieur le Professeur RAILHAC
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Radiologie

*Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse
Hommage respectueux*

Monsieur le Professeur LEFEBVRE
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Physiologie et thérapeutique

*Qui nous a guidé tout au long de la réalisation de cette étude
Pour sa disponibilité et sa gentillesse lors de ce travail ou même avant celui-ci
Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance*

Madame le Docteur DIQUELOU
Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores

*Qui a aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse
Sincères remerciements*

Nous tenons tout particulièrement à remercier Pierre FERRE pour son amitié, son soutien et son optimisme inconditionnel, aussi bien lors de la réalisation de ce travail que dans le projet qui l'a précédé.

Qu'il soit assuré de notre gratitude et de notre amitié.

*A mes parents,
A ma sœur,
A ma famille,
A mes amis,*

A Carole,

Pour leur soutien et leurs encouragements de tous les instants.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	14
1. L' ADMINISTRATION INTRAMUSCULAIRE : UNE VOIE TRÈS EMPLOYÉE -----	14
2. LES ÉCUEILS-----	15
2.1 <i>Aspects éthiques</i>	15
2.2 <i>Aspects économiques</i>	16
2.3 <i>Aspects sanitaires</i>	17
3. LES FACTEURS DE VARIATION DE LA TOLÉRANCE MUSCULAIRE-----	18
3.1 <i>Produit injecté</i>	19
3.2 <i>Mode d'injection, espèce cible et site d'injection</i>	20
4. LES MOYENS D'ÉTUDE ACTUELS DE LA TOLÉRANCE MUSCULAIRE-----	22
4.1 <i>En pratique</i>	22
4.2 <i>Les axes de recherche</i>	24
5. LES PRINCIPES DE L'ÉCHOGRAPHIE -----	26
5.1 <i>Principes physiques</i>	26
5.2 <i>Principes de fonctionnement</i>	27
5.3 <i>Interactions entre tissus et ultrasons</i>	30
MATERIELS ET METHODES	34
1. ANIMAUX-----	34
2. PRODUIT INJECTÉ -----	34
3. ECHOGRAPHE ET ACCESSOIRES-----	34
4. OPÉRATEURS-----	35
5. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL -----	35
5.1 <i>Standardisation des administrations IM</i>	35
5.2 <i>Etude du développement des lésions</i>	36
5.2.1 <i>Examen échographique sur animaux vivants</i> :.....	36
5.2.2 <i>Mesures post-mortem</i> :.....	36
5.3 <i>Méthodes de traitement des résultats</i>	37
5.3.1 <i>Méthode échographique</i>	38
5.3.2 <i>Méthode macroscopique directe</i>	39
5.3.3 <i>Comparaison des méthodes macroscopique directe et échographique à la méthode de référence</i>	41
RESULTATS.....	43
1. SUIVI CLINIQUE DES ANIMAUX -----	43
2. EVALUATION ÉCHOGRAPHIQUE QUALITATIVE DES LÉSIONS MUSCULAIRES-----	43
3. EVALUATION ÉCHOGRAPHIQUE QUANTITATIVE DES LÉSIONS MUSCULAIRES -----	45
4. EVALUATION MACROSCOPIQUE QUALITATIVE DES LÉSIONS MUSCULAIRES-----	50
3.1 <i>Sensibilité et Spécificité</i>	50
3.2 <i>Identification du type lésionnel</i>	50
5. EVALUATION MACROSCOPIQUE QUANTITATIVE DES LÉSIONS MUSCULAIRES-----	53
DISCUSSION	56
1. JUSTIFICATION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL -----	56
1.1 <i>Animaux</i>	56
1.2 <i>Produit injecté</i>	56

1.3 Site d'injection.....	57
2. ANALYSE DES RÉSULTATS-----	58
CONCLUSION.....	63
BIBLIOGRAPHIE.....	65
ANNEXES.....	69
1. TERRAMYCINE® LONGUE ACTION -----	69
2. TEXTES RELATIFS AUX ÉTUDES SUR LA TOLÉRANCE LOCALE (MUSCULAIRE)-----	70
<i>EMEA</i>	70
<i>FDA</i>	73
3. SUIVI ÉCHOGRAPHIQUE DE L' AIRE DE MUSCLE LONGISSIMUS DORSI MODIFIÉ APRÈS ADMINISTRATION IM DE 5 ML D'UNE FORMULATION D'OXYTÉTRACYCLINE LONGUE ACTION POUR LES DEUX PÉRIODES EXPÉRIMENTALES, POUR LES BREBIS B, C, D ET E (LA BREBIS A EST PRÉSENTÉE DANS LES RÉSULTATS P. 44)-----	76

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Définition axiale -----	29
Figure 2 : Ondes réfléchies et ondes transmises -----	31
Figure 3 : Réfraction-----	33
Figure 4 : Suivi échographique des sites d'administration-----	44
Figure 5 : Coefficient de détermination entre mesures échographiques et mesures de références -----	48
Figure 6 : Comparaison entre mesures échographiques et mesures de références-----	49
Figure 7 : Fréquence des types lésionnels en fonction de l'ancienneté des lésions -----	52
Figure 8 : Répartition de l'indice de reproductibilité -----	54
Figure 9 : Répartition de l'indice de répétabilité-----	55

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concordance entre la méthode macroscopique directe et la méthode de référence pour la détection des lésions -----	51
--	----

INDEX DES DOCUMENTS

Doc. 1 : Clichés échographiques du muscle Longissimus dorsi avant toute administration IM -----	46
Doc. 2 : Clichés échographiques du muscle Longissimus dorsi 6 jours après l'administration IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action. -----	47

INTRODUCTION

Que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, les administrations parentérales sont fréquemment utilisées. Parmi elles, la voie intramusculaire tient une place très importante. Ce succès peut s'expliquer par les avantages qu'elle possède vis à vis des autres voies d'administration, que ce soit sur le plan pratique ou pharmacocinétique.

Cependant, des problèmes de tolérance locale se posent fréquemment.

Les effets secondaires observés présentent des implications diverses :

- Ethiques, chez l'homme et les animaux de compagnie principalement, de par la douleur et les lésions potentiellement générées au point d'injection.
- Economiques, chez les animaux de rente, en raison de la formation de lésions musculaires iatrogènes entraînant le déclassement voire la saisie partielle ou totale des pièces concernées.
- De santé publique, en augmentant la teneur en résidus du principe actif au site d'injection.

Pour toutes ces raisons, il est indispensable d'améliorer la tolérance locale des produits destinés à ce mode d'administration.

Actuellement, les industries pharmaceutiques, pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM), doivent évaluer la tolérance du produit par un examen anatomopathologique macroscopique qualitatif ou au mieux semi-quantitatif, éventuellement complété d'une analyse histologique. Cette méthode nécessite l'euthanasie d'un grand nombre d'animaux, ce qui est coûteux et critiquable éthiquement.

Face à ce constat, il semblait logique de rechercher une méthode quantitative et non invasive, permettant de standardiser les résultats et d'améliorer les caractères éthiques et économiques de ce type d'études.

A ce stade, notre choix s'est porté sur l'échographie. En effet, ce mode non invasif d'imagerie médicale, est adapté à l'étude des tissus mous et présente une mise en œuvre simple ainsi qu'un coût matériel raisonnable. Enfin ce type d'examen permet une approche quantitative par la réalisation de mesures sur les éléments observés.

Après un rappel des données de la littérature sur la tolérance locale des produits injectés par voie intramusculaire, nous présenterons les résultats d'une étude expérimentale. Cette dernière a pour buts l'évaluation de la méthode macroscopique directe actuellement utilisée et de l'outil échographique, dans l'appréciation des lésions musculaires au point d'injection. Deux séries d'administrations IM ont été réalisées à 22 jours d'intervalle sur cinq brebis, permettant d'obtenir des lésions anciennes et récentes lors de l'euthanasie des animaux. Les sites d'injection ont été étudiés par échographie, sur les animaux vivants, puis par une méthode anatomopathologique macroscopique. Sur le plan quantitatif, les résultats ont été comparés à ceux obtenus par planimétrie assistée par ordinateur, méthode choisie comme référence.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'administration intramusculaire : une voie très employée

L'administration intramusculaire (IM) possède plusieurs avantages qui ont fait son succès. Sa facilité de réalisation et sa rapidité d'exécution en font un mode d'administration très bien adapté à la pratique courante. Au-delà de cet aspect purement technique, l'IM permet d'obtenir une très bonne biodisponibilité, presque totale, comme celle de l'administration intraveineuse, pour de nombreux produits. Elle permet d'administrer une dose précise, ce que n'autorise pas la voie orale par exemple, en raison du caractère très variable de l'absorption digestive ou encore de l'effet de premier passage hépatique. Enfin, d'un point de vue pharmacocinétique, la variété des formes galéniques proposées pour ce type d'administration, donne au clinicien la possibilité de jouer sur la rapidité d'action du produit qu'il injecte ainsi que sur sa durée d'action (formulation « à effet retard » par exemple).

Tous ces points forts ont fait de l'administration IM un des modes d'administration les plus utilisés en médecine humaine et vétérinaire.

Une étude réalisée par le « Boston Collaborative Drug Surveillance Program » [20], portant sur 26 294 personnes hospitalisées, mentionne que 46 % des patients ont reçu au moins une administration IM durant leur traitement.

Dans le domaine vétérinaire, une telle base de données n'existe pas, mais le succès de l'administration IM peut s'estimer de façon indirecte par les lésions observées aux sites courants d'injections lors d'autopsies ou à l'abattoir. Cette approche sous-estime sans doute la réalité. En effet, les lésions les plus anciennes ont pu disparaître et les lésions les plus minimes ou les plus profondes peuvent ne pas être décelées.

2. Les écueils

Des séquelles ou des effets secondaires sont fréquemment observés suite à des administrations IM. Différents types de conséquences peuvent alors être envisagés.

2.1 Aspects éthiques

Que se soit chez l'homme ou chez l'animal, un éventail extrêmement large de réactions a été décrit suite à des administrations IM.

L'étude que nous avons déjà citée plus haut [20] mentionne que des réactions locales ont été attribuées à l'administration IM de médicaments pour 48 patients, soit 0.4 % des 12 134 personnes ayant reçu au moins une IM. Sur ces 48 manifestations, 23 sont apparues dans les deux jours suivant l'injection. Les réactions les plus fréquentes ont été :

- la formation d'un abcès (31 %),
- une induration locale, un érythème ou un œdème (25 %),
- une douleur persistante au point d'injection (23 %),
- l'apparition d'un hématome (12.5 %),
- un saignement (4 %),
- la persistance d'un nodule au point d'injection (4 %).

Bien que bénignes en général, ces complications ont entraîné l'arrêt du traitement pour 22 des 48 patients concernés.

Une autre étude [4] rapporte 11 cas de contractures du triceps chez des enfants de 6 à 13 ans ayant subi des administrations IM répétées. Cette même étude précise que si ce muscle est rarement concerné par ce type de manifestations, ce n'est pas le cas des quadriceps ou des deltoïdes, beaucoup plus fréquemment touchés. Cette différence tient uniquement au fait que le triceps n'est pas un site très employé pour les administrations IM chez l'homme.

Actuellement, une pathologie émergente en médecine humaine, la myofasciite à macrophages [11-13], provoquant des myalgies diffuses, des arthralgies, un syndrome fébrile et de l'asthénie, voire même des symptômes neurologiques, a été récemment identifiée comme étant une séquelle de l'administration IM de vaccins contenant de l'aluminium [3].

Enfin un dernier article [45] décrit chez le porc des troubles neurologiques liés à l'extension d'un phénomène inflammatoire jusqu'aux structures nerveuses voisines, suite à des administrations IM. Sur un groupe de 180 animaux ayant reçu, à l'âge de quatre semaines, une administration IM d'antibiotique longue action (non cité dans l'article), dans la cuisse droite, 150 ont développé en une à huit semaines, une paralysie du membre correspondant. Sur un autre lot de 380 porcs ayant reçu, à l'âge de cinq semaines, une administration de vaccin dans la cuisse, 30 % ont présenté une paralysie du membre dans les 10 jours qui ont suivi.

De nombreux autres articles [1, 14, 15, 18, 25, 27, 30, 31, 33, 37, 38, 44, 47] mentionnent sans plus de détails, diverses réactions suite à des administrations IM. Ainsi, on peut dire que les administrations IM s'avèrent souvent douloureuses. Suite à ces administrations, de nombreuses réactions locales peuvent également survenir, depuis le simple œdème jusqu'à la nécrose et l'abcédation du site, en passant par la contracture ou la formation d'hématomes par exemple.

Cependant, au-delà de l'aspect purement médical, le plus souvent bénin, du moins à court terme, se pose dans le domaine vétérinaire le problème économique lié à ces effets indésirables.

2.2 Aspects économiques

Chez les animaux de rente, la dimension économique est primordiale. Les effets délétères des administrations IM peuvent avoir des répercussions majeures en dévaluant la viande ou en occasionnant la saisie partielle ou totale des pièces concernées ou éventuellement en termes de ralentissement de la croissance musculaire. A long terme, les complications peuvent même entraîner une mortalité élevée.

Chez le porc [45], un taux de mortalité entre 30 et 40 % a été décrit suite à des phénomènes septiques tels que des pneumonies et des septicémies, issus de plaies occasionnées sur les membres paralysés. A ces pertes se rajoutent la dépréciation des carcasses et les retards de croissance pour les survivants.

Une autre étude [18] chez le bovin s'intéresse directement à l'impact économique. L'auteur analyse la taille des lésions trouvées sur les différentes

parties musculaires nobles et la masse de muscle parée et saisie à l'abattoir. La perte est estimée à plus de deux millions de dollars pour la seule année 1995 pour l'industrie de la viande aux Etats Unis. Ce résultat englobe les saisies et la dépréciation de la viande estimée propre à la consommation, mais de qualité organoleptique moindre.

Une dernière étude [46], plus récente, concerne 220 veaux ayant reçu des administrations IM ou sous-cutanée (SC) au niveau de la croupe, de la cuisse, du cou, ou des côtes, à la naissance, au marquage ou au sevrage. Les substances administrées étaient : 2 préparations de sélénium, une bactérine clostridiale, 2 combinaisons de bactérines clostridiales et d'*Haemophilus somnus*, 2 bactérines d'*H. somnus* ainsi qu'une formulation de pénicilline, de florfénicol, de ceftiofur, de triméthoprime-sulfa ou de tilmicosin. Les pertes économiques estimées sur la base de la quantité de tissus parés et de la dévaluation de la viande pouvaient aller jusqu'à \$14,53 par site d'injection.

Là encore, d'autres études dont l'aspect économique n'est pas le sujet principal mentionnent tout de même les pertes occasionnées par les séquelles d'administrations IM [17, 24, 27, 30, 32, 33, 37, 47].

2.3 Aspects sanitaires

Le dernier aspect a trait aux conséquences potentielles pour la santé publique.

Certains auteurs [32, 33], en effet, évoquent une corrélation entre le taux d'irritation et d'inflammation et la persistance de résidus au site d'injection. Après avoir injecté différentes formulations d'oxytétracycline à des porcs, des moutons et des veaux, les auteurs ont étudié l'importance de l'irritation locale au bout de 10 jours ainsi que l'existence de résidus dans les organes, les muscles, le plasma, les urines, la graisse et sur le site d'injection. Une des conclusions de ces études est que la teneur en résidus est liée à l'ampleur de la réaction inflammatoire locale, cette dernière variant d'une espèce à l'autre et selon la formulation du produit (concentration, excipient).

Une autre étude [47] nuance le même type de conclusions par l'existence d'autres effets tels que celui du site d'injection. Quatre bovins de boucherie ont reçu des administrations IM d'oxytétracycline au niveau du cou et de

la cuisse 28 jours avant leur abattage. L'auteur conclut que la taille des lésions n'est pas corrélée à la teneur en résidus dans le cou mais qu'elle l'est dans la cuisse.

On peut donc dire que la tolérance locale d'un produit injecté par voie IM détermine en partie la teneur en résidus au point d'injection au cours du temps.

Toutes ces implications, qu'elles soient éthiques, économiques ou de santé publique, ont même poussé certains auteurs à rechercher des voies d'administration de substitution. La voie SC a notamment été proposée.

Dans une première étude [15] une formulation d'oxytétracycline a été injectée à 14 veaux soit par voie IM soit par voie SC. Les auteurs observent alors que les différents paramètres pharmacocinétiques ne varient pas d'une voie d'administration à l'autre. Par contre, le suivi des concentrations sériques en créatine kinase (CK) et en glutamooxaloacetictransaminase (AST ou Aspartate transaminase) entre 0 et 30 heures après l'administration semble traduire une meilleure tolérance locale pour la voie sous-cutanée.

Dans une autre étude [29] des veaux ont reçu des injections d'ampicilline ou d'amoxicilline, en différents sites, par voie IM ou SC. L'auteur observe alors les valeurs moyennes des pics sériques en antibiotiques ainsi que les valeurs moyennes des AUC des deux produits. Il conclut que la biodisponibilité des produits injectés varie avec le site d'injection dans des proportions équivalentes pour les deux voies. Il remarque également que la biodisponibilité de la voie SC n'est pas inférieure à celle de la voie IM.

A l'heure actuelle, la voie SC n'a pas encore supplanté l'IM et de nombreux produits sont administrés en IM. L'étude de leur tolérance locale est donc indispensable. Elle impose, dans un premier temps, l'identification des différents facteurs pouvant entraîner des variations sur les réactions locales.

3. Les facteurs de variation de la tolérance musculaire

De nombreuses études ont montré que divers facteurs pouvaient influencer la tolérance locale d'un produit injecté par voie IM. Deux groupes peuvent se distinguer, le premier ayant trait au produit injecté en lui-même et le

second concernant le mode d'injection, l'espèce qui la reçoit et le site choisi pour sa réalisation. On peut retrouver tous ces facteurs dans des revues bibliographiques [26, 38, 42].

3.1 Produit injecté

Que ce soit chez l'homme ou l'animal, des différences de tolérance locale ont pu être remarquées lors de l'utilisation de divers produits.

En milieu hospitalier [20], certains médicaments apparaissent plus souvent impliqués dans les complications locales au point d'injection que d'autres. Par exemple, la céfalotine ou les tétracyclines entraînent respectivement 10.8% et 8.0% de complications locales alors que la mépéridine ou la prochlorpérazine n'en provoquent que 0.2% et 0.1%.

Chez le porc [30], l'injection IM de plusieurs produits couramment utilisés (Terramycine, Engémicine, Glovécicol, Dépocilline, Vécorténol, Stresnil, Imposil, Ocytocine, Tylan et Duoprim) a permis d'observer des manifestations inflammatoires diverses. La Terramycine, le Glovécicol et l'Engémicine se sont avérés beaucoup plus irritants que les autres médicaments.

Chez les bovins [37], des administrations IM d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : phenylbutazone, flunixin, métamizole et kétoprofène, ont montré sur la base de l'activité sérique en créatine kinase que les deux premiers AINS entraînaient plus d'irritations que les deux autres.

Ainsi, certains principes actifs sont reconnus comme étant très irritants. C'est le cas par exemple des vitamines A, D3, E, ou encore des tétracyclines [38].

Cependant, on peut remarquer que pour un même principe actif, selon la formulation, la tolérance locale sera différente.

Les principaux facteurs sont la concentration du principe actif et le volume de produit injecté (les deux variant de façon inversement proportionnelle). L'injection à des porcs de médicaments contenant de l'oxytétracycline à des concentrations de 10 ou 20%, a conduit à la conclusion que les produits les plus concentrés entraînaient les lésions les plus importantes [32]. D'un autre côté Svendsen [42] mentionne qu'un petit volume d'une solution très concentrée de zuclopenthixol, provoquait moins de lésions qu'un volume plus important d'une solution moins concentrée du même produit. Il semble donc que selon le principe

actif, la concentration de ce dernier ou le volume de solution injecté soit prédominant dans la détermination de la tolérance locale.

Les médicaments injectables contiennent également un excipient ayant pour but de faciliter ou de moduler la vitesse d'absorption du principe actif.

Dans l'étude de Rasmussen [38] différents excipients ont été injectés à des porcs, des lapins et des poules: propylène glycol, éthanol, phosphate de sodium, glycérol formaldéhyde, acide citrique, eau distillée ou soluté physiologique. Il ressort de cette expérience que le glycérol formaldéhyde et le propylène glycol entraînent les lésions musculaires les plus importantes.

Dans une autre étude, Nouws et coll.[33] en comparant différentes formulations d'oxytétracycline, ont observé pour deux formulations à 10 %, que l'irritation locale et les lésions musculaires étaient beaucoup plus importantes pour le produit dont l'excipient était du glycérol formaldéhyde que pour celui contenant de la polyvinylpyrrolidone.

C'est donc bien le couple principe actif-excipient, c'est à dire l'ensemble de la formulation, qu'il faut prendre en compte pour évaluer la tolérance d'un médicament.

D'autres paramètres d'importance moindre ont été étudiés, tel que l'osmolarité ou encore le pH du produit injecté.

3.2 Mode d'injection, espèce cible et site d'injection

Le mode d'injection comprend le type de matériel utilisé et la vitesse d'injection.

Une étude [47] s'est intéressée à la différence de tolérance qui pouvait exister entre une injection manuelle classique et une injection réalisée à l'aide d'un fusil lance-fléchettes. Des bovins ont reçu des administrations IM d'oxytétracycline dans l'encolure ou la cuisse, par ces deux modes opératoires, 28 jours avant abattage. L'auteur n'a pas mis en évidence de différence significative entre ces deux méthodes d'injection, en ce qui concerne la fréquence d'apparition des lésions. Par contre la taille des lésions était supérieure pour les administrations manuelles, alors que les produits étaient injectés sous une pression inférieure à celle appliquée par les fléchettes. L'auteur nuance cette observation par le fait que la contention des animaux était difficile lors des administrations manuelles.

Dans une autre étude [42], Svendsen analyse l'étendue des lésions musculaires provoquées par l'administration IM d'un soluté de chlorure de sodium 0,9% à des vitesses de 0,1 et 1 ml/sec. Il conclut que l'hémorragie locale traduisant l'ampleur de la lésion est équivalente pour les deux vitesses avec une légère tendance à être plus marquée pour la vitesse la plus rapide. Il montre également que l'administration IM d'un produit connu pour sa mauvaise tolérance locale intrinsèque à des vitesses allant de 0,03 à 1 ml/sec provoque des lésions équivalentes. Cependant, il mentionne une différence statistiquement significative entre les vitesses faibles (0,03 ; 0.1 ml/sec) et les vitesses élevées (0,3 ; 1 ml/sec).

Il semble donc que le mode et la vitesse d'injection n'aient pas un rôle prédominant sur la tolérance locale d'un produit administré par voie intramusculaire. Cependant, des vitesses rapides d'administration, de l'ordre de 1 ml/sec (pas si éloignée des vitesses rencontrées en pratique) peuvent aggraver les lésions.

En ce qui concerne l'espèce cible par contre, des variations importantes ont pu être notées.

Ladage et coll. [25] ont montré que le muscle quadriceps fémoral du rat ne représentait pas un bon modèle pour l'étude de la tolérance musculaire chez le mouton. En effet, il constate que la nécrose musculaire après injection de chloramphénicol est plus importante en réalité chez ce dernier que ce qui pouvait être prédit grâce aux lésions induites chez le rat. Il met également en évidence que l'effet bénéfique de la polyvinylpyrrolidone sur la tolérance locale de l'oxytétracycline chez le mouton n'est pas transposable à l'espèce porcine.

Dans une autre étude [43] la différence de tolérance locale pour deux produits injectés dans le muscle sacro-spinal est mise en évidence entre le chien et le lapin, sur la base d'examen macroscopiques et microscopiques des sites d'injection.

Nouws et coll. [33] après avoir injecté, dans l'encolure, différentes formulations d'oxytétracyclines à des moutons, des porcs et des veaux ont constaté des variations inter-spécifiques de tolérance locale, sur la base d'un examen anatomo-pathologique. Il conclut que l'étendue d'un phénomène inflammatoire au point d'injection ne peut pas être extrapolée d'une espèce à une autre.

Enfin plusieurs études se sont intéressées aux sites d'injection. Selon l'espèce, ces derniers ne sont pas les mêmes pour des raisons pratiques ou économiques et peuvent dans certains cas conduire à des administrations seulement partiellement intramusculaires comme cela est mentionné dans certains articles [14, 33].

Chez le chien, une étude [2] se base sur l'injection d'un produit radio-opaque en région cervicale, lombaire ainsi que dans les portions crâniales et caudales de la cuisse. Seules les injections réalisées en zone lombaire ou dans la portion crâniale de la cuisse se sont avérées entièrement intramusculaires. Dans les deux autres situations, une partie du produit a été retrouvée en position intermusculaire.

Chez le cheval [7] la meilleure probabilité de réaliser une administration intramusculaire stricte est obtenue, en région cervicale, entre le bord dorsal du muscle brachiocéphalique et le bord ventral du ligament nuchal, à hauteur de la cinquième vertèbre cervicale.

Etant donné le caractère multifactoriel de la tolérance locale d'un médicament administré par voie intramusculaire, ce paramètre nécessite encore aujourd'hui une étude spécifique lors de l'évaluation d'un nouveau produit.

4. Les moyens d'étude actuels de la tolérance musculaire

4.1 En pratique

Les industries pharmaceutiques, avant de commercialiser un nouveau produit injectable, sont tenues d'établir un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM), dont une partie est consacrée à l'évaluation de la tolérance locale. Pour les produits à administration IM, les réglementations en vigueur sont peu détaillées, que ce soit celles établies par la EMEA en Europe ou par la FDA aux Etats Unis (cf. annexes). Pour la première, une étude pilote sur animaux de laboratoire peut, par exemple, suffire dans la mesure où les réactions observées sont considérées comme bénignes. Dans le cas contraire, des études sur l'espèce cible doivent être entreprises et lorsque des réactions locales se manifestent cliniquement

et alors seulement, une étude nécropsique est effectuée, sur les sites d'injections. Un examen histologique n'est alors entrepris que si une lésion macroscopiquement visible est décelée. Or, comme nous venons de le voir, certains auteurs [33, 38, 43] ont montré que la tolérance locale d'un même produit variait d'une espèce à l'autre, rendant difficiles les extrapolations. Toutes ces études devraient donc être menées d'emblée sur les espèces cibles et non pas, seulement, sur animaux de laboratoire, comme cela est parfois le cas. La FDA demande quand à elle des études sur des animaux « représentatifs de l'espèce cible » et généralise les examens anatomopathologiques macroscopiques et microscopiques, sous réserves d'une traduction clinique d'intolérance au produit. Ces directives n'imposent, en fait, qu'un examen non systématique des sites d'injection, qualitatif ou au plus semi-quantitatif, par le biais d'une étude anatomopathologique macroscopique, éventuellement complétée d'une analyse histologique. Enfin, ces examens n'étant pas standardisés et reposant sur des scores définis par les opérateurs eux-mêmes, il peut exister toutes sortes de variations dans la réalisation et l'interprétation des tests. En effet il n'existe actuellement aucun guide de bonnes pratiques ou autre grille standard d'évaluation des lésions, qui assurerait une unité dans la réalisation et l'interprétation de ce type d'études.

D'un point de vue pratique, l'examen anatomopathologique impose de plus l'euthanasie d'un grand nombre d'animaux pour obtenir des résultats représentatifs. Si l'on veut obtenir une idée du développement de la réaction locale au cours du temps, il faut abattre des groupes d'animaux à différents temps après l'administration IM, ce qui multiplie le nombre d'animaux sacrifiés et le coût de l'étude. C'est pour cette raison que les études de tolérance sont couplées avec les études sur la persistance des résidus.

Au delà de cet aspect « matériel » se pose un nouveau problème éthique vis à vis des animaux en général et des espèces de compagnie en particulier, pour lesquelles l'euthanasie ne peut pas se justifier par la nécessité de rechercher les résidus dans la viande.

4.2 Les axes de recherche

Le but des études actuelles est de trouver un nouveau moyen d'évaluation de la tolérance locale, par le biais d'un outil :

- Non invasif, pour limiter le nombre d'euthanasies, voire, dans certains cas éluder totalement cette phase (animaux de compagnie) et pouvoir comparer différentes formulations sur les mêmes animaux.
- Quantitatif pour permettre une meilleure standardisation de ce type d'études et donner ainsi la possibilité de comparer les résultats de différents produits.
- Facile à mettre en œuvre pour pouvoir répéter l'examen aussi souvent que nécessaire et ainsi permettre une approche de la cinétique de la réaction locale.
- D'un coût abordable, permettant une application pratique.

Deux types d'approches sont classiquement retrouvés dans la littérature :

- La première, indirecte, consiste à trouver un « marqueur » sanguin spécifique des cellules musculaires et à étudier les répercussions d'une lésion musculaire sur sa concentration ou son activité plasmatique. Le choix se porte souvent sur la créatine kinase (CK). Cette méthode de calcul nécessite la connaissance de différents paramètres élémentaires : l'activité moyenne en CK dans le muscle concerné, la biodisponibilité de la CK à partir du muscle et sa clairance plasmatique. Une fois ces paramètres obtenus, la mesure des activités plasmatiques de CK après une administration IM permet de calculer l'équivalent de muscle lésé. De nombreuses études ont déjà ouvert cette voie [1, 27, 31, 44].
- La seconde, correspond à une approche plus directe de la lésion. En effet, la méthode classique, anatomopathologique, peut sans doute être avantageusement remplacée par une méthode non invasive d'imagerie médicale. A ce stade, le choix se porte naturellement sur l'échographie. En effet, cet outil est adapté à l'étude des tissus mous, contrairement à la radiographie par exemple et présente une facilité de mise en œuvre ainsi

qu'un coût matériel sans comparaison possible avec d'autres méthodes comme l'imagerie par résonance magnétique ou la scintigraphie. Enfin ce type d'examen permet de réaliser des mesures sur les éléments observés.

Certaines études sont très encourageantes; Kles et coll. [24] après avoir injecté une solution de triméthoprime et de sulfadoxine en région lombaire 3 et 32 jours avant abattage, respectivement à deux brebis, ont examiné les sites par échographie 2, 27 et 30 jours après l'injection puis ont comparé ces résultats à ceux obtenus macroscopiquement après abattage. Leurs conclusions sont que le muscle injecté apparaît très différent du témoin sain et que son estimation des dimensions des lésions est bien corrélée aux mesures directes.

Lehto [28] a provoqué chez des rats des ruptures partielles du muscle gastrocnémien et en a suivi l'évolution par échographie et par examen histologique. Il conclut à une bonne concordance des deux méthodes et à la valeur de l'échographie dans l'étude des lésions musculaires surtout en phase de début de cicatrisation.

Dans une autre étude [16] 120 athlètes souffrant d'un problème musculaire font l'objet d'un examen échographique et clinique. Une décision opératoire est prise sur les bases de l'examen clinique pour 25 d'entre eux. Sur ces 25 cas opérés, 21 avaient été correctement décrits par l'échographie. La chirurgie a confirmé l'absence de lésion chez cinq patients suspects cliniquement mais dont l'échographie était normale. Pour les autres cas, la description échographique des lésions était correcte à l'exception de quatre lésions dont la nature liquidienne ou solide était erronée. Les auteurs concluent donc que l'échographie est un outil fiable dans la détection de lésions musculaires même de petite taille et dans l'appréciation de leur nature.

De plus, les résultats obtenus dans différents domaines avec ce type de matériel, aujourd'hui très répandu, sont plus que favorables. Cauvin [10] insiste sur les qualités de l'outil échographique dans la détection précoce de pathologies articulaires voire osseuses. Hassen et coll. [21] ont montré les qualités de l'échographie dans la prédiction de la composition des carcasses avant abattage. Braun et coll. [8, 9], chez la vache, ont identifié la plupart des structures cervicales ventrales par échographie, ou atteint même des organes internes chez ces animaux

de grand format. Banting et Tranquart [5] ont étudié les modifications du parenchyme mammaire sur des vaches en lactation, chez lesquelles ils avaient induit une mammite à staphylocoques. Sur 30 vaches, la réaction inflammatoire a pu être identifiée au bout de 7 jours pour 40 % des quartiers infectés et au bout de 11 jours pour la totalité d'entre eux. Il a également observé par échographie la fibrose progressive des tissus sur les six semaines de son expérimentation. Les auteurs ont noté une corrélation entre l'examen bactériologique et les observations échographiques. Ils concluent que l'échographie pourrait, de la même façon, permettre le suivi non invasif de la réaction locale suite à une administration IM, voire permettre la description de la taille et de la nature de ces lésions.

Les bonnes performances de l'outil échographique dans tous ces secteurs d'activités ainsi que les résultats encourageants des études pilotes comme celle de Kles et coll., imposaient une étude plus approfondie.

5. Les principes de l'échographie

Le principe général de l'échographie est d'émettre des ultrasons puis de recueillir et d'interpréter les ondes qui se sont réfléchies sur les différents tissus rencontrés. Cette interprétation peut alors se traduire de différentes façons, comme par exemple, la formation d'une image sur un écran intégré à l'appareil [19, 34].

5.1 Principes physiques

Les ultrasons correspondent à des ondes de très haute fréquence. Cette dernière est exprimée en Hertz (Hz), 1 Hz correspondant à un cycle, une sinusoïde complète, par seconde. Pour des applications diagnostiques, par exemple, les appareils emploient des fréquences de 2 à 10 Méga-Hertz (MHz).

De même que les sons audibles, les ultrasons ne se propagent pas dans le vide et peu dans les gaz.

De cette notion découle une première remarque : il est indispensable d'assurer correctement la transmission des ultrasons de la sonde qui les émet au milieu que l'on veut étudier. En effet si la sonde est simplement posée sur la peau, il restera toujours une couche d'air, aussi fine soit elle qui gênera la propagation des ondes aussi bien lors de l'émission que de la réception et la qualité de l'image sera médiocre. Il est donc particulièrement important de bien préparer la zone de contact entre la sonde et la peau en éliminant les poils et en utilisant un gel échographique qui assure un contact uniforme et une bonne propagation des ultrasons.

Enfin, la propagation des ultrasons dans un milieu dépend de son impédance acoustique, qui est le produit de sa densité par la vitesse des ultrasons dans ce milieu. Or lorsque les ultrasons passent d'un milieu à un autre d'impédance acoustique différente, il se produit différents phénomènes, de réflexion, réfraction, diffraction et absorption, qui sont la base du principe de l'échographie.

5.2 Principes de fonctionnement

La sonde de l'échographe contient des cristaux piézo-électriques, qui ont la particularité de se déformer lorsqu'ils sont traversés par un courant électrique. Cette déformation se traduit par une vibration et l'émission d'ultrasons.

La fréquence de l'onde quant à elle, dépend principalement de la fréquence naturelle de résonance du cristal et de l'épaisseur de celui-ci. La fréquence est inversement proportionnelle à la longueur de l'onde, ce qui a des conséquences en terme de profondeur de propagation et de définition d'image. En effet, la sonde émet des impulsions de quelques ondes (2 à 6), donc plus la fréquence est élevée, plus l'impulsion est courte et plus la résolution axiale est bonne (c'est à dire la capacité à distinguer deux éléments alignés dans l'axe de propagation des ultrasons) mais les ultrasons pénètrent peu profondément dans les tissus car l'atténuation est plus marquée (cf. Figure 1).

La fréquence influe également sur la résolution latérale (c'est à dire la capacité à distinguer deux éléments alignés perpendiculairement à l'axe de

propagation des ultrasons). De plus la résolution latérale est meilleure pour une distance égale à la distance focale, c'est à dire, où le faisceau est le plus fin.

Les ultrasons émis par la sonde se propagent à travers les tissus et se réfléchissent en partie sur les différentes structures qu'ils rencontrent. Ces ondes réfléchies sont captées par les cristaux piézo-électriques, qui se déforment et l'appareil convertit cet effet mécanique en courant électrique. Dans notre cas, ce courant est traduit par un spot lumineux à l'écran, allant du blanc au noir selon l'intensité du faisceau réfléchi et dont la position dépend à la fois du temps mis pour revenir à la sonde (profondeur) et du cristal qui l'a capturé (latéralisation).

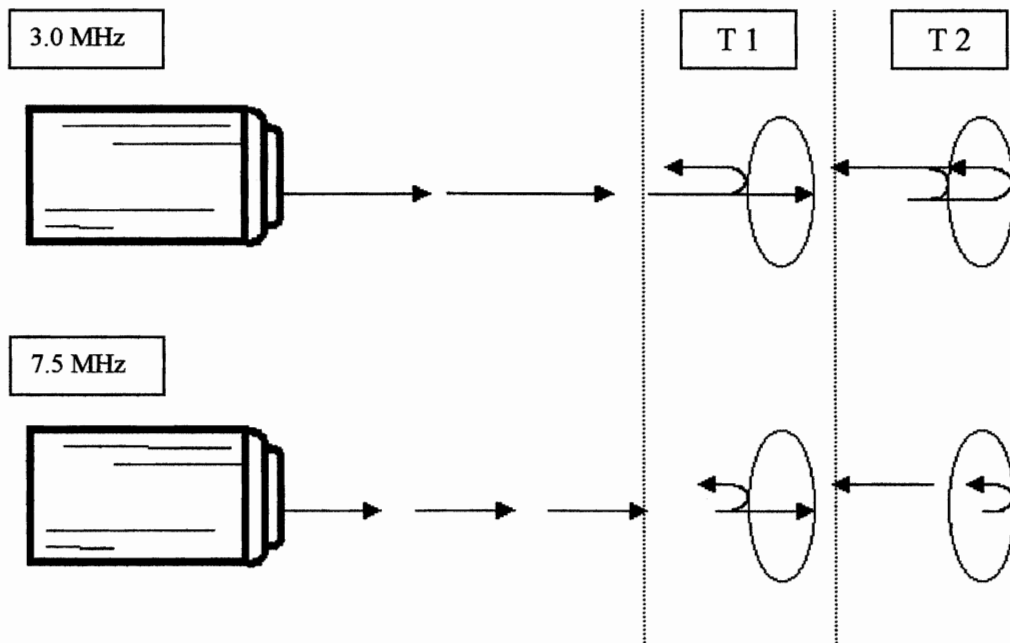


Figure 1 : Définition axiale (d'après [34]) :

La définition axiale correspond à l'aptitude de l'appareil à séparer deux éléments situés dans l'axe de propagation des ultrasons. La sonde délivrant des impulsions constituée de 2 à 6 ondes, plus la fréquence de ces ondes sera élevée plus l'impulsion ultrasonore sera courte. Dans notre exemple, pour une fréquence de 3.0 MHz, les ondes ultrasonores n'ont pas fini de se réfléchir sur la première interface alors que la partie des ondes transmises se réfléchit déjà sur la seconde. Les deux trains d'ondes vont donc se confondre lors de leur retour à la sonde et les deux interfaces ne seront pas séparées par l'appareil. Pour la fréquence de 7.5 MHz, l'impulsion est plus courte et les deux trains d'ondes qui se sont réfléchis respectivement sur l'une et l'autre des interfaces, reviennent séparément à la sonde. L'appareil donnera donc une image distincte des deux interfaces. Les ondes réfléchies par deux éléments proches ont donc plus de chances de revenir séparément jusqu'à la sonde et de donner deux images distinctes, lorsque la fréquence est élevée. Donc, plus la fréquence est élevée plus la définition axiale est bonne.

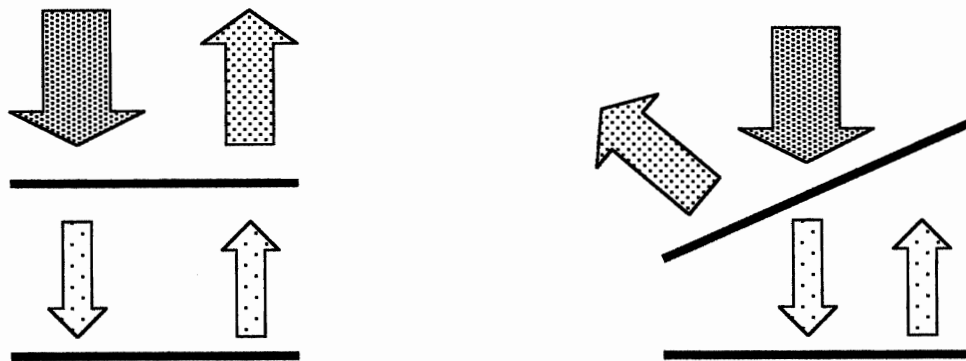
5.3 Interactions entre tissus et ultrasons

Pour permettre une bonne interprétation des faisceaux captés, il est important de connaître la nature des interactions entre tissus et ultrasons, afin de déterminer quelle part des ultrasons a été retournée. L'intensité de l'onde réfléchie dépend de plusieurs facteurs dont les différences d'impédances acoustiques entre les tissus traversés, l'angle avec lequel les limites de ces tissus sont rencontrées et la distance parcourue.

Lors du passage d'un milieu à un autre, d'impédance acoustique différente, une partie des ultrasons est réfléchi. Plus cette différence est importante, plus le ratio de réflexion augmente. Si la frontière entre les deux tissus est perpendiculaire à la direction des ultrasons, le faisceau réfléchi revient directement à la sonde, par contre s'il existe un angle, alors selon ce dernier, l'onde de retour peut être perdue. (Figure 2)

Au fur et à mesure des réflexions, la part d'ultrasons transmise, qui poursuit son parcours à travers les tissus est de plus en plus faible, c'est le phénomène d'atténuation. Ce dernier est également le fait de l'absorption qui correspond à la conversion d'une partie de l'énergie en chaleur et de la dispersion, qui correspond à l'éclatement du faisceau d'ultrasons sur de toutes petites structures. C'est ce dernier phénomène qui est à l'origine des caractères échographiques de tissus dits homogènes, comme le foie par exemple. En effet, si ces milieux étaient réellement homogène, ils ne donneraient lieu à aucun retour d'ultrasons et donc à aucune image, ou plutôt à une image noire.

Ce phénomène d'atténuation est pris en compte par l'appareil qui va amplifier le signal reçu de façon variable au cours du temps. Plus une onde met de temps à revenir à la sonde, plus son parcours a été long, le nombre de tissus rencontrés élevé et l'atténuation importante, ce que l'appareil compense par une amplification adaptée.






-  Faisceau ultrasonore incident issu de la sonde.
-  Partie du faisceau incident réfléchi sur la première interface.
-  Faisceau résiduel transmis à travers l'interface 1 et qui reste potentiellement utile pour visualiser les structures qui se trouvent derrière comme la deuxième interface par exemple.

Figure 2 : Ondes réfléchies et ondes transmises (d'après [19]) :

Lorsque le faisceau d'ultrasons rencontre une surface perpendiculaire à son axe de propagation, les ondes réfléchies retournent directement à la sonde en suivant le même trajet en sens inverse. L'interprétation est alors exacte. Par contre, si la surface rencontrée forme un angle avec l'axe de progression de l'onde, alors la partie réfléchi du faisceau peut être perdue ou provoquer des parasites lors de l'interprétation. Seule la partie résiduelle transmise reste potentiellement utile.

Enfin le dernier principe à connaître est celui de la réfraction qui peut entraîner des erreurs de localisation des structures rencontrées (Figure 3).

Pour s'affranchir de ce phénomène, il faut se placer dans une situation où les différentes surfaces rencontrées sont perpendiculaires à l'axe de propagation des ultrasons.

Dans notre cas, les ultrasons vont traverser la couverture de gras dorsal et le fascia du muscle *Longissimus Dorsi*. Toutes les interfaces seront donc perpendiculaires au faisceau d'ultrasons. Une fois dans le muscle, le but sera d'identifier des modifications de l'échogénicité, liées à d'éventuelles lésions. Pour cela il est important de connaître l'aspect échographique du muscle sain.

Fornage et coll. [16] affirment dans leur étude que tous les groupes musculaires donnent des images échographiques de même type. Une coupe longitudinale donne une image comportant de fines lignes obliques correspondant aux septa fibroadipeux. Ces derniers sont beaucoup plus échogènes que les fibres musculaires elles-mêmes. En coupe transversale, l'aspect échographique est moins homogène car les septa sont dispersés dans les faisceaux musculaires.

Dans une autre étude [48], on peut retrouver l'opposition entre l'hypoéchogénicité relative des fibres musculaires par rapport à l'hyperéchogénicité des septa fibroadipeux. Les auteurs mentionnent également le caractère strié des coupes longitudinales et l'aspect beaucoup moins homogène des coupes transversales qu'ils qualifient d'images en « ciel étoilé ».

Toute la difficulté de notre étude sera donc d'identifier des zones d'échogénicité modifiée dans un milieu plus ou moins homogène.

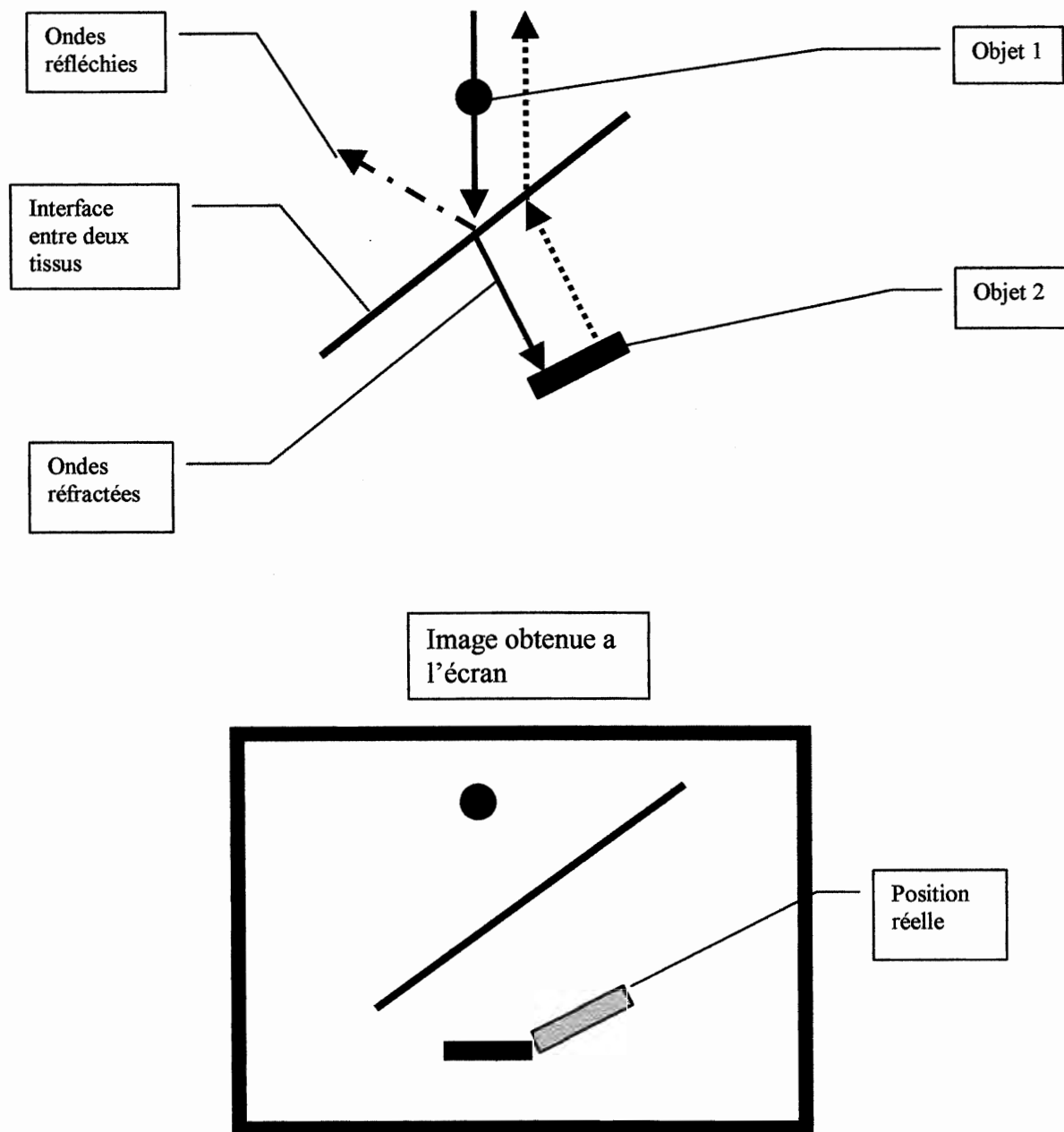


Figure 3 : Réfraction (d'après [19]) :

Le faisceau d'ultrasons est en partie réfléchi sur l'interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes. La part des ultrasons qui poursuit sa progression est réfractée, son axe de propagation est modifié. Par la suite, si l'onde se réfléchit sur une autre structure, les ultrasons retourneront vers la sonde en empruntant le même trajet en sens inverse (pour le cas où l'objet 2 est perpendiculaire à l'axe des ultrasons réfractés, comme dans l'exemple). Ainsi l'appareil analysera l'onde de retour comme si son axe de propagation n'avait jamais changé et placera l'objet 2 dans l'axe de l'objet 1.

MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

L'expérimentation a été menée sur cinq brebis pesant en moyenne 50 kg (50 ± 2.1 kg), logées à l'animalerie de l'Unité Mixte de Recherche de Physiopathologie et de Toxicologie expérimentales de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, après une période d'acclimatation d'un mois.

Chaque brebis recevait quotidiennement une ration composée de 1.2 kg de fourrage, 250 g d'aliment du commerce pour Ruminants (Rumina Broutard, Purina, France) et était abreuvée *ad libitum*.

Les animaux étaient régulièrement tondus en zone thoraco-lombaire afin de réaliser dans de bonnes conditions les administrations IM et les observations des sites d'injection. Un suivi clinique quotidien a été réalisé pendant toute la durée de l'expérience.

2. Produit injecté

Une formulation longue-action d'oxytétracycline (Terramycine LAND, Pfizer santé animale, Orsay, France) a été administrée en un seul point, à une dose de 20 mg/kg, soit un volume de 5 ml (annexe 1).

3. Echographe et accessoires

Les examens échographiques ont été réalisés à l'aide d'un échographe portatif (Scanner 100, Pie Medical Equipment, Maastricht, Pays-Bas) et d'une sonde linéaire de 7.5 MHz du même fabricant. La transmission des ultrasons a été assurée par un gel prévu à cet effet, appliqué sur la zone préalablement tondue et directement sur la sonde. Un tapis d'échographie de 1 cm d'épaisseur, constitué d'un gel hydraté de polyacrylamide-agar (Geistlich, Wolhusen, Suisse) était placé

entre la sonde et la peau pour éloigner la sonde et amener ainsi la zone à étudier au niveau de la distance focale de l'appareil.

4. Opérateurs

Toutes les mesures, *in vivo* ou *post-mortem* ont été réalisées par trois opérateurs formés aussi bien aux techniques échographiques qu'à l'examen macroscopique du muscle. Un quatrième opérateur était en charge du suivi quotidien des sites d'administration IM.

5. Protocole expérimental

Deux séries d'administrations ont été réalisées à 22 jours d'intervalle.

Période 1 : Administration IM d'oxytétracycline, en région lombaire droite, au jour J0.

Période 2 : Administration IM d'oxytétracycline, en région lombaire gauche, au jour J22.

Période 3 : Euthanasie des animaux au jour J29, soit 29 jours après la première administration IM d'oxytétracycline et 7 jours après la seconde. L'euthanasie a été réalisée par saignée sous anesthésie à la xylazine (0.2 mg/kg IM) associée à la kétamine (10 mg/kg IM).

Chaque administration IM d'oxytétracycline était suivie d'examen échographiques quotidiens et standardisés.

5.1 Standardisation des administrations IM

Toutes les administrations IM ont été réalisées dans la région lombaire à l'aide d'une aiguille stérile de 17 G (Delvo, Bienne, Suisse). Le point de pénétration de l'aiguille se trouvait à égale distance de la crête dorsale constituée par les apophyses épineuses et de l'extrémité latérale des processus vertébraux transverses. L'aiguille était enfoncée verticalement et jusqu'à la garde assurant ainsi une profondeur d'injection constante égale à deux centimètres. De cette façon, l'injection était réalisée au sein du muscle *Longissimus Dorsi* par voie IM stricte.

5.2 Etude du développement des lésions

5.2.1 Examen échographique sur animaux vivants :

Les examens échographiques étaient standardisés et réalisés sur animal debout. Le positionnement de la sonde était repéré par la présence d'un marquage indélébile à l'aplomb du site d'injection. Toutes les mesures échographiques ont été réalisées à l'aide des outils intrinsèques à l'appareil et en aveugle, la personne réalisant l'échographie n'ayant pas accès aux valeurs chiffrées, masquées à l'écran.

Dans un premier temps, les qualités métrologiques de la méthode ont été évaluées. Avant toute administration intramusculaire, chaque investigateur a réalisé sur chaque brebis cinq clichés du muscle *Longissimus dorsi* en coupe transversale, puis en a mesuré la largeur, hauteur, circonférence et surface. L'ordre de réalisation de ces clichés était aléatoire. Ces mesures ont permis d'évaluer les qualités de mesures intrinsèques de la méthode en termes de répétabilité et de reproductibilité.

Après chaque administration IM d'oxytétracycline, un suivi régulier du développement d'éventuelles lésions au site d'injection a été réalisé par un même opérateur.

Enfin, 24 heures avant l'euthanasie des animaux, les qualités de l'échographie pour la détection de lésions musculaires ainsi que la précision et l'exactitude des mesures obtenues par cette méthode ont été évaluées. Chaque opérateur a réalisé aléatoirement cinq clichés sur chaque brebis puis a mesuré la hauteur, largeur, circonférence et surface des lésions éventuelles. Seuls les sites d'injections récentes ont pu être étudiés car les lésions n'étaient plus détectées de façon fiable sur les sites de la période 1.

5.2.2 Mesures post-mortem :

Après l'euthanasie, les régions lombaires ont été isolées et congelées à - 20°C. Les pièces anatomiques ont ensuite été découpées en tranches de 1 à 1.5 cm

d'épaisseur au niveau des sites d'injection (droit et gauche). Chaque tranche a fait l'objet d'un examen macroscopique direct et d'une étude assistée par ordinateur après réalisation de clichés photographiques numérisés (méthode de référence).

Pour l'examen macroscopique direct, la face caudale de chaque tranche était examinée de manière aléatoire, deux fois par chaque investigateur. La tranche était classée, à chaque fois, dans l'une des quatre catégories suivantes, sur la base de la lésion dominante :

A = absence de lésion

N = nécrose

H = hémorragie

F = fibrose.

De même, chaque investigateur a réalisé, à deux reprises, sur chacune des tranches, réparties de façon aléatoire, la mesure directe, à l'aide d'une règle graduée, de la largeur et de la hauteur des lésions. La surface lésionnelle était alors estimée par le produit « largeur × hauteur ».

Des mesures ont été réalisées, dans un second temps, grâce à une méthode de planimétrie assistée par ordinateur (Visiolab 2000, Biocom, Les Ulis, France). L'image de chaque pièce a été numérisée puis agrandie, ce qui permettait de mieux délimiter les lésions à l'écran. Après avoir tracé le contour de la lésion à l'aide de la souris, le logiciel a permis d'obtenir le périmètre, la surface, la largeur maximale et la hauteur maximale de la zone délimitée.

Cette méthode a été choisie comme référence pour les mesures effectuées *in vivo* par échographie ou par la méthode macroscopique directe.

5.3 Méthodes de traitement des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Systat 8.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

5.3.1 Méthode échographique

Evaluation des qualités de la méthode échographique pour détecter les lésions

Pour chaque opérateur, la fréquence de visualisation d'une lésion a été calculée sur les vingt cinq clichés échographiques réalisés (cinq échographies par opérateur sur chacune des cinq brebis).

Les différentes observations ont ensuite été classées en fonction de leur concordance ou non avec la méthode de référence. Le taux de détection des lésions par la méthode échographique a alors été calculé ainsi que le taux d'erreur.

Evaluation des qualités métrologiques intrinsèques de la méthode échographique

Pour les différentes mesures effectuées (largeur, hauteur, circonférence, surface du muscle *Longissimus Dorsi*), les coefficients de variation de reproductibilité (variabilité des mesures entre les différents opérateurs pour une même tranche observée) et de répétabilité (variabilité des mesures réalisées par un même opérateur sur une même pièce anatomique) ont été évalués par une analyse de variance à deux facteurs à effets aléatoires, selon le modèle de l'équation (1).

$$Y_{ijk} = \mu + Op_i + An_j + (Op*An)_{ij} + \epsilon_{ijk} \text{ (eq 1)}$$

Avec Y_{ijk} : $k^{ième}$ valeur mesurée pour l'animal j par l'opérateur i , μ : moyenne de la variable mesurée, Op_i : effet de l'opérateur i , An_j : effet de l'animal j , $(Op*An)_{ij}$: effet de l'interaction animal-opérateur, ϵ_{ijk} : erreur résiduelle liée au modèle.

Le coefficient de variation de répétabilité est obtenu par l'équation (2)

$$CV_{\text{répétabilité}} (\%) = \frac{SD\epsilon}{\mu} \times 100 \text{ (eq 2)}$$

Avec $SD\epsilon$: écart-type du terme résiduel.

Le coefficient de variation de reproductibilité est calculé par l'équation

(3)

$$CV_{\text{reproductibilité}} (\%) = \frac{SD_{\text{opérateur}}}{\mu} \times 100 \quad (\text{eq 3})$$

Avec $SD_{\text{opérateur}}$: écart-type non biaisé de l'effet de l'opérateur, obtenu grâce à l'équation (4) lorsqu'il n'existe pas d'interaction significative $(Op*An)_{ij}$,

$$SD_{\text{opérateur}}^2 = \frac{MS_{\text{opérateur}} - SD_{\varepsilon}^2}{n \times p} \quad (\text{eq 4})$$

Avec $MS_{\text{opérateur}}$: moyenne des carrés des écarts à la moyenne due à l'opérateur (donnée directement par l'analyse de la variance), n : nombre de mesures par animal et par opérateur, p : nombre total d'animaux.

Evaluation des qualités de la méthode échographique pour le suivi des lésions musculaires

Les valeurs des différentes variables mesurées ont été transcrites sous forme de courbes (cf résultats).

5.3.2. Méthode macroscopique directe

Evaluation des qualités de la méthode macroscopique directe pour détecter les lésions

Les pièces anatomiques correspondaient aux tranches constituant le site lésionnel proprement dit ainsi qu'à quelques tranches saines issues des extrémités. En effet lorsque les régions lombaires avaient été isolées, une marge de sécurité avait été prise de part et d'autre des sites d'injection. Toutes les tranches ont été soumises à l'ensemble des tests, mais selon les cas les résultats de certaines d'entre elles étaient exclus des traitements statistiques ou autres interprétations.

Dans un premier temps, nous cherchions à évaluer la capacité de la méthode macroscopique directe à différencier la présence et l'absence de lésion. Il était donc normal de conserver toutes les tranches, y compris les tranches saines.

Les observations réalisées, réparties en deux groupes (lésion ; non lésion) sur l'ensemble des tranches ont été classées en fonction de leur concordance ou non avec la méthode de référence (voir plus loin). La sensibilité (probabilité que la méthode détecte une lésion sur l'ensemble des tranches qui en portent une) et la spécificité (probabilité que la méthode conclue à l'absence de lésion sur les tranches effectivement saines) de la méthode ont ainsi pu être calculées selon les équations suivantes (5 et 6):

$$\text{Sensibilité} = (\text{vrais positifs}) / (\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs}) \text{ (eq 5)}$$

$$\text{Spécificité} = (\text{vrais négatifs}) / (\text{vrais négatifs} + \text{faux positifs}) \text{ (eq 6)}$$

Evaluation des qualités de la méthode macroscopique directe pour identifier le type lésionnel

La proportion des différents types lésionnels observés sur les sites des périodes 1 et 2 a été calculée, par rapport au nombre total de lésions observées sur chaque site.

Les résultats des observations ont également permis d'établir deux indices, visant à évaluer la reproductibilité et la répétabilité de la méthode de classification. Le but de ces indices étant d'estimer la valeur de la méthode à classer une lésion (déjà détectée) selon sa nature, les tranches issues des marges, reconnues unanimement saines par la méthode de référence et par les trois opérateurs lors de leur deux classements ont été exclues de ces calculs.

➤ Reproductibilité : indice inter-opérateur (S_n)

$$S_n = \sum (1 \text{ si } i = j, 0 \text{ si } i \neq j) \text{ (eq 7)}$$

Avec i : première ou seconde observation d'un opérateur, j : première ou seconde observation d'un autre opérateur, de telle sorte que toutes les combinaisons entre première ou seconde série de classement de deux opérateurs différents soient prises en compte.

➤ Répétabilité : indice intra-opérateur (S_m)

$$S_m = \sum (1 \text{ si } i = j, 0 \text{ si } i \neq j) \text{ (eq 8)}$$

Avec i : première observation d'un opérateur et j : seconde observation du même opérateur.

Enfin la répartition en terme de fréquence des valeurs prises par chaque indice a été comparée à celle qui aurait résulté d'un classement aléatoire des pièces par les trois opérateurs.

Evaluation des qualités métrologiques intrinsèques de la méthode macroscopique directe

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ont été calculés, par analyse de la variance, pour la mesure directe sur les pièces anatomiques de la hauteur, de la largeur et de la surface lésionnelle. Le facteur « animal » a été remplacé par le facteur « tranche » dans le modèle décrit précédemment. (eq 1)

Là encore le but était d'évaluer les qualités de mesure de la méthode sur des lésions déjà identifiées. Ainsi les mêmes tranches que précédemment ont été ignorées. En effet, en prenant en compte des tranches saines, on améliorerait anormalement nos résultats car la mesure « zéro » est parfaitement répétable et reproductible.

5.3.3 Comparaison des méthodes macroscopique directe et échographique à la méthode de référence

Pour la méthode échographique, l'aire lésionnelle moyenne de chaque brebis a été comparée à l'aire maximale de la méthode de référence, trouvée sur les tranches du site d'injection de la période 2, de la brebis correspondante.

La même comparaison a été faite pour la méthode macroscopique, en considérant la moyenne des mesures pour chaque tranche et la mesure de référence de la tranche correspondante.

Pour toutes ces comparaisons, des coefficients de détermination ont été calculés.

RESULTATS

1. Suivi clinique des animaux

A l'exception d'un œdème local et de manifestations de douleur légère, observés sur tous les animaux, au site d'administration IM d'oxytétracycline, aucune autre modification clinique n'a été notée.

2. Evaluation échographique qualitative des lésions musculaires

L'examen échographique réalisé 24 heures avant l'euthanasie a permis de détecter des lésions dans 32 %, 48 % et 100% des cas, suivant les différents opérateurs.

Dans la mesure où toutes les brebis présentaient des lésions (selon la méthode de référence), on peut dire que sur les 75 observations (cinq échographies, réalisées sur cinq brebis par chacun des trois opérateurs), 45 correspondaient à la réalité et 30 étaient erronées. Ainsi, on obtient un taux de détection des lésions de 60% et un taux d'erreur de 40%.

En ce qui concerne l'approche cinétique du développement des lésions, réalisée par un suivi échographique quotidien des animaux, de nombreuses irrégularités, voire contradictions sont apparues d'un jour sur l'autre et d'une brebis à l'autre. En effet, il est biologiquement impossible que des lésions apparaissent et disparaissent d'un jour sur l'autre (figure 4). Pour cette raison, ces résultats n'ont pas été interprétés plus avant.

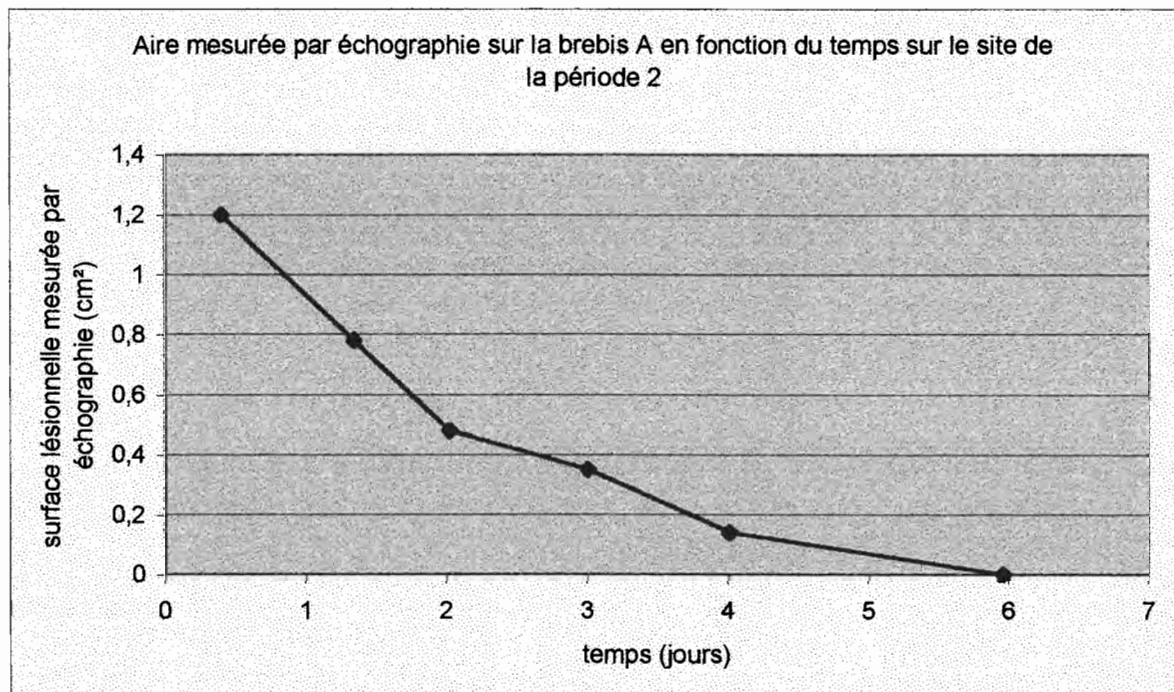
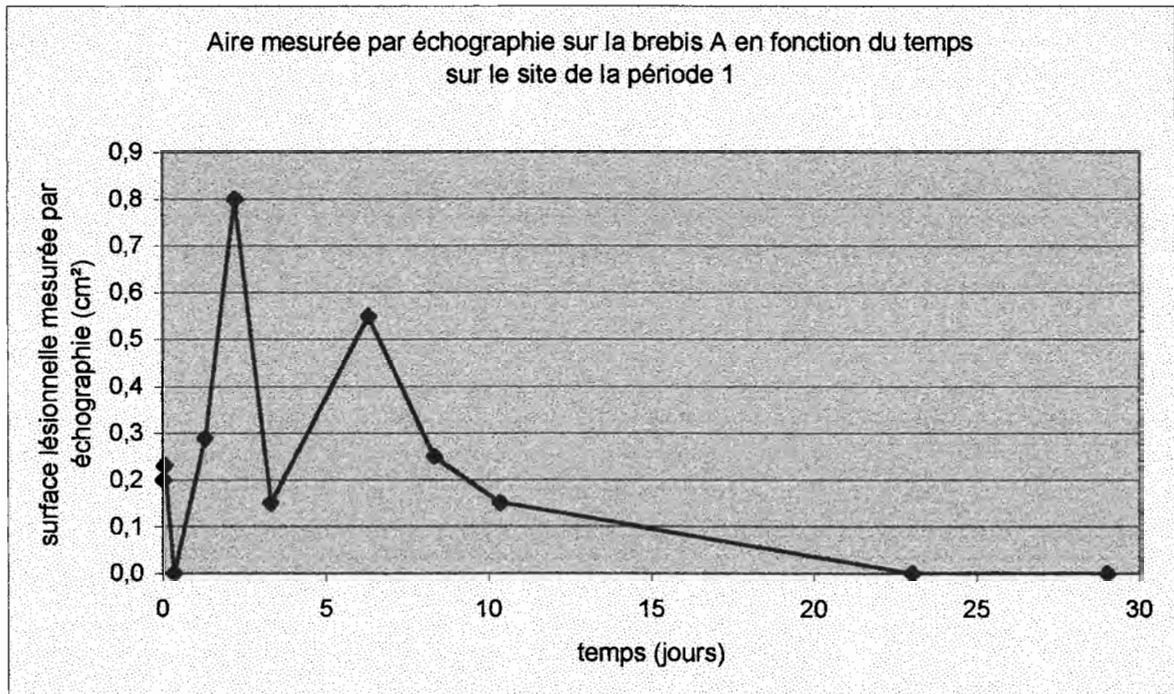


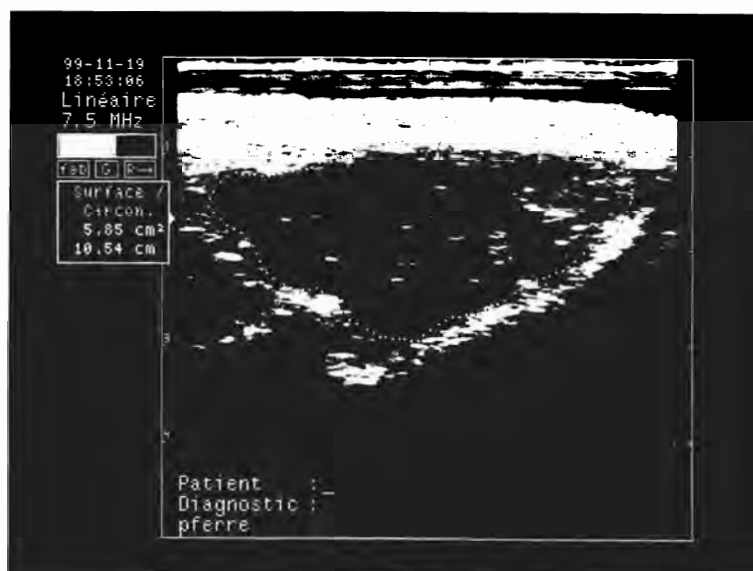
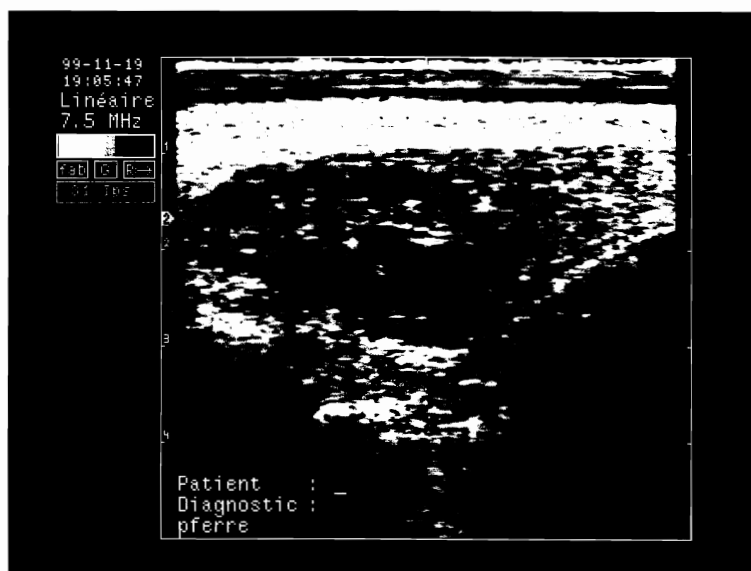
Figure 4 : Suivi échographique des sites d'administration

Evolution de la mesure échographique de la surface de muscle *Longissimus dorsi* modifiée après administration IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action pour une brebis représentative sur deux périodes expérimentales (autres brebis en annexes). Les résultats obtenus, par un opérateur unique, biologiquement impossibles, traduisent les difficultés rencontrées dans la mise en évidence des lésions et dans leur mesure.

3. Evaluation échographique quantitative des lésions musculaires

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ont été calculés pour la mesure de la hauteur (6,1% et 1,6%), la largeur (5,6% et 7,3%), la circonférence (5% et 2,6%) et l'aire (9,5% et 4,1%) du muscle *longissimus dorsi* sain, avant toute injection, pour évaluer les qualités de mesure intrinsèques de la méthode. Les mêmes coefficients ont été calculés pour la hauteur (51,4% et 92%), la largeur (66,8% et 70,1%), la circonférence (60,9% et 81,8%) et l'aire (61,4% et 101,4%) des lésions induites en période 2 (les lésions de la période 1 n'étaient plus détectables de façon fiable).

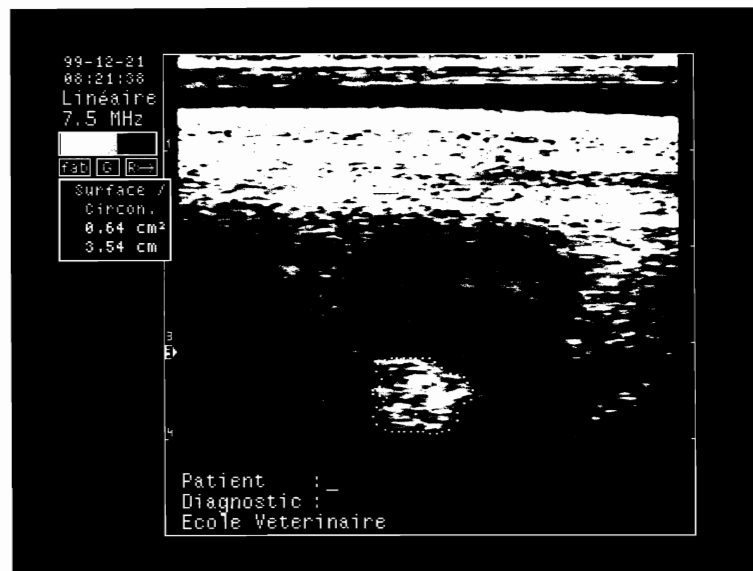
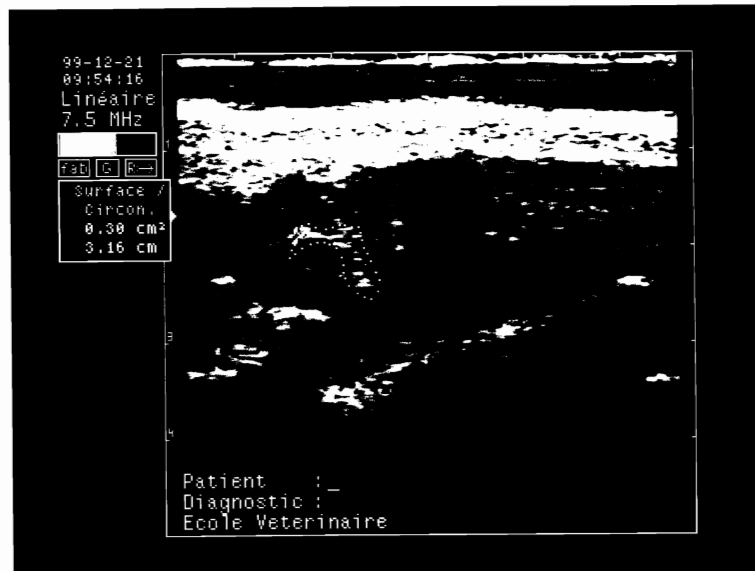
Enfin les résultats obtenus par échographie ont été comparés aux mesures réalisées par planimétrie assistée par ordinateur. On obtient un coefficient de détermination de 61 % pour la mesure de l'aire lésionnelle (figure 5). L'aire moyenne des lésions mesurée in vivo, s'est avérée 3,7 à 6,2 fois plus faible que l'aire de référence, selon l'animal. L'outil échographique entraîne donc une sous-estimation majeure de la taille des lésions (figure 6).



Doc. 1 : Clichés échographiques du muscle Longissimus dorsi avant toute administration

IM

Les qualités métrologiques de la méthode échographique ont été évaluées par la mesure de la hauteur, la largeur, la circonférence et l'aire du muscle Longissimus dorsi avant toute administration IM. Chacun des trois opérateurs a réalisé cinq clichés sur chaque brebis. L'ensemble des résultats a permis de calculer les coefficients de répétabilité et de reproductibilité pour chaque type de mesure.



Doc. 2: Clichés échographiques du muscle Longissimus dorsi 6 jours après l'administration IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action.

24 heures avant l'euthanasie, soit 6 jours après l'administration IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action, chaque opérateur a réalisé cinq clichés du muscle Longissimus dorsi sur chacune des cinq brebis. La hauteur, la largeur, la circonférence et l'aire des lésions éventuelles ont été mesurées.

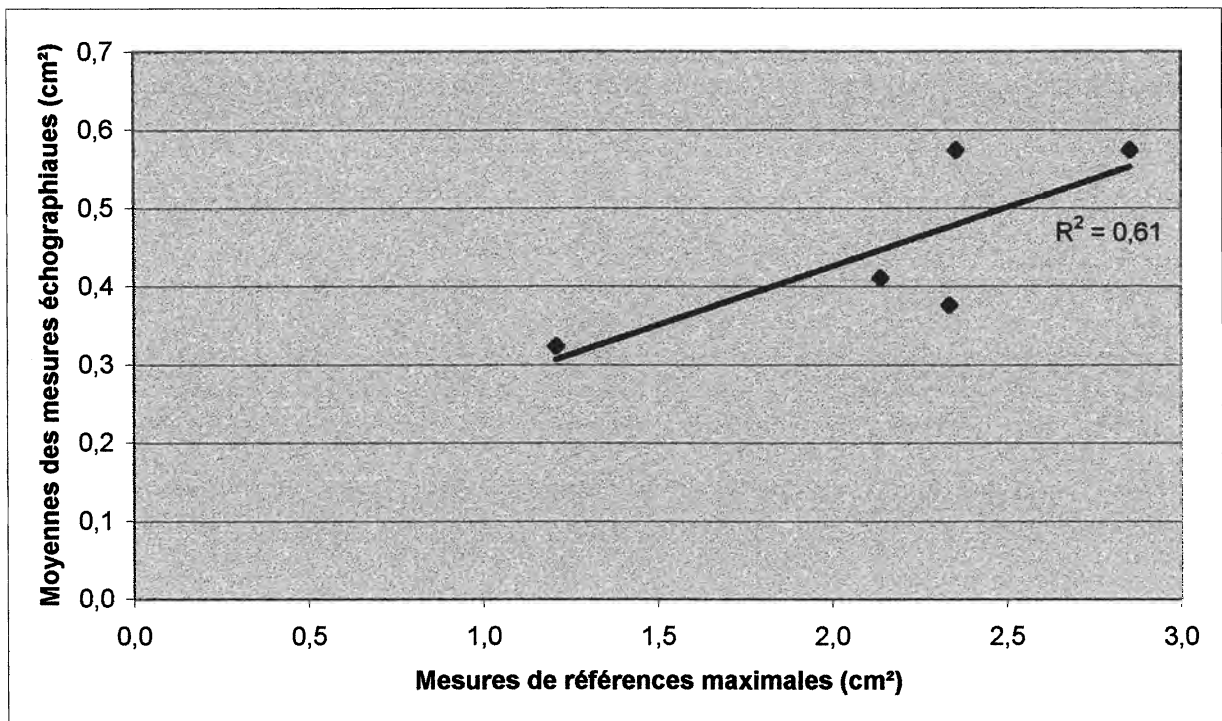


Figure 5 : Coefficient de détermination entre mesures échographiques et mesures de références

Coefficient de détermination entre la moyenne des mesures échographiques in vivo de la surface de muscle *Longissimus dorsi* modifiée 7 jours après administration IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action et la mesure de référence maximales par planimétrie assistée par ordinateur, obtenue après euthanasie, sur chacune des cinq brebis.

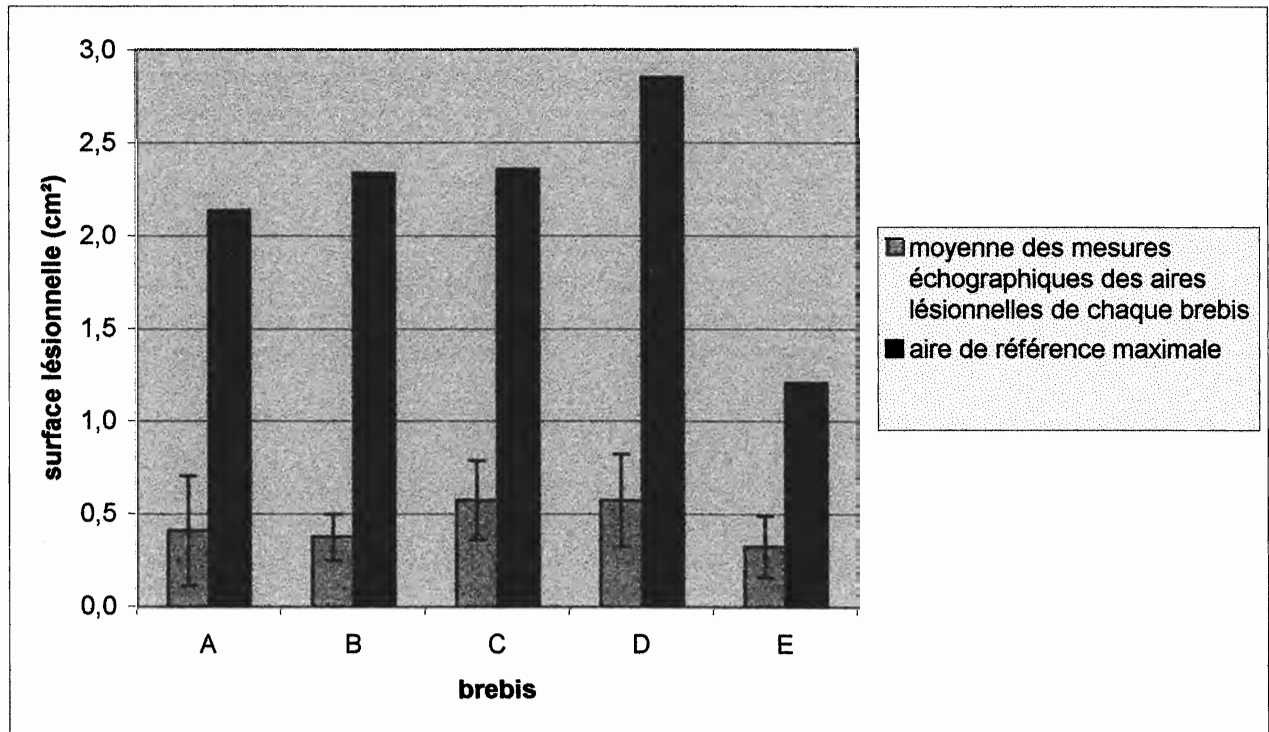


Figure 6 : Comparaison entre mesures échographiques et mesures de références

Comparaison entre la moyenne des mesures échographiques in vivo de la surface de muscle *Longissimus dorsi* modifiée 7 jours après l'administration IM de 5 ml d'une formulation longue action d'oxytétracycline, et l'aire de référence maximale obtenue après euthanasie par planimétrie assistée par ordinateur. On constate que l'outil échographique entraîne une sous-estimation majeure de la surface des lésions.

4. Evaluation macroscopique qualitative des lésions musculaires

3.1 Sensibilité et Spécificité

Sur les 396 observations réalisées (66 tranches, classées chacune deux fois par trois opérateurs), 215 concluaient à la présence de lésions. Parmi celles-ci, 200 étaient en accord avec la méthode de référence (vrais positifs), les 15 restantes étaient en opposition (faux positifs). Parmi les 181 observations négatives, 135 correspondaient à la méthode de référence (vrais négatifs) et 46 différaient (faux négatifs).

Ainsi, la sensibilité de la méthode est de 81,3% et la spécificité de 90% (tableau 1).

3.2 Identification du type lésionnel

Des lésions anciennes (induites 29 jours plus tôt) étaient présentes chez toutes les brebis. Des manifestations fibrotiques, nécrotiques et hémorragiques ont été observées respectivement sur 76, 21,1 et 2,9% des pièces anatomiques correspondant aux sites d'injection de la période 1.

Pour les lésions récentes (induites par l'IM de la période 2 ; 7 jours plus tôt), la répartition était différente avec 59,4 % d'hémorragie, 27 % de nécrose et 13,6 % de fibrose. Là encore toutes les brebis étaient concernées (tableau 2 et figure 7).

	Vrais positifs	Vrais négatifs	Faux positifs	Faux négatifs
Nombre	200	135	15	46
Fréquence	50.50%	34.10%	3.8%	11.6%
	Soit 84.6% d'observations concordant avec la référence		Soit 15.4% d'observations erronées	

Tableau 1 : Concordance entre la méthode macroscopique directe et la méthode de référence pour la détection des lésions

Cinq brebis ont reçu chacune deux administrations IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action, respectivement à J0 en région lombaire droite et à J22 en région lombaire gauche. Après euthanasie à J29, les sites d'administrations ont été prélevés et découpés en tranches. Les 33 tranches droites et 33 tranches gauches ont été classées 2 fois chacune par trois opérateurs en deux classes (présence de lésion : positif ou absence de lésion : négatif). Ces 396 observations macroscopiques directes ont été comparées au classement de la méthode de référence par planimétrie assistée par ordinateur.

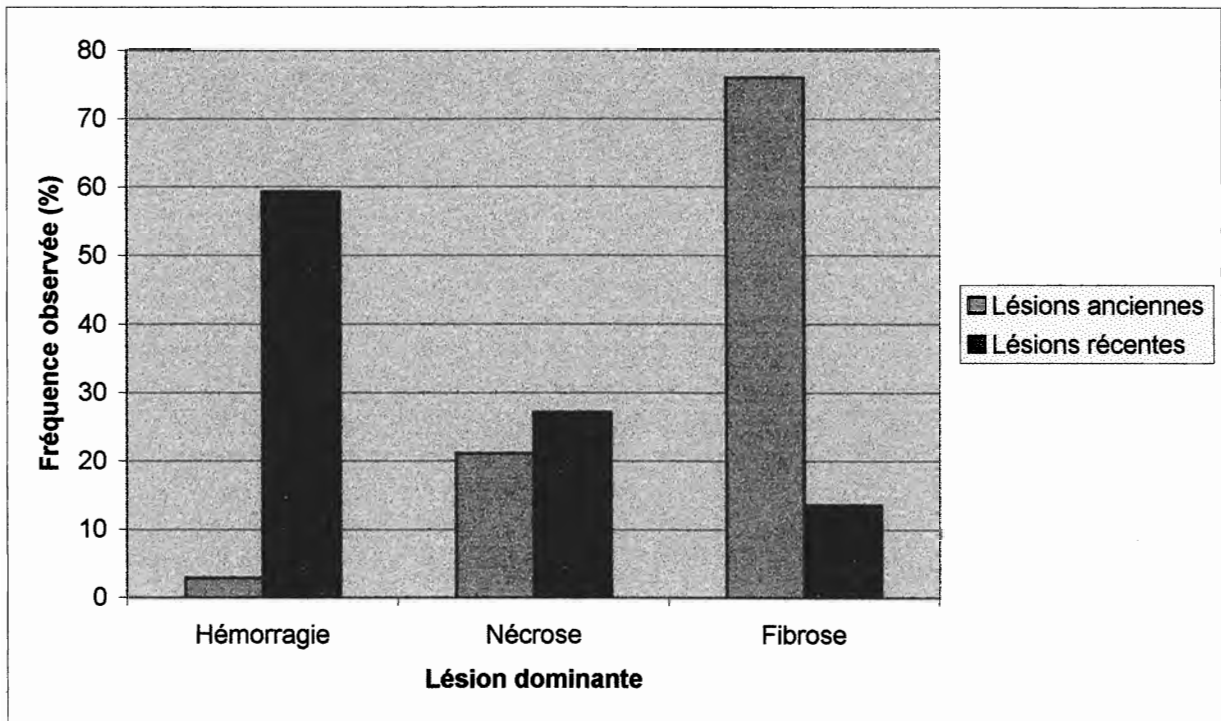


Figure 7 : Fréquence des types lésionnels en fonction de l'ancienneté des lésions

Cinq brebis ont reçu chacune deux administrations IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action, respectivement à J0 en région lombaire droite et à J22 en région lombaire gauche. Après euthanasie à J29, les sites d'administrations ont été prélevés et découpés en tranches. Chaque tranche a été classée deux fois par trois opérateurs en fonction du type lésionnel observé (hémorragie, nécrose ou fibrose). La répartition en fréquence des différents types lésionnels en fonction de l'ancienneté des lésions est la suivante.

Pour le calcul des indices de répétabilité et de reproductibilité, vingt tranches ont été éliminées.

L'indice de répétabilité (S_m : intra-opérateur) était de 100 % (valeur =3) dans 56,5 % des cas, d'au moins 50 % (valeur ≥ 1.5) dans 86,9 % des cas.

L'indice de reproductibilité (S_n : inter-opérateur) était de 100% (valeur = 12) pour 36,9 % des pièces anatomiques et d'au moins 50 % (valeur ≥ 6) pour 60,9 % d'entre elles.

Enfin, les répartitions des fréquences de ces deux indices se sont avérées différentes de celles obtenues pour une classification aléatoire des pièces anatomiques (tableaux 3 et 4 et figures 8 et 9).

5. Evaluation macroscopique quantitative des lésions musculaires

Les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ont été respectivement de 69,55 % et 21,27 % pour la mesure de la hauteur lésionnelle, de 53,03 % et de 24,7 % pour la largeur et de 81,66 % et 38,77 % pour l'aire des lésions.

La comparaison des mesures directes sur les pièces anatomiques avec les mesures indirectes obtenues par planimétrie a révélé un coefficient de détermination de 21% pour la hauteur, 50% pour la largeur et 49% pour l'aire. On peut noter que si la planimétrie permet de trouver une différence significative entre la taille des lésions récentes et celle des lésions anciennes, les mesures directes ne le permettent pas.

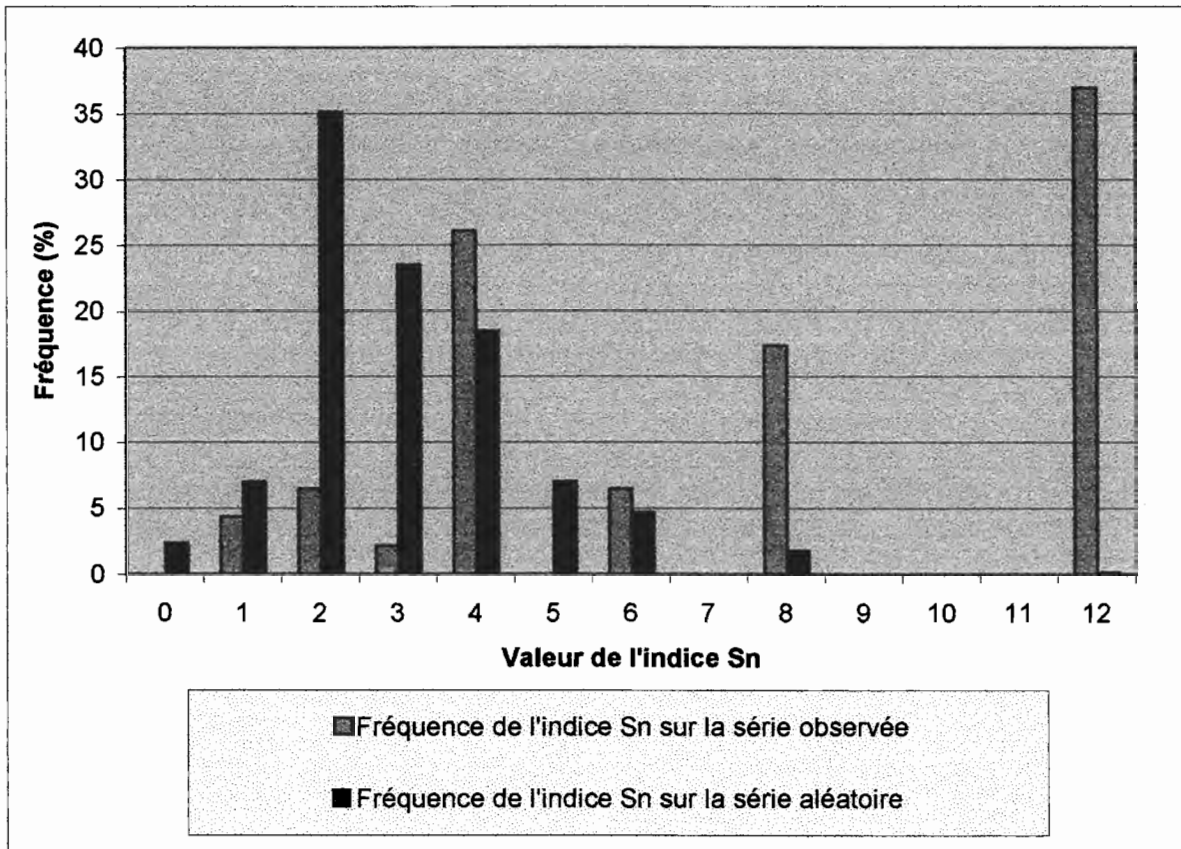


Figure 8 : Répartition de l'indice de reproductibilité

Cinq brebis ont reçu chacune deux administrations IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action, respectivement à J0 en région lombaire droite et à J22 en région lombaire gauche. Après euthanasie à J29, les sites d'administrations ont été prélevés et découpés en tranches. Chaque tranche a été classée deux fois par trois opérateurs en fonction du type lésionnel observé (hémorragie, nécrose ou fibrose). L'indice de reproductibilité (Sn) évalue la concordance entre les différentes observations des trois opérateurs. Cet indice a également été calculé sur la base d'un classement aléatoire des tranches. La comparaison entre les fréquences d'observations des différentes valeurs de Sn pour le classement réel des tranches et pour un classement aléatoire apparaît sur le diagramme ci-dessous.

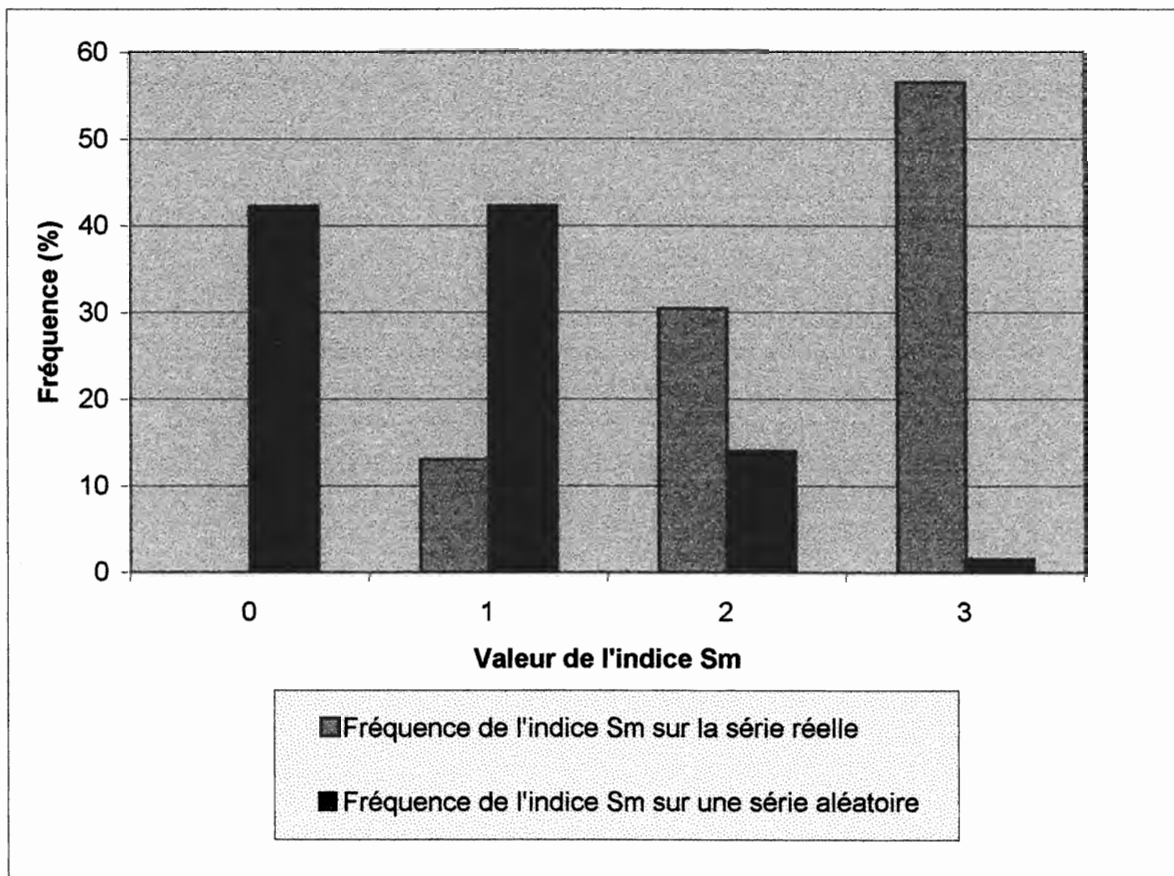


Figure 9 : Répartition de l'indice de répétabilité

Cinq brebis ont reçu chacune deux administrations IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action, respectivement à J0 en région lombaire droite et à J22 en région lombaire gauche. Après euthanasie à J29, les sites d'administrations ont été prélevés et découpés en tranches. Chaque tranche a été classée deux fois par trois opérateurs en fonction du type lésionnel observé (hémorragie, nécrose ou fibrose). L'indice de répétabilité (Sm) traduit la concordance entre les deux observations d'un même opérateur. Cet indice a également été calculé pour une répartition aléatoire des tranches. La comparaison entre les fréquences d'observations des différentes valeurs de Sm pour le classement réel des tranches et pour un classement aléatoire apparaît sur le diagramme ci-dessous.

DISCUSSION

1. Justification du modèle expérimental

1.1 Animaux

Le choix s'est porté sur les brebis pour différentes raisons. Il s'agit tout d'abord d'une espèce cible. Ces animaux sont relativement facile à manipuler et à contenir. De plus, leur taille permet de mieux standardiser les administrations IM et permet enfin la réalisation facile des examens échographiques, à l'aide d'un appareil « standard » et d'une sonde de puissance « classique ».

1.2 Produit injecté

De nombreuses expérimentations ont étudié les effets délétères de divers produits administrés dans le muscle [17, 20, 25, 30, 37, 38, 42]. Peu d'entre eux semblent exempts de réactions locales secondaires. Cependant, l'intensité de ces réactions dépend grandement du principe actif injecté ou plus précisément de l'association principe actif-excipient.

Dans notre étude, le principe actif retenu a été l'oxytétracycline. Plusieurs articles [14, 15, 17, 32, 33, 47] font état de lésions suite à l'injection de ce type de produit.

Nouws et coll. [32, 33], après avoir injecté à des porcs, des moutons ou des veaux différentes formulations d'oxytétracycline, dans l'encolure, ont trouvé, à l'examen nécropsique, des lésions allant de l'œdème et de l'hémorragie légère à la nécrose tissulaire ou à la formation d'abcès importants.

De Laistre Banting et De La Horie [15] ont objectivé l'existence de lésions, chez des veaux, par l'augmentation des activités plasmatiques en CK et AST suite à des injections dans le cou. De Laistre Banting et Baggot, chez le porc ont combiné à cette méthode des examens échographiques, macroscopiques directs et microscopiques [14].

Cette molécule semble unanimement reconnue pour son caractère de faible tolérance locale. De plus le choix s'est porté sur une formulation dite longue

action, dont le principe est de provoquer la précipitation du produit dans le muscle, entraînant un relargage lent du principe actif. Cette catégorie de médicaments semble aggraver les lésions. Ainsi, nous étions certains de nous placer dans de bonnes conditions permettant de comparer les méthodes d'évaluation des lésions.

1.3 Site d'injection

Le sujet de l'étude étant la tolérance locale lors d'administration IM, il était indispensable de s'assurer du bon respect de la voie d'administration. Or, comme nous l'avons déjà vu, différents auteurs ont démontré que la réalisation d'une administration strictement IM imposait plusieurs conditions [2, 7]. En effet, sur des sites fréquemment utilisés pour ce type d'injection, que sont l'encolure et la cuisse, il existe un nombre élevé de muscles, chacun délimité par son enveloppe aponévrotique. Or, cette compartimentation n'étant pas perceptible extérieurement, la maîtrise exacte du point d'injection n'est pas possible et le risque de pratiquer une administration partiellement intermusculaires augmente. En revanche, dans des zones plus denses musculairement, comme le haut de la croupe ou la région lombaire, la réalisation d'une administration IM stricte devient plus aisée.

Pour cette raison et parce que la morphologie générale de la région lombaire se prête bien à l'examen échographique, ce site a été retenu pour cette étude. Il facilite la standardisation des administrations et du suivi échographique.

De plus, en comparaison avec la croupe, il y a moins de risques ici de voir se développer une atteinte neurologique, par extension d'un phénomène inflammatoire, puisqu'on s'éloigne des nerfs majeurs comme le nerf sciatique.

Il faut cependant noter que cette zone n'est pas habituellement utilisée pour les administrations IM chez les ovins, pour épargner les masses musculaires « nobles » sous-jacentes, dont la valeur économique est importante et en raison de l'abondance de la laine à ce niveau.

2. Analyse des résultats

Dès les examens cliniques, le fait que tous les animaux aient présenté des manifestations locales, même légères, sous forme d'œdèmes et de réactions douloureuses montrait un défaut de tolérance locale. Cette observation a été confirmée par l'examen anatomopathologique, puisque 100 % des sites d'injection portaient des lésions musculaires plus ou moins anciennes selon la série d'injections dont elles étaient issues. Nous avons donc confirmation de la mauvaise tolérance locale du produit choisi.

Actuellement, la méthode de référence utilisée par les industries pharmaceutiques pour étudier la tolérance locale des produits administrés par voie IM est basée principalement sur un examen macroscopique des sites d'injection. Après abattage, une ou plusieurs incisions sont pratiquées en regard du point d'administration. Les surfaces musculaires ainsi exposées sont alors classées dans différentes catégories en fonction des lésions observées. Malheureusement, aucune standardisation de méthode n'assure une bonne répétabilité ou reproductibilité des opérations, l'erreur pouvant intervenir par un mauvais repérage du site d'injection, une incision incorrecte... Les méthodes de classement des lésions, elles non plus, ne sont pas standardisées, rendant difficile les comparaisons entre produits différents. Enfin, ce type de méthode reste qualitatif ou au mieux semi-quantitatif, ce qui accentue encore la difficulté de comparaison entre deux produits.

Dans cette étude, nous avons recherché à quantifier les lésions. Pour cela, l'étude de la totalité de chaque zone d'injection a été réalisée. Le prélèvement des sites d'administration, la réalisation de coupes et l'analyse de chaque pièce anatomique est plus lourde à mettre en œuvre, mais permet d'approcher la lésion dans sa globalité, pour en quantifier l'étendue. De plus, l'approche qualitative est également améliorée dans la mesure où la multiplication des sections permet d'obtenir un échantillon plus représentatif du type lésionnel prédominant. Les résultats obtenus par examen macroscopique direct, ont été comparés à ceux obtenus par une méthode de planimétrie assistée par ordinateur. Cette dernière permet pour chaque pièce anatomique, d'obtenir, à partir d'une image de sa surface, un tracé précis du contour de la zone lésionnelle. Ainsi la surface de la lésion est

estimée de façon beaucoup plus fine que par la méthode directe. Pour ces raisons, la méthode assistée par ordinateur a été choisie comme méthode de référence, pour toutes les comparaisons.

Sur le plan qualitatif, la méthode macroscopique directe montre une sensibilité de 81,3 % et une spécificité de 90 %. Cette méthode est donc relativement fiable pour constater l'absence de lésion ou pour en détecter la présence. Les résultats obtenus, quant au type lésionnel, sont en accord avec le déroulement classique des phénomènes physiopathologiques et la description habituelle du développement des lésions musculaires au point d'injection, avec une prédominance des manifestations fibrotiques pour les lésions les plus anciennes et des hémorragies pour les lésions récentes. Cependant, malgré une répartition des pièces anatomiques différente de celle liée au hasard, on peut noter des indices de reproductibilité et de répétabilité dont les valeurs ne sont pas satisfaisantes (l'indice de répétabilité (S_m : intra-opérateur) était de 100 % (valeur =3) dans seulement 56,5 % des cas et d'au moins 50 % (valeur ≥ 1.5) dans 86,9 % des cas ; l'indice de reproductibilité (S_n : inter-opérateur) était de 100% (valeur = 12) pour seulement 36.9 % des pièces anatomiques et d'au moins 50 % (valeur ≥ 6) pour 60,9 % d'entre elles).

D'un point de vue quantitatif, les coefficients de détermination, dont les valeurs sont médiocres, montrent que cette méthode entraîne des variations de mesures importantes par rapport à la référence. On peut noter un manque de précision de la méthode directe, qui se traduit par des coefficients de variation de reproductibilité et de répétabilité, dont les valeurs sont élevées, les plus basses étant de 24,7 et 21,3%, pour la mesure de la largeur et de la hauteur, respectivement. Ce manque de précision est confirmé par une absence de différence significative entre lésions récentes et anciennes, cette différence de taille étant décelée par notre méthode de référence.

Ainsi, il semble que la méthode servant actuellement dans les études de tolérance locale soit d'une interprétation délicate. De plus, peu d'études voire aucune ne mentionnent de validation de méthode, au minimum par l'analyse de la répétabilité et de la reproductibilité de leurs observations. Les conclusions tirées de

tels travaux sont donc, aux vues de nos résultats, à considérer avec précaution. En effet, si l'on se fixe comme objectif des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité du même ordre que ceux appliqués aux méthodes analytiques, c'est à dire inférieurs à 15 % (FDA, 1998), la méthode macroscopique directe est mise en défaut.

Pour l'échographie, comme nous l'avons vu précédemment, des perspectives encourageantes avaient été évoquées aux vues des performances obtenues dans différents domaines. Elles devaient autoriser le suivi non invasif du développement des lésions musculaires au point d'injection, la quantification de leur étendue, voire une approche de leur nature.

L'échographie avait également déjà fait ses preuves dans le domaine zootechnique en permettant une estimation de la composition des carcasses par la réalisation de mesures sur le muscle *Longissimus dorsi* et la couche de gras dorsal chez les bovins et les ovins [21, 22, 35, 40], voire même en évaluant la quantité de gras intramusculaire [22]. Les qualités intrinsèques de mesure de notre appareil ont d'ailleurs été évaluées par la mesure de l'épaisseur, la largeur, la circonférence et l'aire du muscle *Longissimus dorsi* avant toute injection, avec des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité tous inférieurs à 15 % (le plus élevé étant de 9.5 %). Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature, notamment ceux concernant l'aspect échographique de l'anatomie de la région ventrale du cou chez les bovins [9] qui mentionnent des coefficients de variation entre ces différentes mesures de l'ordre de 3 à 12.3 %. Cette aptitude de l'échographie à bien délimiter les différents muscles tient au fait que les septa intermusculaires constituent des interfaces très échogènes. Ces derniers réfléchissent une grande partie du faisceau ultrasonore, ce qui se traduit par une image nette et bien différenciée sur l'écran de l'appareil. Ainsi, sur l'image, chaque muscle dont le parenchyme apparaît comme un « ciel étoilé », résultant principalement des phénomènes de dispersion, se voit délimité par une frontière hyperéchogène correspondant à son fascia. Malheureusement cette aptitude à délimiter précisément un muscle grâce à son enveloppe, n'est pas transposable au cas des lésions musculaires suite à une administration IM.

D'un point de vue qualitatif, nos résultats révèlent une sensibilité de 60% pour la détection des lésions, ce qui est inférieur aux valeurs rapportées par

certain auteurs. Une étude portant sur les myopathies inflammatoires humaines donnait, par exemple, une sensibilité de 82.9 % [39]. Il apparaît également une grande influence du manipulateur sur le taux de détection des lésions musculaires, avec des valeurs allant de 32 à 100 % selon l'investigateur. Pourtant les aptitudes des trois opérateurs avaient été évaluées sur muscle sain avec succès puisque les coefficients de variation de reproductibilité et de répétabilité des mesures effectuées étaient tous largement inférieurs à 15 %. Il serait intéressant que la personne ayant un taux de détection de 100 % reprenne une série de clichés échographiques sur un lot comptant des animaux sains et des animaux ayant reçu une injection. En effet, cette grande disparité d'un opérateur à l'autre est peut être due à l'absence de brebis témoins, c'est à dire des conditions ne correspondant pas à un réel test en aveugle. Pour cette étude, un tel résultat améliore le taux moyen de détection des lésions, qui est de ce fait sans doute surestimé. Cette influence de l'opérateur sur la méthode échographique est évoquée dans plusieurs études.

Des articles comme ceux de Robinson ou de Russel [40, 41] tiennent pour acquis le fait que les aptitudes du manipulateur sont un caractère déterminant de la qualité des résultats, lors des mesures de l'épaisseur de gras dorsal ou de la surface du muscle *Longissimus dorsi* par exemple.

Par opposition, pour le même type de mesures, d'autres auteurs semblent ne pas trouver de différences significatives entre les résultats de deux opérateurs inexpérimentés ou de deux manipulateurs aguerris ou encore de deux investigateurs d'expériences différentes [21, 35, 36].

De plus, l'aspect échographique même des lésions peut poser problème, puisque l'œdème, par exemple, semble pour certains entraîner une augmentation d'échogénicité et pour d'autres une diminution de ce même paramètre [39, 48].

Dans une autre étude, après avoir injecté en IM, trois formulations différentes d'oxytétracycline à des porcs, la tolérance locale de ces produits est évaluée par la mesure de l'activité sérique en CK et des examens échographiques, macroscopiques et histologiques. L'auteur conclut qu'il existe des discordances entre les résultats des trois dernières méthodes [14].

Il semble donc que l'échographie présente des défauts majeurs sur le plan qualitatif.

Enfin, lorsque les lésions ont été décelées, l'échographie s'est avérée être un outil peu performant dans leur quantification. De grandes difficultés à

délimiter les lésions ont conduit à des coefficients de variation de reproductibilité et de répétabilité médiocres, pour les diverses mesures réalisées. L'échographie est un outil dont le principe de fonctionnement s'appuie sur la réflexion d'un faisceau ultrasonore au niveau de l'interface entre deux milieux d'impédances acoustiques différentes, ceci explique peut-être les difficultés à détecter une lésion diffuse à l'intérieur d'un parenchyme. En effet si l'on « modélise » la lésion, même si l'impédance acoustique au centre de celle-ci est très différente de l'impédance normale du muscle sain, pour le halo diffus périphérique, c'est à dire la zone de transition entre les deux, l'augmentation d'impédance doit être très faible et n'occasionner que très peu de réflexion. Ce dernier phénomène peut alors être masqué par la dispersion normale des ultrasons et donner au plus une augmentation légère de l'échogénicité de l'image (niveau de gris) très difficilement perceptible. Ainsi, la mise en évidence d'une limite nette est, elle, extrêmement difficile pour ce type de lésions, même si l'on perçoit la différence entre le centre lésionnel et le muscle sain. Les lésions observées étaient de plus irrégulières, apparaissant sous la forme de petits îlots d'échogénicité plus ou moins augmentée rendant plus difficile encore leur interprétation. Enfin si l'on compare les résultats obtenus par mesures échographiques et ceux obtenus par la méthode de référence on constate, découlant directement des difficultés de délimitation des lésions, une sous-estimation majeure de la taille de ces dernières. En effet les valeurs obtenues par échographie pour l'aire lésionnelle sont de 3,7 à 6,2 fois inférieures à celles obtenues par notre méthode de référence. On pourrait interpréter cette différence en considérant que la zone de transition diffuse entre le centre lésionnel et le muscle sain, prise en compte macroscopiquement, n'apparaît pas à l'échographie.

CONCLUSION

Nos résultats semblent donc montrer l'existence de failles dans la méthode anatomopathologique macroscopique actuellement utilisée dans l'industrie pharmaceutique aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif. Cependant, ces défauts sont moins marqués que ceux présentés par la méthode échographique. En effet, d'un point de vue qualitatif, c'est à dire pour la détection de lésions musculaires, l'échographie est un outil peu performant. D'un point de vue quantitatif, le jugement qui découle de nos résultats est sans appel, puisque la sous-estimation de l'aire lésionnelle est une règle générale. Etant donné que l'erreur se produit toujours dans le même sens, on pourrait penser à appliquer un facteur de correction aux valeurs obtenues, comme cela a été proposé dans l'étude de Robinson pour la mesure de la surface du muscle *longissimus dorsi* [40], cependant l'importance de l'erreur varie du simple au double rendant la détermination de ce facteur difficile et le résultat obtenu guère plus satisfaisant. Un biais que l'on peut mentionner cependant est que la comparaison de méthode concernait l'aire moyenne des mesures échographiques à l'aire maximale présente sur les pièces anatomiques correspondant à la même lésion. Ce choix avait donc tendance à accentuer la sous-estimation. Quoiqu'il en soit, dans les conditions d'utilisation courantes ces biais seraient également présents et les résultats comparables.

Il apparaît donc que malgré un attrait intuitif vers l'imagerie médicale, pour la détection des lésions causées par une administration IM et la quantification de leur étendue, l'échographie soit loin de remplir les conditions requises. D'autres méthodes d'imagerie médicale peuvent alors être envisagées. Plusieurs études sont présentes dans la littérature, concernant notamment l'imagerie par résonance magnétique. Cette technique permet d'obtenir des images dont le contraste est plus élevé entre les tissus et s'affranchit de l'influence du manipulateur. Une reconstitution en trois dimensions est également possible avec ce type d'appareil alors que l'échographie ne donne qu'une coupe unique du muscle et de la lésion. Il semble que la précision de mesure soit excellente, une étude mentionnant des différences de 0 à 9.5 % entre les résultats obtenus par IRM et ceux issus de mesures réalisées sur images photographiques de la pièce anatomique [6]. Cependant, comme dans notre cas, une étude concernant le suivi de lésions

musculaires au point d'injection, mentionne une mauvaise délimitation de ces dernières par IRM, conduisant aux mêmes problèmes que dans notre étude [31]. Enfin, une dernière publication conclut que, associée à certains produits « de contraste », l'IRM semble donner de bons résultats dans la quantification des lésions aiguës d'infarctus du myocarde [23]. Cependant, pour ce type de méthodes se pose un problème de faisabilité aussi bien du point de vue technique que financier.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. VACHER Jean-François
a été admis(e) sur concours en : 1995
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 8 juillet 1999
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, H. LEFEBVRE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
déclare que j'ai lu la thèse de :
M. VACHER Jean-François
intitulée :
"Evaluation expérimentale chez la brebis des qualités métrologiques des méthodes échographique et anatomopathologique macroscopique pour la quantification des lésions musculaires iatrogènes"
et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Professeur Hervé LEFEBVRE

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**



Professeur Jean-Jacques RAILHAC
SERVICE IMAGERIE MEDICAL

Pr. J.-J. RAILHAC
Bât. J. PUTOIS - C.H.U. PURPAN
31050 TOULOUSE CEDEX
23, chemin des Capelles - 31076 Toulouse Cedex 3 - France - Tél. (+33) 561 193 802 - Fax (+33) 561 193 993 - E-mail : direction@envt.fr

**Vu le : 9 octobre 2001
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur Raymond BASTIDE



BIBLIOGRAPHIE

- 1 **Aktas M., Vinclair P., Lefebvre H.P., Toutain P-L. and Braun J-P.**
In vivo quantification of muscle damage in dogs after intramuscular administration of drugs.
Br. Vet. J., 1995, **151**, 189-196.
- 2 **Autefage A., Fayolle P. and Toutain P-L.**
Distribution of material injected intramuscularly in dogs.
Am. J. Vet. Res., 1990, **51**, 901-904.
- 3 **Authier FJ., Cherin P., Creange A., Bonnotte B., Ferrer X., Abdelmoumni A., Ranoux D., Pelletier J., Figarella-Branger D., Granel B., Maisonobe T., Coquet M., Degos J.D. and Gherardi R.K.**
Central nervous system disease in patients with macrophagic myofasciitis
Brain, 2001, **124**, 974-983.
- 4 **Babhulkar S.S.**
Triceps contracture caused by injections. A report of 11 cases
J. Bone Joint Surg., 1985, **67**, 94-96.
- 5 **Banting A. and Tranquart F.**
Echography as a tool in clinical pharmacology
Acta vet. scand., 1991, **Suppl. 87**, 215-216.
- 6 **Beneke R., Neuerburg J. and Bohndorf K.**
Muscle cross-section measurement by magnetic resonance imaging.
Eur. J. Appl. Physiol., 1991, **63**, 424-429.
- 7 **Boyd J.S.**
Selection of sites for intramuscular injections in the neck of the horse.
Vet. Rec., 1987, **121**, 197-200.
- 8 **Braun U.**
Ultrasonographic examination of the right kidney in cows
Am. J. Vet. Res., 1991, **52**, 1933-1939.
- 9 **Braun U., Föhn J. and Pusterla N.**
Ultrasonographic examination of the ventral neck region in cows
Am. J. Vet. Res., 1994, **55**, 14-21.
- 10 **Cauvin E.R.**
Musculoskeletal ultrasonography: seeing is believing
Vet. J., 1999, **158**, 4-5.
- 11 **Cherin P., Authier FJ., Gherardi RK., Romero N., Laforet P., Eymard B., Herson S. and Caillat-Vigneron N.**
Gallium-67 scintigraphy in macrophagic myofasciitis.
Arthritis Rheum, 2000, **43**, 1520-1526.
- 12 **Cherin P. and Gherardi RK.**
Macrophagic myophaciitis.
Curr. Rheumatol. Rep., 2000, **2**, 196-200.
- 13 **Cherin P., Laforet P., Gherardi RK., Authier FJ., Maisonobe T., Coquet M., Mussini J.M., Pellissier J-F., Eymard B. and Herson S.**
Macrophagic myophaciitis. Study and research Group on Acquired and Dysimmunity-related muscular diseases
Presse Med, 2000, **29**, 203-208.

- 14 **De Laistre Banting A. and Baggot J.D.**
Comparison of the pharmacokinetics and local tolerance of three injectable oxytetracycline formulations in pigs
J. Vet. Pharmacol. Therap., 1996, **19**, 50-55.
- 15 **De Laistre Banting A. and Fanneau de la Horie G.C.**
Subcutaneous and intramuscular injection of oxytetracycline in calves: comparison of serum concentration and local tolerance.
J. Vet. Pharmacol. Therap., 1987, **10**, 184-186.
- 16 **Fornage B.D., Touche D.H., Segal P. and Rifkin M.D.**
Ultrasonography in the evaluation of muscular trauma
J. Ultrasound Med., 1983, **2**, 549-554.
- 17 **George M.H., Heinrich P.E., Dexter D.R., Morgan J.B., Odde K.G., Glock R.D., Tatum J.D., Cowman G.L. and Smith G.C.**
Injection-site lesions in carcasses of cattle receiving injections at branding and at weaning.
J. Anim. Sci., 1995, **73**, 3235-3240.
- 18 **George M.H., Tatum J.D., Smith G.C. and Cowman G.L.**
Injection-site lesions in beef subprimals: Incidence, palatability consequences, and economic impact.
Comp. Contin. Educ. Pract. Vet., 1997, **19**, 84-93.
- 19 **Goddard P.J.**
General principles
In: Goddard P.J.: *Veterinary Ultrasonography*
Wallingford, CAB International, 1995, 1-19.
- 20 **Greenblatt D.J. and Divoll A.M.**
Intramuscular injection-site complications
J. Am. Med. Assoc., 1978, **240**, 542-544.
- 21 **Hassen A., Wilson D.E., Willham R.L., Rouse G.H. and Trenkle A.H.**
Evaluation of ultrasound measurements of fat thickness and longissimus muscle area in feedlot cattle: Assessment of accuracy and repeatability
Can. J. Anim. Sci., 1998, **78**, 277-285.
- 22 **Herring W.O., Miller D.C., Bertrand J.K. and Benyshek L.L.**
Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle.
J. Anim. Sci., 1994, **72**, 2216-2226.
- 23 **Holman E.R., Van Jonbergen H-P.W., Van Dijkman P.R.M., Van der Laarse A., De Roos A. and Van der Wall E.E.**
Comparison of magnetic resonance imaging studies with enzymatic indexes of myocardial necrosis for quantification of myocardial infarct size.
Am. J. Cardiol., 1993, **71**, 1036-1040.
- 24 **Kles V., Rio C. and Poul J.M.**
Echographic method: interest for evaluation of local tolerance
J. Vet. Pharmacol. Therap., 1997, **20**, 127-180.
- 25 **Ladage C.A., Van Walstijn Th.a. and Van Riessen H.A.**
Comparative macroscopic evaluation of muscle damage in rats and cattle after intramuscular administration of some commercially available injectable medicines
Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology: Proceedings du premier congrès l'European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Zeist, 1979
Elsevier, Amsterdam, 34-40.

- 26 **Lefebvre H.P.**
Evaluation quantitative des lésions musculaires iatrogènes par analyse pharmacocinétique de la libération de la créatine kinase
Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, 1994.
- 27 **Lefebvre H.P., Laroute V., Braun J-P., Lassourd V. and Toutain P-L.**
Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release
Vet. Res., 1996, **27**, 343-361.
- 28 **Lehto M. and Alanen A.**
Healing of a muscle trauma. Correlation of sonographical and histological findings in an experimental study in rats.
J. Ultrasound Med., 1987, **6**, 425-429.
- 29 **Marshall A.B. and Palmer G.H.**
Injection sites and drug bioavailability.
Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology: Proceedings du premier congrès l'European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Zeist, 1979
Elsevier, Amsterdam, 54-60.
- 30 **Martineau G., Belayat F., Coignoul F., Martineau-Doize B., Josse M. and Dewaele A.**
Lésions musculaires chez le porc après injection de médicaments.
Ann. Med. Vet., 1980, **124**, 215-222.
- 31 **Nosaka K. and Sakamoto K.**
Changes in plasma enzyme activity after intramuscular injection of bupivacaine into the human biceps brachii
Acta. Physiol. Scand., 1999, **167**, 259-265.
- 32 **Nouws J.F.M.**
Irritation, bioavailability, and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs.
Vet. Q., 1984, **6**, 80-84.
- 33 **Nouws J.F.M., Smulders A. and Rappalini M.**
A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep.
Vet. Q., 1990, **12**, 129-138.
- 34 **Nyland T.G., Mattoon J.S. and Wisner E.R.**
Physical principles, instrumentation and safety of diagnostic ultrasound.
In: Nyland T.G. and Mattoon J.S.: Veterinary diagnostic ultrasound
Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1995, 3-19.
- 35 **Perkins T.L., Green R.D. and Hamlin K.E.**
Evaluation of ultrasonic estimates of carcass fat thickness and longissimus muscle area in beef cattle.
J. Anim. Sci., 1992, **70**, 1002-1010.
- 36 **Perkins T.L., Green R.D., Hamlin K.E., Shepard H.H. and Miller M.F.**
Ultrasonic prediction of carcass merit in beef cattle: Evaluation of technician effects on ultrasonic estimates of carcass fat Thickness and longissimus muscle area.
J. Anim. Sci., 1992, **70**, 2758-2765.
- 37 **Pyörälä S., Laurila T., Lehtonen S., Leppä S. and Kaartinen L.**
Local tissue damage in cows after intramuscular administration of preparations containing phenylbutazone, flunixin, ketoprofen and metamizole.
Acta. Vet. Scand., 1999, **40**, 145-150.

- 38 **Rasmussen F.**
Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs in food-producing animals
Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology: Proceedings du premier congrès de l'European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Zeist, 1979
Elsevier, Amsterdam, 27-33.
- 39 **Reimers C.D., Fleckenstein J.L., Witt T.N., Muller-Felber W. and Pongratz D.E.**
Muscular ultrasound in idiopathic inflammatory myopathies of adults
J. Neurol. Sci., 1993, **116**, 82-92.
- 40 **Robinson D.L., Mc Donald C.A., Hammond K. and Turner J.W.**
Live animal measurement of carcass traits by ultrasound: Assessment and accuracy of sonographers
J. Anim. Sci., 1992, **70**, 1667-1676.
- 41 **Russel A.J.F.**
Ultrasonography and body composition in sheep
In: Goddard P.J.: Veterinary Ultrasonography
Wallingford, CAB international, 1995, 315-323.
- 42 **Svendsen O.**
Studies of tissue injuries caused by intramuscular injection of drugs and vehicles. Methods for quantification and effects of concentration, volume, vehicle, injection speed and intralipomatous injection.
These de médecine vétérinaire, Kopenhagen, 1988.
- 43 **Tittes-Rittershaus V., De Vries H. and De Jong H.**
Local reaction studies in rabbits and dogs.
Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology: Proceedings du premier congrès l'European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Zeist, 1979
Elsevier, Amsterdam, 41-46.
- 44 **Toutain P-L., Lassourd V., Costes G., Alvinerie M., Bret L., Lefebvre H.P. and Braun J-P.**
A non-invasive and quantitative method for the study of tissue injury caused by intramuscular injection of drugs in horses.
J. Vet. Pharmacol. Therap., 1995, **18**, 226-235.
- 45 **Van Alstine W.G. and Dietrich J.A.**
Porcine sciatic nerve damage after intramuscular injection
Comp. Contin. Educ. Pract. Vet., 1988, **10**, 1329-1332.
- 46 **Van Donkersgoed J., Dubeski P.L., Vanderkop M. and Aalhus J.L.**
The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves
Can Vet J, 2000, **41**, 617-622.
- 47 **Van Donkersgoed J., Vanderkop M., Salisbury C., Sears L. and Holowath J.**
The effect of administering long-acting oxytetracycline and tilmicosin either by dart gun or by hand on injection site lesions and drug residues in beef cattle.
Can. Vet. J., 1999, **40**, 583-587.
- 48 **Van Holsbeeck M. and Introcaso J.H.**
Musculoskeletal ultrasonography
Radiol. Clin. N. Am., 1992, **30**, 907-925.

ANNEXES

1. Terramycine® Longue action

TERRAMYCINE® Longue Action (T.L.A.®)

Solution injectable d'oxytétracycline

Composition

Solution injectable :

OXYTETRACYCLINE (s.f. de dihydrate) _____ 20 g

Excipient q.s.p. _____ 100 ml

Propriétés

La formule spéciale de la T.L.A.® permet, en une seule injection, de réaliser une antibiothérapie complète. En effet, après une seule injection à la posologie de 1 ml pour 10 kg de poids vif, des taux sanguins efficaces se maintiennent pendant 3 à 5 jours. L'injection unique remplace trois injections à 24 heures d'intervalle d'un antibiotique à formule classique.

Cette propriété est particulièrement intéressante en thérapeutique vétérinaire où, dans certains types d'élevage, il est difficile, voire impossible, de manipuler plusieurs jours de suite les animaux pour réaliser un traitement antibiotique par voie injectable.

Des taux sanguins élevés apparaissent très rapidement après l'injection (pic sérique obtenu dans les 15 minutes suivant l'injection), ce qui permet le traitement d'infections aiguës. L'activité antimicrobienne de l'oxytétracycline est très étendue : bactéries Gram positif et Gram négatif, *Actinomyces*, spirochètes, mycoplasmes, chlamydiae et certains protozoaires.

Indication

Chez les bovins, ovins, porcins : traitement des infections à germes sensibles à l'oxytétracycline.

- Pneumopathies infectieuses liées aux stress des transports (*shipping-fever*).
- Gastro-entérites infectieuses.
- Métrites, mammites, syndrome "MMA".
- Avortements infectieux (chlamydiae, brucellose).
- Panaris, arthrites.
- Anaplasmose, leptospirose, charbon symptomatique, actinobacillose.
- Prévention de l'infection chirurgicale, traumatique ou obstétricale.
- Complications bactériennes des maladies à virus.
- Pathologie africaine (anaplasmose, *cowdriose*).

Administration et posologie

Voies I.M. ou S.C.

- *Bovins, ovins, porcins* : posologie de base : 1 injection unique de 20 mg d'oxytétracycline par kg, soit 1 ml de T.L.A.® pour 10 kg par voie I.M. profonde.
- *Porcelets de moins de 10 kg* : par voie I.M. profonde.
- *Porcelets de 2 à 10 kg* : 1 ml de T.L.A.®, par voie S.C.

— *Porcelets de moins de 2 kg* : 0,5 ml de T.L.A.®, par voie S.C.

Ne pas administrer du fer injectable le même jour.

Dans les infections nécessitant une antibiothérapie prolongée, le renouvellement de l'injection peut se réaliser 3 à 5 jours après la première.

Précautions

Une tuméfaction passagère peut s'observer au point de l'injection : elle ne présente aucun caractère de gravité et disparaît en quelques jours.

Pour diminuer ce phénomène, il est recommandé de ne pas injecter :

- plus de 20 ml au même point chez les bovins,
- plus de 5 ml au même point chez les ovins,
- plus de 10 ml au même point chez les porcins.

Temps d'attente

Viande et abats : 21 jours.

Lait : 7 jours (14 traites).

Catégorie

Liste I.

A ne délivrer que sur ordonnance devant être conservée pendant le temps d'attente du médicament.

Conservation

Ne pas stocker à une température supérieure à 30° C. Un léger noircissement de la solution peut apparaître, ce qui n'altère en rien son efficacité.

Tenir à l'abri du gel.

Présentations

- Flacon multidose de 100 ml
A.M.M. 686 396.6 du 22/06/79
- Flacon multidose de 250 ml
A.M.M. 696 988.3 du 15/02/84
- Flacon multidose de 500 ml
A.M.M. 699 685.1 du 22/07/87

® Marque déposée de PFIZER

PFIZER Santé Animale

86, rue de Paris
91407 ORSAY Cedex
Tél. : 01.69.18.66.66
Télex : 602 807 F
Télécopie : 01.69.18.66.64
Web : <http://www.pfizer-vet.fr/>

2. Textes relatifs aux études sur la tolérance locale (musculaire)

EMEA

3. TOLERANCE STUDIES IN THE TARGET ANIMAL

This part gives the details of investigation of safety in few animals of each target species, where many parameters should be measured under controlled conditions.

For the purpose of these guidelines target animal species are the species for which the product is intended.

The specific information needed for a veterinary medicinal product depends on such factors as classification of the active ingredient(s), type of product, proposed use regimen, species, breed and/or class of animals, claims, dosage and/or previous use history. All data mentioned in these guidelines would not necessarily need to be collected for every product. Omission and deviation should be justified. For certain products (e.g. intramammary, ophthalmic, otic products etc.) information not specified in these guidelines may be required.

Studies on target animal tolerance should be adequately designed, well controlled in order to have relevance to the target population under study.

Investigations of target animal tolerance should, whenever possible, be carried out in a controlled, randomised design, employing an adequate number of animals/experimental units per treatment group. Where prior knowledge is likely to influence allocation to treatment, management of treatment groups, or the assessment of response parameters, blind techniques should be employed.

The appropriate number of animals per treatment and the number of replicates will depend upon such things as the variability of the observations, the size of the difference among the various treatment groups that the experimenter would like to be able to detect, as well as the significance level and power of the statistical tests employed.

3.1 Studies on general tolerance

3.1.1 Experimental conditions

3.1.1.1 Test animals

Unless otherwise justified, the studies should be performed in groups of each category of each target species in comparison with appropriate control groups. A negative control group is recommended. Treated and control animals should be handled identically except for product exposure.

Test animals should be healthy and of the species and representative categories for which the product is intended. Selection of species other than the target animal species may be made in exceptional cases, e.g. in the case of minor species. Justification should be made for non-target animal species.

Appropriate diagnostic tests, vaccinations, prophylactic and therapeutic treatments should be completed prior to the baseline period of the test period. Exceptions should be included in the study protocol. No treatment other than the administration of the test product should be given during the study period.

Sufficient time must be given to acclimate test animals in line, especially if a special diet or feeding regimen is intended.

3.1.1.2 Test product

The product to be evaluated must be identical to the product intended to be marketed, i.e. same chemical, same particle size, and same formulation. Any exception shall be justified.

3.1.1.3 Route of administration

The routes of administration should include at least those proposed by the label. The site of application must be specified. The choice of a different approach should be justified. For products exhibiting a narrow margin of safety it may be necessary to test others than the proposed route of administration: e.g. if significant amounts of the active ingredient(s) of a product intended for external use will be ingested under the proposed use conditions, the oral tolerance should be tested. For products to be administered intramuscularly or subcutaneously it may be necessary to test the intravenous tolerance.

3.1.1.4 Dosage regimen

The studies should be conducted using the recommended dose and multiple dose levels in order to determine the margin of safety for the product for the proposed duration of use.

The choice of dose levels should take into account the proposed use of the product, management conditions etc.. Omission of multiple dose studies should be justified.

3.1.1.5 Duration of administration

It is recommended that the products should be studied for a period of time in excess of the recommended maximum duration of use administering the highest recommended dose level. However, for products intended for long-term administration (15 days or longer) it may be impossible to carry out studies for such a period. If this arises, tolerance studies should be conducted with the product being administered at least for the maximum use duration and using the highest recommended dose level.

3.1.2 Observations

Investigations necessary to evaluate effects of the product depend on the type of action of the active ingredient, potential of toxicity, proposed use of the product, and class to which the target animals belong.

Clinical observations should be recorded at predetermined intervals appropriate for the investigative purpose(s), during the entire study period.

Where relevant, appropriate diagnostic procedures/tests (clinical or otherwise) should be carried out at predetermined intervals, either on all animals, or on a representative sample from each treatment group, as the case may be.

A complete physical examination should be performed, and baseline data should be collected. Data should be obtained prior to the start of the trial and at reasonable, predetermined intervals thereafter.

Evaluation should include:

- daily monitoring of feed and, if possible, water consumption;
- periodic weighing;
- characterisation of all toxic responses;
- appropriate clinical pathologic procedures which should be conducted on all test groups. This is required on all animals in each group or, when appropriate, on a representative number of animals preselected at random of each group at predetermined intervals, as provided in the protocol;

- where appropriate animals which have not shown overt clinical signs of intolerance but which have demonstrated changes in blood chemistry, urinalysis, etc., should be monitored until such parameters return to within the accepted range for normality;
- a necropsy examination with gross pathology and histopathology should be performed on all animals which die or which undergo euthanasia to prevent further suffering. Histopathology should be performed on all grossly affected organs or suspected target organs, identification of the latter will be based on laboratory animal toxicological studies and other pertinent data;
- Necropsy including histopathology should be carried out of all, or a representative sample of animals, from treatment groups which have shown overt clinical signs of intolerance.

For products intended for use in breeding animals reproductive performance should be documented. Omission shall be justified.

3.2 Studies on local tolerance

3.2.1 Tolerance testing of injectables

Testing of injectables includes intravenous, intramuscular, and subcutaneous routes.

3.2.1.1 Dosage regimen

Studies should take into account the proposed dose levels. Where necessary, studies on the product vehicle may be carried out. The applicant should take into consideration the volume of injection of the product necessary for the treatment in relation to the body weight. Particular attention must be paid where heavier animals, e.g. cattle or horses, require large volumes.

3.2.1.2 Observations

3.2.1.2.1 Clinical examination

Repeated observations of the animals and the injection sites should be performed. Examination of injection sites and surrounding tissues should be carried out at regular intervals during the 48-96 hours period after administration. Time intervals should be justified by the nature of the substance/product under investigation. If significant lesions are still present at the end of this period, observations should continue until the lesions have subsided to an insignificant level. The sites should be carefully examined for signs of inflammation (swelling, pain, etc.) by inspection and palpation; the dimensions of (palpable) lesions should be recorded.

3.2.1.2.2 Gross and microscopic pathology

For injectables intended for intramuscular or subcutaneous administration pilot studies on local toxicity may be carried out in laboratory animals, e.g. in rabbits. The concentration and the injection volume of the test product to be administered should be justified. Laboratory-animal testing may suffice, provided that such testing conclusively shows any damage to be negligible. Such studies should consist of three parts, i.e. macroscopic and microscopic examination of the injection site, and determination of the serum activity of the enzyme Creatinine Phosphokinase (CPK) before injection and at appropriate time intervals after injection, until the pre-injection level is reached.

For products where testing in laboratory animals and/or in the target animal species indicate tissue reactions, target animal studies on local tolerance must always include a

comprehensive post mortem examination of the injection sites. All injection sites, or a representative sample from each treatment group should be examined at the end of the trial period, and any lesion revealed should be examined histologically.

In order to document the reversibility of any local lesion, injection sites should be examined at various time intervals after administration of the product, until such time that no significant change is detectable, or until such time that any lesion present is unlikely to show further regression (healing up) within a reasonable period of time.

3.2.2 Tolerance testing of products intended for dermal application

The local toxicity of pour-on products and similarly formulated preparations should be investigated clinically and, where warranted, by post mortem examination. In addition, if the product is intended for use in production animals, in which the hide is normally used for leather manufacturing, the quality of the tanned skin must be documented.

3.2.3 Tolerance testing of certain products intended for oral administration

Bolus-formulated products should be tested with respect to any effect that may arise, either in connection with the administration procedure (e.g. "large" boluses intended for "small" animals may get stuck in the oesophagus), or may be caused by the presence of the product in the gastrointestinal tract for extended periods (e.g. sustained-release or pulse-release boluses intended for ruminants may cause damage to the forestomachs).

FDA

III. DRUG TOLERANCE TEST

A. Introduction

The dose response curve of a product in animals is a dynamic continuum ranging from no effect to effective, to toxic effects, and to lethal effects. Our interest is focused upon the effective and toxic doses and the margin of safety represented by the difference between the two.

The drug tolerance test characterizes, under controlled conditions, the target animal response to a toxic

dose(s) of a drug. This should be accomplished by inducing toxicity and recording the clinical sign(s) manifested by the test animals following administration of specific doses. The investigator should observe clinical signs, including changes in behavior and appearance, and gross lesions in animals which die during the test. This will provide a clinical picture for the toxic effects of a drug product. Clinical pathologic and histologic data should be collected. These data should reveal the physiological functions most readily affected, and this should aid in focusing the data requirements of the target animal toxicity studies. In many instances, data required to identify the tolerance to a product can be obtained from acute and subchronic toxicity studies.

Drug tolerance testing is required for drug products containing a new chemical entity, and for use of an approved new animal drug in additional animal species. In general, drug tolerance studies will not be required for drugs administered for localized activity (e.g., otic, ophthalmic, intramammary, intraarticular, etc.). Conversely, this exemption does not apply to drugs for generalized dermal application and topically administered drugs which act systemically rather than locally.

Drug tolerance testing generally does not apply to:

1. Supplemental use of an approved new animal drug in the same animal species/class and at equivalent or lower doses.
2. Previously approved single ingredient drug products (generic applications).
3. Combination drug products containing previously approved drug products provided that safety and efficacy data do not indicate a chemical or physiological reaction between the drug ingredients.
4. New salts of a moiety with a known toxic syndrome and/or widespread clinical use. Comparability studies should usually suffice for such drug products.

B. Test Design

1. Dosage and routes of administration

a. Dosage form

The market formulation of the drug should be used. If this is not possible, the formulation used should be acceptable for adequate testing of the product.

b. Route of administration

The drug being tested should be administered by the recommended route(s) under the proposed conditions of use, unless a different route would be more useful in measuring the particular parameters of drug action. If volume or palatability becomes a limiting factor for administration, special techniques (gavage, intravenous, multiple sites, incremental doses, etc.) may be used. Depending upon the vehicle and the volume to be used, and special techniques to be employed, a vehicle control group may be required.

c. Dose

The characteristics of the drug and its proposed conditions of use are used to determine the dosage regimen.

1.) In general, for drugs intended for short-term (14 days or less) administration, administer up to ten times (10X) the maximum proposed dose according to the proposed method of administration for the proposed maximum duration of use.
2.) For drugs intended for long-term, continuous use (15 days or longer), administer up to 10X the maximum proposed use level for up to 21 days.

Tests conducted with one of the above two treatment regimens will usually meet the requirements for a drug tolerance test whether or not toxicity is observed. There may be some cases where a higher dose should be administered and/or the drug should be administered for a longer period of time in order to characterize the signs of toxicity. If testing a higher dose is justified, there would need to be unusual circumstances to warrant testing doses higher than 25X. Before initiating the test there should be agreement between the sponsor and FDA regarding the dosage regimen and objectives of the test.

If toxicity to the drug occurs at one of the levels in the toxicity study (described below), it will meet the requirement for a drug tolerance test. An alternative is to include a 10X treatment regimen in the toxicity study to meet the requirements of a tolerance test.

2. Test animals

Studies should be conducted in healthy animals representative of the class/classes/breed(s) of animals (species, size, and age) for which the drug is intended. Generally, no more than four animals are required for the tolerance test. If the situation warrants the testing of fewer than four animals, a minimum of two animals is recommended.

3. Baseline period

Baseline values for parameters of drug action to be measured during the study should be determined prior to beginning the test. All prophylactic and therapeutic medication should be administered prior to this period so that they do not interfere with the study.

4. Observations and examinations

Test animals should be closely monitored to characterize the response to a toxic dose(s) of a drug. The types of observations and examinations depend upon the drug and class of animals being tested. Examples of some of the findings indicating drug toxicity are listed in Addendum No. 1 of each chapter for target animal species except poultry, which findings are listed in Chapter IX.

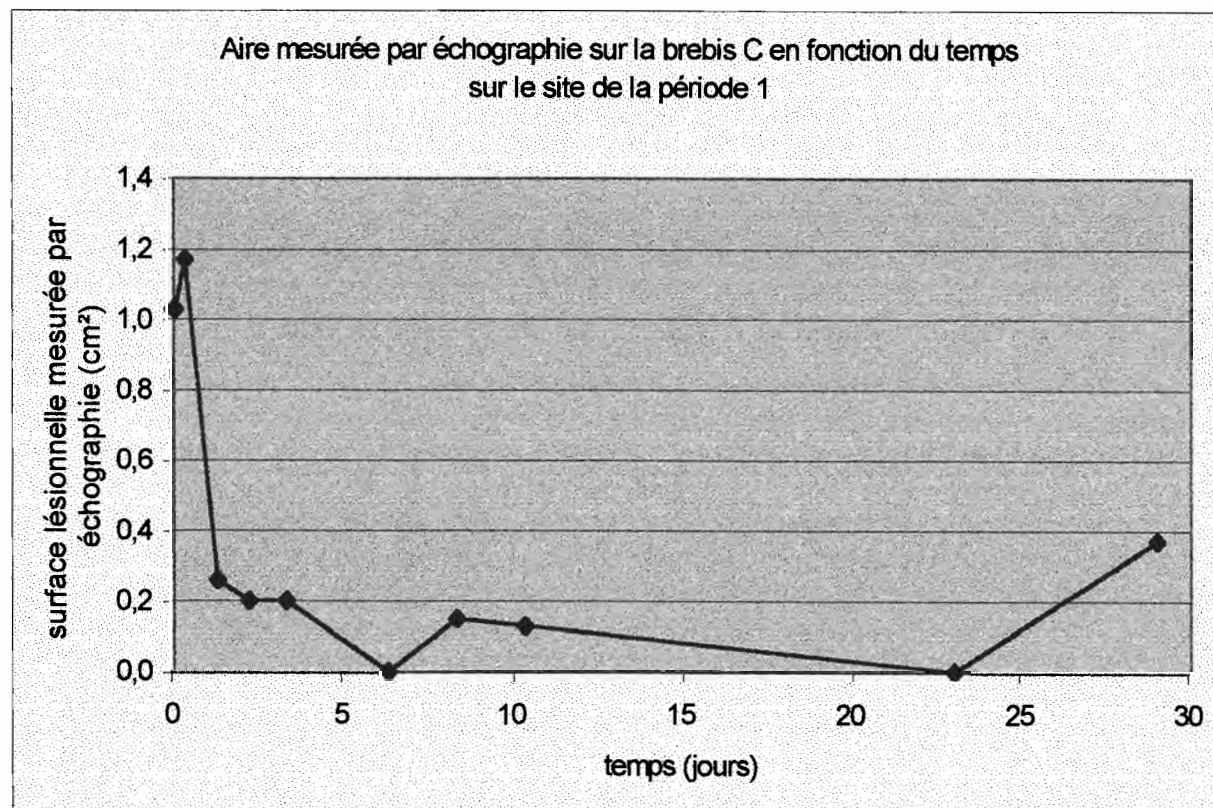
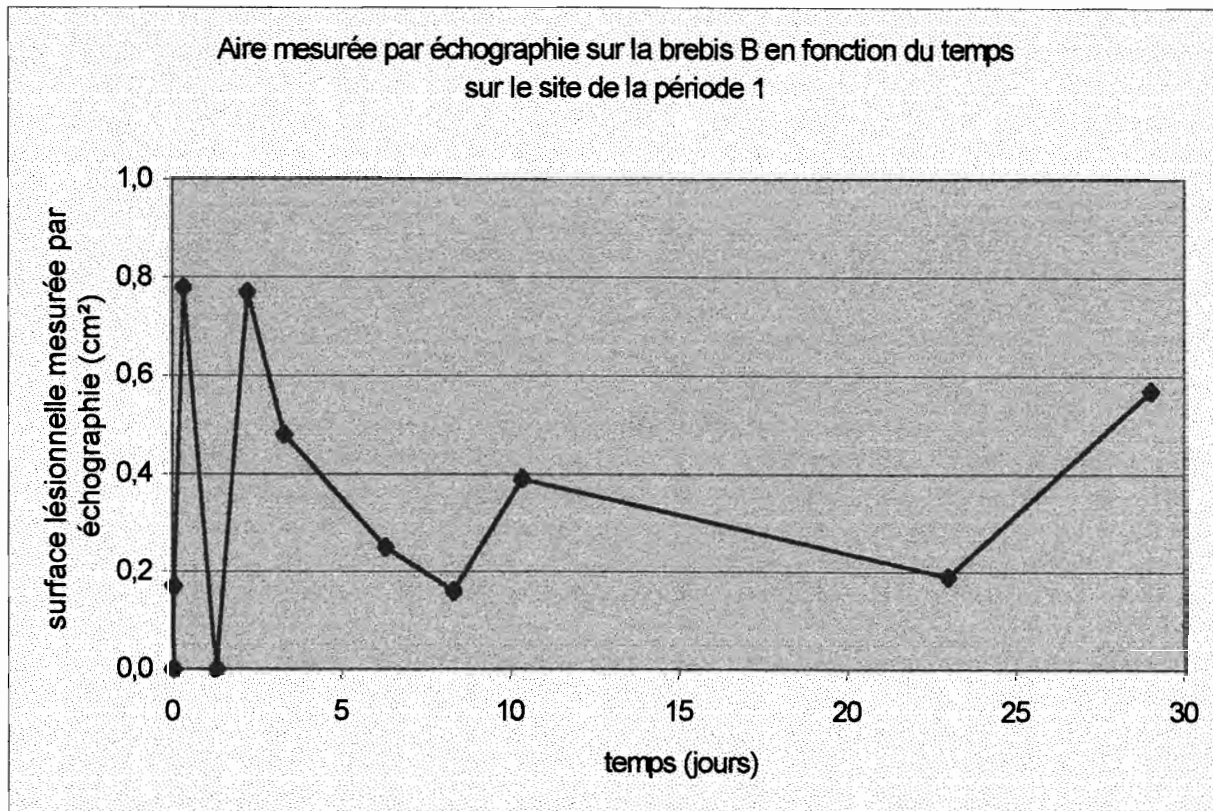
5. Parameters to measure (reporting results)

Clinical pathological tests should be conducted on all animals.

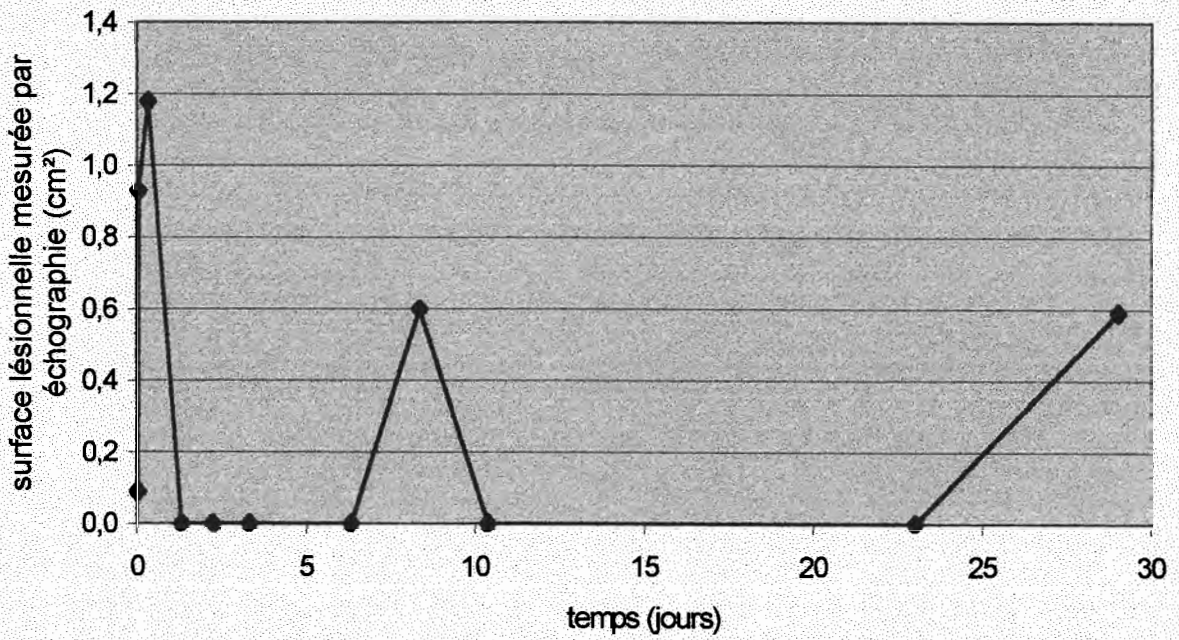
If the animals exhibit toxic signs to a drug, gross and histopathologic examinations should also be conducted. These data will aid in focusing the data requirements of the target animal toxicity study. The parameters to be measured depend upon the drug and class of animals being tested.

Examples of histopathologic examinations and clinical pathologic tests are found in Addenda No. 2 and 3 of each chapter for each target animal species except poultry, which are given in Chapter IX.

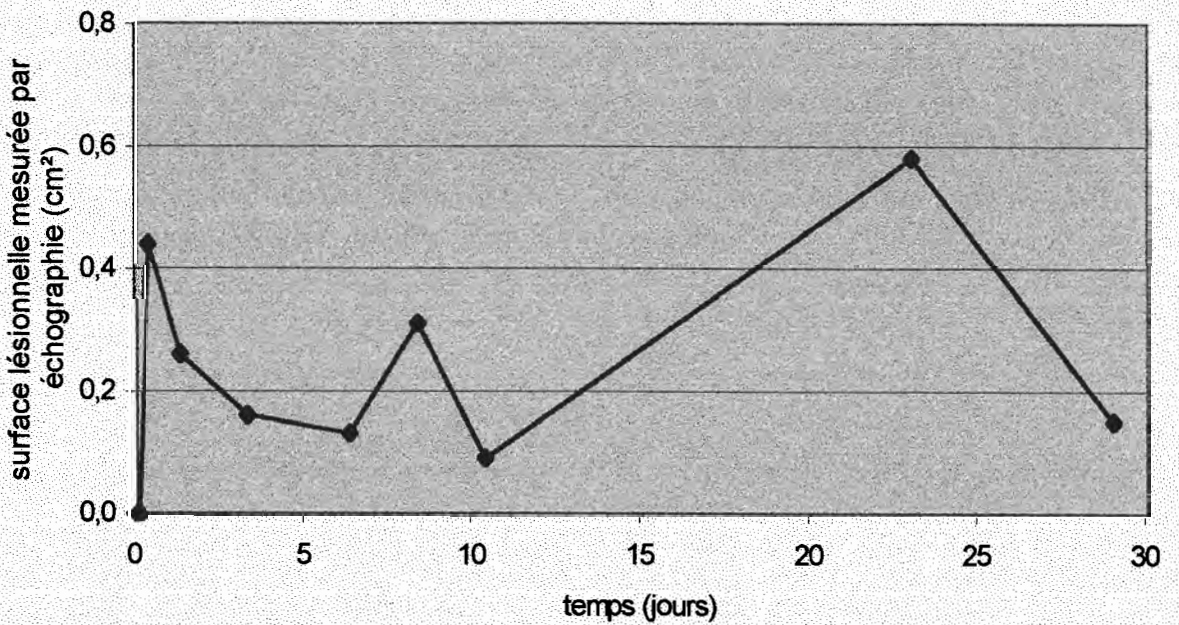
3. Suivi échographique de l'aire de muscle Longissimus dorsi modifié après administration IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action pour les deux périodes expérimentales, pour les brebis B, C, D et E (la brebis A est présentée dans les résultats p. 44)

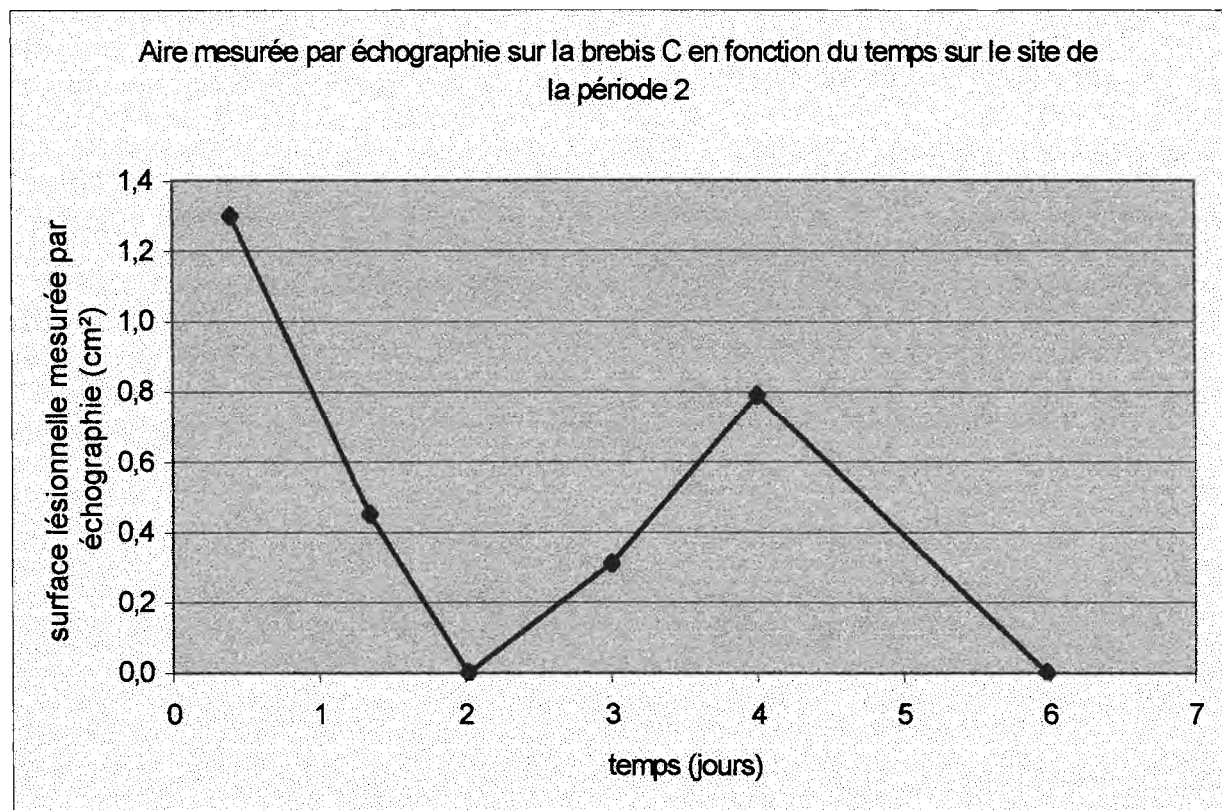
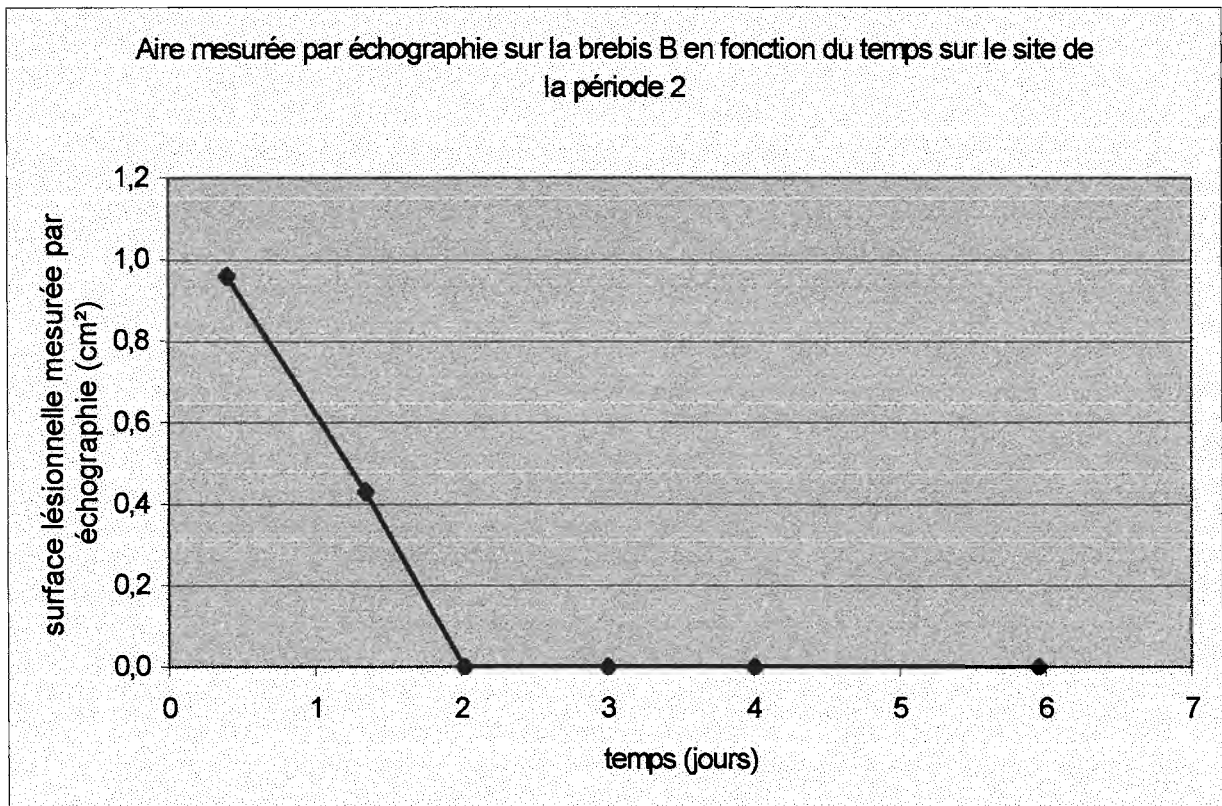


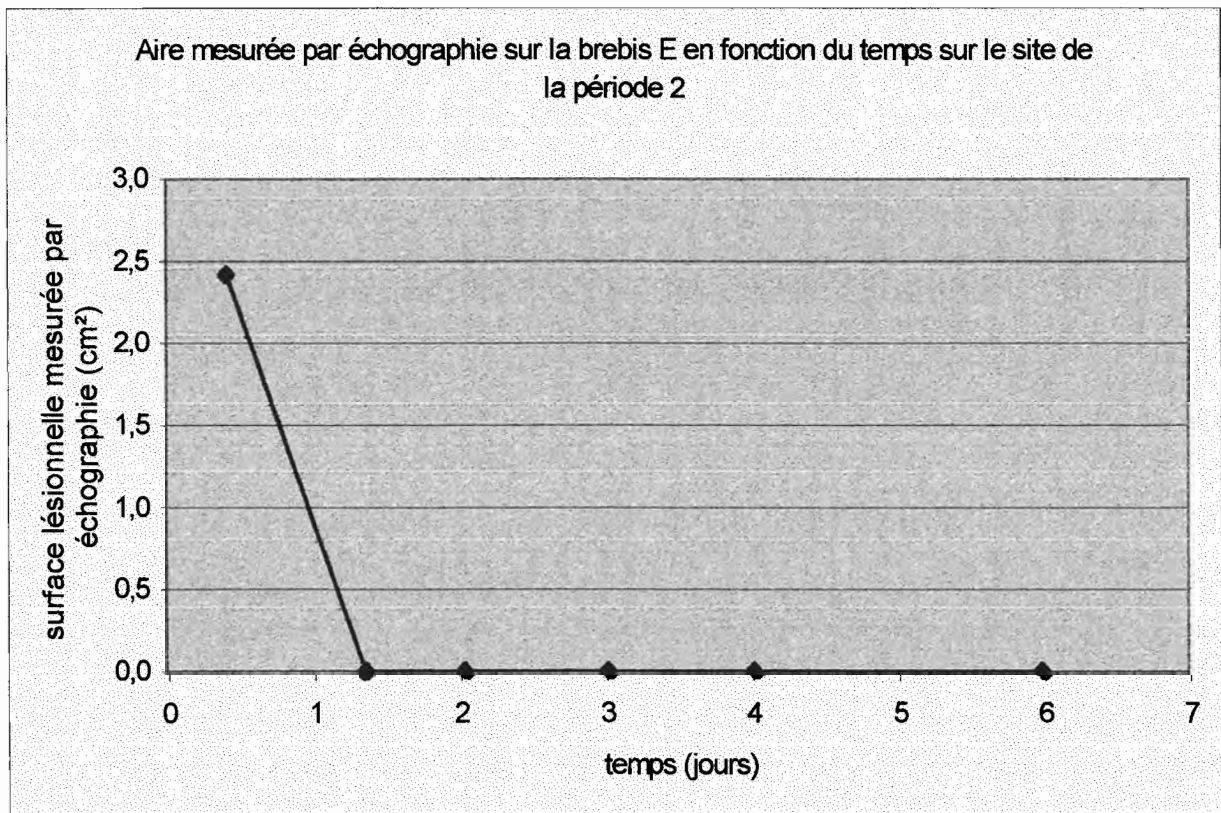
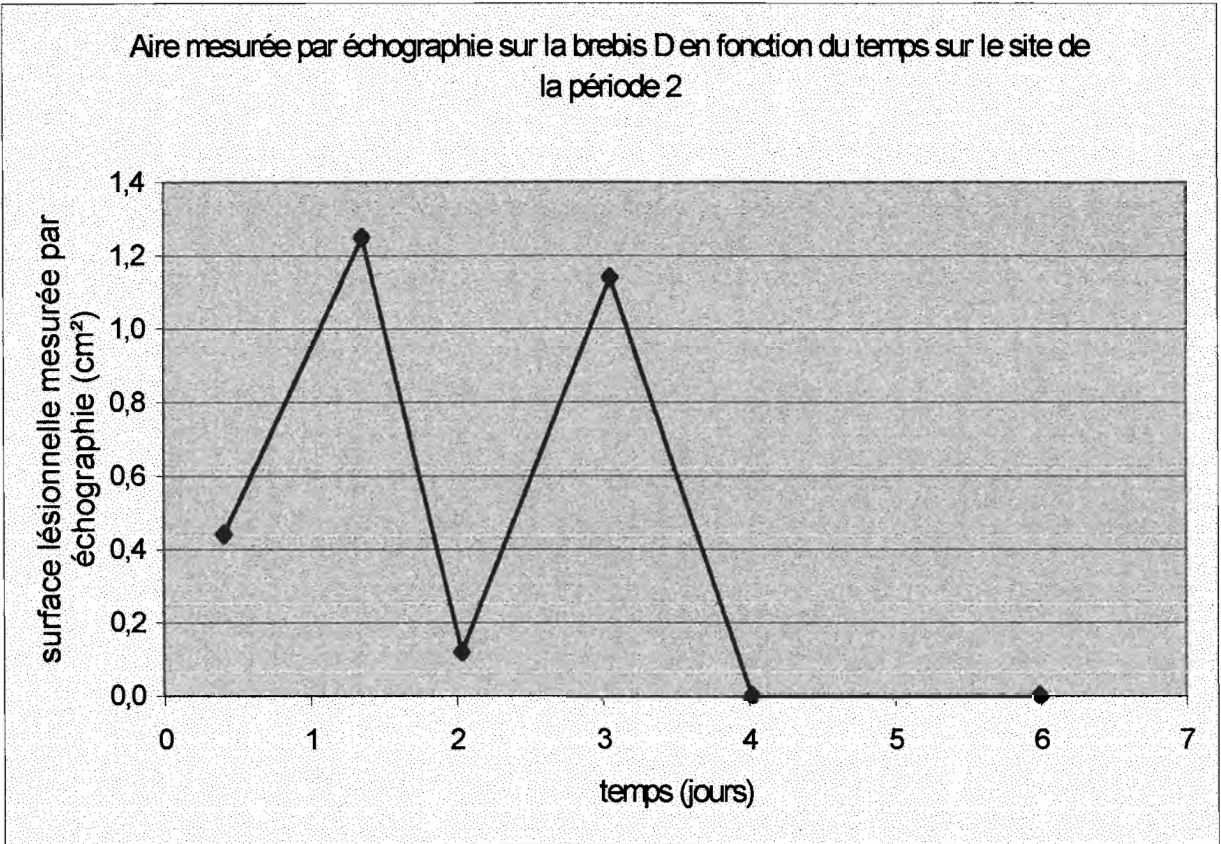
Aire mesurée par échographie sur la brebis D en fonction du temps sur le site de la période 1



Aire mesurée par échographie sur la brebis E en fonction du temps sur le site de la période 1







Toulouse, 2001

NOM : VACHER

PRENOM : Jean-François

TITRE : **Evaluation expérimentale chez la brebis des qualités métrologiques des méthodes échographique et anatomopathologique macroscopique pour la quantification des lésions musculaires iatrogènes.**

RESUME : Que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, les administrations intramusculaires (IM) sont très employées. Pourtant, des problèmes de tolérance locale se posent fréquemment, avec des conséquences pouvant revêtir des aspects éthiques, économiques ou de santé publique.

Les industries pharmaceutiques, pour obtenir une autorisation de mise sur le marché, doivent évaluer la tolérance locale du produit concerné. Actuellement, elles ont recours à un examen anatomopathologique macroscopique éventuellement complété d'une analyse histologique.

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les qualités métrologiques de la méthode anatomopathologique macroscopique actuellement utilisée et d'une méthode échographique qui pourrait s'y substituer avantageusement sur les plans éthique et économique.

Pour cela deux séries d'administrations IM de 5 ml d'une formulation d'oxytétracycline longue action ont été réalisées à J0 et J22 dans le muscle Longissimus dorsi, sur cinq brebis. Des mesures sur les lésions éventuelles ont été réalisées par échographie sur animaux vivants à J28 et par examens anatomopathologiques à J29. Les mêmes mesures ont été effectuées sur des photographies numérisées des pièces anatomiques par planimétrie assistée par ordinateur, cette méthode servant de référence.

Il a ainsi été mis en évidence que la méthode anatomopathologique macroscopique présentait des failles aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif et que l'échographie était un outil peu performant dans la détection des lésions ainsi que dans leur mesure, malgré de bonnes qualités métrologiques intrinsèques.

Les efforts doivent donc se tourner vers d'autres méthodes d'imagerie médicale ou vers des approches moins directes comme l'analyse pharmacocinétique de la libération de la créatine kinase.

MOTS-CLES : brebis – échographie – anatomopathologie macroscopique – quantification – lésions musculaires – administration intramusculaire

ENGLISH TITLE : **Experimental assessment in ewes of metrological qualities of ultrasonography and macroscopic pathology for the quantification of iatrogenic muscular lesions.**

ABSTRACT : Intramuscular (IM) administration is very common both in human and veterinary medicine. However, local tolerance problems are frequently mentioned, involving ethical, economic and sanitary consequences.

Pharmaceutics industries, for approval procedures, have to assess local tolerance of the product. At present, they use a macroscopic pathology examination possibly completed by an histological analysis.

This study's purposes were to assess metrological qualities of the macroscopic pathology used at the present time and ultrasonography which could substitute for the first with economic and ethical advantages.

Two series of IM administrations of 5 ml of an oxytetracycline long acting formulation were conducted on J0 and J22 in Longissimus dorsi muscles of 5 ewes. Measurements on the possible lesions were made by ultrasonography on alive animals on J28 and by a macroscopic pathology examination on J29. The same measurements were made on digitised photographs of anatomic pieces by computer-assisted planimetry, which was our reference.

It has been shown that macroscopic pathology was an imperfect method both qualitatively and quantitatively and that ultrasonography was an unsuitable tool for the detection and the measurement of muscular lesions, despite good intrinsic metrologic qualities.

Further studies have to evaluate other medical imaging techniques or indirect methods like pharmacokinetic analysis of creatine kinase release.

KEY WORDS : ewe – ultrasonography – macroscopic pathology – quantification – muscular lesions – intramuscular injection