



HAL
open science

Détermination de nouvelles modalités d'utilisation des bêta-lactamines en médecine vétérinaire par des approches PK/PD en vue de la protection de la santé publique: implication de la taille de la charge bactérienne pathogène.

Maleck V. Vasseur

► To cite this version:

Maleck V. Vasseur. Détermination de nouvelles modalités d'utilisation des bêta-lactamines en médecine vétérinaire par des approches PK/PD en vue de la protection de la santé publique: implication de la taille de la charge bactérienne pathogène.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2014. Français. NNT : . tel-02799744

HAL Id: tel-02799744

<https://hal.inrae.fr/tel-02799744>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Maleck Vasseur

Le 12 septembre 2014

Titre :

Détermination de nouvelles modalités d'utilisation des bêta-lactamines en médecine vétérinaire par des approches PK/PD en vue de la protection de la santé publique : implication de la taille de la charge bactérienne pathogène.

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

UMR 1331 Toxalim INRA/INP

Directeur(s) de Thèse :

Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU

Monsieur le Docteur Michel LAURENTIE

Rapporteurs :

Monsieur le Professeur Antoine ANDREMONT

Monsieur le Docteur Jean-Yves MADEC

Autre(s) membre(s) du jury :

Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU

Madame le Professeur Christine ROQUES

Monsieur le Docteur Michel LAURENTIE

Membre invité : Monsieur le Professeur Guy-Pierre MARTINEAU

Examineur

Examineur

Examineur

Remerciements

A Monsieur le Professeur Antoine ANDREMONT et Monsieur le docteur Jean-Yves MADEC qui ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit.

A Madame le Professeur Christine ROQUES, qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU qui a fait l'erreur de me recruter comme doctorant au sein de la défunte UMR 181, qui m'a, tant bien que mal, supporté, formé, aidé et guidé tout au long de cette thèse avec une incommensurable patience, une grande rigueur et un optimisme sans faille. Je lui serai éternellement reconnaissant de m'avoir fait découvrir la pharmacologie et le monde vétérinaire. Je le remercie également pour sa ponctualité sans faille et son humour ravageur.

A Monsieur le Docteur Michel LAURENTIE qui a fait l'erreur de valider le choix de recrutement effectué par le professeur BOUSQUET-MELOU et qui a également dû faire preuve d'une grande patience et de médiation durant mon épopée fougèraise. Je le remercie pour toutes nos interminables discussions, pour ses bonnes idées, pour m'avoir réconcilié (un peu) avec les statistiques, pour m'avoir sensibilisé à la qualité en recherche et pour m'avoir initié à ce fabuleux loisir qu'est la pêche à la mouche.

A Monsieur le Docteur Pascal SANDERS, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire au nom de la solidarité régionale. Je le remercie également pour son implication dans mon sujet de thèse.

A Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN, que je peux considérer comme mon troisième directeur de thèse. Je le remercie pour son immense culture quelle soit scientifique ou non, son enthousiasme et ses très bons conseils.

A Madame le Docteur Aude FERRAN, que je peux considérer comme ma quatrième directrice de thèse. Je la remercie pour m'avoir formé et vite intégré au sein du laboratoire, pour m'avoir supporté, pour sa gentillesse, pour tous ses conseils précieux et ses corrections toujours pertinentes.

A Madame le Docteur Véronique DUPOUY, qui a participé de manière active à mon travail expérimental, je la remercie pour sa disponibilité, son implication et son savoir-faire qui m'ont fait gagner un temps précieux.

A Madame Nathalie ARPAILLANGE, qui s'est beaucoup investie dans la réalisation de plusieurs expérimentations de mon travail de thèse.

A Madame le Docteur Catherine VIGUIÉ et Mesdames les Professeurs Véronique GAYRARD et Nicole HAGEN, (les drôles de dames) qui m'ont initié aux joies de la contention animale, à la chirurgie et aux phases animales à 4000 prélèvements avec des prélèvements toutes les minutes pendant 48 heures. Merci également pour votre patience à mon égard et pour m'avoir initié à la boisson.

A Madame le Docteur Marlène LACROIX et Madame Sylvie PUEL, à qui le dosage de la cefquinome et de l'amoxicilline dans toutes sortes de matrices terrestres et extraterrestres est possible et ce, dans des temps records.

A Monsieur le professeur Didier CONCORDET, merci pour les quelques éclaircissements concernant le monde nébuleux des statistiques et pour toutes ces discussions où nous avons refait le monde.

A Monsieur Pascal BOURDAUD'HUI, pour tous ses dépannages informatiques, ses bons tuyaux et son soutien sans faille au TEFÉCÉ.

A Mesdames Valérie DEFFORGE, Marie-Françoise RAYMOND et Christiane BRASSENS, qui m'ont beaucoup facilité la vie au cours du déroulement de ma thèse en me guidant de façon efficace dans la jungle des démarches administratives notamment celles de l'INRA et en me permettant de déchiffrer en partie les obscurs logiciels que sont WORD et Power Point.

A Madame Simone BAURES, sans qui l'obtention de tout le savoir inaccessible par les voies classiques ainsi que l'obtention de certaines fournitures vitales ne seraient pas possibles. Et n'oublie pas « en voiture Simone, c'est moi qui conduit, c'est toi qui klaxonne »

A Madame le Docteur Céline LAFFONT, merci pour tes encouragements et ta bonne humeur.

A toute l'équipe zootechnie (Equipe 21) de l'UMR1331 présente sur le site de l'ENVT : Madame le Docteur Élisabeth JEUNESSE, la grande marieuse de l'ENVT, Monsieur Sylvain BRUYAS dit « BRUYANANAS le regretté », merci pour ton aide et ta bonne humeur durant nos manip GRUIGRUI sur les rythmes endiablés de NTM et même si tu t'en vas chez l'ennemi, tu garderas toujours une petite place dans mon cœur, Monsieur Cédric LACASSAGNE dit « LA CASTAGNE », merci également pour ces fameuses manip GRUIGRUI et pour m'avoir fait découvrir des élevages de MEUMEU et de GRUIGRUI que ce soit au fin fond de l'Aveyron ou de l'Ariège, Monsieur Jean-Pierre GAU, qui est capable de trouver du matériel introuvable pour tout type de manip et Monsieur Valentin RODRIGUEZ pour son aide précieuse au cours des manip rongeurs.

A Monsieur le Professeur Guy-Pierre MARTINEAU, pour sa gentillesse, sa disponibilité, toute son expertise et son savoir-faire précieux qui m'ont beaucoup aidé notamment sur les manip « cochon ».

A Madame Agnès PERRIN-GUYOMARD, merci pour son accueil, ses conseils, son soutien et ses remarques constructives.

A Monsieur Jean-Guy ROLLAND, un grand merci pour son aide si précieuse durant les phases animales, pour son inventivité, pour sa bonne humeur, pour m'avoir supporté durant ces longues heures d'expérimentations et pour son soutien inconditionnel au Stade Rennais, bien que mon cœur aille indéfectiblement à l'En Avant Guingamp.

A Monsieur le Docteur Jérôme HENRI, mon colocataire de bureau durant mon épopée fougèraise, merci pour nos longues discussions scientifiques, pour avoir refait le monde à peu près 15000000 fois et pour ton amour inconditionnel de la grande chanson française : Patrick Sébastien, Claude François, François Valéry, etc...

A tous les membres de l'ANSES Fougères qui m'ont accueilli chaleureusement et ont ainsi contribué à la réalisation de ce travail : Madame le Docteur Mireille BRUNEAUX, Madame Jacqueline MANCEAUX et Monsieur Alain TRICHEREAU.

A toute l'équipe des thésards de Toulouse, mes deux mamans : Docteur Séverine COLLET pour son accueil, ses précieux conseils, sa gentillesse et son racisme (notamment sa préférence des plateaux blancs), Docteur Béatrice ROQUES, pour son accueil, pour son enseignement des rouages du labo, pour son initiation à la chirurgie et pour son autoritarisme des plus total à mon encontre et mon lemming-frère-binôme de thèse, Tanguy CORBEL dit « Guiguite », merci pour sa gentillesse, pour nos soirées, son aide précieuse, pour avoir subi mes attaques en ayant le droit de réponse uniquement le vendredi et puis parce que c'est uniquement de sa faute. Merci à tous les trois, pour cette ambiance particulière dans le bureau, pour tous ces moments de délire et de pétages de plomb. A Davy GUIGNARD dit « Croquette » qui débute dans cet univers, courage...

A Julien REY, mon petit stagiaire, pour nos grandes réflexions mathématiques (le compte est bon), nos délires de manips et notre fan club.

A toute l'équipe des Bernard et Bernadette de Fougères, merci pour votre accueil et nos soirées toujours fofolles : Cécile DESMARAIS, qui m'a gentiment guidé et appris le fonctionnement du laboratoire de microbiologie, merci pour sa patience, Pamela HOUÉE-LOUÂPRE qui m'a également guidé dans ce dédale que constituait le laboratoire de microbiologie et pour son humour pince sans rire, Rachelle LANCELEUR, pour sa bonne humeur, ses plans M&M'S et autres douceurs et ses tcheks ravageurs, Docteur Antoine HUGUET pour nos délires, ses imitations et sa carboglace, Docteur Sophie MOMPÉLAT,

pour sa gentillesse, nos discussions et la fameuse manip « Poulet », Docteur Adeline TARANTINI, pour sa patience, sa gentillesse et ses films, Jimmy ALARCAN pour son amour du PSG et de Patrice Loko, sans oublier les deux thésards de choc : Manuel SAINT-CYR pour son amour de la grande musique (Booba, La Fouine, etc...), pour son accueil, nos délires (fracture de la veine nasale) et sa gentillesse et Pierre-Jean FERRON, le toxicologue qui a le swag, pour tous nos délires (alors il a fait combien de tours aujourd'hui ?) et son altermondialisme.

A tous les membres de l'ANSES Fougères, pour leur accueil et leur gentillesse.

A ma mère, à mon père, à mon frère, à ma grand-mère et à toute ma famille pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études.

A tous les Khreûvards de Valenciennes, les copains de 15 ans, en somme, pour tous nos délires, nos conneries, nos soirées, nos énormes parpaings, nos discussions, notre plan de domination mondiale et votre soutien inconditionnel au régime Nord Coréen : Adrien dit « Gouz' » mon frère d'anniversaire, pour m'avoir appris ce que c'était d'être un véritable gentleman, Jean-Baptiste dit « Chinois », le meilleur d'entre nous, pour son armée de 300000 hommes et sa multiagronationale, François dit « Fan » pour son hippisme, ses considérations sur la vie et son amour du monde végétal (euh euh !), Fabien dit « Mitou » parce que tu es le seul à comprendre ce qu'il y a dans mon cerveau, Yann dit « Yannou » mi-ch'ti, mi-

toulousain, mi-stoner, merci de m'avoir fait découvrir Toulouse, William dit « Bedo », pour ton âme de révolutionnaire malchanceux et pour sa connaissance du Nord-Pas-de-Calais, Aurélien dit « Assan », mon ami de 20 ans, pour m'avoir accueilli à Toulouse et pour ton âme de pilote de Rallye, Etienne dit « le gros », pour ton savoir faire cynégétique et ta volonté de réguler les populations, Julie dit « Juju » pour ton amour des cafés valenciennois et ta calligraphie corporelle , Marjorie dit « Marjo », pour ta folie et pour les crêpes de tonton Gwendoline dit « Gwen » pour son côté maman et son coup de pagaie et Anaïs dit « Tortilla » pour sa touche minorité ethnique et sa capacité à faire des plans.

A monsieur le professeur Harry EAGLE et monsieur le Docteur Marek EDELMAN, mes deux héros, l'un pour son génie scientifique si peu reconnu et l'autre pour être l'incarnation même de l'héroïsme et de l'engagement authentique.

A Steven, Sylvester, Arnold, Jean-Claude, Bruce, Dolph, Chuck et tous les autres, pour tous les moments de bonheur que vous m'avez offert depuis mon plus jeune âge.

A Minet, notre mascotte regrettée, pour ta démarche de Jack Sparrow et ton mépris total des règles de bienséance, que Dieu te préserve.

« -Alors ?

-Le premier se croyait invincible et l'autre croyait savoir voler.

-Alors ?

-Ils se trompaient tous les deux ! »

Steven Seagal, Désigné pour mourir, 1990

AVANT PROPOS

Ces travaux de thèse ont fait l'objet, à l'heure actuelle, des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

Articles publiés

VASSEUR M.V., LAURENTIE M., ROLLAND J-G., PERRIN-GUYOMARD A., HENRI J., FERRAN A.A., TOUTAIN P-L. and BOUSQUET-MELOU A.

Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora.

Antimicrob. Agents Chemother., 58, 1744-1748, 2014.

SAINT-CYR M.J., PERRIN-GUYOMARD A., ROLLAND J-G., HOUEE P., **VASSEUR M.V.** and M. LAURENTIE.

Use of accuracy profile procedure to validate a real-time PCR method to quantify bacteria in feces.

J. AOAC Int., 2014 Mars-Apr. ; 97(2) : 573-9.

Manuscrits en préparation

VASSEUR M.V., A.A. FERRAN, M.Z. LACROIX, P-L TOUTAIN and A. BOUSQUET-MELOU.

Impact of inoculum-size adjusted doses of beta-lactams on the clinical and microbiological outcomes in experimental pneumonia in mice: Consequences on dosage regimen and antibiotic consumption.

VASSEUR M.V., A.A. FERRAN, M.Z. LACROIX, P-L TOUTAIN and A. BOUSQUET-MELOU.

Assessment of the selectivity of veterinary antibiotics on the target pathogen vs. commensal flora: development of a pharmacodynamic selectivity index for public health protection

COMMUNICATIONS ORALES

M.V. VASSEUR, A.A. FERRAN, P.-L. TOUTAIN and A. BOUSQUET-MELOU

Differential Activity of Veterinary Antibiotics on Target Pathogens vs. Digestive Flora: Development of a Pharmacodynamic Selectivity Index for Public Health Perspective.

12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT), 2012, Noordwijkerhout, Pays-Bas

A. BOUSQUET-MELOU, **M.V. VASSEUR**, A.A. FERRAN and P.-L. TOUTAIN

Early vs Later Antibiotic Treatments of Pulmonary Infections. A Strategy to Conciliate Control of Infectious Diseases and Reduction of Antibiotic Consumption.

6th International conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM), 2012 Washington, Etats-Unis

M.V. VASSEUR, V. DUPOUY, N. ARPAILLANGE, J.G. ROLLAND, A. PERRIN-GUYOMARD, P.L. TOUTAIN, M.LAURENTIE et A. BOUSQUET-MELOU

Utilisation des bêta-lactamines en élevage et résistances bactériennes Impacts sur le microbiote intestinal et enjeux de santé publique.

Journée «Microbiote et Antibiorésistance» du Pôle Alimentation Sécurité Sanitaire et Santé (PA3S), 2013, Toulouse, France

POSTERS

M.V. VASSEUR, A.A. FERRAN, P.-L. TOUTAIN and A. BOUSQUET-MELOU

Influence of bacterial inoculum size on the bactericidal activity of two beta-lactam antibiotics against *Pasteurella multocida* and *Escherichia coli*.

Journée d'Animation Scientifique du département santé animale de l'INRA, 2011, Fréjus, France

M.V. VASSEUR, A.A. FERRAN, P.-L. TOUTAIN and A. BOUSQUET-MELOU

Impact of early versus later beta-lactam treatments on clinical and microbiological outcomes in an original mouse model of airborne *Pasteurella multocida* lung infection

12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT), 2012, Noordwijkerhout, Pays-Bas

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	11
TABLE DES MATIERES	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION	23
CHAPITRE 1 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	29
1.1. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES EN ELEVAGE PORCIN	29
1.1.1. Modalités d'utilisation des antibiotiques chez les animaux de rente	29
1.1.2. Consommation d'antibiotiques en élevage porcin	31
1.2. LES BETA-LACTAMINES	33
1.2.1. Présentation générale des bêta-lactamines.....	33
1.2.2. Les différentes familles de bêta-lactamines.....	36
1.2.3. Utilisation des bêta-lactamines en élevage porcin.....	40
1.2.4. Paramètres pharmacologiques permettant de prédire l'efficacité des bêta-lactamines.....	41
1.2.5. Influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité des bêta-lactamines..	47
1.3. MECANISMES DE RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES	49
1.3.1. Production de bêta-lactamases	50
1.3.2. Diminution de la perméabilité de la membrane externe	59
1.3.3. Pompes à efflux.....	60
1.3.4. Modification des PLP	61
1.4. EXPOSITION DE LA FLORE COMMENSALE DIGESTIVE AUX ANTIBIOTIQUES	63
1.4.1. La flore commensale digestive : un écosystème complexe et de grande taille.....	63
1.4.2. Composition de la flore commensale digestive du porc	64
1.4.3. Emergence de bactéries dans la flore digestive chez l'animal et conséquences en termes de santé publique	65
1.4.4. Impact de l'utilisation des bêta-lactamines sur la flore commensale	70
1.5. LES MODELES D'ETUDE DE LA FLORE COMMENSALE DIGESTIVE.....	73
1.5.1. Paramètres d'intérêt dans les études de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal	73
1.5.2. Les modèles in vitro	73
1.5.3. Les modèles animaux à flore contrôlée ou gnotobiotique	75
1.5.4. Les études chez les espèces cibles et les modèles animaux à flore totale	77
1.5.5. Les études cliniques chez l'Homme	77
1.6. OBJECTIFS DE LA THESE ET METHODOLOGIE GENERALE	79

CHAPITRE 2 - ETUDE EXPERIMENTALE	83
2. EXPLORATION DE LA SELECTIVITE DES ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DE BACTERIES PATHOGENES ET COMMENSALES	83
2.1. INTRODUCTION	83
2.2. DETERMINATION DES CMI ET REALISATION DE CINETIQUES DE BACTERICIDIE	84
2.2.1. <i>Problématique et objectifs</i>	84
2.2.2. <i>Matériels et méthodes</i>	84
2.2.3. <i>Résultats</i>	85
2.2.4. <i>Conclusions</i>	87
2.3. DETERMINATION DES RELATIONS CONCENTRATION-EFFET ET MODELISATION DES EFFETS ANTIBACTERIENS	88
2.3.1. <i>Objectifs</i>	88
2.3.2. <i>Matériels et méthodes</i>	88
2.3.3. <i>Résultats</i>	91
2.3.4. <i>Conclusion</i>	93
2.4. IMPACT DE LA TAILLE DE L'INOCULUM BACTERIEN SUR L'ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES	94
2.4.1. <i>Problématique et objectifs</i>	94
2.4.2. <i>Matériels et méthodes</i>	94
2.4.3. <i>Résultats</i>	95
2.4.4. <i>Conclusion</i>	98
2.5. DISCUSSION	99
2.5.1. <i>Détermination de la sensibilité des souches bactériennes à l'amoxicilline et à la cefquinome</i>	99
2.5.2. <i>Modélisation de l'effet antibactérien</i>	99
2.5.3. <i>Amélioration de l'indice de sélectivité pour les antibiotiques vétérinaires</i>	100
2.6. CONCLUSION	102
2.7. MANUSCRIT 1	103
CHAPITRE 3 - ETUDE EXPERIMENTALE	131
3. IMPACT DE LA TAILLE DE LA CHARGE BACTERIENNE ET DE LA PRECOCITE DU TRAITEMENT SUR LA GUERISON CLINIQUE ET MICROBIOLOGIQUE D'UNE INFECTION PULMONAIRE	131
3.1. INTRODUCTION	131
3.2. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE D'INFECTION PULMONAIRE A <i>P.MULTOCIDA</i> CHEZ LA SOURIS	133
3.2.1. <i>Problématique et objectifs</i>	133
3.2.2. <i>Matériels et méthodes</i>	134
3.2.3. <i>Résultats</i>	135
3.2.4. <i>Conclusion</i>	136
3.3. DETERMINATION DES POSOLOGIES ADAPTEES A UNE INFECTION INSTALLEE : ETUDE PHARMACOCINETIQUE ET APPROCHE PK/PD	137
3.3.1. <i>Problématique et objectifs</i>	137
3.3.2. <i>Matériels et méthodes</i>	137
3.3.3. <i>Résultats</i>	138
3.3.4. <i>Conclusion</i>	139

3.4. DETERMINATION DES POSOLOGIES ADAPTEES A UNE CHARGE BACTERIENNE FAIBLE (TRAITEMENT PRECOCE)	140
3.5. COMPARAISON DES POSOLOGIES ANTIBIOTIQUES AJUSTEES A LA TAILLE DE L'INOCULUM	142
3.5.1. <i>Matériels et méthodes</i>	142
3.5.2. <i>Résultats</i>	143
3.5.3. <i>Conclusion</i>	146
3.6. DISCUSSION	147
3.7. MANUSCRIT 2	150
CHAPITRE 4 - ETUDE EXPERIMENTALE	183
4. IMPACT D'UNE DOSE DE CEFQUINOME ADAPTEE AU TRAITEMENT PRECOCE D'UN PETIT INOCULUM SUR LA GUERISON DE L'INFECTION ET SUR L'EMERGENCE DE RESISTANCES AU SEIN DE LA FLORE FECALE.....	183
4.1. INTRODUCTION.....	183
4.2. ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES BACTERIES UTILISEES	184
4.2.1. <i>Problématique et objectifs</i>	184
4.2.2. <i>Matériels et méthodes</i>	184
4.2.3. <i>Résultats</i>	184
4.3. PHARMACOCINETIQUE DE LA CEFQUINOME CHEZ LE RAT ET DETERMINATION DES SCHEMAS POSOLOGIQUES	185
4.3.1. <i>Problématique et objectifs</i>	185
4.3.2. <i>Matériels et méthodes</i>	185
4.3.3. <i>Résultats</i>	186
4.3.4. <i>Conclusion</i>	188
4.4. EVALUATION DE L'EFFICACITE DES DIFFERENTS TYPES DE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUES SUR LA GUERISON DES ANIMAUX	189
4.4.1. <i>Problématique et objectifs</i>	189
4.4.2. <i>Matériels et méthodes</i>	189
4.4.3. <i>Résultats</i>	192
4.4.4. <i>Conclusion</i>	193
4.5. IMPACT DES DIFFERENTS TYPES DE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE SUR LA FLORE DIGESTIVE DES ANIMAUX.....	194
4.5.1. <i>Problématique et objectifs</i>	194
4.5.2. <i>Matériels et méthodes</i>	194
4.5.3. <i>Résultats</i>	194
4.5.4. <i>Conclusion</i>	196
4.6. DISCUSSION	197
4.7. ARTICLE 1	199
CHAPITRE 5 - ETUDE EXPERIMENTALE	207
5. IMPACT DES DIFFERENTES MODALITES DE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE SUR LA FLORE DIGESTIVE DE PORC.....	207
5.1. INTRODUCTION.....	207
5.2. MATERIELS ET METHODES	208

5.2.1. Antibiotique et animaux utilisés	208
5.2.2. Traitements antibiotiques	208
5.2.3. Détermination de la résistance au sein de la flore digestive.....	208
5.3. RESULTATS	209
5.4. DISCUSSION	211
DISCUSSION GENERALE	215
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	223
TITRE ET RESUME EN ANGLAIS	237
TITRE ET RESUME EN FRANCAIS.....	239

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux

Tableau 1 : Développement des différents types de bêta-lactamines en réponse à l'émergence de résistance (d'après (Essack 2001)).	36
Tableau 2 : Antibiotiques représentatifs des différentes sous-classes de bêta-lactamines.	37
Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques de l'amoxicilline chez la souris.	45
Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques de la cefquinome chez la souris et le porc.	46
Tableau 5 : Classification moléculaire et fonctionnelle des bêta-lactamases.	55
Tableau 6 : Paramètres ^a du modèle pharmacodynamique décrivant l'évolution des inocula bactériens de 10^7 UFC/mL en fonction des concentrations d'antibiotiques.	92
Tableau 7 : Valeurs des indices de sélectivité pour des inocula de 10^7 UFC/mL de <i>P.multocida</i> .	93
Tableau 8 : Paramètres ^a du modèle pharmacodynamique décrivant l'évolution de l'inoculum de 10^5 UFC/mL de <i>P. multocida</i> en fonction des concentrations d'antibiotiques.	97
Tableau 9 : Valeurs des indices de sélectivité pour des inocula de 10^5 UFC/mL de <i>P.multocida</i> .	98
Tableau 10 : Paramètres pharmacocinétique et indices PK/PD de l'amoxicilline et de la cefquinome chez la souris après une injection par voie sous-cutanée.	139
Tableau 11 : Valeurs des $T_{>MIC}$ pour les différentes doses d'amoxicilline et de cefquinome.	139
Tableau 12 : Paramètres pharmacodynamiques des courbes E_{max} de <i>P.multocida</i> .	140
Tableau 13 : Paramètres pharmacocinétiques de population de la cefquinome chez le rat après une injection par voie sous-cutanée.	187
Tableau 14 : Valeurs des indices PK/PD pour différentes doses de cefquinome chez le rat.	187

Figures

Figure 1: Relations entre l'administration d'antibiotique chez l'animal et les enjeux de santé publique et de santé animale.	24
Figure 2 : Structure chimique des différentes sous-classes de bêta-lactamines.	33
Figure 3 : Mode d'action des bêta-lactamines.	34
Figure 4 : Méthode de détermination de la CMI.	42
Figure 5 : Courbes de bactéricidie représentatives des antibiotiques concentration-dépendants et temps-dépendants.	43
Figure 6 : Effet de l'antibiotique en fonction de sa concentration dans une relation de type E_{max} .	44
Figure 7 : Présentation des principaux paramètres PK/PD utilisés en antibiothérapie.	47
Figure 8 : Mode d'action des bêta-lactamases chez les bactéries à gram négatif.	53
Figure 9 : Mode d'action des bêta-lactamases chez les bactéries à gram positif.	54
Figure 10 : Les différentes familles de pompes à efflux présentes chez les bactéries.	61
Figure 11 : Isolateurs souples pour l'élevage d'animaux axéniques.	76
Figure 12: Cinétique de bactéricidie de l'amoxicilline et de la cefquinome contre <i>P.multocida</i> et <i>E.coli</i> .	86
Figure 13 : Relations entre les concentrations d'antibiotique (amoxicilline et cefquinome) et la croissance des inocula moyens de <i>P. multocida</i> et <i>E.coli</i> .	91
Figure 14 : Cinétique de bactéricidie de l'amoxicilline et de la cefquinome contre des inocula de 10^5 UFC/mL de <i>P.multocida</i> .	96

Figure 15 : Activité antibactérienne de l'amoxicilline et de la cefquinome contre des inocula de 10^5 UFC/mL de <i>P.multocida</i>	97
Figure 16 : Inhalation Exposure System (IES).....	133
Figure 17 : Croissance de <i>Pasteurella multocida</i> en fonction du temps dans les poumons de souris.	135
Figure 18 : Profils de concentrations plasmatiques d'amoxicilline et de cefquinome chez la souris. A) Amoxicilline, 50 mg/kg. B) Cefquinome, 5 mg/kg. (○) Concentrations observées, (-) concentration prédite.	138
Figure 19 : Efficacités cliniques pour les différents groupes de traitement.	145
Figure 20 : Guérison bactériologique pour les différents groupes de traitement.	146
Figure 21 : Concentrations plasmatiques de cefquinome en fonction du temps chez les rats. Les concentrations observées (○) et la moyenne prédite (-) sont ici représentées.	186
Figure 22 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur les <i>Enterobacteriaceae</i> fécales de rats.....	195
Figure 23 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur l'émergence des <i>Enterobacteriaceae</i> fécale céfotaxime résistantes chez le rat.	196
Figure 24 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur les entérobactéries fécales de porcs.	209
Figure 25 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur l'émergence d'entérobactéries céfotaxime-résistantes au sein de la flore fécale de porc.	210

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP binding cassette
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATCC	American Type Cell Culture
AUC	Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps
BHI	Brain Heart Infusion
BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
CcrA	Bêta-Lactamase « Cefotaxin and Carbapenem ResistAnt »
CI	Clairance plasmatique
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C _{max}	Concentration Plasmatique maximale
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMY	Bêta-Lactamase « active on CephaMYcins »
CTX-M	Bêta-Lactamase « active on CefoTaxiMe, first isolated at Munich »
DGAL	Direction Générale de l'ALimentation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EFSA	« European Food Safety Authority »
EUCAST	« EUropean Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing »
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
EOPS	Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique
F	Biodisponibilité absolue
F _{relative}	Biodisponibilité relative
FEC	Bêta-lactamase « Fecal <i>Escherichia Coli</i> »
HEPA	High Efficiency Particulate Air Filter
HFA	Human Flora Associated
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRT	Bêta-lactamase « Inhibitor Resistant TEM beta-lactamase »
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	Bêta-lactamase « <i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase »
L1	L1 Bêta-lactamase « Labile enzyme from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> »
LMR	Limites Maximales de Résidus
LOQ	Limite of quantification
MAR	Multiple Antibiotic Resistance
MATE	Multiple Antimicrobial and Toxin Extrusion
MDR	Multi Drug Resistant
MFS	Major Facilitator Superfamily

MH	Mueller Hinton
MIR	Bêta-lactamase «discovered at MIRiam Hospital»
MRP	Multidrug Resistance-related Protein
NDM	Bêta-lactamase « New Delhi Metallo »
OXA	Bêta-lactamase «active on OXAcillin»
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PC1	Bêta-lactamase «from <i>Staphylococcus aureus</i> strain PC1»
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PLP	Protéine de Liaison à la Pénicilline
PM	<i>Pasteurella multocida</i>
P-gp	P-Glycoprotéine
PK/PD	Pharmacocinétique/Pharmacodynamie
PSE	Bêta-lactamase « <i>Pseudomonas</i> Specific Enzyme»
RND	Resistance-Nodulation-Division
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SHV	Bêta-lactamase «SulfHydryl reagent Variable»
SI	Indice de Sélectivité
SME	Bêta-lactamase « <i>Serratia Marcescens</i> Enzyme»
SMR	Small Multidrug Resistance
T _{>CMI}	Période de temps où les concentrations plasmatiques d'antibiotique sont supérieures à la CMI de clui-ci
T _{1/2}	Temps de demi-vie
TA	Toxine-Antitoxine
TEM	Bêta-lactamase, d'après le nom du patient Temoneira chez qui elle a été identifiée pour la première fois
TGY	Trypticase Glucose Yeast extract
T _{max}	Temps d'occurrence de la concentration plasmatique maximale
UMR	Unité Mixte de Recherche
UFC	Unité Formant des Colonies
V _{ss}	Volume de distribution à l'équilibre

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés au sein de deux unités de recherche : l'Unité Antibiotiques, Biocides, résidus et Résistance du Laboratoire ANSES de Fougères et l'UMR 1331 TOXALIM INRA, ENVT, EIP, UPS, dans les locaux situés sur le campus de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Le Service de Soutien Scientifique et l'unité Antibiorésistance Biocide Résistance et Résidus de Fougères, animés respectivement par les Docteurs Michel Laurentie et Christophe Soumet, ont pour objectif de mettre au point de nouvelles stratégies de traitements vétérinaires en vue d'optimiser l'utilisation des antibiotiques chez les animaux pour limiter l'émergence de résistances.

L'équipe « Pharmacocinétique, Pharmacodynamie et Modélisation » de l'UMR 1331, animée par le Professeur Alain Bousquet-Mélou étudie la problématique de l'antibiorésistance induite par les traitements vétérinaires chez les animaux de production à deux niveaux :

- L'émergence de résistance au sein de la flore pathogène cible de l'antibiothérapie chez l'animal, en vue de préserver l'efficacité des antibiotiques,

- L'émergence de résistance au sein du microbiote commensal du tube digestif de l'animal traité, avec comme conséquences potentielles le transfert à l'Homme, *via* la chaîne alimentaire et/ou l'environnement, soit par des bactéries zoonotiques résistantes soit par des bactéries résistantes non pathogènes mais susceptibles de transférer leurs mécanismes de résistance à des bactéries pathogènes pour l'Homme.

Ces recherches ont pour enjeux la préservation de la santé publique et de la sécurité sanitaire des aliments.

La Figure 1 illustre les impacts liés à l'utilisation des antibiotiques chez l'animal, à la fois en termes de santé publique et de santé animale. Mon travail de thèse s'inscrit dans les thématiques communes des deux équipes. La première partie de mon travail de recherche a consisté à explorer *in vitro*, grâce à une approche pharmacodynamique, la sélectivité des antibiotiques vis-à-vis des microbiotes pathogènes et commensaux. La deuxième partie de mon travail de thèse a porté sur le développement, à partir d'une approche PK/PD, d'un nouveau type traitement antibiotique, qualifié de précoce, consistant à traiter des animaux avec de faibles doses d'antibiotique durant les phases prépatentes de l'infection. Ces travaux ont été réalisés grâce à la mise au point d'un modèle murin d'infection pulmonaire à *Pasteurella multocida*. La troisième partie de mon travail de thèse a consisté à évaluer l'impact du traitement précoce à la fois sur la guérison d'animaux infectés et sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de leur flore digestive. Ces travaux ont été réalisés sur un

modèle d'infection pulmonaire à *Klebsiella pneumoniae* de rats axéniques auxquels a été inoculée une flore digestive de porc. Enfin, la dernière partie de mon travail de thèse a consisté à évaluer chez le porc, l'impact d'une posologie associée au traitement précoce sur la flore commensale digestive et de comparer les résultats à ceux obtenus avec une posologie classique.

Au cours de ces trente dernières années, la consommation croissante d'antibiotiques en médecine vétérinaire, et notamment celle de classes qualifiées de « critique » pour la santé humaine comme les céphalosporines ou les fluoroquinolones, est associée à une émergence de bactéries résistantes à la fois au sein des flores pathogènes et commensales des animaux traités (Garcia-Alvarez, Dawson et al.). La minimisation de l'antibiorésistance pour ces deux flores constitue un double enjeu à la fois de santé animale et de santé publique. En effet, les bactéries commensales du tube digestif peuvent jouer un rôle de réservoir de bactéries résistantes transmissibles à l'Homme *via* la chaîne alimentaire ou *via* l'environnement (van den Bogaard 2001).

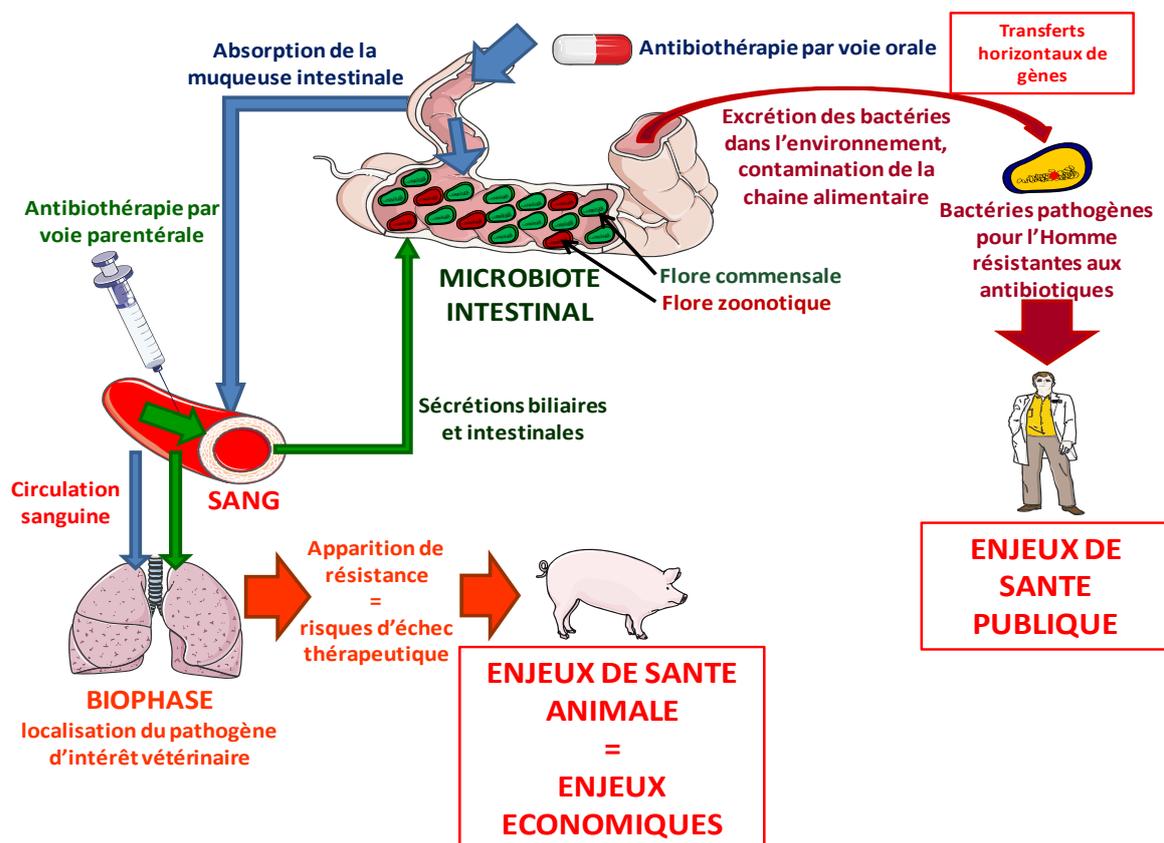


Figure 1: Relations entre l'administration d'antibiotique chez l'animal et les enjeux de santé publique et de santé animale.

Lors de l'administration d'un antibiotique, le développement de la résistance au niveau des flores cibles (foyers infectieux) et non cibles (flore commensale digestive) peut avoir un impact à la fois sur la santé animale et sur la santé publique. La fraction de l'antibiotique atteignant les segments distaux du tube digestif exerce une pression sélective importante sur le microbiote intestinal. Cela peut conduire à l'émergence de résistance parmi les bactéries zoonotiques (*Salmonelle*, *E. coli*, ...) et/ou la constitution d'un réservoir de gènes de résistance chez des bactéries non pathogènes pour l'homme mais pouvant servir de vecteur de diffusion de ces gènes de résistance dans l'environnement ou la chaîne alimentaire.

A l'heure actuelle, l'antibiothérapie en élevage est pratiquée selon trois modalités (Phillips, Casewell et al. 2004): l'usage curatif, consistant à traiter les animaux présentant des signes cliniques d'infection, l'usage métaphylactique (encore appelé *control* aux USA), consistant à traiter tous les animaux d'un groupe à partir du moment où une certaine proportion d'entre eux (généralement 10%) présente des signes cliniques d'infection et l'usage prophylactique qui consiste à traiter tous les animaux d'un groupe soumis à un facteur de risque d'infection bactérienne (sevrage du porcelet, allotement de jeunes bovins, tarissement de la vache laitière ...), mais avant toute occurrence de l'infection. L'intérêt de la métaphylaxie repose sur l'hypothèse qu'au moment du traitement, tous les animaux du groupe sont déjà infectés ou le seront dans un délai très bref, et qu'il est plus favorable de les traiter au cours de la phase d'incubation avant que les symptômes de la maladie ne se soient manifestés. En effet, cette phase d'incubation se distingue de la phase clinique par le statut physiopathologique des animaux et par la densité de la population bactérienne pathogène à éradiquer. Le statut physiologique des animaux a un impact direct sur les capacités de défense de l'organisme, sur la prise alimentaire (anorexie associée au syndrome fébrile) qui peut ainsi empêcher la prise d'un traitement par voie orale et sur l'exposition de l'animal, la pharmacocinétique des antibiotiques pouvant être altérée par des modifications physio-pathologiques comme la fièvre.

La taille de l'inoculum bactérien présent au niveau du site infectieux à l'initiation de l'antibiothérapie est également différente selon les modalités de traitement. Pour la métaphylaxie, la précocité de l'administration par rapport à l'apparition des signes cliniques permet à l'antibiotique d'agir contre une faible population bactérienne alors que dans le cadre du traitement curatif, l'antibiotique doit agir contre une population bactérienne pathogène bien plus importante.

De plus, des études *in vitro* (Ferran, Dupouy et al. 2007; Udekwu, Parrish et al. 2009) et *in vivo* (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949; Ferran, Kesteman et al. 2009; Kesteman, Ferran et al. 2009; Ferran, Toutain et al. 2011) ont montré que de nombreuses familles d'antibiotiques sont plus puissantes et efficaces contre de petits inocula bactériens (retrouvés chez les animaux lors de la phase d'incubation) que contre des grands inocula bactériens (retrouvés chez les animaux lors de la phase clinique).

Dans ce contexte, notre hypothèse de travail est qu'une utilisation de type métaphylactique tout en proposant une réévaluation des schémas posologiques, notamment en termes de diminution des doses administrées aux animaux, serait beaucoup plus favorable en termes d'usage prudent des antibiotiques. En effet, l'optimisation des posologies pour un traitement précoce des animaux permettrait d'utiliser des doses d'antibiotiques plus faibles qu'actuellement, et par conséquent de diminuer à la fois la consommation des antibiotiques et l'impact sur le microbiote intestinal, principal réservoir

potentiel de déterminants de résistance aux bactéries pathogènes humaines (Phillips, Casewell et al. 2004).

Dans une première partie de notre travail de thèse (chapitre 2) nous avons donc exploré, à partir d'une approche pharmacodynamique, la sélectivité des antibiotiques envers la flore pathogène d'un côté, et la flore commensale de l'autre. Un indice décrivant cette sélectivité a été construit, et nous proposons également, au vu des premiers résultats obtenus sur un effet inoculum, une stratégie permettant d'améliorer cet indice.

Nous avons ensuite déterminé sur un modèle murin d'infection pulmonaire l'impact en termes de guérison clinique et microbiologique d'un traitement réalisé durant la phase d'incubation de l'infection, avec des doses d'antibiotiques plus faibles que celles utilisées classiquement. Nous avons comparé cette modalité de traitement au traitement curatif de l'infection à un stade clinique. Les résultats de ces travaux sont présentés dans la deuxième partie du travail expérimental de thèse (chapitre 3).

La troisième partie du travail de thèse a consisté à évaluer conjointement l'impact du traitement de type précoce, à la fois sur la guérison des animaux mais également en termes d'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore commensale digestive. Ces travaux ont été réalisés grâce à l'utilisation d'un modèle d'infection pulmonaire de rat axénique colonisé avec une flore commensale digestive de porc (chapitre 4).

La dernière partie de mon travail de recherche a consisté à évaluer l'impact du traitement de type précoce sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore digestive de porcs destinés à la filière de production. Nous avons comparé les résultats obtenus à ceux des porcs ayant reçu des posologies classiques d'antibiotiques (chapitre 5).

Chapitre 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Utilisation des antibiotiques en élevage porcin

Les familles d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire sont les mêmes. Cependant, quelques sous-familles qualifiées de « critiques », sont réservées à l'usage en médecine humaine pour le traitement d'infections spécifiques (ex : tuberculose, bactéries à Gram négatif et positif multi-résistantes (*Pseudomonas*, SARM)).

En médecine vétérinaire, les traitements antibiotiques ont quatre objectifs :

- la maîtrise des infections bactériennes,
- la restauration ou le maintien du bien-être animal,
- le maintien de la production animale,
- la prévention de la transmission des agents pathogènes aux autres animaux voire à l'Homme (zoonoses).

1.1.1. Modalités d'utilisation des antibiotiques chez les animaux de rente

Quatre types d'utilisation des antibiotiques sont possibles en médecine vétérinaire pour les animaux de rente, chacun de ces usages devant répondre à un objectif précis. (Schwarz and Chaslus-Dancla 2001; Schwarz, Kehrenberg et al. 2001).

1.1.1.1. L'usage curatif

L'usage curatif ou thérapeutique, consiste à traiter individuellement les animaux présentant des signes cliniques d'infection. A l'initiation du traitement, il est généralement admis que la charge bactérienne présente au niveau du site infectieux est importante (Konig, Simmen et al. 1998; Phillips, Casewell et al. 2004). La voie d'administration privilégiée de l'antibiotique est la voie parentérale. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité.

1.1.1.2. L'usage métaphylactique

La métaphylaxie, parfois appelée prévention en milieu infecté, consiste à traiter tous les animaux d'un groupe lorsqu'une certaine proportion d'entre eux (généralement 10%) a manifesté des signes cliniques d'infection bactérienne. La métaphylaxie n'est utilisée que dans les grands élevages d'animaux (porcs, volailles ou veaux). Cette méthode d'usage des antibiotiques se justifie à la fois par des raisons pratiques et scientifiques. En effet, en élevage intensif, il est très difficile de réaliser des traitements au cas par cas étant donné le nombre d'animaux présents et c'est également pour cela que l'antibiotique est administré aux animaux par voie orale (en mélange dans la nourriture ou dans l'eau de boisson).

De plus, la métaphylaxie se justifie en considérant qu'à partir du moment où un certain nombre d'animaux d'un élevage ont déclaré des signes cliniques d'infection, il ne s'agit que d'une question de temps avant qu'un effectif croissant d'animaux ne tombe malade par contagion. Il est supposé qu'une antibiothérapie précoce sur la totalité des animaux du groupe peut permettre de réduire le nombre d'animaux malades et/ou la mortalité au sein de l'élevage.

Nos travaux de thèse porteront sur l'étude de l'efficacité d'une stratégie de traitement en lien avec la métaphylaxie, fondée sur la considération que lors de métaphylaxie l'inoculum bactérien qui infecte les animaux n'ayant pas encore déclaré de signes cliniques est de taille faible.

1.1.1.3. L'usage prophylactique

La prophylaxie est utilisée lors de périodes critiques de la vie des animaux dans l'élevage, c'est-à-dire lors de présence d'un facteur de risque très souvent associé au développement d'infections. Il s'agit notamment de périodes associées à un stress comme lors de transports, de regroupement d'animaux provenant d'élevages divers ou du sevrage, mais aussi lors d'interventions chirurgicales. Par exemple, dans la filière porcine, une antibiothérapie prophylactique est réalisée lors de la période de sevrage des porcelets. Le mode d'administration des antibiotiques varie selon le contexte du traitement, et ceux-ci peuvent être administrés par voie parentérale dans le cadre d'un traitement individuel (antibioprofylaxie lors d'un acte chirurgical) ou par voie orale dans le cadre d'un traitement collectif (antibioprofylaxie lors de périodes critiques dans l'élevage).

La principale différence entre la métaphylaxie et la prophylaxie réside dans le moment de l'intervention par rapport au commencement de la maladie, que l'on peut décrire

comme le moment de déclenchement de la multiplication bactérienne au niveau du site infectieux : l'intervention prophylactique se situe avant (pro) le déclenchement de toute multiplication bactérienne.

Cependant, même si les animaux traités ne présentent aucun signe clinique d'infection, la connaissance *a priori* des infections bactériennes se développant dans ces situations critiques permet de choisir une classe d'antibiotique adaptée à la prévention des infections dues aux bactéries les plus fréquemment rencontrées.

1.1.1.4. L'usage en tant que facteur de croissance

Les antibiotiques sont utilisés dans l'aliment au titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux, sans que les mécanismes à l'origine de l'amélioration de ces performances aient été clairement élucidés (Dibner and Richards 2005). Cet usage a fait l'objet de nombreuses critiques et il est totalement interdit au sein de l'union Européenne depuis 2006 (Soulsby 2007). La FDA a publié en avril 2012 une série de trois articles contenant des lignes directrices visant à abolir cette pratique dans les plus brefs délais aux Etats-Unis (FDA 2012).

1.1.2. Consommation d'antibiotiques en élevage porcin

D'après le rapport ANSES 2013 sur le suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2012 (Chevance, Moulin et al. 2011), environ 37% de la masse d'antibiotiques utilisés en France par la médecine vétérinaire est consommée par l'élevage porcin. Cela fait de la filière porcine le premier consommateur d'antibiotiques nettement devant les filières volailles (23%), bovines (21%) et ovines (8%). Parmi les familles d'antibiotiques les plus utilisés au sein de la filière, les polypeptides arrivent en première position, devant les tétracyclines, les macrolides et les pénicillines. Le tonnage d'antibiotiques vendu en 2012 à destination des porcs est le plus faible estimé depuis 1999. Les antibiotiques de dernières générations qualifiés de « critiques » pour la santé humaine, comme les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération et les fluoroquinolones ne représentent que 1.35% et 0.22% respectivement et leur consommation n'a cessé d'évoluer au cours des dix dernières années. Très récemment, la consommation de céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération a diminué de 62,1 % entre 2010 et 2012 suite à la limitation de l'utilisation du ceftiofur et de la cefquinome par la filière porcine.

1.2. Les bêta-lactamines

1.2.1. Présentation générale des bêta-lactamines

Les bêta-lactamines sont des composés naturels à activité antibiotique produits à l'origine par certaines espèces bactériennes et fongiques. La capacité de production des bêta-lactamines par les espèces fongiques a été acquise par transfert interrègne de la machinerie génétique impliquée dans la voie de synthèse de ces composés (Brakhage, Al-Abdallah et al. 2005). Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines sont des molécules ayant la particularité de toutes posséder un noyau bêta-lactame dans leur structure (Figure 2). Il s'agit d'une large famille d'antibiotiques composée de plusieurs sous-classes parmi lesquelles les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de bêta-lactamase, qui ne sont pas des antibiotiques au sens strict du terme mais plutôt des composés permettant d'inhiber certains mécanismes de résistance (voir section 1.2.2. Les différentes familles de bêta-lactamine). Chaque sous-classe se définit par des molécules possédant des structures chimiques et des propriétés biologiques très proches.

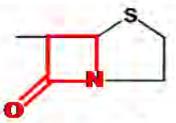
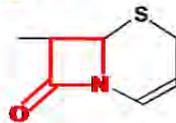
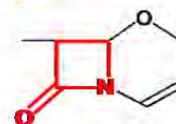
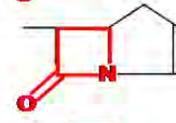
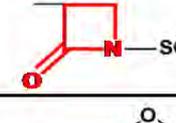
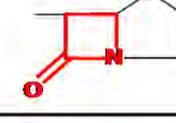
	STRUCTURE	TYPE DE CYCLE	EXEMPLE
ANTIBIOTIQUES		pénème	amino-pénicilline: amoxicilline
		céphème	céphalosporine de 4 ^{ème} génération: cefquinome
		oxacéphème	céphalosporine de 3 ^{ème} génération: moxalactam
		carbapénème	imipénem
		monobactame	aztreonam
INHIBITEUR ENZYMATIQUE		clavame	inhibiteur de bêta-lactamase: acide clavulanique

Figure 2 : Structure chimique des différentes sous-classes de bêta-lactamines.

Le noyau bêta-lactame (rouge) est commun à toutes les molécules de cette famille et confère l'activité antibiotique. Les différences structurales au sein des différentes sous-classes sont notamment responsables des différences de puissance et de spectre d'activité entre les molécules.

1.2.1.1. Mode d'action des bêta-lactamines

L'action antibiotique des bêta-lactamines est portée par leur noyau bêta-lactame. En effet, ce noyau possède une très forte affinité pour le site catalytique des PLP (Protéines de Liaison à la Pénicilline), enzymes essentielles de la synthèse et du remodelage du peptidoglycane bactérien (Tipper 1985). Les PLP sont des transpeptidases qui interviennent dans la stabilisation du peptidoglycane en formant les liaisons inter-peptidoglycanes. Le peptidoglycane est le constituant principal de la paroi de toutes les espèces bactériennes, et une inhibition de sa synthèse entraîne la mort de la bactérie par choc osmotique (Figure 3). De ce fait, les bêta-lactamines possèdent une activité bactéricide (Kohanski, Dwyer et al. 2007). De par leur mode d'action, les bêta-lactamines sont des antibiotiques temps-dépendant et les schémas posologiques utilisés lors de l'administration de ces molécules sont conçus afin de maximiser le temps d'exposition des bactéries pathogènes à l'antibiotique (Martinez, Toutain et al. 2006).

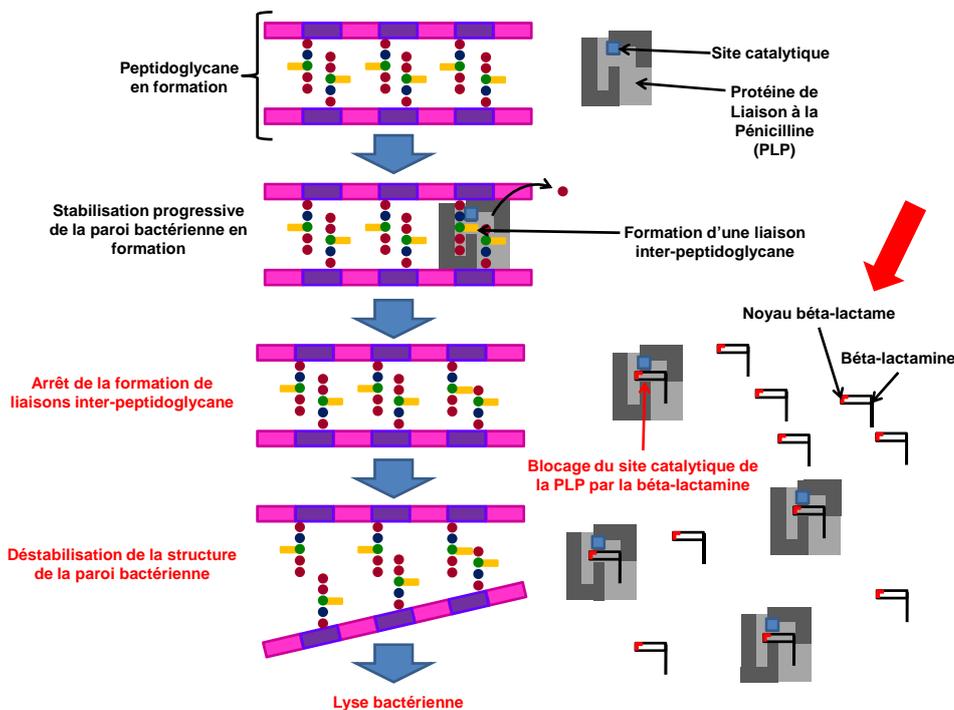


Figure 3 : Mode d'action des bêta-lactamines.

1.2.1.2. Développement de nouvelles bêta-lactamines en réponse à l'émergence de résistance

Les bactéries ont acquis la capacité de produire des bêta-lactamases (enzymes hydrolysant les bêta-lactamines) depuis des millions d'années. Ces enzymes, très apparentées aux PLP, sont produites dans l'environnement, par certaines colonies

bactériennes pour réguler le métabolisme de la paroi bactérienne, mais surtout pour se protéger contre la production de bêta-lactamines par d'autres colonies bactériennes et certaines espèces de champignon présentes dans l'environnement. Cependant, c'est l'utilisation des bêta-lactamines en médecine humaine et vétérinaire qui a favorisé l'émergence et la dispersion de bactéries sécrétrices de bêta-lactamase en exerçant une pression de sélection au sein des flores pathogènes, commensales et de l'environnement (Livermore 1998). La propagation progressive de la résistance bactérienne aux bêta-lactamines a poussé l'industrie pharmaceutique à développer des molécules plus résistantes aux bêta-lactamases et des composés inhibant leur action (Rolinson 1998). Cependant, l'utilisation de ces nouvelles molécules a entraîné l'émergence de nouvelles formes de résistance (Tableau 1). Devant les capacités d'adaptation des cellules procaryotes (temps de génération, adaptation aux conditions extrêmes, fréquence de mutation importante ...) et le temps nécessaire à la mise au point de nouveaux antibiotiques, la stratégie consistant à tout miser sur le seul développement de nouvelles molécules dans la lutte contre les infections bactériennes apparaît comme une guerre perdue d'avance tant l'acquisition de mécanismes de résistances par les bactéries est rapide par rapport au développement de ces molécules (Metlay, Powers et al. 2006). Le développement de stratégies visant à réduire l'émergence et la dissémination des mécanismes de résistance au sein des populations pathogènes mais également commensales et environnementales apparaît donc comme une nécessité afin de pouvoir conserver l'utilité thérapeutique des bêta-lactamines existantes aussi longtemps que possible.

Tableau 1 : Développement des différents types de bêta-lactamines en réponse à l'émergence de résistance (d'après (Essack 2001)).

Type de bêta- lactamines	Mécanismes de résistance
benzylpénicillines	pénicillases staphylococciques
isoxazolyl-pénicillines	modification des PLP
amino-pénicillines	TEM-1 et SHV-1 chez les entérobactéries PSE-1 chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
uréido-pénicillines	TEM-1 et SHV-1 chez les entérobactéries PSE-1 chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
céphalosporines de première génération	TEM-1 hyperproduction de bêta-lactamases de classe C
céphalosporines de deuxième génération	hyperproduction de bêta-lactamases de classe A par <i>Klebsiella oxytoca</i> hyperproduction de bêta-lactamases TEM et SHV par les entérobactéries hyperproduction de bêta-lactamases de classe C
céphalosporines de troisième génération	BLSE (Bêta-Lactamase à Spectre Etendu) hyperproduction de bêta-lactamases de classe C hyperproduction de bêta-lactamases de classe A par <i>Klebsiella oxytoca</i>
céphalosporines de quatrième génération	modification des PLP + BLSE hyperproduction spécifique de SHV-5 hyperproduction de bêta-lactamases de classe C
monobactames	BLSE hyperproduction de bêta-lactamases de classe C hyperproduction de bêta-lactamases de classe A par <i>Klebsiella oxytoca</i>
carbapénèmes	métallo-bêta-lactamases

1.2.2. Les différentes familles de bêta-lactamines

Les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines sont classés en quatre sous-classes : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames auxquelles il faut

ajouter les inhibiteurs de bêta-lactamases, qui ne sont pas des antibiotiques *sensus stricto* mais des molécules permettant l'inhibition de certains mécanismes de résistance aux bêta-lactamines utilisés par les bactéries (Bryskier 1999). Le Tableau 2 présente chacune de ces sous-classes.

Tableau 2 : Antibiotiques représentatifs des différentes sous-classes de bêta-lactamines.

Sous-classes de bêta-lactamines	Antibiotiques représentatifs
Pénicillines	
benzyl-pénicillines	pénicilline G
isoxazolyl-pénicillines	cloxacilline, oxacilline
amino-pénicillines	ampicilline, amoxicilline , pivampicilline
uréido-pénicillines	pipéracilline, azlocilline
carboxy-pénicillines	carbénicilline, ticarcilline
amidino-pénicillines	mécillinam, pivmécillinam
Céphalosporines	
première génération	céfalexine, céfalotine, céfazoline
deuxième génération	céfoxitine, céfuroxime, céfotétan
troisième génération	céfotaxime, ceftriaxone, ceftiofur, céfixime
quatrième génération	céfépime, cefpirome, cefquinome
Monobactames	aztreonam
Carbapénèmes	imipénem, méropénem, ertapénem
Inhibiteurs de bêta-lactamases	acide clavulanique, sublactam, tazobactam

1.2.2.1. Les pénicillines

La benzyl-pénicilline (pénicilline G), initialement isolée en 1928 par Alexander Fleming à partir de la moisissure *Penicillium notatum*, fut le premier antibiotique utilisé en médecine humaine. Cette molécule possède un spectre antibactérien couvrant les cocci à Gram positif et négatif et les bacilles à Gram positif. L'émergence progressive de souches de *Staphylococcus aureus* résistantes, notamment par la production de pénicillases, a poussé au développement de composés beaucoup plus stable à l'hydrolyse par cette enzyme.

Les isoxazolyl-pénicillines (pénicillines du groupe M) ont été développées en réponse à cette émergence. Ces molécules, beaucoup plus stables à l'hydrolyse enzymatique que la pénicilline G, possèdent cependant une activité antibactérienne amoindrie.

Les amino-pénicillines (pénicillines du groupe A) possèdent un spectre antibactérien élargi par rapport à la pénicilline G (activité contre les bacilles à Gram négatif notamment). L'amoxicilline, qui est la bêta-lactamine la plus utilisée en médecine humaine, appartient à ce groupe. Cet antibiotique a été développé dans le but d'obtenir une forme d'ampicilline administrable par voie orale. Ces deux antibiotiques ne diffèrent d'ailleurs que par la présence d'un groupement hydroxyle en position 4 sur le groupement phényle de l'amoxicilline qui lui confère une biodisponibilité par voie orale bien supérieure à celle de l'ampicilline (Ferres 1983).

Les uréido-pénicillines et les carboxy-pénicillines possèdent également un spectre élargi à certains bacilles à Gram négatif, notamment à la bactérie nosocomiale, *Pseudomonas aeruginosa* et contre certaines souches productrices de céphalosporinases. Ces composés sont réservés à la médecine humaine.

Les amidino-pénicillines en revanche, sont des bêta-lactamines possédant un spectre antibactérien limité aux bacilles à Gram négatif.

1.2.2.2. Les céphalosporines

Les premières céphalosporines ont été découvertes en 1948 par Giuseppe Brotzu, à partir de cultures de la moisissure *Cephalosporium acremonium* (Bo 2000). Cette sous-classe de bêta-lactamine se caractérise par un large spectre antibactérien notamment contre les bacilles à Gram négatif. Les céphalosporines sont classées en quatre générations en fonction de leur spectre antibactérien mais surtout en fonction de leur capacité de résistance vis-à-vis des différents types de céphalosporinases (bêta-lactamases ayant une très forte affinité pour les céphalosporines) (Marshall and Blair 1999).

Les céphalosporines de première génération possèdent un spectre antibactérien qui couvre les cocci à Gram positif ainsi que quelques espèces bactériennes à Gram négatif. Ce sont les céphalosporines les plus sensibles à l'hydrolyse par les céphalosporinases.

Les céphalosporines de deuxième génération possèdent un spectre antibactérien plus étendu contre les bactéries à Gram négatif. Elles sont résistantes à l'hydrolyse de nombreuses bêta-lactamases d'origine plasmidique n'étant pas des Bêta-Lactamases à Spectre Étendu (BLSE) mais sont sensibles à l'hydrolyse par les céphalosporinases d'origine chromosomique (AmpC).

Les céphalosporines de troisième génération possèdent un spectre antibactérien plus élargi contre les bactéries à Gram négatif mais au détriment d'un spectre plus étroit que les précédentes générations contre les cocci à Gram positif. Cependant, elles sont beaucoup plus résistantes à l'hydrolyse par les céphalosporinases chromosomiques (AmpC) que les précédentes générations. La découverte des BLSE en 1983 marque le début d'une nouvelle ère dans l'histoire de la résistance aux bêta-lactamines (Knothe, Shah et al. 1983). Les BLSE possèdent une activité accrue contre les bêta-lactamines et sont notamment capables d'hydrolyser les céphalosporines de troisième génération et les monobactames (Bush 2001).

Les céphalosporines de quatrième génération possèdent un spectre antibactérien comparable à celui des céphalosporines de première génération en ce qui concerne les bactéries à Gram positif et à celui des céphalosporines de troisième génération en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif. De plus, ce type de céphalosporine est beaucoup plus résistant aux souches bactériennes hyperproductrices de bêta-lactamases que les céphalosporines de troisième génération. La cefquinome commercialisée en médecine vétérinaire appartient à cette génération de céphalosporine.

1.2.2.3. Les monobactames

Cette sous-classe de bêta-lactamine n'est composée que d'un seul agent commercialisé et réservé à la médecine humaine : l'aztréonam. Son spectre antibactérien se limite aux bacilles à Gram négatif et sa voie d'administration est parentérale du fait de sa très faible biodisponibilité par voie orale (inférieure à 1%).

1.2.2.4. Les carbapénèmes

Cette sous-classe de bêta-lactamine possède, de par sa très forte affinité pour les PLP, le spectre antibactérien le plus large existant chez les bêta-lactamines. Celui-ci couvre la majorité des bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif. De plus, ces molécules possèdent une excellente résistance aux bêta-lactamases et seules les métallo-bêta-lactamases sont capables de les hydrolyser. Ces antibiotiques sont souvent utilisés en dernier recours et sont, de ce fait, réservés à la médecine humaine.

1.2.2.5. Les inhibiteurs de bêta-lactamases

Les inhibiteurs de bêta-lactamases ne sont pas des antibiotiques car leur action n'entraîne ni la bactériostase ni la mort de la bactérie. Ceci est dû à leur très faible affinité pour les PLP. Il s'agit cependant de molécules appartenant à la famille des bêta-lactamines de par leur structure chimique (présence d'un noyau bêta-lactame). Ces composés agissent sur les bêta-lactamases en se fixant de manière irréversible sur le site catalytique de ces enzymes, pour lesquelles ils possèdent une très forte affinité, empêchant définitivement l'action de ces dernières. L'administration d'inhibiteurs de bêta-lactamases en complément d'une bêta-lactamine permet ainsi d'empêcher la dégradation de l'antibiotique par des souches bactériennes productrices de bêta-lactamases, ce qui préserve son action. Cependant, bien qu'ils soient actifs contre de nombreuses bêta-lactamases, les inhibiteurs de bêta-lactamases n'inhibent pas les céphalosporinases et les métallo-bêta-lactamases.

1.2.3. Utilisation des bêta-lactamines en élevage porcin

1.2.3.1. Les bêta-lactamines autorisées pour l'espèce porcine en France

En France, cinq bêta-lactamines sont autorisées dans l'espèce porcine : la pénicilline G, l'ampicilline, l'amoxicilline, le ceftiofur (céphalosporine de 3^{ème} génération) et la cefquinome (céphalosporine de 4^{ème} génération). Tous ces antibiotiques peuvent être administrés par voie parentérale mais seules l'ampicilline et l'amoxicilline sont administrables par voie orale. Ils peuvent être administrés seuls ou en association avec d'autres familles d'antibiotiques (polypeptides, sulfamides ou aminoglycosides) (2012). Bien qu'utilisée dans plusieurs pays européens (Belmar-Liberato, Gonzalez-Canga et al. 2011) et en France sur d'autres espèces (bovin, chien et chat), l'association amoxicilline-acide clavulanique n'a pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour l'espèce porcine.

1.2.3.2. Indications des bêta-lactamines pour l'espèce porcine

Les indications des bêta-lactamines pour l'espèce porcine diffèrent selon l'âge des animaux :

-Truies : utilisation de l'amoxicilline par voie orale ou du ceftiofur et de la cefquinome par voie parentérale pour le traitement des cystites bactériennes. La cefquinome et la pénicilline G peuvent être également utilisées en traitement curatif du syndrome mammite métrite agalactie (MMA).

-Porcelets en maternité : utilisation de la pénicilline G, de l'amoxicilline, de la cefquinome et du ceftiofur en traitement préventif des arthrites. L'amoxicilline, l'ampicilline ou des associations ampicilline-colistine, amoxicilline-colistine et ampicilline-sulfadiméthoxine sont utilisées par voie orale en traitement curatif des diarrhées à colibacilles en périodes de pré et post-sevrage.

-Porcelets au sevrage : utilisation de l'amoxicilline, de la cefquinome et du ceftiofur dans le traitement curatif des infections respiratoires (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*) et des infections à *Streptococcus suis*.

-Porcs en engraissement : utilisation de l'amoxicilline et de l'association pénicilline-dihydrostreptomycine dans le traitement des infections respiratoires. En cas d'épisodes infectieux respiratoires dans un élevage, l'amoxicilline peut être utilisée en traitement métaphylactique par voie orale. Du fait de son faible temps d'attente, la cefquinome est l'antibiotique de choix dans le traitement des infections respiratoires (notamment à *Actinobacillus pleuropneumoniae*) lorsque les porcs sont en période de fin d'engraissement.

1.2.4. Paramètres pharmacologiques permettant de prédire l'efficacité des bêta-lactamines

Les indices pharmacologiques permettant la prédiction de l'efficacité d'un traitement antibiotique possèdent deux composantes : une composante pharmacocinétique (PK) et une composante pharmacodynamique (PD). Les paramètres pharmacodynamiques (puissance, efficacité, spectre antibactérien) sont propres à l'interaction entre un antibiotique et une bactérie donnée et peuvent être déterminés par des études *in vitro*. En revanche, les paramètres pharmacocinétiques, qui reflètent l'action de l'organisme sur la substance, varient en fonction de l'espèce animale à laquelle elle est administrée, du fait des différences biologiques (génétiques, physiologiques, etc..) inhérentes à chaque espèce. Ces paramètres doivent donc être déterminés sur chacune des espèces cibles.

1.2.4.1. Détermination des paramètres pharmacodynamiques des antibiotiques

La détermination des paramètres pharmacodynamiques des antibiotiques est réalisée grâce à deux méthodes *in vitro*, la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et les courbes de bactéricidie.

1.2.4.1.1. Détermination de la CMI

La technique de détermination de la CMI est la technique la plus simple afin de déterminer le spectre d'activité d'un antibiotique ainsi que le niveau de sensibilité des différentes souches bactériennes à ce dernier. La CMI est déterminée selon une méthode standardisée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009). Un inoculum de $5 \cdot 10^5$ UFC/mL est exposé à une gamme de concentrations d'antibiotique obtenue par dilution sériée au demi. La croissance des bactéries est observée à l'œil nu après une incubation à 35°C de 15 à 18 heures. La CMI est la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu (Figure 4).

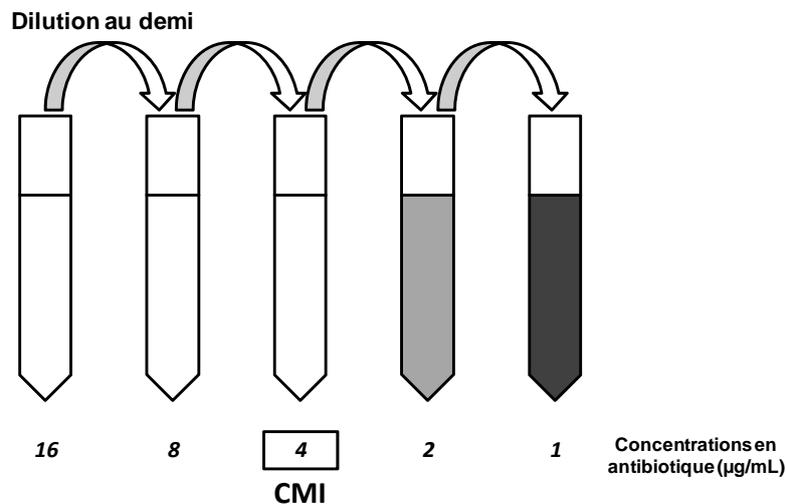


Figure 4 : Méthode de détermination de la CMI.

Les zones grisées correspondent à une croissance bactérienne visible à l'œil nu.

Cette technique simple et standardisée permet d'obtenir rapidement des résultats comparables entre tous les laboratoires. Cependant, la faible charge bactérienne utilisée lors de ce test ne reflète pas les charges bactériennes présentes au niveau des sites infectieux (10^9 - 10^{10} UFC) (Gerber, Craig et al. 1983; Bingen, Lambert-Zechovsky et al. 1990) et ne permet d'évaluer l'effet de l'antibiotique qu'après un temps d'incubation fixé.

1.2.4.1.2. Les courbes de bactéricidie

Les courbes de bactéricidie sont obtenues par dénombrement de la population bactérienne exposée à différentes concentrations d'antibiotiques. Elles permettent de déterminer l'activité de l'antibiotique au cours du temps sur des inocula bactériens de différentes tailles. Il en existe deux types : les courbes de bactéricidie en présence de concentrations constantes en antibiotique et les courbes de bactéricidie en présence de concentrations variables. Ces dernières utilisent des systèmes dits « *in vitro* dynamiques », qui miment l'élimination de l'antibiotique par l'organisme et qui sont ainsi plus proches des conditions *in vivo*. L'utilisation des courbes de bactéricidie permet de déterminer si un

antibiotique est bactéricide (*i.e.* s'il provoque la lyse bactérienne) ou bactériostatique (*i.e.* s'il empêche la croissance bactérienne) et également si celui-ci possède la même efficacité sur des petits (ex : 10^5 UFC/mL) et des gros (ex : 10^8 UFC/mL) inocula bactériens. De plus, cette technique permet de classer l'antibiotique testé selon deux modes d'action : un mode concentration-dépendant et un mode temps-dépendant (Figure 5).

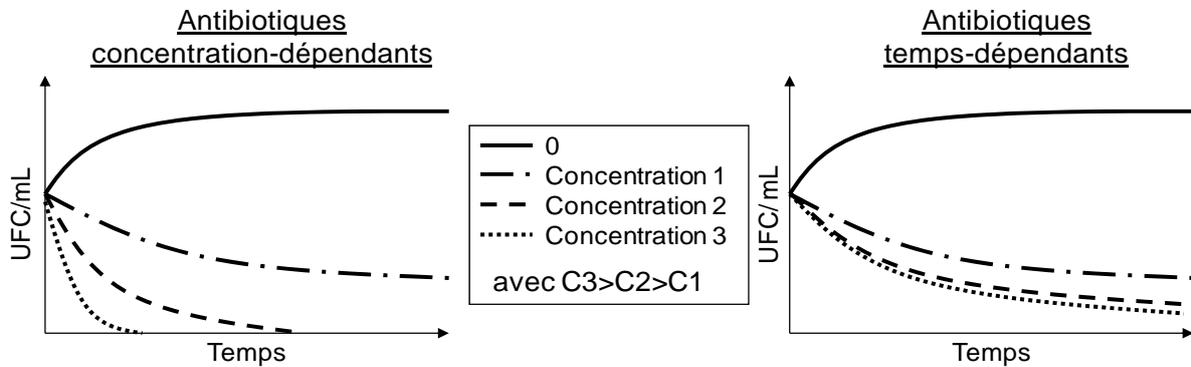


Figure 5 : Courbes de bactéricidie représentatives des antibiotiques concentration-dépendants et temps-dépendants.

Le graphique de gauche représente les courbes de bactéricidie obtenues pour un antibiotique concentration-dépendant, l'activité bactéricide augmente avec la concentration en antibiotique. Le graphique de droite représente les courbes de bactéricidie obtenues pour un antibiotique temps-dépendant, l'activité bactéricide augmente avec le temps d'incubation avec l'antibiotique.

A partir des courbes de bactéricidie, il est possible de modéliser l'action des antibiotiques sur la population bactérienne, grâce à des équations décrivant l'effet de l'antibiotique en fonction de sa concentration (Mattie 2000; Regoes, Wiuff et al. 2004). Pour de nombreux antibiotiques, l'utilisation d'un modèle de type E_{max} (équation 1) permet de bien décrire cette relation concentration-effet et ainsi d'obtenir des paramètres pharmacodynamiques reflétant l'efficacité (E_{max}) et la puissance (EC_{50}) des antibiotiques testés (Figure 6) :

$$E = \frac{E_{max} \times C^\gamma}{C^\gamma + EC_{50}^\gamma} \quad (\text{Equation 1})$$

où E est l'effet de l'antibiotique observé pour la concentration C, E_{max} est l'effet maximal de l'antibiotique, EC_{50} est la concentration en antibiotique produisant 50% de l'effet maximal et γ est le coefficient de sigmoïdité de la courbe.

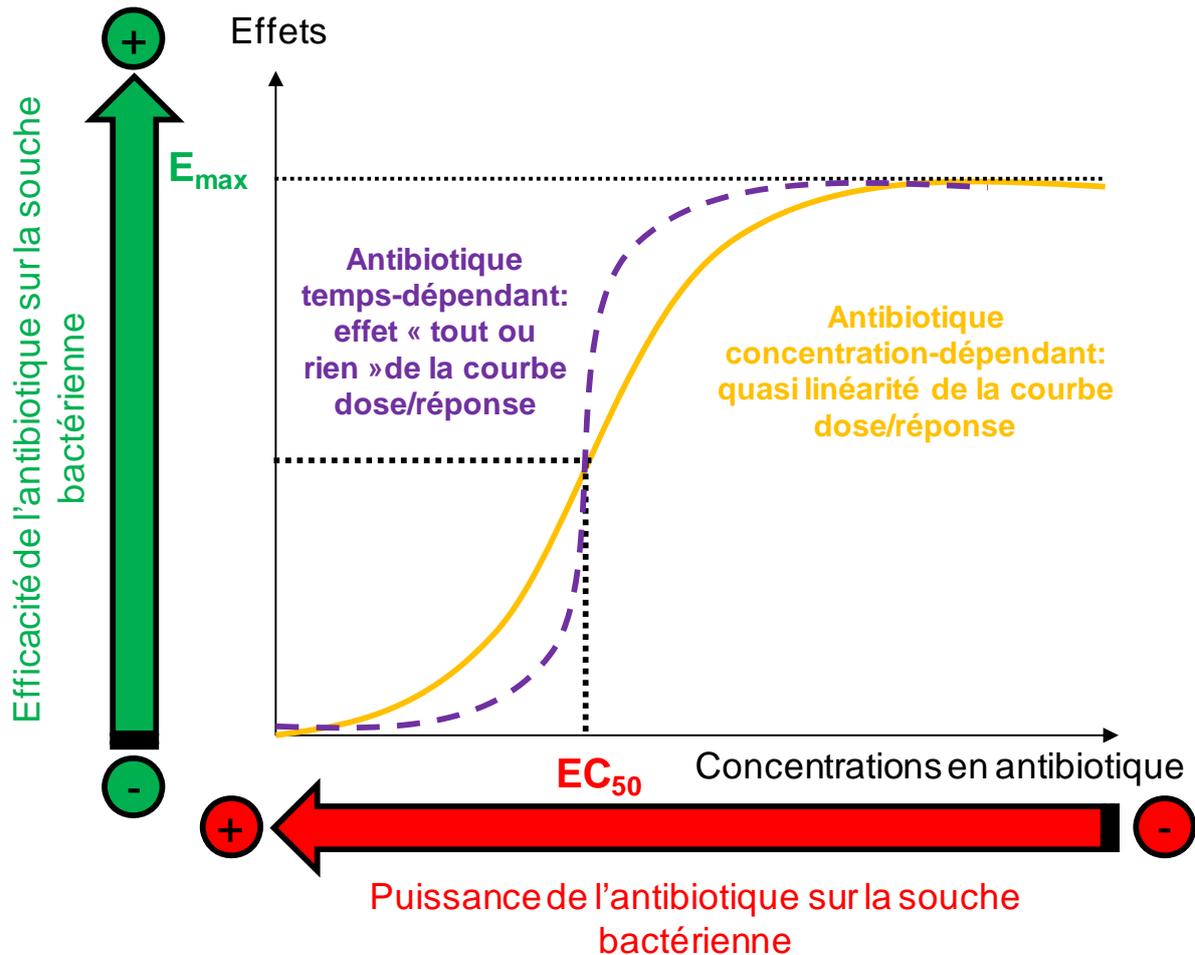


Figure 6 : Effet de l'antibiotique en fonction de sa concentration dans une relation de type E_{max} .

L'effet de l'antibiotique augmente avec sa concentration jusqu'à atteindre l'effet maximal pour les fortes concentrations.

L'obtention des paramètres de puissance et d'efficacité ainsi que la classification des antibiotiques en fonction de leur mode d'action permet d'adapter les schémas posologiques pour obtenir une efficacité optimale des antibiothérapies.

1.2.4.2. Paramètres pharmacocinétiques des bêta-lactamines chez l'animal

Cette section présente les paramètres pharmacocinétiques des deux bêta-lactamines utilisées au cours de ces travaux de thèse : l'amoxicilline et la cefquinome, chez les différentes espèces utilisées lors des expérimentations

1.2.4.2.1. Paramètres pharmacocinétiques de l'amoxicilline chez la souris

Le tableau 3 présente les paramètres pharmacocinétiques déterminés sur différentes souches de souris au cours de trois différentes études. Quelque soit la voie d'administration, la demi-vie d'élimination ($T_{1/2}$) de l'amoxicilline est très courte (inférieure à une heure) chez la souris.

Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques de l'amoxicilline chez la souris.

Référence	Soriano <i>et coll.</i> , 1996 (Soriano, Ponte et al. 1996)	Azoulay-Dupuis <i>et coll.</i> , 1996 (Azoulay-Dupuis, Moine et al. 1996)	Gisby <i>et coll.</i> , 1991 (Gisby, Wightman et al. 1991)
Souche	femelle OF1	Swiss	MF1
Poids (g)	20-22	-	18-22
Voie d'administration	sous-cutanée	sous-cutanée	oral
Dose (mg/kg)	10	10	20
AUC _[0-∞] (µg*h/mL) ^a	4.6	11	-
C _{max} (µg/mL) ^b	9.2	-	-
T _{1/2} (h) ^c	0.24	0.40	0.36
C _{moy} (µg/mL) ^d	-	-	7.9

^a AUC_[0-∞] : aire sous la courbe des concentrations de 0 à l'infini

^b C_{max} : concentration maximale plasmatique

^c T_{1/2} : temps de demi-vie d'élimination

^d C_{moy} : concentration plasmatique moyenne

1.2.4.2.2. Paramètres pharmacocinétiques de la cefquinome chez la souris et le porc

Le Tableau 4 présente les paramètres pharmacocinétiques de la cefquinome obtenus chez la souris et le porc au cours de deux études différentes. Le temps de demi-vie d'élimination de la cefquinome est très court chez la souris pour une administration en sous cutanée (inférieur à une heure) et plutôt court chez le porc lors d'une administration en intraveineuse (1.3h). En revanche, lors d'une administration par voie intramusculaire la demi-vie d'élimination est quasiment quadruplée (4.3h) du fait d'un délai d'absorption beaucoup plus long de la substance. Cependant, le temps nécessaire pour obtenir les concentrations plasmatiques maximales (T_{max}) est très court que ce soit chez la souris par voie sous cutanée (0.38h) ou chez le porc par voie intramusculaire (0.28h).

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques de la cefquinome chez la souris et le porc.

Référence	Limbert <i>et coll.</i> , 1991 (Limbert, Isert et al. 1991)	Limbert <i>et coll.</i> , 1991 (Limbert, Isert et al. 1991)	Li <i>et coll.</i> , 2008 (Li, Wu et al. 2008)
Espèce	souris	porc	porc
Voie d'administration	sous-cutanée	intraveineuse	intramusculaire
Dose (mg/kg)	10	10	2
AUC _[0-∞] (µg*h/mL) ^a	7.8 ± 1.9	66.7 ± 27.2	7.58 ± 1.59
C _{max} (µg/mL) ^b	7.5 ± 2.9	-	4.01 ± 0.57
T _{max} (h) ^c	0.38 ± 0.16	-	0.28 ± 0.07
T _{1/2} (h) ^d	0.58 ± 0.09	1.32 ± 0.18	4.36 ± 2.35
F (%) ^e	-	-	95.13 ± 9.93

^a AUC_[0-∞] : aire sous la courbe des concentrations de 0 à l'infini
^b C_{max} : concentration maximale plasmatique
^c T_{max} : temps nécessaire pour atteindre C_{max}
^d T_{1/2} : temps de demi-vie d'élimination
^e F : biodisponibilité absolue

1.2.4.3. Critères d'efficacité d'un traitement antibiotique aux bêta-lactamines

L'efficacité d'un traitement antibiotique ne se mesure pas uniquement par la guérison clinique mais également par l'élimination des bactéries au niveau du site infectieux. En effet, si l'éradication bactérienne n'est pas obtenue à la fin du traitement, une rechute chez le sujet traité est possible avec un risque de dissémination de souches résistantes vers d'autres sujets (Dagan, Klugman et al. 2001).

La relation quantitative entre d'un côté les paramètres pharmacocinétiques décrivant l'exposition à l'antibiotique - tels que l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques (AUC), le pic de concentrations (C_{max}) ou la durée d'exposition au dessus d'un certain niveau de concentrations, et de l'autre les paramètres pharmacodynamiques tels que la concentration minimale inhibitrice (CMI), permet de construire des indices PK/PD. L'utilisation de ces indices pour décrire, prédire et comprendre les relations entre un traitement et son efficacité sur le plan clinique et bactériologique a été développée dans les années 1980-90 par W A Craig (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949).

Trois principaux indices PK/PD sont utilisés pour déterminer l'efficacité des antibiotiques : le maintien d'une concentration supérieure à la CMI durant un certain pourcentage de l'intervalle d'administration (T_{>CMI}), le rapport de la concentration plasmatique maximale sur la CMI (C_{max}/CMI) et le rapport de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatique sur la CMI (AUC/CMI) (Figure 7) (Rybak 2006). Le choix de ces indices dépend du mode d'action des antibiotiques, à savoir s'ils sont temps dépendants ou concentration-dépendants. Pour les antibiotiques concentration-dépendants comme les aminoglycosides et les fluoroquinolones, les indices PK/PD qui sont les mieux corrélés avec l'efficacité sont les rapports AUC/CMI et C_{max}/CMI (Blaser, Stone et al. 1987; Forrest, Nix et al. 1993). En revanche, pour les antibiotiques temps-dépendants comme les bêta-lactamines, le T_{>CMI} se révèle être l'indice le plus prédictif de l'efficacité (Craig 2003). Le T_{>CMI} des bêta-lactamines

doit être d'au moins 50% (bactéries Gram positif) et préférablement de 80% (bactéries Gram négatif) de l'intervalle entre deux administrations pour obtenir un effet optimal en terme de guérison microbiologique (Craig 1998; Toutain, del Castillo et al. 2002).

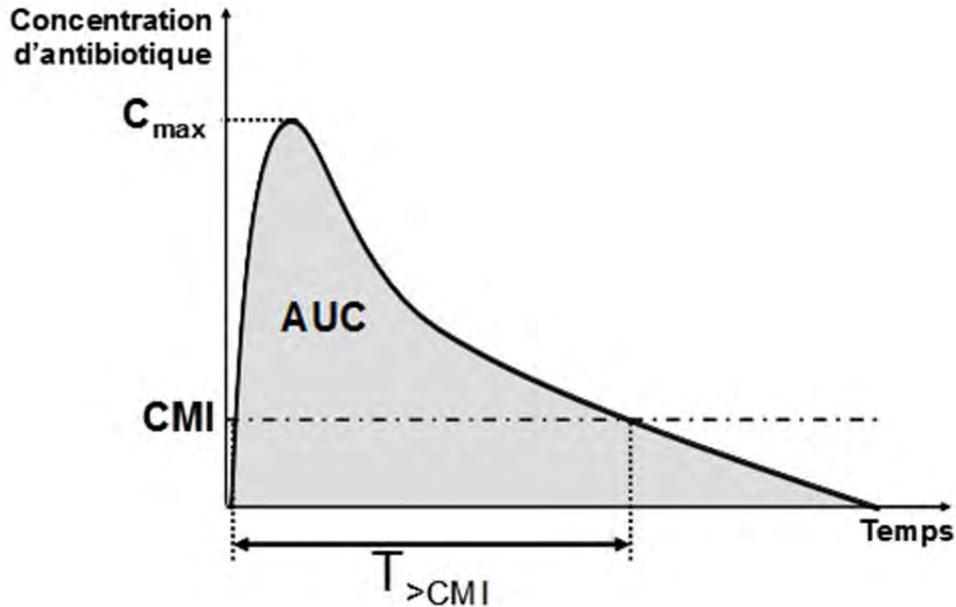


Figure 7 : Présentation des principaux paramètres PK/PD utilisés en antibiothérapie.
La courbe des concentrations plasmatiques d'antibiotique représentée en fonction du temps permet de visualiser l'Aire sous la courbe (AUC), le pic maximal de concentration plasmatique (C_{max}) ainsi que le temps passé par les concentrations au-dessus de la CMI ($T_{>CMI}$).

1.2.5. Influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'efficacité des bêta-lactamines

Pour déclencher certaines infections bactériennes, une dizaine à une centaine de bactéries peuvent être suffisantes (Eagle, Magnuson et al. 1947). Au cours de l'infection, la charge bactérienne se développe au niveau du site infectieux jusqu'à atteindre des densités de l'ordre de 10^9 à 10^{10} UFC (Gerber, Craig et al. 1983). Cette augmentation peut se produire soit de manière exponentielle soit plus progressivement, en fonction de l'espèce bactérienne. Cependant, lorsqu'un seuil critique est atteint, l'individu contaminé déclenche des signes cliniques liés à l'infection qui peuvent résulter à la fois de la détection du pathogène et de la mise en place de mécanismes de défense par le système immunitaire et/ou de lésions tissulaires induites par des toxines produites par les bactéries pathogènes.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les bêta-lactamines étaient plus puissantes et efficaces contre de petits inocula bactériens que contre des gros inocula bactériens (Eagle 1949; Firsov, Ruble et al. 1997; Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Udekwu, Parrish et al. 2009). Par exemple, le Dr Harry Eagle a montré en 1947, sur un modèle de syphilis chez le lapin, qu'une dose de pénicilline G de 32000 unités/kg était

nécessaire pour guérir 100% des lapins infectés par $2 \cdot 10^5$ *Treponema pallidum* alors qu'une dose de 4000 unités/kg était nécessaire pour guérir 100% des lapins infectés par $2 \cdot 10^3$ *Treponema pallidum* et qu'une dose de 1000 unités/kg était nécessaire pour guérir 100% des lapins infectés par $2 \cdot 10^1$ *Treponema pallidum* (Eagle, Magnuson et al. 1947). Ce phénomène appelé « effet inoculum » est retrouvé chez de nombreuses familles d'antibiotiques (Udekwa, Parrish et al. 2009; Ferran, Toutain et al. 2011).

1.3. Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines

Les bactéries ont acquis divers mécanismes de résistance aux bêta-lactamines bien avant l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. En effet, depuis des millions d'années, les bactéries et les champignons luttent dans l'environnement pour coloniser certaines niches écologiques. Si les champignons ont acquis, au cours de l'évolution, la capacité à produire des bêta-lactamines pour éliminer leurs concurrents, les bactéries ont acquis en réponse la capacité de produire des bêta-lactamases afin de détruire ces molécules (Keller, Turner et al. 2005). Cependant, l'utilisation intensive d'antibiotiques de la famille des bêta-lactamines en médecine durant ces 60 dernières années a conduit à une explosion de l'émergence de bactéries résistantes et particulièrement chez les bactéries pathogènes pour l'Homme et les animaux (Livermore 1998).

Comme nous l'avons vu précédemment, la méthode de référence pour déterminer l'efficacité d'un antibiotique sur une souche bactérienne est la détermination de la CMI. Cette dernière permet de définir si une souche bactérienne est résistante ou non à l'antibiotique testé. La notion de résistance peut être définie selon différents critères en fonction des domaines de spécialité (microbiologie, épidémiologie, pharmacologie, clinique) (Davison, Low et al. 2000). Afin de réaliser les meilleurs choix thérapeutiques possibles, des valeurs critiques de CMI ont été définies par des comités d'experts regroupant des spécialistes des différents domaines précités. Elles permettent de définir la catégorie à laquelle appartient une souche bactérienne donnée (sensible, intermédiaire, résistante) et de choisir le cas échéant, l'antibiotique le plus adapté. La détermination de ces valeurs seuils prend en compte la distribution des CMI pour un antibiotique donné des différentes souches testées de l'espèce bactérienne considérée, les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'antibiotique et les résultats des études cliniques (Turnidge and Paterson 2007). Bien que la détermination de la valeur de la CMI soit la méthode de référence, la détermination du niveau de résistance d'une souche bactérienne est possible par l'utilisation d'un antibiogramme. En effet, des valeurs critiques de diamètres en mm (contrairement à la MIC en $\mu\text{g/mL}$) ont également été déterminées dans l'interprétation des résultats de cette technique d'analyse.

Au cours de ces quarante dernières années, les avancées effectuées dans les domaines de la microbiologie, de la biochimie et de la biologie moléculaire ont permis d'identifier la nature des différents mécanismes de résistance possédés par les souches bactériennes résistantes aux bêta-lactamines, ce qui a permis à la fois une meilleure compréhension de ces mécanismes, le développement de nouveaux types de bêta-lactamines et d'outils diagnostics (test de recherche de bêta-lactamases). L'utilisation de techniques de biologie moléculaire comme la PCR et ses dérivés (puces à ADN) sont

également utilisées dans le domaine de l'épidémiologie afin de pouvoir suivre l'émergence et la dissémination des différents déterminants génétiques codants pour des mécanismes de résistances aux bêta-lactamines (Ojha and Kostrzynska 2008).

A l'heure actuelle, quatre type de mécanismes de résistance aux bêta-lactamines ont été identifiés: la production de bêta-lactamases qui demeure de loin le plus répandu, la diminution de la perméabilité membranaire, l'excrétion de l'antibiotique hors de la bactérie par des protéines d'efflux et la modification de la cible, la perte d'affinité des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (Poole 2004).

1.3.1. Production de bêta-lactamases

1.3.1.1. Les éléments génétiques mobiles porteurs de la résistance : *intégrons, plasmides, transposons et bactériophages*

Ces éléments facilement transmissibles d'une bactérie à l'autre, que ce soit par des phénomènes d'échanges entre des bactéries d'espèces différentes (transfert horizontal) ou à leur descendance (transfert vertical) constituent les principaux vecteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques pour le genre bactérien. Ces supports sont d'autant plus efficaces que pour certains d'entre eux (plasmides en l'occurrence), il n'est pas rare que plusieurs mécanismes de résistance pour différentes familles d'antibiotiques soient codés sur un seul de ces éléments. Ainsi la sélection d'une souche bactérienne grâce à l'expression d'un mécanisme de résistance entraîne irrémédiablement la sélection des autres phénotypes de résistance. De plus, l'échange de ces éléments porteurs de phénotype de multi-résistance entre les bactéries et notamment celles pathogène pour l'Homme, est un phénomène de plus en plus préoccupant pour la santé publique car cette co-sélection diminue de façon considérable l'arsenal thérapeutique efficace contre ces bactéries (Canton and Ruiz-Garbajosa 2011).

1.3.1.1.1. Les intégrons

Les intégrons sont organisés sous forme de cassettes de gènes comportant un système de capture de la séquence génique et un système d'expression génique. Ces cassettes sont des éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison d'ADN spécifique médié par une intégrase. Par conséquent, les intégrons sont constitués d'une région 5' comprenant un gène codant pour une intégrase, un site d'attachement à l'ADN et un promoteur. Cependant, les intégrons sont incapables d'autoréplication et doivent obligatoirement être localisé soit sur un réplicon (plasmide ou

chromosome bactérien), soit sur un élément transposable (transposon). Les intégrons sont répartis en plusieurs classes définies en fonction de la structure du gène codant pour l'intégrase. A ce jour, trois d'entre elles (classes 1, 2 et 3) ont été identifiées comme étant impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.

1.3.1.1.2. Les plasmides

Les plasmides sont des éléments génétiques mobiles constitués d'une hélice d'ADN à double brin, circulaire et cytoplasmique. Ils sont doués de réplication autonome et présentent un panel de taille très variable (de 3 à 400kb). Ils sont les supports de nombreux types de gènes remplissant diverses fonctions physiologiques (dont la résistance aux antibiotiques), permettant une meilleure adaptation des bactéries à leur environnement. La transmission d'un plasmide d'une bactérie à l'autre s'effectue soit par transfert vertical (lors de la division clonale), soit par transfert horizontal (conjugaison, transduction ou transformation). Bien que les plasmides ne revêtent absolument pas un caractère indispensable au métabolisme normal de la cellule bactérienne, les avantages qu'ils confèrent font de ces éléments les principaux vecteurs d'adaptation des bactéries à un nouvel environnement. Ce sont d'ailleurs les principaux médiateurs de la résistance bactérienne aux bêta-lactamines.

1.3.1.1.3. Les transposons

Les transposons sont des séquences d'ADN capables de modifier leur localisation au sein du génome sans jamais y être présents à l'état libre. Ils sont incapables d'autoréplication mais présentent dans leur séquence codante les déterminants de la transposition ainsi que d'autres assurant de nombreuses fonctions physiologiques (gènes de résistance aux antibiotiques). Le mécanisme d'insertion/délétion du transposon dans le génome s'appelle la transposition. L'ensemble des transposons constitue un patrimoine génétique permettant aux bactéries de s'adapter à leur environnement en fonction de la pression du milieu.

1.3.1.1.4. Les bactériophages

Un bactériophage (ou phage) est un virus n'infectant que les bactéries. Pour la plupart d'entre eux, il existe une spécificité d'hôte très étroite (se limitant parfois à une seule souche d'espèce bactérienne). Le support génomique des bactériophages peut être soit de

l'ADN ou de l'ARN, simple ou double brin. Cependant, plus de 95 % des phages identifiés à ce jour sont des phages à ADN double-brin. Au niveau structurel, ils sont également constitués d'une enveloppe protéique externe (la capsid) ayant pour fonction de protéger le matériel génétique et d'une véritable seringue moléculaire ayant pour fonction, l'arrimage du phage à la surface bactérienne et l'injection du matériel génétique au niveau du cytoplasme bactérien. En fonction de sa nature (ADN ou ARN), le matériel génétique est composé de divers éléments permettant, en couplage avec la machinerie cellulaire de la bactérie, la réplication des acides nucléiques phagiques. De plus, ce matériel génétique peut contenir divers déterminants génétiques pouvant conférer à la bactérie des avantages sélectifs (gènes de résistance aux antibiotiques notamment). Les bactériophages persistent dans le monde bactérien sous deux états distincts : sous forme virulente/ lytique (se répliquant dans la cellule bactérienne infectée et provoquant sa lyse) ou sous forme lysogène (inséré dans le génome bactérien sous la forme d'un prophage et devenant ainsi partie intégrante du génome de l'hôte). Le mécanisme d'acquisition de matériel génétique d'une bactérie par l'infection de bactériophages est appelé transduction.

1.3.1.2. Présentation générale des bêta-lactamases

Les bêta-lactamases sont des enzymes, produites par les bactéries, et ayant la capacité d'hydrolyser le noyau bêta-lactame des bêta-lactamines. Cette hydrolyse inactive ainsi l'antibiotique avant que celui-ci n'atteigne les PLP. Evolutivement, les bêta-lactamases dérivent des PLP (Kelly, Dideberg et al. 1986; Massova and Mobashery 1998). En effet, ces deux types d'enzymes possèdent de nombreuses analogies structurales et séquentielles et sont capables de fixer les bêta-lactamines. La différence majeure entre ces deux types d'enzymes réside dans le fait que seules les bêta-lactamases sont capables d'hydrolyser et ainsi d'inactiver les bêta-lactamines.

Suivant le type d'enveloppe bactérienne, les bêta-lactamases sont soit exportées dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*), soit dans l'espace périplasmique (bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*) (Figure 8 et Figure 9). A l'heure actuelle, plus de 500 bêta-lactamases différentes ont été répertoriées (Babic, Hujer et al. 2006). La destruction des bêta-lactamines par les bêta-lactamases est le mécanisme de résistance majeur des bactéries à Gram négatif. Bien qu'étant probablement à l'origine des gènes chromosomiques de par leur ascendance, les gènes codant pour les bêta-lactamases sont majoritairement portés par des éléments génétiques mobiles, notamment des plasmides mais également des transposons, des intégrons et par le matériel génétique de certains phages (Colomer-Lluch, Jofre et al. 2011;

Mokracka, Gruszczynska et al. 2012; Garcia-Cobos, Arroyo et al. 2013). Cependant, il existe encore des gènes chromosomiques codant pour ces enzymes. Les éléments génétiques mobiles codant pour des bêta-lactamases sont généralement transmis par transfert vertical mais peuvent également l'être par transfert horizontal y compris entre espèces phylogénétiquement éloignées (Livermore 1995). Chez certaines espèces bactériennes, la résistance à certaines bêta-lactamines par production de bêta-lactamase est dite naturelle. Cela signifie qu'une très forte proportion des souches d'une espèce bactérienne, présentent un phénotype de résistance à un antibiotique donné et ceci en l'absence de toute pression de sélection. Par exemple, *Aeromonas hydrophila* est naturellement résistante à la pénicilline G par production d'une pénicillinase (Zelman, Gonzalez et al. 1984). Par opposition à la résistance naturelle, la résistance acquise se manifeste sous l'effet d'une pression de sélection. L'exemple de la propagation de TEM-1, la première bêta-lactamase plasmidique identifiée chez une bactérie à Gram négatif est un très bon exemple. Cette enzyme a été isolée pour la première fois dans une culture de sang d'un patient nommé Temoneira en Grèce (Datta and Kontomichalou 1965). La dissémination du gène *tem-1* vers d'autres espèces bactériennes a été très rapide étant donné que ce gène est porté par des plasmides et des transposons et en quelques années, des bactéries porteuses de ce gène ont été retrouvées dans tous les pays du monde, notamment chez diverses espèces à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* et *Neisseria gonorrhoeae*) (Bradford 2001).

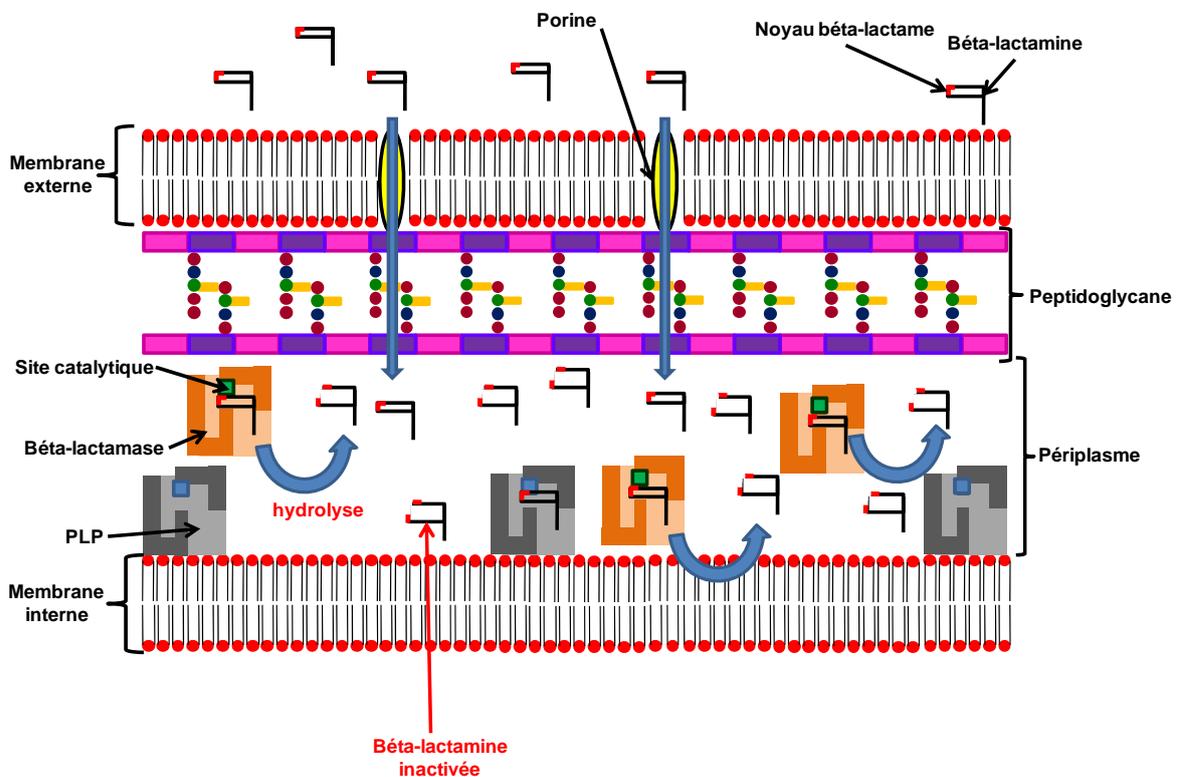


Figure 8 : Mode d'action des bêta-lactamases chez les bactéries à gram négatif.

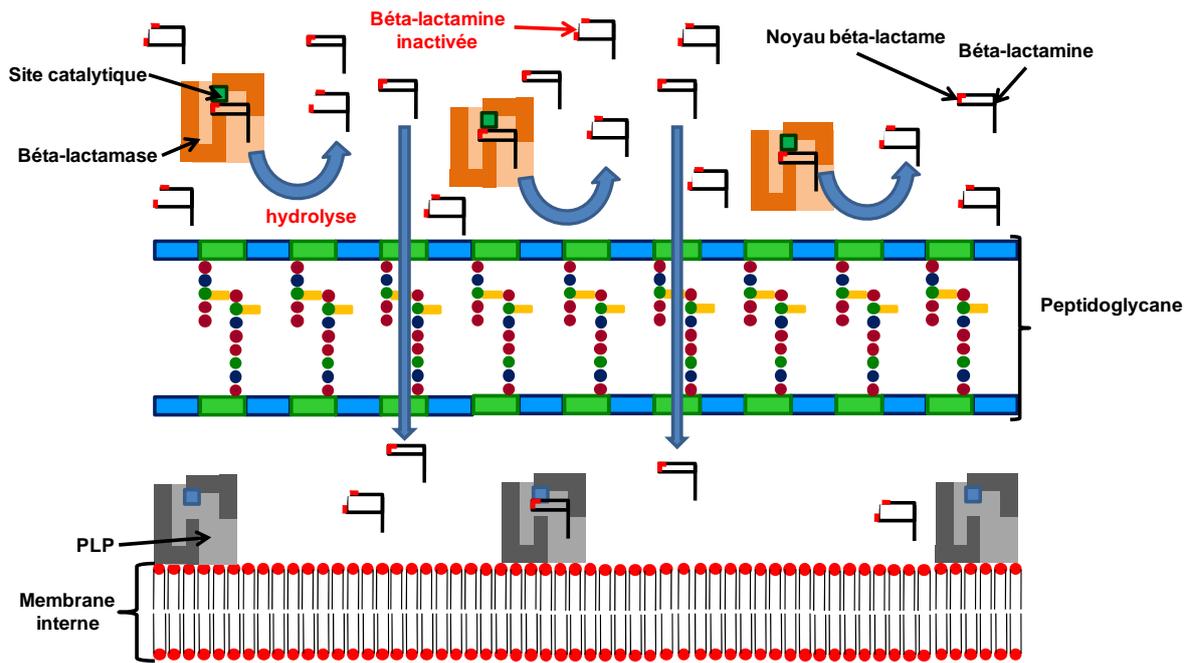


Figure 9 : Mode d'action des bêta-lactamases chez les bactéries à gram positif.

1.3.1.3. Classification des bêta-lactamases

Deux types de classification ont été proposées pour les bêta-lactamases : une classification fonctionnelle (Bush, Jacoby et al. 1995) et une classification moléculaire (Ambler 1980). La classification fonctionnelle repose sur plusieurs critères en relation avec l'activité des différentes bêta-lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) contenant chacun des sous-groupes. La classification moléculaire s'appuie elle sur les parentés phylogénétiques des différentes bêta-lactamases et divise également ces enzymes en quatre groupes (A à D). Les bêta-lactamases des classes A, C et D font partie des enzymes à sérine active, c'est-à-dire possédant au niveau de leur site actif une sérine intervenant dans le mécanisme d'acétylation au cours de l'hydrolyse des bêta-lactamines. En revanche, la classe B inclut les métallo-bêta-lactamases dont l'activité catalytique nécessite la présence d'ions métalliques. La classification comparée des bêta-lactamases selon leur parenté moléculaire et fonctionnelle est présentée dans le Tableau 5. La nomenclature des bêta-lactamases est détaillée dans la liste des abréviations (page 11).

Tableau 5 : Classification moléculaire et fonctionnelle des bêta-lactamases.

Classification fonctionnelle (Bush, Jacoby et al. 1995)	Classification moléculaire (Ambler 1980)	Substrats	Inhibition par :		Exemples
			Acide clavulanique	EDTA	
1	C	céphalosporines	-	-	AmpC, CMY-2
2a	A	pénicillines	+	-	PC1
2b	A	pénicillines, céphalosporines	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	pénicillines, céphalosporines de 3 ^{ème} et 4 ^{ème} génération, monobactames	+	-	BLSE (TEMs, SHVs, CTX-Ms)
2br	A	pénicillines	+/-	-	IRT TEMs
2c	A	pénicillines, carbénicilline	+	-	PSE-1
2d	D	pénicillines, cloxacilline	+/-	-	OXAs
2e	A	céphalosporines	+	-	FEC-1
2f	A	pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes	+	-	KPC-1, SME-1
3	B	la plupart des bêta-lactamines	-	+	L1, CcrA, NMD-1
4 ^a					

^aLa classe 4 regroupe les bêta-lactamases ne pouvant être classées dans les autres groupes.

1.3.1.3.1. La classe A

Il s'agit de la classe comprenant les enzymes les plus diverses. Historiquement, elle était principalement représentée par les pénicillinases possédant une activité contre les pénicillines mais également, à un moindre degré sur les céphalosporines de première génération (ex : PC1 isolée chez *Staphylococcus aureus*). La majorité de ces enzymes est sensible aux inhibiteurs de bêta-lactamases. Les principaux représentants de ce groupe sont les bêta-lactamases du type PC1, TEM, SHV et plus récemment la famille des CTX-M. Les Bêta-Lactamases à Spectre Etendu (BLSE) qui se caractérisent par une résistance à l'ensemble des bêta-lactamines exceptées les céphamycines (sous-classe des céphèmes) et les carbapénèmes sont réparties dans les différentes familles de cette classe.

a) Bêta-lactamases de type TEM

TEM-1 est l'enzyme la plus fréquemment rencontrée chez *E. coli*, mais elle est également présente chez d'autres espèces telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Haemophilus influenzae* et *Neisseria gonorrhoeae*. Environ 90% des souches d'*E. coli* résistantes à l'ampicilline le sont grâce à la production de TEM-1 (Livermore 1995). TEM-1 est capable d'hydrolyser l'ampicilline, l'oxacilline, la céfalotine, et possède une activité catalytique non-négligeable vis-à-vis des céphalosporines dites à spectre étendu. L'enzyme TEM-2 ne diffère de TEM-1 que par un seul acide aminé dans sa séquence peptidique. Les gènes codants pour ces enzymes sont situés sur des plasmides et des transposons (Tn1, Tn2 ou Tn3) ce qui facilite beaucoup la dissémination interspécifique (transferts horizontaux) de cette enzyme (Partridge and Hall 2005). La première Bêta-Lactamase à Spectre Etendu (BLSE) de type TEM (TEM-3) a été isolée en 1989 (Sougakoff, Goussard et al. 1988). Depuis les trente dernières années, plus de cent bêta-lactamases dérivées de TEM-1 ont émergé par substitution d'un ou plusieurs acides aminés (Paterson and Bonomo 2005). Certains de ces dérivés sont des IRT (Inhibitor-Resistant TEM bêta-lactamase) qui ont été mis en évidence à partir d'isolats cliniques résistants à l'action de l'acide clavulanique (Canton, Morosini et al. 2008). La majorité des dérivés de type TEM sont des BLSE isolées le plus souvent chez *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* mais également mises en évidence chez d'autres bactéries à Gram négatif (Bradford 2001).

b) Bêta-lactamases de type SHV

Les gènes codant pour ce type de bêta-lactamase sont souvent isolés chez les bactéries du genre *Klebsiella*. Ces enzymes sont des pénicillinases et SHV-1 est la plus fréquemment rencontrée, notamment chez *Klebsiella pneumoniae* dont la majorité des souches possèdent le gène codant pour cette enzyme sur leur chromosome. Cependant, chez certaines espèces bactériennes comme *E. coli*, ce gène peut être porté par des éléments génétiques mobiles (plasmides). A l'heure actuelle, une centaine de bêta-lactamases dérivées de SHV-1 ont été mises en évidence (Bradford 2001).

c) Bêta-lactamases de type CTX-M

Au cours des dix dernières années, une nouvelle famille de BLSE hydrolysant préférentiellement le céfotaxime a émergé notamment au sein des entérobactéries : les bêta-lactamases de type CTX-M. Ces enzymes, majoritairement portées par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides (Kang, Kwon et al. 2013), les transposons (Kang, Kwon et al. 2013) et les bactériophages (Colomer-Lluch, Jofre et al. 2011), se sont rapidement propagées au niveau mondial et sont devenues les BLSE majoritaires des entérobactéries de certaines zones géographiques (Soulsby 2007).

1.3.1.3.2. La classe B : métallo-bêta-lactamases

La particularité des métallo-bêta-lactamases est qu'elles sont capables d'hydrolyser les carbapénèmes, bêta-lactamines qui échappent à l'activité catalytique des bêta-lactamases à sérine active (classe A, C et D). De plus, la plupart des métallo-bêta-lactamases hydrolysent la quasi-totalité des pénicillines et des céphalosporines et sont insensibles aux inhibiteurs de bêta-lactamases (Bebrone 2007). L'ensemble de ces critères fait que les bactéries pathogènes ayant la capacité de sécréter des métallo-bêta-lactamases sont problématiques lorsqu'elles sont rencontrées en clinique car peu de solutions thérapeutiques. En 2009, une nouvelle métallo-bêta-lactamase a été identifiée chez *Klebsiella pneumoniae* à partir d'un isolat d'un patient suédois ayant effectué un voyage en Inde. Cette enzyme nommée NDM-1 (New Delhi Metallo-beta-lactamase-1) est codée par un gène (bla_{NDM-1}) appartenant à un intégron codant également pour une céphalosporinase de classe C (CMY-4) et une nouvelle érythromycine estérase : ARR-2. Cet intégron confère à la bactérie porteuse un profil de résistance à tous les antibiotiques exceptés aux quinolones et

aux polypeptides. L'enzyme NDM-1 est capable d'hydrolyser toutes les bêta-lactamines hormis l'aztreonam (Yong, Toleman et al. 2009). Depuis 2010, plusieurs enzymes dérivées de NDM-1 (NDM-2, NDM-4 et NDM-5 notamment) ont été mises en évidence dans divers pays à travers le monde (Inde, Chine, Etats-Unis, Cameroun, Allemagne, Libye, Danemark...) principalement chez trois espèces bactériennes à Gram négatif (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*) (Charan, Mulla et al. ; Dortet, Poirel et al. ; Hammerum, Larsen et al. ; Leski, Vora et al. ; Wang, Liu et al.). La dissémination très rapide de cette nouvelle métallo-bêta-lactamase dans de nombreux pays du monde est un phénomène très inquiétant pour la santé publique.

1.3.1.3.3. La classe C : les céphalosporinases

La classe C comprend les céphalosporinases de type AmpC : une bêta-lactamase ayant été mises en évidence chez *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* et conférant un profil de résistance aux oxyimino-céphalosporines (céfotaxime, ceftriaxone,...), aux 7-méthoxy-céphalosporines (céfoxitine et cefotetan) et aux monobactames (Sanders 1987). Bien qu'ayant été caractérisés à l'origine comme des enzymes codées par des gènes chromosomiques à expression inductible, un grand nombre de gènes codant ce type d'enzymes a été identifié sur des éléments génétiques mobiles de type plasmide (CMY-2, MIR-1, FOX-2, ACC-1) (Philippon, Arlet et al. 2002). Ces enzymes présentent une faible affinité pour les inhibiteurs de bêta-lactamases et ne sont donc pas inhibées par ces composés (Shanthi and Sekar).

1.3.1.3.4. La classe D : les oxacillinases

La classe D regroupe les bêta-lactamases hydrolysant préférentiellement l'oxacilline et la cloxacilline et conférant une résistance à l'ampicilline et à la céfalotine (OXA-1, OXA-2,...) (Gupta 2007). Ces enzymes présentent une faible affinité pour l'acide clavulanique et ne sont donc pas inhibées par celui-ci. Ces bêta-lactamases sont majoritairement synthétisées par *Pseudomonas aeruginosa* mais d'autres espèces bactériennes à Gram négatif les produisent également (notamment *E.coli*). De nombreuses enzymes dérivées d'OXA-10 appartiennent à la classe des BLSE (OXA-18, OXA-28,...). Ces enzymes ont acquis la capacité d'hydrolyser les céphalosporines (céfotaxime, ceftriaxone) ou les monobactames (aztreonam) (Paterson and Bonomo 2005).

1.3.2. Diminution de la perméabilité de la membrane externe

Chez les bactéries à Gram négatif, les bêta-lactamines doivent traverser, en plus du peptidoglycane qui est relativement perméable aux bêta-lactamines, la membrane externe bactérienne afin de pouvoir cibler les PLP situées au niveau périplasmique. Pour traverser cette membrane, les bêta-lactamines ont deux possibilités : passer à travers des canaux membranaires spécifiques (porines) ou diffuser à travers la bicouche phospho-lipidique. En fonction de leur degré d'hydrophobicité, les bêta-lactamines ont plus ou moins de facilité à diffuser à travers la membrane. Ainsi, certaines céphalosporines hydrophobes comme la céfazoline, le ceftazole ou la céphaloridine diffusent facilement à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif alors que des composés hydrophiles comme la pénicilline G ou la céfalotine diffusent très mal au travers de celle-ci (Sawai, Matsuba et al. 1979). En ce qui concerne le passage à travers les canaux protéiques de la membrane externe comme les porines, de nombreuses études ont montré que plusieurs classes d'antibiotiques comme les bêta-lactamines, les fluoroquinolones ou les phénicolés utilisaient préférentiellement ce système de transport passif pour atteindre leur cible au sein de la bactérie (Domenech-Sanchez, Martinez-Martinez et al. 2003) (Figure 8). Les bactéries à Gram négatif utilisent les porines pour s'approvisionner en nutriments et pour rejeter dans le milieu extracellulaire les déchets métaboliques. La diminution de l'expression de certaines porines, utilisées par les bêta-lactamines, au niveau de la membrane externe bactérienne, entraîne une diminution de l'accumulation de celles-ci au niveau du périplasme. Ceci peut entraîner des confusions en termes de diagnostic sur le phénotypage de la bactérie pathogène. En effet, une diminution de l'expression des porines OmpC et OmpF couplée à la sécrétion de la pénicillinase TEM-1 confère à *E.coli* le phénotype BLSE alors que celle-ci n'en sécrète aucune (Beceiro, Maharjan et al.). Longtemps considéré comme un mécanisme de résistance « secondaire », la diminution de la perméabilité de la membrane externe chez les bactéries pathogènes à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) est aujourd'hui de plus en plus considérée comme un mécanisme majeur, notamment dans l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes (Dahmen, Mansour et al. ; Fernandez Cuenca, Sanchez Mdel et al. ; Santella, Pollini et al. ; Chia, Siu et al. 2009), bêta-lactamines réservées à l'usage hospitalier et utilisées en dernière intention dans le cadre de traitement d'infections dues à des bactéries pathogènes multi-résistantes.

1.3.3. Pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des protéines membranaires permettant l'expulsion des antibiotiques hors de la bactérie par transport actif, ceci même contre le gradient de concentration de la substance. Ce mécanisme confère ainsi un phénotype de résistance en empêchant l'action des antibiotiques au niveau de leur cible. En fonction de leur structure et de leur mécanisme d'action, les pompes à efflux sont classées en cinq superfamilles, quatre d'entre elles (Resistance-Nodulation-Division (RND), Multidrug And Toxic Efflux (MATE), Small Multidrug Resistance (SMR) et Major Facilitator Superfamily (MFS) sont des transporteurs actifs secondaires, *i.e.* utilisant la force proton motrice ou tout autre forme de force « cation motrice » (notamment sodium) afin d'expulser les antibiotiques hors de la bactérie. La cinquième superfamille est la famille des ATP-Binding Cassette (ABC), transporteurs dits primaires car utilisant directement l'énergie résultant de l'hydrolyse de l'ATP afin d'expulser les antibiotiques (Poole 2005) (Figure 10). Les pompes à efflux de la super-famille RND sont spécifiques aux bactéries à Gram négatif. De par la capacité de ces pompes à efflux à pouvoir prendre en charge différents types de molécules toxiques pour les bactéries, celles-ci sont qualifiées de « Multi Drug Resistant » (MDR).

Les pompes à efflux ayant été mises en évidence comme étant impliquées dans l'acquisition d'un phénotype de résistance aux bêta-lactamines sont de manière générale les RND transporteurs chez les bactéries à Gram négatif avec notamment MexAB-OprM et MexXY-OprM (résistance à la céfépime) (Campo Esquisabel, Rodriguez et al. ; Poole 2004) chez *Pseudomonas aeruginosa* et AcrAB-TolC chez *Haemophilus influenza* et les transporteurs ABC chez les bactéries à Gram positif avec notamment LmrA (résistance à l'ampicilline) chez *Lactococcus lactis* (Kaczmarek, Gootz et al. 2004). La pompe AcrAB-TolC participe également au phénotype de résistance de certaines souches d'*E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques de la famille des glycylicyclines, des macrolides, des fluoroquinolones et des oxazolidinones, MexAB-OprM est impliquée dans la résistance de certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux fluoroquinolones, aux glycylicyclines et aux aminoglycosides et LmrA confère un phénotype de résistance à certaines souches de *Lactococcus lactis* contre les aminoglycosides et les fluoroquinolones (Poole 2005).

Chez certaines espèces pathogènes comme *E.coli* ou *Salmonella sp.*, l'expression des pompes à efflux peut être induite par différents facteurs de stress environnementaux tels que des changements de pH, de pression osmotique ou une limitation nutritionnelle (Nishino, Nikaido et al. 2009). Ces conditions hostiles pour les bactéries sont notamment retrouvées au niveau du site infectieux. Il a été montré chez *E.coli*, que l'expression des gènes codants pour la pompe AcrAB était plus importante en cas d'un stress nutritionnel au glucose ou d'un stress osmotique (Ma, Alberti et al. 1996; Rand, Danby et al. 2002).

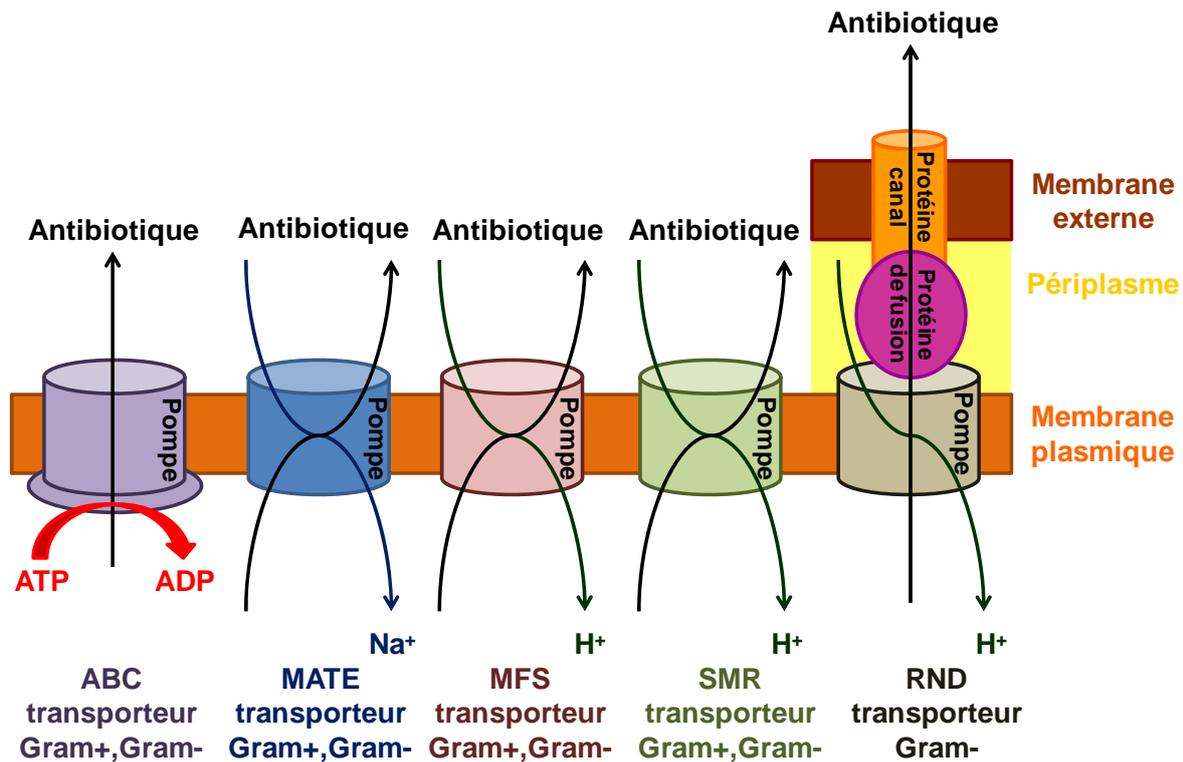


Figure 10 : Les différentes familles de pompes à efflux présentes chez les bactéries.

1.3.4. Modification des PLP

Au sein de leur génome, les bactéries possèdent plusieurs gènes codants pour différentes isoformes de PLP. Plusieurs de ces isoformes peuvent être exprimées en même temps au sein de la bactérie. Des mutations peuvent affecter l'un de ces gènes et conduire à une diminution de l'affinité des bêta-lactamines pour l'isoforme de PLP qu'il code. Lorsqu'une bactérie ayant subi une telle mutation est confrontée à des bêta-lactamines, l'isoforme possédant une faible affinité pour ces antibiotiques va assurer les fonctions biologiques des PLP inhibés par ces derniers. Les bactéries acquièrent ainsi un phénotype de résistance vis-à-vis de certaines bêta-lactamines. Ce mécanisme de résistance est prépondérant chez les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* (notamment pour les SARM), *Streptococcus pneumoniae* et les entérocoques (Zapun,

Contreras-Martel et al. 2008). Cependant ce mécanisme de résistance a également été mis en évidence chez certaines espèces à Gram négatif comme *Neisseria gonorrhoeae* (résistance à la pénicilline), *Haemophilus influenzae* (résistance à l'ampicilline) et *E.coli* sur des souches non productrices de bêta-lactamases (Spratt 1978; Dougherty 1986; Kaczmarek, Gootz et al. 2004). Récemment, il a été mis en évidence que certains phages pouvaient être porteurs de gènes codants pour des PLP modifiées et ainsi participer à la dissémination de ce mécanisme de résistance par transduction (Colomer-Lluch, Jofre et al. 2011).

1.4. Exposition de la flore commensale digestive aux antibiotiques

1.4.1. La flore commensale digestive : un écosystème complexe et de grande taille

Présente dans le tube digestif de la majorité des espèces métazoaires, la flore commensale digestive est essentielle à la vie des animaux en ayant un rôle crucial dans la digestion et l'assimilation des aliments, en assurant une fonction de barrière vis-à-vis des bactéries pathogènes circulant en permanence dans le tube digestif ainsi que dans l'initiation du système immunitaire (Atarashi, Umesaki et al. ; Guamer 2007). Chez les différentes espèces du règne animal, la flore commensale digestive présente divers niveaux de complexité. En effet, la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis* possède une flore digestive constituée de deux espèces bactériennes *Aeromonas veronii* et *Rikenella microfusis* (Graf, Kikuchi et al. 2006), le moustique *Anopheles gambiae*, vecteur du paludisme, possède 16 espèces bactériennes au sein de sa flore digestive (Lindh, Terenius et al. 2005) alors que chez les mammifères et notamment l'Homme on estime que 1000 à 1500 espèces bactériennes colonisent le tube digestif (Qin, Li et al. 2010). Il semble cependant y avoir une corrélation entre complexité de la flore et variété du régime alimentaire.

Chez les mammifères, bien que la majorité des micro-organismes présents appartiennent au phylum bactérien (99% chez l'Homme), aux archées (0.8% chez l'Homme), aux eucaryotes unicellulaires (mycètes et protozoaires) et aux virus sont également naturellement présents au sein de la flore commensale digestive (Qin, Li et al. 2010). Il a notamment été mis en évidence chez l'Homme et la souris qu'une diminution de la présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au sein de la flore commensale était corrélée avec un syndrome inflammatoire et notamment avec la maladie de Crohn (Iliev, Funari et al. ; Joossens, Reinisch et al. 2002). A l'heure actuelle, plus de 10 espèces de mycètes ont été mis en évidence dans la flore commensale de souris (Scupham, Presley et al. 2006). Chez l'Homme trois espèces archéennes du genre *Methanobrevibacter* ont été mis en évidence au sein de la flore digestive (Dridi, Raoult et al.).

En plus d'une grande diversité, la flore commensale digestive se distingue également par sa taille. En effet, chez l'Homme, on estime à 10^{14} le nombre total de bactéries colonisant le tube digestif dont la majorité (entre 10^{11} et 10^{12} bactéries) sont localisées au niveau du colon (Ley, Peterson et al. 2006). Il est estimé que le nombre total de bactéries présentes au niveau des différentes flores (la principale étant la flore digestive) est 10 fois supérieur au nombre de cellules eucaryotes formant un être humain.

La flore commensale digestive cohabite avec des effecteurs du système immunitaire de son hôte comme les immunoglobulines de type A (IgA). Cette classe d'anticorps est celle

majoritairement sécrétée par les plasmocytes (environ 75% du nombre total d'immunoglobuline) et son rôle est de tapisser les diverses muqueuses de l'organisme afin de les protéger des agressions des micro-organismes pathogènes. Chez les mammifères, il est estimé qu'en plus de leur rôle de protection contre les pathogènes (toxines bactériennes, virus), les IgA colonisant la muqueuse intestinale auraient un rôle central dans l'acquisition de la flore commensale digestive au moment du sevrage (Geuking, McCoy et al.). Chez l'Homme, la quantité journalière d'IgA sécrétée dans les fèces est estimée à environ 3 grammes (Geuking, McCoy et al.), ce qui témoigne de l'importance de ces protéines dans le maintien de l'intégrité de la relation de symbiose entre la flore commensale et l'hôte. La flore du tube digestif établit des relations multiples avec l'hôte, créant un équilibre dynamique dont la stabilité est maintenue par des interactions partiellement connues. De part sa complexité structurale, et son rôle physiologique majeur pour l'organisme entier, le microbiote intestinal peut être considéré comme un organe à part entière (Baquero and Nombela 2012).

En plus de la flore résidente, il peut exister une flore transitoire, qui ne s'implante pas dans le tube digestif, sauf dans des circonstances pathologiques ou lors d'une antibiothérapie. En effet, la flore digestive agit comme une barrière en s'opposant à l'implantation et à la multiplication des micro-organismes d'origine exogène (Vollaard and Clasener 1994). Cet effet de barrière prévient aussi la colonisation du tube digestif par des micro-organismes déjà présent tels que les levures ou *Clostridium difficile*, potentiellement pathogènes pour l'hôte. Cette résistance à la colonisation est principalement assurée par la flore anaérobie, par des facteurs anatomiques et physiologiques (péristaltisme, sécrétion de salive, acidité gastrique...) et par le système immunitaire (sécrétion d'IgA au niveau des muqueuses ...).

1.4.2. Composition de la flore commensale digestive du porc

Chez le porc, comme chez la plupart des mammifères, il existe un gradient croissant de la charge bactérienne dans le sens aboral du tube digestif. En effet, l'estomac, le duodénum et l'intestin grêle proximal contiennent peu de bactéries (10^5 - 10^7 UFC/mL), la majorité étant des lactobacilles et des streptocoques (Kararli 1995). A partir de l'intestin grêle distal et jusqu'au colon, la densité microbienne s'intensifie jusqu'à atteindre 10^9 - 10^{11} UFC/mL. Le colon abrite une majorité de bactéries anaérobies strictes, composées de nombreux genres bactériens dont les majoritaires sont : *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* et *Bacteroides*. L'ensemble de ces bactéries compose la flore dominante. La flore sous-dominante regroupe des espèces bactériennes anaérobies strictes mais aussi des espèces aérobie-anaérobie facultatives : les entérobactéries et les

entérocoques. Chez le porc, les souches d'*E. coli* représentent environ 2% des bactéries fécales (Moore, Moore et al. 1987).

1.4.3. Emergence de bactéries dans la flore digestive chez l'animal et conséquences en termes de santé publique

Au cours d'une antibiothérapie, une fraction de la dose d'antibiotique présente dans la circulation sanguine peut être excrétée sous forme inchangée (active) par voie biliaire ou sécrétée par la muqueuse intestinale et ainsi entrer en contact avec la flore microbienne et (Figure 1). De plus, dans le cadre d'une antibiothérapie par voie orale, la fraction de la dose non absorbée au niveau intestinal peut également agir sur le microbiote. Les quantités d'antibiotiques alors en contact avec l'écosystème microbien peuvent altérer son équilibre. Les effets observés peuvent être (Edlund and Nord 2000):

- l'élimination des bactéries sensibles à l'antibiotique,
- la sélection et la prolifération de bactéries résistantes au sein de la flore endogène.

L'antibiothérapie modifie donc la stabilité de l'écosystème microbien intestinal et altère la composition de la flore barrière. Plusieurs facteurs interviennent sur l'intensité des modifications de l'écosystème intestinal au cours d'un traitement antibiotique, notamment la concentration active qui atteint la lumière intestinale, la puissance et l'efficacité de l'antibiotique sur les bactéries composant la flore résidante, la fixation de l'antibiotique à des composants du bol alimentaire (protéines, cellulose) et son inactivation éventuelle dans le contenu intestinal (Sullivan, Edlund et al. 2001).

Plusieurs études chez l'espèce porcine ont montré que l'administration d'antibiotique augmentait la prévalence de la résistance au sein des bactéries de la flore commensale (Gellin, Langlois et al. 1989; Mathew, Saxton et al. 1999; Delsol, Anjum et al. 2003; Akwar, Poppe et al. 2008; Nguyen, Chachaty et al. 2012).

1.4.3.1. Emergence de micro-organismes pathogènes pour l'hôte au sein de sa flore digestive

La disparition de l'effet de barrière peut entraîner l'émergence de bactéries pathogènes. Par exemple, chez l'homme, les colites pseudomembraneuses liées au développement de souches de *Clostridium difficile* productrices de toxines et de levures saprophytes telles que *Candida albicans* sont l'illustration de l'effet des antibiotiques sur la flore intestinale (Sullivan, Edlund et al. 2001). La prise d'antibiotique est également un facteur de risque développer une infection à salmonelles (Sullivan, Edlund et al. 2001).

En médecine vétérinaire, l'administration d'ampicilline aux rongeurs et aux lagomorphes entraîne une perturbation de leur écosystème digestif pouvant conduire à des colites (émergence de *Clostridium difficile* chez les rongeurs et de *Clostridium spiroforme* chez les lagomorphes) (Prescott 2006).

1.4.3.2. Emergence de bactéries zoonotiques résistantes au sein de la flore digestive des animaux et conséquences en termes de santé publique

Chez l'animal, le traitement antibiotique peut permettre l'émergence ou la sélection de bactéries zoonotiques résistantes dans le tube digestif des animaux. Ces bactéries peuvent être transmises à l'Homme par l'alimentation, et être responsable de toxi-infections dites « alimentaires » (Kennedy 2008; Wang, McEntire et al. 2012), mais aussi par contact direct avec les animaux. Les bactéries du genre *Campylobacter* et *Salmonella* sont les principales bactéries zoonotiques responsables de toxi-infections alimentaires, la viande de porc étant une des sources de contamination pour l'Homme. L'acquisition de mécanismes de résistance par les bactéries zoonotiques peut avoir plusieurs conséquences (Molbak 2005). En effet, les diarrhées bactériennes zoonotiques de gravité faible ou modérée ne sont habituellement pas traitées par antibiothérapie. Cependant, les patients âgés, bactériémiques ou les malades à risque de complication reçoivent un traitement. L'acquisition d'un phénotype de résistance par les bactéries responsables de l'infection peut conduire à un échec thérapeutique. De plus, les bactéries zoonotiques résistantes seraient à l'origine d'infections plus invasives et d'une augmentation de la mortalité des patients. Enfin, des bactéries zoonotiques résistantes contaminant un individu soumis préalablement à une antibiothérapie auraient un avantage sélectif pour coloniser le tube digestif de cet individu. En termes de santé publique, un premier enjeu de l'utilisation prudente et raisonnée des antibiotiques en médecine vétérinaire est donc d'empêcher ou de limiter leur impact sur l'émergence et la sélection de bactéries zoonotiques résistantes présentes au niveau du tube digestif des animaux (EFSA 2008).

1.4.3.3. Emergence de bactéries commensales résistantes au sein de la flore digestive des animaux et conséquences en termes de santé publique

Les antibiothérapies peuvent également causer l'émergence ou la sélection de bactéries résistantes au sein du microbiote intestinal qui ne sont pathogènes ni pour

l'Homme ni pour les animaux. Dans ce contexte, le danger réside dans la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques au sein de la flore commensale car les gènes de résistance portés par une bactérie peuvent être transférés directement à sa descendance (transfert vertical) mais également à d'autres genres bactériens présents au sein de son biotope par des phénomènes de conjugaisons bactériennes (transfert horizontal) (Vedantam and Hecht 2003). Le tube digestif des animaux traités peut alors devenir un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Les bactéries commensales porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être transmises à l'homme par les mêmes voies que les bactéries zoonotiques et peuvent également coloniser l'environnement lorsqu'elles sont excrétées dans les fèces. Ces bactéries commensales d'origine animale peuvent coloniser, de façon transitoire ou permanente, le tube digestif de l'Homme et transférer leurs gènes de résistance aux bactéries commensales humaines. L'écosystème intestinal humain se trouverait donc enrichi de déterminants génétiques de résistance d'origine animale, potentiellement transmissibles horizontalement à des bactéries pathogènes (Salysers, Gupta et al. 2004) De même, les bactéries de la flore commensale d'origine animale ayant acquis des mécanismes de résistance et se retrouvant dans l'environnement peuvent potentiellement échanger leur mécanismes de résistance avec des bactéries pathogènes humaines rencontrées dans leur nouveau biotope. Il n'existe donc pas d'étanchéité en termes de flux de gènes de résistance entre les populations bactériennes d'origine humaine et animale. De plus, ces populations bactériennes peuvent être génétiquement très proches. En effet, plusieurs études ont montré que des personnes travaillant au contact des animaux partageaient plusieurs souches bactériennes au sein de leurs flores digestives et nasales (Ateba and Bezuidenhout 2008; Rwego, Gillespie et al. 2008; Thorsteinsdottir, Haraldsson et al. 2010; Unno, Han et al. 2010; Sparo, Urbizu et al. 2012; Frana, Beahm et al. 2013). Un deuxième enjeu en termes de santé publique de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire est donc de limiter voire d'empêcher l'excrétion par les animaux de bactéries résistantes dans l'environnement car ces bactéries peuvent potentiellement transmettre leurs gènes de résistance à des bactéries de la flore commensale humaine mais également aux bactéries pathogènes de l'Homme.

1.4.3.4. Quantification du niveau de résistance au sein de la flore commensale des animaux de rente

La quantification de la résistance au sein de la flore commensale des animaux de rente permet de documenter l'impact de l'administration d'antibiotiques sur la sélection et l'amplification des résistances dans la flore digestive. A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode de référence validée permettant de déterminer le niveau de résistance des flores

digestives (Davison, Low et al. 2000). Il existe cependant plusieurs méthodes de quantification. La mesure de la résistance à un antibiotique au sein de la flore commensale peut être réalisée grâce à la caractérisation des profils de résistance de bactéries indicatrices telles que *E. coli* et *Enterococcus faecium*, classiquement utilisées car facilement cultivables mais également de par leur importance en pathologie vétérinaire et humaine. La détermination du pourcentage de souches d'*E.coli* résistantes est couramment utilisée chez le porc pour mesurer le niveau de résistance de la flore commensale (Sorum and Sunde 2001). Une autre méthode consiste à calculer le rapport entre le dénombrement de bactéries poussant sur milieu supplémenté en antibiotique (à une concentration qui inhibe les bactéries sensibles), et le dénombrement total de bactéries cultivables. Cet indicateur a notamment été appliqué chez le porc en utilisant les entérobactéries (généralement *E.coli*) comme souches indicatrices (Belloc, Lam et al. 2005; Dewulf, Catry et al. 2007). Une étude épidémiologique utilisant des souches fécales d'*E.coli* isolées de porcs provenant de dix fermes avec un profil différent de pratiques en antibiothérapie, a montré des pourcentages de bactéries résistantes plus importants dans les fermes où l'utilisation des antibiotiques était considérée comme élevée (Sunde, Fossum et al. 1998). Une étude ultérieure de la même équipe a mis en évidence que le tube digestif de ces porcs pouvait être considéré comme un réservoir de gènes de résistance, étant donné que les séquences d'ADN codant pour les différents mécanismes de résistance étaient localisées sur des éléments génétiques mobiles facilement transmissibles à d'autres bactéries par transfert horizontal (Sunde and Sorum 1999).

Avec l'émergence de la biologie moléculaire, la quantification de gènes de résistance au sein de la flore commensale digestive totale est devenue possible notamment par la technique de PCR quantitative en temps réel. Par exemple, chez le chien, la quantification des gènes *bla_{TEM}* dans les fèces par PCR quantitative en temps réel a permis d'évaluer l'impact d'une nouvelle stratégie de traitement destinée à limiter les effets de l'ampicilline sur l'écosystème digestif (Harmoinen, Mentula et al. 2004). Une étude chez le porc menée au sein de notre laboratoire et ayant pour but l'évaluation de différents schémas posologiques d'ampicilline sur l'émergence de résistance au sein des entérobactéries fécales, a montré que la quantification des gènes de résistance *bla_{TEM}* était un indicateur de résistance bien plus sensible que la quantification de résistance par dénombrement des bactéries sur milieux sélectifs. En effet, la quantification de *bla_{TEM}* a permis de montrer qu'un traitement à l'ampicilline administré par voie intramusculaire faisait émerger moins de résistance au sein des entérobactéries de la flore commensale du porc qu'un même traitement administré par voie orale alors que la quantification microbiologique ne permettait pas cette discrimination (Bibbal, Dupouy et al. 2007). Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire a également permis d'améliorer l'obtention des données dans les études

épidémiologiques et dans la comparaison de souches bactériennes. Ces méthodes ont rendu possible le suivi de la diffusion d'un clone résistant au sein d'une population bactérienne donnée et également de mettre en évidence des transferts horizontaux de gènes (Aarts, Boumedine et al. 2001).

1.4.3.5. Les autres facteurs influençant le niveau de résistance des bactéries de la flore digestive

Malgré l'absence totale d'utilisation d'antibiotiques chez certaines personnes au cours de leur vie, des entérobactéries résistantes ont été retrouvées dans le tube digestif de certains hommes ainsi que dans l'environnement (Salyers and Amabile-Cuevas 1997; Boerlin, Wissing et al. 2001). Des études semblables réalisées sur des fèces d'animaux sauvages, qui *a priori* n'ont jamais été traités avec des antibiotiques, ont montré la présence de gènes codant pour des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV (Costa, Poeta et al. 2006). De plus, il a été mis en évidence, chez le porc, que l'arrêt de l'utilisation d'antibiotiques n'entraînait pas la disparition des souches résistantes du tube digestif (Langlois, Dawson et al. 1988; Bunner, Norby et al. 2007). Ces exemples montrent que dans l'environnement, des facteurs autres que les antibiotiques contribuent à la distribution et au maintien des gènes codants pour les mécanismes de résistance au sein la flore digestive des animaux (Summers 2002; Andersson 2003; Andersson and Hughes 2011).

L'antibiothérapie n'est donc pas le seul facteur contribuant à l'émergence et au maintien de bactéries résistantes au niveau du microbiote intestinal. Chez l'espèce porcine, plusieurs études ont étudié l'impact de différents facteurs sur le niveau de résistance de la flore digestive. Des études ont ainsi montré que des stress thermiques froids ou chauds, conduisaient à une excrétion plus importante de bactéries résistantes dans la flore fécale (Moro, Beran et al. 1998; Moro, Beran et al. 2000). Une étude a également montré que le stress provoqué par un transport de longue durée ainsi qu'une longue période d'attente avant l'abattage conduisait à une augmentation du nombre de bactéries résistantes excrétées dans les fèces (Molitoris, Fagerberg et al. 1987).

Les conditions d'hébergement, d'hygiène et l'âge des animaux pourraient aussi influencer le développement et le maintien de bactéries résistantes au sein la flore commensale digestive du porc (Langlois, Dawson et al. 1988; Dewulf, Catry et al. 2007). Ces études montrent donc que l'antibiothérapie n'est donc pas le seul facteur influençant le maintien des mécanismes de résistance au sein des bactéries et qu'il est nécessaire de prendre en compte des facteurs tels que le stress subi par les animaux ou les conditions d'hébergement dans la résolution du problème. Cependant, l'utilisation des antibiotiques

demeure tout de même le facteur prépondérant dans l'émergence et le maintien de bactéries résistantes au sein des flores commensales humaines et animales.

1.4.4. Impact de l'utilisation des bêta-lactamines sur la flore commensale

1.4.4.1. Caractérisation de gènes codants pour la résistance aux bêta-lactamines au sein de la flore commensale des animaux

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.1.2. (Consommation d'antibiotiques en élevage porcin), les filières des animaux de rente sont les plus grandes consommatrices d'antibiotiques en médecine vétérinaire (plus de 90%). De ce fait, de nombreuses études ont montré la présence de bactéries résistantes au sein de la flore commensale digestive chez ces animaux. De part l'absence d'étanchéité entre les différentes populations bactériennes présentes dans l'environnement, les bactéries de la flore commensale des animaux possèdent les mêmes gènes de résistance aux bêta-lactamines que toutes les autres populations bactériennes. Ainsi, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence au sein de la flore commensale digestive des animaux de nombreux gènes de résistance aux bêta-lactamines isolés chez des pathogènes humains et animaux mais également provenant d'autres niches écologiques. Certaines études ont permis de mettre en évidence chez des *E.coli* fécales d'origine animale, la présence de gènes de résistance codant pour des bêta-lactamases de type CTX-M (CTX-M-1/14/17/24/27/55/105) (Gellin, Langlois et al. 1989; Liebana, Batchelor et al. 2006; Ma, Liu et al. 2012; Tian, Wang et al. 2012), TEM (TEM-35/52 et IRT-4) (Liebana, Batchelor et al. 2006; Bielak, Bergenholtz et al. 2011; Endimiani, Rossano et al. 2012), CMY (CMY-2/4) (Zhao, White et al. 2001; Donaldson, Straley et al. 2006; Endimiani, Rossano et al. 2012; Gregova, Kmetova et al. 2012), SHV (SHV-2/5/12/57/97)(Ma, Liu et al. 2012; Tian, Wang et al. 2012), DHA (DHA-1) (Ma, Liu et al. 2012), KPC (Tian, Wang et al. 2012).

1.4.4.2. Impact d'une antibiothérapie aux bêta-lactamines sur la flore commensale de porc

Une étude a montré que l'administration d'ampicilline par voie orale à des porcs, fait diminuer le nombre de colibacilles au sein de la flore commensale des animaux au bout de huit heures avant de retrouver son niveau initial au bout de vingt-quatre heures. Cependant, vingt-quatre heures après l'administration, la majorité de la population est devenue résistante

à l'ampicilline. L'étude a également montré que l'ampicilline était inactivée au niveau du caecum, certainement par des bactéries porteuses de plasmides codant pour une bêta-lactamase hydrolysant l'ampicilline (Escoula, Coste et al. 1982). Cette hypothèse a été confirmée par les mêmes auteurs au cours d'une étude chez l'agneau (Coste, Gouet et al. 1984). Une étude récente de notre équipe chez le porc a montré qu'un traitement à l'ampicilline faisait fortement émerger le nombre de bactéries résistantes à l'ampicilline au sein de la flore d'*E.coli* fécale. En effet, avant le traitement antibiotique, le taux d'*E.coli* fécales résistantes à l'ampicilline était de 6% alors que quatre et sept jours après traitement, le taux de résistance était de 90% (Bibbal, Dupouy et al. 2009).

Concernant l'utilisation des céphalosporines, une étude récente réalisée chez le porc a montré qu'un traitement avec des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations (ceftiofur et cefquinome) faisait émerger et persister pendant plus de 25 jours de fortes proportions d'entérobactéries fécales présentant un phénotype de BLSE. En revanche, un traitement à l'amoxicilline sélectionnait beaucoup moins d'entérobactéries fécales porteuses de BLSE (Cavaco, Abatih et al. 2008).

1.4.4.3. Impact d'une antibiothérapie aux bêta-lactamines sur la flore commensale humaine

L'absence d'étanchéité entre les différentes populations bactériennes présentes dans l'environnement, le fait que la flore digestive humaine soit potentiellement un réservoir de gènes de résistance et le risque potentiel de transmission de ces gènes de résistance à des bactéries pathogènes pour l'Homme ou les animaux, justifient l'intérêt de documenter l'impact des bêta-lactamines sur le microbiote intestinal humain. Une synthèse de toutes les études réalisées sur l'impact de l'administration des bêta-lactamines sur la microflore du tube digestif de l'homme a été effectuée en 2001 (Sullivan, Edlund et al. 2001).

Celle-ci montre que l'administration d'ampicilline ou d'amoxicilline chez l'homme entraîne une importante croissance d'entérobactéries fécales résistantes. Une étude longitudinale réalisée en Allemagne sur des patients ayant subi des antibiothérapies à l'amoxicilline et à l'ampicilline a confirmé ces résultats (Raum, Lietzau et al. 2008). Cependant, les effets sur la flore digestive aérobie à Gram positif (cocci) et sur les bactéries anaérobies sont modérés. Aucune étude n'a mis en évidence l'émergence de résistance au sein des populations d'entérocoques et chez les *Bacteroides* commensales du tube digestif. En revanche, chez certains patients, une colonisation par des bactéries ou des levures potentiellement pathogènes comme *Clostridium difficile* ou *Candida* a pu être mise en évidence (rupture de l'effet barrière).

En ce qui concerne l'administration de céphalosporines par voie orale ou parentérale, une diminution importante du nombre d'entérobactéries, une augmentation du nombre des bactéries aérobies à Gram positif (cocci) ainsi qu'un effet modéré sur les bactéries anaérobies sont observés. L'émergence de résistance est absente au sein des entérocoques, des entérobactéries et des *Bacteroides*. Cependant, comme dans le cadre de l'utilisation des amino-pénicillines, le tube digestif des sujets traités est plus fréquemment colonisé par *Clostridium difficile*. Lors de l'administration de céphalosporines, il a été mis en évidence qu'une forte production de céphalosporinases au sein de la flore digestive était en corrélation avec une diminution des concentrations en céphalosporines retrouvées dans les fèces des patients (Leonard, Andremont et al. 1989; Edlund, Stark et al. 1994). Une étude a posé l'hypothèse que les bêta-lactamases produites par les bactéries de la flore commensale digestive dégradent les céphalosporines sécrétées dans le tube digestif. Ainsi, l'administration de céphalosporines chez les sujets dont la flore produisait des bêta-lactamases hydrolysant les céphalosporines n'avait quasiment pas d'incidence sur la composition de la flore (Chachaty, Bourneix et al. 1993).

Les résultats des différentes études effectuées chez l'Homme montrent donc l'implication de différents phénomènes complexes dont l'étude sur sujet humain paraît impossible. Pour remédier à ce problème, des chercheurs ont mis au point différents modèles animaux, plus ou moins complexes, permettant d'étudier ces phénomènes.

1.5. Les modèles d'étude de la flore commensale digestive

1.5.1. Paramètres d'intérêt dans les études de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal

Comme nous l'avons vu précédemment, le paramètre le plus utilisé dans ce type d'études est le dénombrement et le suivi dans le temps des populations bactériennes totales et résistantes aux antibiotiques afin de déterminer le taux de résistance au sein de la flore digestive (Donaldson, Straley et al. 2006; Cavaco, Abatih et al. 2008; Bibbal, Dupouy et al. 2009; Gregova, Kmetova et al. 2012). L'évolution de cet indicateur est étudiée sur des souches bactériennes indicatrices de la flore avant, pendant et après l'arrêt du traitement antibiotique. La recherche et le suivi de certains gènes de résistance au sein de la flore est également beaucoup utilisée (Liebana, Batchelor et al. 2006; Endimiani, Rossano et al. 2012). Un suivi des CMI des différentes populations peut également être effectué afin de déterminer l'émergence des résistances au sein de la flore (Kimura, Yamagishi et al. 2010).

Le suivi du nombre total de bactéries des différentes populations bactériennes formant le microbiote intestinal peut également être réalisé par séquençage de masse afin de déterminer l'impact écologique d'un traitement antibiotique sur la flore digestive en termes de dynamique des différentes populations bactériennes qui la composent (Perrin-Guyomard, Poul et al. 2006).

Un autre paramètre utilisé est le suivi de l'implantation d'un pathogène bactérien au sein de la flore digestive consécutivement à un traitement antibiotique. En effet, nous avons vu qu'une perturbation de l'équilibre de la flore du tube digestif peut entraîner la croissance d'une population pathogène endogène maintenue à un niveau très faible, ou la colonisation du tube digestif par un pathogène exogène ingéré. Ces perturbations peuvent être mesurées par des études de « challenge » qui consistent à administrer par voie orale aux animaux, traités, une bactérie exogène et à rechercher ensuite si elle s'implante dans le tube digestif des animaux ou si elle est éliminée (Hentges, Stein et al. 1985). Ces tests peuvent également être réalisés *in vitro* (Payne, Gibson et al. 2003).

1.5.2. Les modèles *in vitro*

Lors de la réalisation d'études *in vitro*, différents modèles peuvent être utilisés : des modèles statiques et des systèmes de culture en fermenteur semi-continu ou continu.

Les modèles statiques consistent à incuber dans du milieu de culture une suspension de fèces soumise à une atmosphère anaérobie afin de conserver toutes les espèces bactériennes. Ces modèles, très simples, ne permettent cependant que des études de très

courtes durées (une heure ou deux) étant donné les changements très rapides subis par le milieu de culture (pH, potentiel réducteur/oxydant ...), la complexité de la flore incubée et le non-renouvellement du milieu.

En revanche, les systèmes de culture semi-continus et continus assurent le renouvellement du milieu de culture et permettent ainsi des études beaucoup plus longues. Le système de culture semi-continu est constitué d'un compartiment en anaérobiose stricte renfermant un milieu de culture (permettant soit la culture de flore totale ou la culture d'espèces particulières). Le pH et la température du milieu sont contrôlés en permanence et ce dernier est renouvelé de manière régulière mais intermittente. Ce système a été mis au point pour l'étude de la flore du colon humain (Miller and Wolin 1981). Les systèmes de culture continus ne diffèrent des systèmes semi-continus qu'au niveau du taux de renouvellement du milieu de culture, qui dans le cas d'un système continu, est renouvelé en permanence afin de reproduire le flux intestinal. Ce flux continu permet de maintenir une population bactérienne à peu près stable, sous l'hypothèse que le maintien de la population bactérienne dépend uniquement de la différence entre le taux de croissance et le taux d'élimination du système. Ce système a d'abord été développé dans les années 60 afin d'étudier les populations bactériennes ruminales (Slyter, Nelson et al. 1964). Ce système a ensuite été transposé pour étudier la microflore digestive du rat (Veilleux and Rowland 1981), puis la flore colonique humaine (Edwards, Duerden et al. 1985).

Cependant, comme tout modèle, l'utilisation de ces techniques présente des limites. La principale limite est l'absence d'intégration dans un système physiologique. Le milieu de culture utilisé ne reproduit pas la diversité des nutriments présents au sein du tube digestif, notamment en termes de sécrétions des entérocytes (mucines) (Rumney and Rowland 1992). De plus, les bactéries incubées dans le milieu de culture sont en suspension, donc non-associées à la muqueuse (par fixation sur le glycocalyx des entérocytes) ou aux sécrétions intestinales, ce qui peut avoir un impact sur leur statut physiologique. Ceci peut entraîner une plus forte exposition et une plus forte sensibilité des bactéries à l'antibiotique, d'autant plus que l'antibiotique ne peut pas se fixer à la matière fécale dans le modèle *in vitro* (Hazenbergh, Pennock-Schroder et al. 1986; Edlund, Lindqvist et al. 1988). Enfin, ces modèles ne prennent pas en compte des facteurs tels que le système immunitaire intestinal (sécrétion d'IgA, de peptides antimicrobiens (défensines)...), l'absorption de certains métabolites bactériens et la teneur en eau.

Malgré toutes ces limites, les modèles de culture à flux continu représentent une alternative intéressante pour prédire une partie des relations entre la microbiote intestinal et le tube digestif (Freter, Stauffer et al. 1983). Leurs principaux avantages pour l'étude de l'impact d'un traitement antibiotique sur la flore digestive sont le suivi en temps réel de la composition de la flore, de la quantité d'antibiotique présente dans le milieu ainsi que de la

sensibilité des différentes populations bactériennes à cet antibiotique. De plus, ils permettent de réaliser des études utilisant des substances toxiques ou radioactives, ce qui est généralement beaucoup plus compliqué lors d'études *in vivo*. Le dernier avantage est la maîtrise d'un certain nombre de paramètres comme le pH, la disponibilité et la concentration des nutriments et la vitesse du flux qui n'est pas possible avec l'utilisation de modèles *in vivo*.

1.5.3. Les modèles animaux à flore contrôlée ou gnotobiotique

En 1912, les travaux de Cohendy furent les premiers à montrer que la vie sans micro-organismes était possible. Pour cela, il confina en milieu stérile absolu (hébergement+nourriture) des cochons d'inde et des souris nés par césarienne sous condition stérile (Cohendy 1912). Ces animaux sont qualifiés d'axéniques (du grec *xénos* = étranger et "a" privatif) car confrontés à aucune flore. Cependant ce n'est qu'à partir de 1928 que la mise au point de lignées d'animaux axéniques a commencé, permettant l'étude de la flore commensale sur ce type de modèle animal.

Les lignées d'animaux axéniques sont généralement des rongeurs. Après naissance par césarienne, ils sont maintenus dans des isolateurs en conditions stériles totales (Figure 11). L'obtention de porcelets et de poussins axéniques est également possible.

Le tube digestif des animaux axéniques peut être colonisé par une (monoxénique), deux (dixénique) ou plusieurs espèces bactériennes, les animaux étant alors qualifiés de gnotobiotiques (du grec *gnotos* = connu et *bio* = la vie). Les animaux gnotobiotiques possèdent une flore caractérisée et contrôlée permettant une meilleure maîtrise des paramètres étudiés.

L'implantation chez les animaux axéniques de flores digestives complètes provenant d'autres espèces animales ou de l'Homme est également possible. Lorsque l'implantation d'une flore digestive humaine est réalisée, les animaux sont qualifiés d'HFA pour « Human Flora Associated » (Perrin-Guyomard, Poul et al. 2006), mais il est également possible d'implanter une flore digestive d'origine porcine, les animaux sont alors appelés PFA (Pig Flora Associated) (Hirayama 1999), ou encore une flore de poulet (Hirayama 1999).

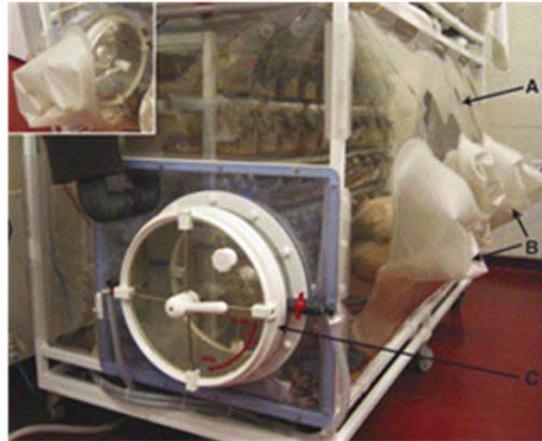


Figure 11 : Isolateurs souples pour l'élevage d'animaux axéniques.

L'intérieur de l'isolateur est ventilé sous pression positive avec un filtre à air HEPA (*High Efficiency Particulate Air Filter*) (A), les animaux sont manipulés à l'intérieur de l'isolateur à l'aide de gants (B). Une double porte latérale (C) formant un sas permet de faire entrer des éléments stériles (eau, nourriture, instrument, ...) dans l'isolateur. D'après (Smith, McCoy et al. 2007).

Les animaux axéniques présentent des variations anatomiques, physiologiques et biochimiques par rapport aux animaux conventionnels porteurs d'une flore « naturelle ». Les principales différences observées sont des modifications physiologiques profondes au niveau intestinal (peu ou pas de villosités, organisation tissulaire différente...), une diminution de la masse et du flux sanguin de l'intestin, une altération du système immunitaire (diminution de la sécrétion d'IgA et de la numération en lymphocyte T CD4 et CD8 α/β notamment), une modification de l'expression des gènes régulant le fonctionnement de la muqueuse intestinale (absorption et sécrétion notamment) ainsi que des gènes de régulation du métabolisme (Smith, McCoy et al. 2007). Toutes ces modifications pourraient entraîner des variations des paramètres pharmacocinétiques des substances administrées aux animaux axéniques.

En ce qui concerne les limites des modèles gnotobiotiques, le fait que ces animaux n'hébergent que peu de souches bactériennes au sein de leur flore digestive, peut avoir un impact sur la flore implantée, notamment en termes de fitness de ces souches (diminution du temps de génération) (Rang, Licht et al. 1999).

Bien que ces modèles présentent certaines limites, les animaux gnotobiotiques restent d'excellents modèles d'étude. En effet, ils permettent d'étudier une flore digestive plus ou moins complexe, animale ou humaine sans les contraintes de variabilités provoquées par l'environnement et l'alimentation (contaminations microbiologiques, diversité de l'apport en nutriments, présence de résidus d'antibiotiques). Plusieurs études ont montré que la flore implantée dans le tube digestif des animaux restait comparable à la flore administrée et que les conditions écologiques intestinales des animaux modèles restaient

proches de celles des espèces cibles (Hazenberg, Bakker et al. 1981; Mallett, Bearne et al. 1987; Corpet 1993).

1.5.4. Les études chez les espèces cibles et les modèles animaux à flore totale

L'étude de l'impact des antibiotiques sur la flore commensale intestinale peut être réalisée sur la flore d'animaux conventionnels sains (Sunde and Sorum 1999; Høyen, Pultz et al. 2003; Belloc, Lam et al. 2005; Cavaco, Abatih et al. 2008) ou infectés (Goessens, Mouton et al. 2007; Kesteman, Perrin-Guyomard et al. 2010).

Par rapport aux études cliniques chez l'Homme, les études sur les animaux conventionnels peuvent être réalisées dans un environnement contrôlé, permettant de limiter les variations inter et intra-individuelles de la flore digestive. De plus, elles permettent l'utilisation d'animaux possédant un statut physiopathologique défini (lignée d'animaux diabétiques par exemple).

Cependant, lors de l'utilisation de tout modèle animal (comme les rongeurs), il est important de noter que la flore digestive de ces derniers est différente de celle de l'Homme ou de l'espèce cible de l'antibiotique. Les résultats obtenus doivent donc être interprétés avec précaution.

1.5.5. Les études cliniques chez l'Homme

Comme dans le cadre des études sur espèces cibles et modèles animaux à flore totale, ces études permettent d'obtenir des résultats dits de « terrain » dans l'évaluation de l'impact des antibiotiques sur la flore commensale intestinale humaine. Elles peuvent être effectuées sur des volontaires sains (Finegold, Ingram-Drake et al. 1987; Nord, Rasmanis et al. 2006) ou sur des patients malades (Carratala, Fernandez-Sevilla et al. 1996; Gupta, Hooton et al. 2005). L'avantage principal de ces études est d'obtenir des résultats sur la population cible, notamment pour les études réalisées sur des patients malades.

Cependant ces études présentent également des inconvénients, le principal étant la présence d'une grande variabilité interindividuelle de la flore digestive au sein de la population mais également intra- et inter-jour chez un même individu rendant certains résultats difficilement interprétables. La nécessité de réaliser ce type d'expérimentation sur une cohorte assez importante et sur un intervalle de temps assez long, afin de pouvoir interpréter les résultats, rend ces études très rares car trop lourdes à mettre en place. Le

deuxième inconvénient de ces études est la difficulté du contrôle de l'environnement, lié notamment au risque de contamination des individus par l'alimentation (contamination microbiologique ou en présence de résidus antibiotiques) ou entre individus (contamination croisée) (Rumney and Rowland 1992).

1.6. Objectifs de la thèse et méthodologie générale

Parmi les données présentées dans la synthèse bibliographique, les trois éléments suivants peuvent être rapprochés, car ils ont contribué à la construction des objectifs de ce travail de thèse.

1) Les enjeux de santé humaine portés par l'antibiothérapie des animaux de rente sont très majoritairement liés à la pression de sélection exercée par les antibiotiques sur la flore digestive des animaux traités.

2) La taille de l'inoculum bactérien responsable d'une infection est un facteur déterminant de l'activité d'un certain nombre d'antibiotiques. L'observation de ce phénomène n'a pas eu jusqu'à présent de traduction en termes de schémas posologiques.

3) L'usage métaphylactique des antibiotiques en élevage correspond à une situation au cours de laquelle une proportion des animaux traités se trouve à un stade précoce d'évolution d'une infection, à un moment où l'on peut supposer que la taille de la charge bactérienne est inférieure au niveau qui sera atteint à un stade ultérieur.

Dans ce contexte, les objectifs de notre travail de thèse ont été :

- D'explorer par des modèles *in vitro* les relations concentrations-effets des antibiotiques étudiés, à la fois sur des bactéries pathogènes cibles de l'antibiothérapie et sur des bactéries non pathogènes, indicatrices de la flore commensale du tube digestif. Ces travaux ont servi de support à l'élaboration d'un indice pharmacodynamique capable de décrire la capacité d'un antibiotique à produire un effet thérapeutique, contre un pathogène cible, avec un impact minimal sur les bactéries des flores commensales.
- D'étudier l'impact de la taille de l'inoculum bactérien et de la précocité du traitement sur les relations dose-réponse des antibiotiques testés, et leurs conséquences sur des schémas posologiques optimisés qui pourraient être proposés dans le cadre de la métaphylaxie.
- D'évaluer l'impact de ces schémas posologiques optimisés sur l'émergence de bactéries résistantes au niveau de la flore commensale digestive des animaux traités, à la fois dans un modèle rongeur d'infection et sur l'espèce cible.

Nous avons choisi d'étudier deux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, l'amoxicilline et la cefquinome, car cette famille d'antibiotique est la plus utilisée en médecine humaine et une des plus utilisées en médecine vétérinaire. De plus certaines classes au sein de cette famille comme les céphalosporines de troisième et quatrième génération sont qualifiées de critiques pour la santé humaine et leur utilisation en santé animale fait l'objet de moratoires voire de suspensions définitives dans le cadre de certains usages. Le

développement de stratégies de traitement visant à limiter l'émergence et la dissémination de la résistance vis-à-vis de cette classe d'antibiotiques apparaît donc comme un enjeu majeur aussi bien en santé humaine qu'en santé animale.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié l'impact de l'amoxicilline et de la cefquinome sur *Pasteurella multocida* car il s'agit de l'un des principaux pathogènes respiratoires chez les espèces bovines et porcines, ainsi que dans les élevages de volailles et de lapins. Nous avons choisi *Escherichia coli* comme bactérie indicatrice de la flore digestive car il s'agit de la bactérie la plus utilisée dans les études d'émergence de résistance aux antibiotiques au sein de cette flore.

Nous avons utilisé des modèles murins pour la réalisation des preuves de concept et la dernière étude a été réalisée chez le porc.

Chapitre 2

ETUDE EXPERIMENTALE

Exploration de la sélectivité des antibiotiques vis-à-vis de bactéries pathogènes et commensales

CHAPITRE 2 - ETUDE EXPERIMENTALE

2. Exploration de la sélectivité des antibiotiques vis-à-vis de bactéries pathogènes et commensales

Cette partie du travail de thèse a donné lieu à un manuscrit en préparation intitulé: « Assessment of the selectivity of veterinary antibiotics on the target pathogen vs. commensal flora: development of a pharmacodynamic selectivity index for public health protection » (voir paragraphe 2.7).

2.1. Introduction

L'usage d'un antibiotique chez les animaux de rente a pour double objectif de produire un effet thérapeutique assurant la guérison de l'animal, tout en préservant les flores bactériennes commensales d'une pression de sélection qui favorisait l'émergence de résistances bactériennes.

La préconisation d'utiliser autant que faire se peut des antibiotiques à spectre étroit découle de ce double objectif, mais elle n'est pas suffisante lorsque par exemple les bactéries pathogènes et les flores commensales appartiennent aux mêmes ensembles bactériens (bactéries Gram positif, ou Gram négatif).

Dans ce chapitre, nous avons exploré *in vitro* les impacts combinés d'un même antibiotique sur deux espèces bactériennes Gram négatif, une bactérie pathogène, *Pasteurella multocida*, et sur une bactérie indicatrice de la flore commensale digestive, *Escherichia coli*.

Pour chaque bactérie, nous avons réalisé des cinétiques de croissance bactérienne en présence de différentes concentrations d'amoxicilline et de cefquinome et nous avons modélisé les dynamiques temporelles.

Les paramètres pharmacodynamiques obtenus ont été combinés afin de construire un indicateur capable de décrire la capacité d'un antibiotique à produire un effet thérapeutique contre un pathogène cible, avec un impact minimal sur une bactérie indicatrice de la flore digestive.

Les résultats obtenus au cours de ces différentes études seront présentés dans 4 parties distinctes avant d'être discutés dans la dernière partie de ce chapitre.

2.2. Détermination des CMI et réalisation de cinétiques de bactéricidie

2.2.1. Problématique et objectifs

Chaque souche bactérienne a sa propre sensibilité face à un antibiotique donné ce qui va conditionner les résultats obtenus lors de la détermination des paramètres pharmacodynamiques.

L'objectif de cette étude était de **déterminer *in vitro*, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'amoxicilline et de la cefquinome, ainsi que les paramètres de croissance, en présence de ces antibiotiques, d'une souche de *Pasteurella multocida* (PM) isolée dans un poumon de porc et d'*Escherichia coli* ATCC25922 (EC).**

2.2.2. Matériels et méthodes

2.2.2.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination de la CMI de l'amoxicilline et de la cefquinome a été réalisée dans du bouillon Mueller-Hinton (MH) selon la méthode de microdilution préconisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Un inoculum de 5.10^5 UFC/mL a été mis en contact avec une gamme de concentrations d'antibiotiques obtenue par une série de dilutions au demi. La CMI a été fixée en considérant la concentration minimale en amoxicilline ou en cefquinome qui a inhibé toute croissance visible après une incubation de 18 heures à 35°C. La détermination de la CMI pour l'amoxicilline et la cefquinome a été réalisée 3 fois, lors d'expériences indépendantes.

2.2.2.2. Cinétique de bactéricidie

Des suspensions de PM et de EC contenant 10^7 UFC/mL dans du bouillon MH ont été incubées pendant une heure à température ambiante, avant l'ajout de différentes concentrations d'amoxicilline et de cefquinome correspondant à des multiples de leurs CMI respectives : 0, 0.5, 1, 2, 4, 8,16, 32 et 64 fois la CMI. Les échantillons ont été placés à l'étuve à 37°C et des prélèvements de 500µL ont été effectués à différents temps : 0, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h et 24h. Les prélèvements ont été centrifugés à 3000g pendant 10 minutes à 20°C, le surnageant a ensuite été éliminé et les culots bactériens ont été

resuspendus dans 500µL de bouillon MH frais. Cette étape a permis d'éliminer l'antibiotique du milieu de culture.

Un dénombrement des bactéries a ensuite été réalisé à partir des prélèvements qui ont été dilués plusieurs fois au 10^{ème}. Dix microlitres de chaque dilution ont ensuite été déposés sur une gélose MH sans antibiotique (3 dépôts par dilution). Après une incubation de 18 h à 37°C, les colonies formées à l'emplacement de chaque dépôt ont été comptées si leur nombre était inférieur à 15. La moyenne du nombre de colonies des 3 dépôts issus de la même dilution a ensuite été calculée et multipliée par le facteur de dilution afin d'obtenir le nombre de bactéries par millilitre. La limite de détection était de 100 UFC/mL. Les expérimentations ont été réalisées en triplicate et les résultats obtenus ont été moyennés.

2.2.3. Résultats

2.2.3.1. CMI

Les CMI de l'amoxicilline pour PM et EC ont respectivement été évaluées à 0.125 µg/mL et 4 µg/mL. Les CMI de la cefquinome pour PM et EC ont été évaluées à 0.016 µg/mL et 0.064 µg/mL respectivement.

2.2.3.2. Cinétique de bactéricidie

Les cinétiques de bactéricidie sont présentées dans la Figure 12. Pour PM, les résultats sont similaires pour les deux antibiotiques (Figure 12A et 12C). En absence d'antibiotique, les comptages bactériens ont montré une phase de latence de la bactérie entre 0 et 2 h suivie d'une phase de croissance exponentielle de la population bactérienne entre 2 et 8 h puis d'une phase stationnaire autour de 10⁹ UFC/mL, 8 h après la mise en culture. Les gammes de concentration comprises entre 0.5 et 2 fois la CMI ne provoquent qu'un léger retard de la croissance de l'inoculum, celui-ci atteignant une densité de l'ordre de 10⁹ UFC/mL après 24 heures d'incubation. En revanche, une concentration en amoxicilline ou en cefquinome égale à 4 fois la CMI provoque un effet bactériostatique. Ceci signifie qu'il n'existe pas de croissance de l'inoculum, celui-ci se maintenant à une densité bactérienne proche de celle de départ (entre 10⁷ et 10⁸ UFC/mL). Pour les concentrations d'antibiotique comprises entre 8 et 64 fois la CMI, une réduction de la taille de l'inoculum est observable.

Ainsi, pour les concentrations de 8 et 16 fois la CMI, l'inoculum bactérien est respectivement aux alentours de 10⁵ UFC/mL et 10⁴ UFC/mL à 24 heures. Pour les

concentrations de 32 et 64 fois la CMI, l'inoculum bactérien est aux alentours de 10^3 UFC/mL à 24 heures. La plus faible concentration bactéricide (produisant une réduction de 99.99% de l'inoculum initial) est de 16 fois la CMI pour la cefquinome et 32 fois la CMI pour l'amoxicilline (Figure 12A et 12C).

Pour EC, les résultats sont légèrement différents entre les deux antibiotiques. En absence d'antibiotique, les comptages bactériens ont montré une phase de croissance exponentielle de la population bactérienne entre 0 et 2 h puis une phase stationnaire autour de 10^9 UFC/mL, de 2h à 24h après la mise en culture. Les gammes de concentration comprises entre 0.5 et 2 fois la CMI ne provoquent qu'un léger retard de la croissance de l'inoculum, celui-ci atteignant une densité de l'ordre de 10^9 UFC/mL après 24 heures d'incubation. En revanche, une concentration en amoxicilline égale à 4 fois la CMI provoque un effet bactériostatique alors que 4 fois la CMI de la cefquinome provoque un effet bactéricide. Cet effet bactéricide est obtenu pour l'amoxicilline à une concentration de 8 fois la CMI. Pour les concentrations de cefquinome comprises entre 8 et 64 fois la CMI et d'amoxicilline comprises entre 16 et 64 fois la CMI, l'inoculum bactérien est inférieur à la limite de quantification à 24 heures (Figure 12B et 12D).

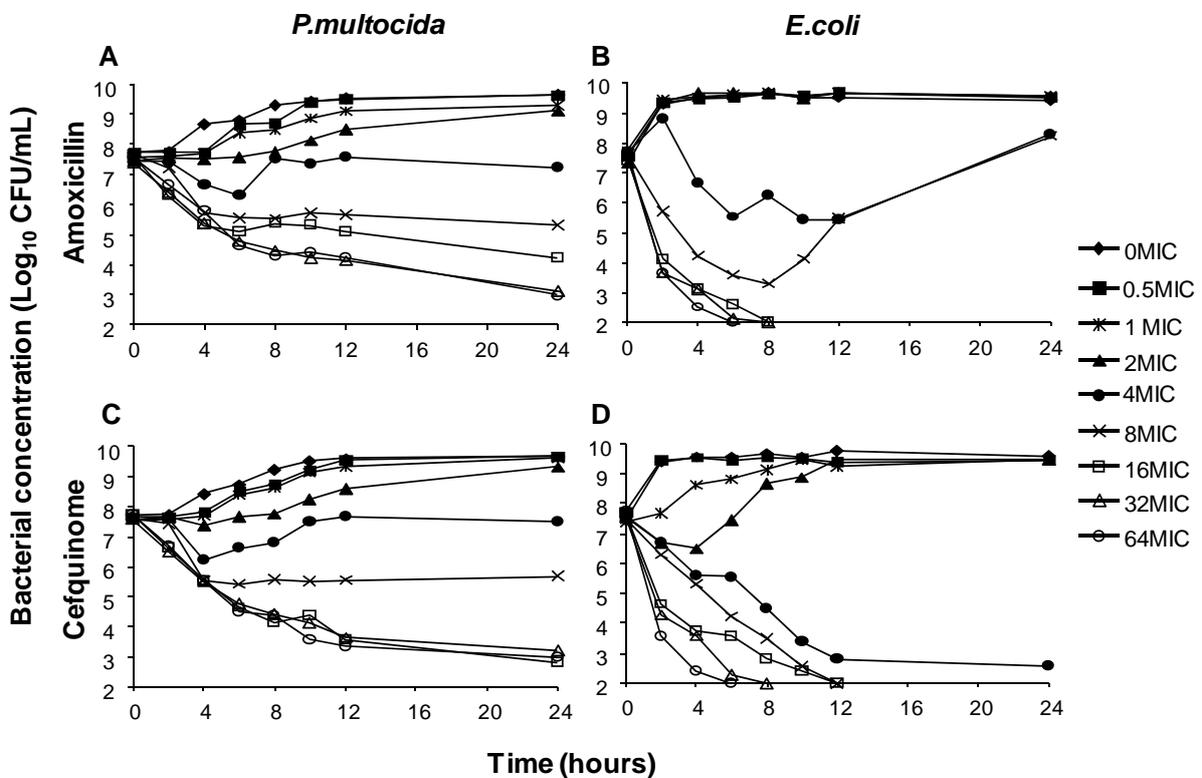


Figure 12: Cinétique de bactéricidie de l'amoxicilline et de la cefquinome contre *P.multocida* et *E.coli*.

A) Amoxicilline/*P.multocida*, B) Amoxicilline/*E.coli*, C) Cefquinome/*P.multocida*, D) Cefquinome/*E.coli* Les concentrations d'antibiotiques sont exprimées en multiple de la CMI : 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64.

2.2.4. Conclusions

Pour PM et EC, les CMI de la cefquinome sont très inférieures à celles de l'amoxicilline, corroborant l'activité antibactérienne plus puissante de la céphalosporine vis-à-vis de ces espèces bactériennes.

Pour les deux antibiotiques, les CMI de PM sont inférieures à celle obtenues avec EC. En revanche, les écarts entre les CMI sont très différents : la CMI pour EC (4 µg/mL) est 32 fois plus élevée que pour PM (0.125 µg/mL) dans le cas de l'amoxicilline, et 4 fois plus élevée dans le cas de la cefquinome (0.064 vs 0.016 µg/mL).

Les cinétiques de bactéricidie montrent une croissance plus rapide pour EC, ainsi qu'une activité antibactérienne des deux antibiotiques (corrigée par la CMI) plus intense contre cette bactérie. Ces deux phénomènes peuvent être mis en relation, compte-tenu du mécanisme d'action des deux beta-lactamines qui agissent sur des bactéries en division.

2.3. Détermination des relations concentration-effet et modélisation des effets antibactériens

2.3.1. Objectifs

Le premier objectif de cette partie est d'analyser les cinétiques de bactéricidie obtenues précédemment afin de produire des relations explicites entre les concentrations d'antibiotiques et l'effet antibactérien. Ceci a été réalisé en construisant, pour chaque concentration d'antibiotique, un indicateur global de l'effet antibactérien qui résume l'ensemble des observations effectuées entre 0 et 24h d'incubation.

Le deuxième objectif consiste à construire, à partir des relations concentration-effet, un indice permettant de décrire la sélectivité de l'action antibactérienne de l'antibiotique, contre *Pasteurella multocida* d'une part, et *Eschérichia coli* d'autre part.

2.3.2. Matériels et méthodes

2.3.2.1. Détermination de l'inoculum moyen

A partir de chaque courbe de bactéricidie (Figure 12), nous avons calculé l'aire sous la courbe des densités bactériennes en fonction du temps (AUC, en log UFC/mL) entre 0 et 24 h pour chaque concentration d'antibiotique. Pour les comptages bactériens inférieurs à la limite de quantification (100 UFC/mL), nous avons fixé leur valeur à 10 UFC/mL. Une fois les AUC déterminées, nous les avons divisées par le temps d'incubation (24 heures) afin d'obtenir une valeur moyenne de la taille de l'inoculum bactérien sur 24h.

2.3.2.2. Détermination de la croissance relative de l'inoculum moyen

La croissance relative de l'inoculum moyen pour une concentration a d'antibiotique a été définie de la manière suivante :

$$\Delta I(a) = I(a) - I_{\text{BASAL}} \quad (\text{Equation 2})$$

Où $I(a)$ est l'inoculum moyen (log UFC/mL) obtenu avec une concentration a d'antibiotique et I_{BASAL} (log UFC/mL) est l'inoculum initial (à $t=0$). Par exemple, pour un inoculum initial de 10^7 UFC/mL, $I_{\text{BASAL}} = 7$.

2.3.2.3. Modélisation de la croissance relative de l'inoculum bactérien

La relation entre la croissance de l'inoculum moyen et la concentration en antibiotique a été modélisée au moyen de l'équation suivante, implémentée dans le logiciel WinNonlin[®] (Pharsight, Moutain view) :

$$\Delta I(a) = \Delta I_{\text{MAX}} - \frac{(\Delta I_{\text{MAX}} - \Delta I_{\text{MIN}}) \times \left(\frac{a}{\text{EC}_{\text{STATIC}}} \right)^\gamma}{\left(\frac{a}{\text{EC}_{\text{STATIC}}} \right)^\gamma - \frac{\Delta I_{\text{MIN}}}{\Delta I_{\text{MAX}}}} \quad (\text{Equation 3})$$

où $\Delta I(a)$ (log UFC/mL) est la croissance de l'inoculum moyen pour une concentration a d'antibiotique, ΔI_{MAX} (log UFC/mL) est la croissance maximale de l'inoculum moyen en absence d'antibiotique, ΔI_{MIN} (log UFC/mL) est la croissance minimale (croissance négative) de l'inoculum moyen quand la concentration en antibiotique est maximale, $\text{CE}_{\text{STATIC}}$ ($\mu\text{g/mL}$) est la concentration d'antibiotique produisant un effet bactériostatique, c'est-à-dire pour laquelle $\Delta I(\text{CE}_{\text{STATIC}})=0$ et $I(\text{CE}_{\text{STATIC}})= I_{\text{BASAL}}$, et γ est le coefficient de sigmoïdité de la courbe. Ce modèle correspond à une reparamétrisation d'un modèle Emax-sigmoïde classique (Regoes, Wiuff et al. 2004).

2.3.2.4. Construction d'un indice de sélectivité

Une partie du rapport bénéfices sur risques d'une substance médicamenteuse repose sur sa capacité à produire des effets thérapeutiques (bénéfiques) tout en minimisant la survenue d'effets indésirables. Ce phénomène est directement lié à la sélectivité de la substance médicamenteuse, une notion développée en pharmacologie qui vise à décrire la distance qui existe entre d'une part la relation concentrations-effets pour les effets bénéfiques, et d'autre part la relation concentrations-effets pour les effets indésirables. Cette distance est classiquement décrite par le rapport entre la concentration produisant une intensité (ou fréquence) donnée de l'effet indésirable (correspondant généralement à un maximum tolérable) et la concentration de médicament produisant une intensité (ou fréquence) donnée de l'effet bénéfique (correspondant généralement à un minimum acceptable). Ce rapport est dénommé *Indice de sélectivité* (SI).

$$SI = \frac{\text{Concentration produisant le maximum acceptable de l'effet indésirable}}{\text{Concentration produisant le minimum acceptable de l'effet bénéfique}}$$

Nous avons tenté d'appliquer ces notions à la problématique posée aux antibiotiques vétérinaires, en définissant comme effet bénéfique l'action contre le pathogène responsable de l'infection et comme effet indésirable l'impact sur la flore commensale digestive. Dans ce contexte, nous avons construit un indice de sélectivité à partir de l'équation suivante :

$$SI = \frac{CE_{\text{STATIC}}^{\text{coli}}}{CE_{90}^{\text{pm}}} \quad (\text{Equation 4})$$

où $CE_{\text{STATIC}}^{\text{coli}}$ est la concentration d'antibiotique produisant un effet bactériostatique sur *Escherichia coli* et CE_{90}^{pm} est la concentration d'antibiotique produisant 90% de l'effet antibactérien maximal sur *Pasteurella multocida*.

En considérant *E.coli* comme l'espèce bactérienne indicatrice des *Enterobacteriaceae* du microbiote intestinal, choisir $CE_{\text{STATIC}}^{\text{coli}}$ comme seuil d'effet indésirable signifie que l'on demande à l'antibiotique une absence d'effet mesurable (du moins en termes de dénombrement) sur les Enterobactéries totales, c'est-à-dire qu'il n'exerce pas de pression de sélection sur cette fraction de la flore digestive. $CE_{\text{STATIC}}^{\text{coli}}$ est estimé directement à partir de l'équation 3.

CE_{90}^{pm} , la concentration produisant le minimum acceptable de l'effet bénéfique (action contre *P.multocida*), n'est pas déterminée directement par l'équation 3. Elle peut être obtenue à partir de l'équation suivante, qui permet de calculer n'importe quelle concentration d'antibiotique produisant un pourcentage (x%) de l'effet antibactérien maximal :

$$CE_{x\%} = CE_{\text{STATIC}} \times \left(\frac{x\%}{x\% - 100} \right)^{\frac{1}{Y}} \times \left(\frac{\Delta I_{\text{MIN}}}{\Delta I_{\text{MAX}}} \right)^{\frac{1}{Y}} \quad (\text{Equation 5})$$

où $CE_{x\%}$ ($\mu\text{g/mL}$) est la concentration en antibiotique produisant un pourcentage donné ($x\%$) de l'effet antibactérien maximal ($E_{\text{MAX}} = \Delta I_{\text{MAX}} - \Delta I_{\text{MIN}}$). CE_{STATIC} , ΔI_{MIN} , ΔI_{MAX} et γ ont été définis dans les sections précédentes. CE_{90}^{pm} est obtenu en posant $x\%=90$.

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Relations concentration-effet et modélisation de l'effet antibactérien

Les relations entre les concentrations d'antibiotique (amoxicilline et cefquinome) et la croissance de l'inoculum moyen (*E. coli* et *P. multocida*) sont présentées dans la Figure 13. Les données observées ont été ajustées par l'équation 3 et les paramètres du modèle pharmacodynamique sont présentés dans le Tableau 6. Pour les deux espèces bactériennes, la CE_{STATIC} de la cefquinome est inférieure à celle de l'amoxicilline. La CE_{STATIC} de l'amoxicilline est 4.2 fois supérieure à la CMI pour les deux espèces bactériennes quand celle de la cefquinome est de 2.7 et de 4.7 fois la CMI pour *E.coli* et *P.multocida*, respectivement. Pour *P.multocida*, ΔI_{MIN} , qui est un paramètre exprimant la capacité de l'antibiotique à réduire l'inoculum bactérien initial, est à peu près identique pour l'amoxicilline et la cefquinome (-2.91 et -2.80 log UFC/mL). Pour *E.coli*, ΔI_{MIN} est similaire pour l'amoxicilline et la cefquinome, et beaucoup important que contre *P.multocida* (-5.03 et -5.52 log UFC/mL). En effet, ce paramètre intègre à la fois la taille minimale de l'inoculum atteinte à la fin des 24h d'exposition, et la vitesse avec laquelle cet effet bactéricide maximal est obtenu : après 12h pour *P. multocida*, entre 6h et 12h pour *E. coli* (Figure 13).

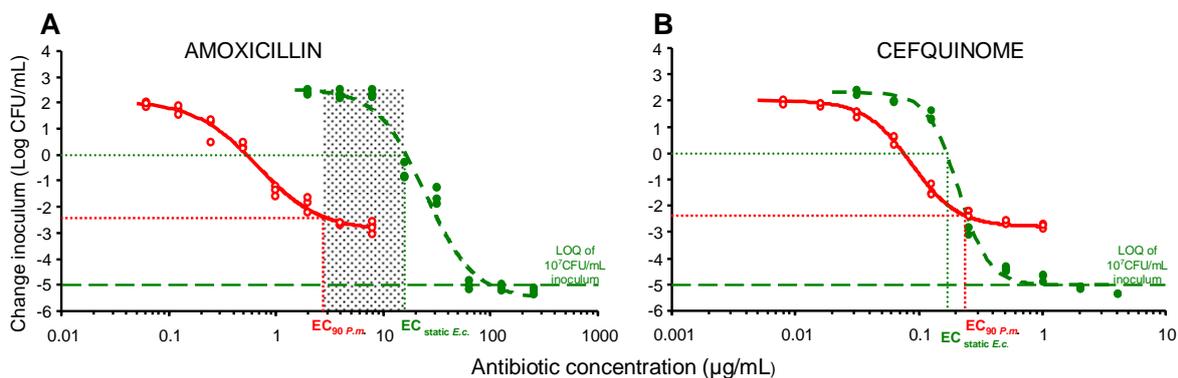


Figure 13 : Relations entre les concentrations d'antibiotique (amoxicilline et cefquinome) et la croissance des inocula moyens de *P. multocida* et *E.coli*.

L'amoxicilline (panneau A) et la cefquinome (panneau B) ont été incubées à des concentrations différentes en présence d'un inoculum initial de 10^7 UFC/mL de *P. multocida* (courbes rouges) et *E. coli* (courbes vertes). Les cercles représentent les données observées et les traits (—, ---) les ajustements réalisés grâce au modèle décrit par l'équation 3. Pour *E.coli*, les concentrations CE_{STATIC} associées à un effet bactériostatique ($\Delta I=0$) sont indiquées en vert. Pour *P.multocida*, les concentrations CE_{90}^{pm} produisant 90% de l'effet maximal sont indiquées en rouge. Panneau A, amoxicilline : la zone hachurée correspond à la gamme de concentrations pour laquelle

l'effet désiré est obtenu ($\text{Conc} > EC_{90}^{pm}$) en absence d'effet indésirable ($\text{Conc} < EC_{STATIC}^{coli}$). Panneau B, cefquinome : absence de zone hachurée car EC_{STATIC}^{coli} est inférieure à EC_{90}^{pm} .

Nous avons comparé, pour chaque antibiotique, les relations entre les concentrations et la croissance des inocula moyens de *P.multocida* et *E.coli*. Avec l'amoxicilline, la relation concentration-effet pour *P.multocida* est décalée sur la gauche par rapport à celle d'*E.coli*. Il

en résulte que la concentration d'amoxicilline produisant 90% de son effet maximal contre *P.multocida* (EC_{90}^{pm}) est sans effet contre *E.coli* (Figure 13). Pour la cefquinome, les relations concentration-effet pour les deux bactéries sont très proches. Il en résulte que la

Tableau 6 : Paramètres^a du modèle pharmacodynamique décrivant l'évolution des inocula bactériens de 10^7 UFC/mL en fonction des concentrations d'antibiotiques.

	Antibiotique	EC_{STATIC}^b ($\mu\text{g/mL}$)	CMI/ EC_{STATIC}	γ^c	ΔI_{MAX}^d (Log UFC/mL)	ΔI_{MIN}^e (Log UFC/mL)
<i>P.multocida</i>	amoxicilline	0.53±0.03	4.24	1.50±0.16	2.07±0.11	-2.91±0.16
	cefquinome	0.075±0.002	4.68	2.32±0.16	2.01±0.06	-2.80±0.07
<i>E.coli</i>	amoxicilline	16.69±1.23	4.17	1.92±0.28	2.55±0.21	-5.52±0.29
	cefquinome	0.168±0.005	2.63	3.49±0.29	2.33±0.10	-5.03±0.09

^a Moyenne±Ecart Standard

^b Concentration d'antibiotique produisant un effet bactériostatique.

^c Coefficient de sigmoïdité de la courbe.

^d Croissance maximale de l'inoculum moyen.

^e Croissance minimale de l'inoculum moyen.

concentration de cefquinome produisant 90% de son effet maximal contre *P.multocida* (EC_{90}^{pm}) induit un effet antibactérien non négligeable contre *E.coli* (une réduction de l'inoculum moyen entre -3 et -2 log UFC/mL, cf Figure 13).

2.3.3.2. Construction d'un indice de sélectivité

Nous avons construit l'indice de sélectivité (SI) tel que défini dans l'équation 3 afin de quantifier la distance observée entre les relations concentration-effet de *P. multocida* et *E.coli*. Les CE_{90}^{pm} ont été calculées grâce à l'équation 4. Les résultats sont présentés dans le Tableau 7. Les CE_{90}^{pm} sont de 2.89 $\mu\text{g/mL}$ pour l'amoxicilline et 0.23 $\mu\text{g/mL}$ pour la cefquinome, confirmant une action antibactérienne plus puissante pour la céphalosporine, en cohérence la différence des CMI pour *P. multocida* (0.125 et 0.016 $\mu\text{g/mL}$). L'indice de sélectivité est de 5.78 pour l'amoxicilline. Il peut être visualisé par la largeur de la zone hachurée de la figure 13A. L'indice de sélectivité est de 0.74 pour la cefquinome, ce qui confirme la superposition des gammes de concentration actives contre *P. multocida* et *E.*

coli (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeurs des indices de sélectivité pour des inocula de 10^7 UFC/mL de *P.multocida*.

	EC_{90}^{pm} ^a ($\mu\text{g/mL}$)	EC_{STATIC}^{coli} ^b ($\mu\text{g/mL}$)	$SI = \frac{EC_{STATIC}^{coli}}{EC_{90}^{pm}}$
Amoxicilline	2.89	16.69	5.78
Cefquinome	0.23	0.17	0.74

^a Concentration en antibiotique produisant 90% de l'effet maximal antibactérien contre un inoculum de *P.multocida* de 10^7 UFC/mL.

^b Concentration en antibiotique produisant l'effet bactériostatique contre un inoculum d'*E.coli* de 10^7 UFC/mL.

2.3.4. Conclusion

L'analyse des cinétiques de bactéricidie a permis d'établir des relations concentration-effet pour chaque couple antibiotique/bactérie.

La comparaison de ces relations concentration-effet confirme que la cefquinome a une activité antibactérienne plus puissante que celle de l'amoxicilline sur les deux bactéries Gram négatif testées.

Elle indique également que la cefquinome est aussi puissante contre *E. coli* que contre *P. multocida*, ce qui peut être traduit comme une absence de sélectivité entre les deux actions. A l'inverse, l'amoxicilline est plus puissante contre *P. multocida* que contre *E. coli*, correspondant à une sélectivité vis-à-vis du pathogène respiratoire.

2.4. Impact de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité des antibiotiques

2.4.1. Problématique et objectifs

De nombreuses études *in vitro* (Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Ferran, Dupouy et al. 2007; Udekwu, Parrish et al. 2009) et *in vivo* (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949; Ferran, Kesteman et al. 2009; Kesteman, Ferran et al. 2009; Ferran, Toutain et al. 2011) ont montré que la taille de l'inoculum bactérien pouvait influencer l'activité – et en particulier la puissance - des antibiotiques.

L'objectif des études suivantes était d'évaluer l'impact de la taille de l'inoculum initial de *P. multocida* sur l'activité antibactérienne de l'amoxicilline et de la cefquinome. A cette fin, des cinétiques de bactéricidie ont été réalisées avec un inoculum de *P. multocida* de 10^5 UFC/mL, les relations concentration-effet correspondantes ont été déterminées ainsi que les indices de sélectivité.

2.4.2. Matériels et méthodes

2.4.2.1. Courbes de bactéricidie

Des suspensions de PM contenant 10^5 UFC/mL dans du bouillon MH ont été incubées pendant une heure à température ambiante, avant l'ajout de différentes concentrations d'amoxicilline et de cefquinome correspondant à des multiples de leurs CMI respectives : 0, 0.5, 1, 2, 4, 8,16, 32 et 64 fois la CMI. Les échantillons ont été placés à l'étuve à 37°C et des prélèvements de 500µL ont été effectués à différents temps : 0, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h et 24h. Les prélèvements ont été centrifugés à 3000g pendant 10 minutes à 20°C, le surnageant a ensuite été éliminé et les culots bactériens ont été resuspendus dans 500µL de bouillon MH frais. Cette étape a permis d'éliminer l'antibiotique du milieu de culture.

Un dénombrement des bactéries a ensuite été réalisé à partir des prélèvements qui ont été dilués plusieurs fois au $10^{\text{ème}}$. Dix microlitres de chaque dilution ont ensuite été déposés sur une gélose MH sans antibiotique (3 dépôts par dilution). Après une incubation de 18 h à 37°C, les colonies formées à l'emplacement de chaque dépôt ont été comptées si leur nombre était inférieur à 15. La moyenne du nombre de colonies des 3 dépôts issus de la même dilution a ensuite été calculée et multipliée par le facteur de dilution afin d'obtenir le nombre de bactéries par millilitre. La limite de détection était de 100 UFC/mL. Les expérimentations ont été réalisées en triplicate et les résultats obtenus ont été moyennés.

2.4.2.2. Détermination des relations concentration-effet et modélisation des effets antibactériens

Les méthodes sont identiques à celles décrites dans la section 2.3.2.

2.4.3. Résultats

2.4.3.1. Cinétiques de bactéricidie

Les cinétiques de bactéricidie sont présentées dans la Figure 14. Les résultats sont similaires pour les deux antibiotiques. En absence d'antibiotique, les comptages bactériens ont montré une phase de croissance exponentielle de la population bactérienne entre 0 et 12 h suivie d'une phase stationnaire autour de 10^9 UFC/mL, 24 h après la mise en culture. La concentration égale à 0.5 fois la CMI ne provoque qu'un léger retard de la croissance de l'inoculum, celui-ci atteignant une densité de l'ordre de 10^9 UFC/mL après 24 heures d'incubation. En revanche, une concentration en amoxicilline ou en cefquinome égale à 1 fois la CMI provoque un effet bactériostatique. Pour les concentrations d'antibiotique comprises entre 2 et 64 fois la CMI, une réduction de la taille de l'inoculum est observable. Des concentrations de 8 à 64 fois la CMI d'amoxicilline provoquent une diminution de l'inoculum bactérien jusqu'à 10^2 - 10^3 UFC/mL à 24 heures. Pour des concentrations de cefquinome de 8 à 64 fois la CMI, les bactéries ne sont plus détectées dans le milieu à partir de 12h d'incubation. La plus faible concentration produisant une réduction de 99.9% de l'inoculum initial est de 8 fois la CMI à la fois pour l'amoxicilline et la cefquinome (Figure 14).

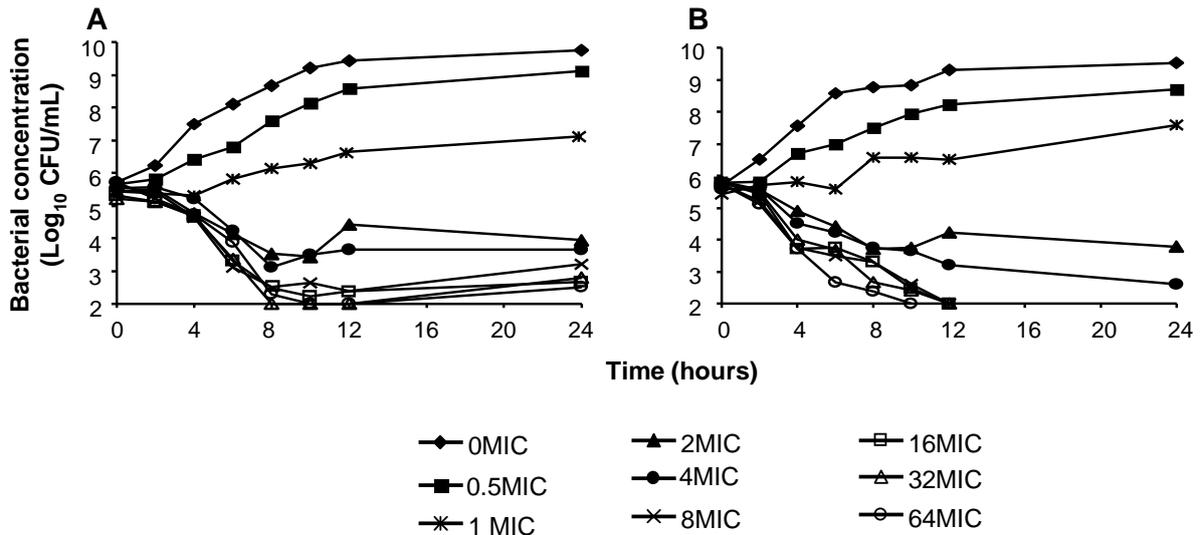


Figure 14 : Cinétique de bactéricidie de l'amoxicilline et de la cefquinome contre des inocula de 10^5 UFC/mL de *P. multocida*.

A) Amoxicilline, B) Cefquinome. Les concentrations d'antibiotiques sont exprimées en multiples de CMI: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 et 64.

2.4.3.2. Relations concentration-effet et modélisation de l'effet antibactérien

Les relations entre les concentrations d'antibiotique (amoxicilline et cefquinome) et la croissance de l'inoculum de 10^5 UFC/mL de *P. multocida* sont présentées dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (courbes rouges). Les résultats obtenus précédemment avec un inoculum de 10^7 UFC/mL d'*E. coli* sont reproduits à l'identique de la Figure 13 (courbes vertes).

Concernant *P. multocida*, les données observées ont été ajustées par l'équation 3 et les paramètres du modèle pharmacodynamique sont présentés dans le Tableau 8. La CE_{STATIC} de la cefquinome est une nouvelle fois inférieure à celle de l'amoxicilline. Les relations concentration-effet de *P. multocida* sont décalées sur la gauche par rapport à celles obtenues avec un inoculum de 10^7 UFC/mL. Il en résulte que pour les deux antibiotiques, les CE_{STATIC} pour un inoculum initial de 10^5 UFC/mL sont cette fois très proches des CMI respectives : 1.44 et 1.62 fois la CMI, contre 4.24 et 4.68 fois la CMI pour un inoculum initial de 10^7 UFC/mL (Tableau 6). Cela signifie que les deux antibiotiques sont plus puissants contre de faibles inocula que contre de gros inocula bactériens.

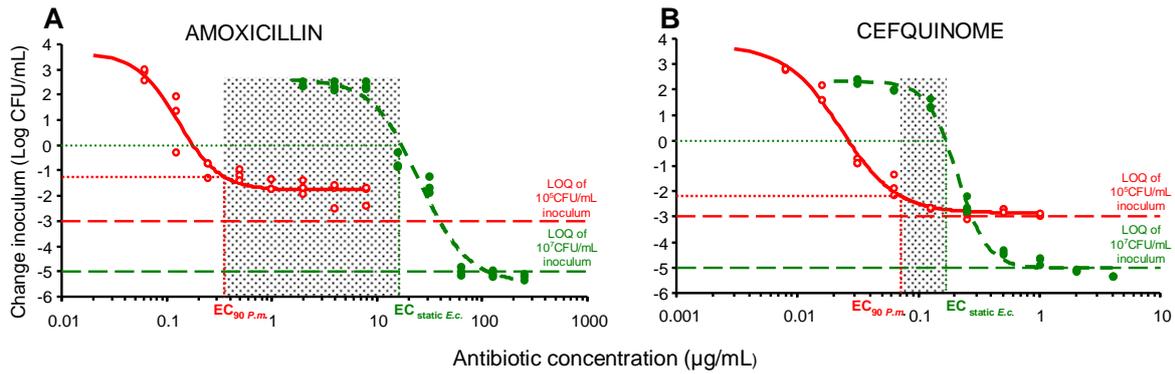


Figure 15 : Activité antibactérienne de l'amoxicilline et de la cefquinome contre des inocula de 10⁵ UFC/mL de *P. multocida*.

L'amoxicilline (panneau A) et la cefquinome (panneau B) ont été incubées à des concentrations différentes en présence d'un inoculum initial de 10⁵ UFC/mL de *P. multocida* (courbes rouges). Les courbes vertes reproduisent à l'identique les résultats obtenus précédemment avec *E. coli* (inoculum initial de 10⁷ UFC/mL). Les cercles représentent les données observées et les traits (—, ---) les ajustements réalisés grâce au modèle décrit par l'équation 3.

Pour *E. coli*, les concentrations CE_{STATIC} associées à un effet bactériostatique (I=0) sont indiquées en vert. Pour *P. multocida*, les concentrations EC₉₀^{pm} produisant 90% de l'effet maximal sont indiquées en rouge.

Panneau A, amoxicilline : la zone hachurée correspond à la gamme de concentrations pour laquelle l'effet désiré est obtenu (Conc > EC₉₀^{pm}) en absence d'effet indésirable (Conc < EC_{STATIC}^{coli}).

Panneau B, cefquinome : absence de zone hachurée car EC_{STATIC}^{coli} est inférieure à EC₉₀^{pm}.

Tableau 8 : Paramètres^a du modèle pharmacodynamique décrivant l'évolution de l'inoculum de 10⁵ UFC/mL de *P. multocida* en fonction des concentrations d'antibiotiques.

Antibiotique	EC _{STATIC} ^b (µg/mL)	MIC/EC _{STATIC}	γ ^c	ΔI _{MAX} ^d (Log UFC/mL)	ΔI _{MIN} ^e (Log UFC/mL)
amoxicilline	0.18±0.01	1.44	2.19±0.37	3.68±0.26	-1.77±0.13
cefquinome	0.026±0.001	1.62	1.92±0.14	3.71±0.13	-2.85±0.08

^a Moyenne ± erreur standard

^b Concentration d'antibiotique produisant l'effet bactériostatique.

^c Coefficient de sigmoïdité de la courbe.

^d Croissance relative maximale de l'inoculum moyen.

^e Croissance relative minimale de l'inoculum moyen.

Les CE₉₀^{pm} des deux antibiotiques ont une nouvelle fois été déterminés en utilisant l'équation 4. Leurs valeurs contre des inocula de 10⁵ UFC/mL sont de 0.35 et 0.072 µg/mL pour l'amoxicilline et la cefquinome (Tableau 9). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues contre des inocula de 10⁷ UFC/mL de *P. multocida* (Tableau 7): d'un facteur 8 pour l'amoxicilline (0.35 vs 2.89 µg/mL) et d'un facteur 3 pour la cefquinome (0.072 vs 0.23 µg/mL). Le décalage sur la gauche des relations concentration-effet avec le petit inoculum de *P. multocida* provoque un élargissement de la zone hachurée (Figure 15), correspondant à la production d'un effet suffisant contre *P. multocida* (Conc > EC₉₀^{pm}) sans effet mesurable contre *E. coli* (Conc < EC_{STATIC}^{coli}).

Les valeurs des indices de sélectivité lorsque l'on utilise les données générées par les

courbes de bactéricidie des inocula de 10^5 UFC/mL de *P.multocida* sont respectivement de 47.7 et de 2.36 pour l'amoxicilline et la cefquinome (Tableau 9). Cela signifie que la sélectivité des deux antibiotiques est améliorée lorsqu'ils agissent contre un petit inoculum pathogène.

Tableau 9 : Valeurs des indices de sélectivité pour des inocula de 10^5 UFC/mL de *P.multocida*.

	EC_{90}^{pm} ^a (μ g/mL)	EC_{STATIC}^{coli} ^b (μ g/mL)	$SI = \frac{EC_{STATIC}^{coli}}{EC_{90}^{pm}}$
Amoxicilline	0.35	16.69	47.69
Cefquinome	0.072	0.17	2.36

^a Concentration en antibiotique produisant 90% de l'effet maximal antibactérien contre un inoculum de *P.multocida* de 10^5 UFC/mL.

^b Concentration en antibiotique produisant l'effet bactériostatique contre un inoculum d'*E.coli* de 10^7 UFC/mL.

2.4.4. Conclusion

Cette étude montre que la taille de l'inoculum bactérien de deux bactéries Gram négatif influence l'activité antibactérienne de l'amoxicilline et de la cefquinome. Cette activité est accrue (les antibiotiques sont plus puissants) face à des inocula de petite taille.

Ce phénomène accroît la sélectivité des antibiotiques : les concentrations efficaces contre un petit inoculum de *P. multocida* sont sans effet contre une population plus grande d'*E. coli*.

Il en résulte qu'une stratégie thérapeutique visant à cibler les charges bactériennes de petites tailles, à un stade précoce de l'évolution d'une infection bactérienne, pourrait contribuer à limiter la pression de sélection exercée sur les flores digestives.

2.5. Discussion

Le but de notre étude a été d'explorer les propriétés optimales requises pour les antibiotiques à usage vétérinaire. En effet, la résistance aux antibiotiques est un problème de plus en plus inquiétant en santé humaine et l'utilisation des antibiotiques en santé animale ne doit pas être un phénomène aggravant. Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont montré que le microbiote intestinal des animaux pourrait être potentiellement le principal réservoir de bactéries résistantes et de gènes de résistance. De ce fait, le but de l'usage prudent des antibiotiques en médecine vétérinaire est de minimiser leurs effets adverses sur le microbiote intestinal tout en éradiquant la flore pathogène. Dans cette étude, nous avons développé un index pharmacodynamique permettant d'évaluer et de quantifier la sélectivité des antibiotiques vétérinaires, grâce à la combinaison de deux composantes : un effet acceptable (éradication de la flore pathogène) et un effet indésirable (protection du microbiote intestinal). Nous avons choisi *Pasteurella multocida*, bactérie responsable d'infections pulmonaires chez le porc et les bovins, comme bactérie pathogène et *E.coli*, comme bactérie sentinelle du microbiote intestinal. L'amoxicilline et la cefquinome, deux antibiotiques de la classe des bêta-lactamines ont été choisis pour comparer la sélectivité des « anciens » et des antibiotiques dits de dernière génération.

2.5.1. Détermination de la sensibilité des souches bactériennes à l'amoxicilline et à la cefquinome

La CMI de l'amoxicilline pour les souches de *Pasteurella multocida* et d'*E.coli* testées ont été respectivement de 0.125µg/mL et de 4µg/mL. Au niveau populationnel, ces valeurs correspondent aux valeurs modales de CMI (EUCAST). Pour la cefquinome, la CMI de notre souche de *P.multocida* est égale à la CMI₉₀ des souches de *P.multocida* (ANSES) et la CMI de notre souche de *E.coli* est égale à la CMI₅₀ des souches de *E.coli*. Ceci montre la pertinence des souches étudiées au niveau populationnel. En ce qui concerne les courbes de bactéricidie, nous avons étudié l'effet des antibiotiques sur 24 heures pour pouvoir prendre en compte le temps nécessaire aux antibiotiques pour agir mais également le temps nécessaire aux bactéries de s'adapter physiologiquement (bactéries persistantes).

2.5.2. Modélisation de l'effet antibactérien

Nous avons utilisé comme Regoes et Ankomah (Ankomah and Levin ; Regoes, Wiuff et al. 2004), une reparamétrisation d'un modèle Emax classique basé sur la variation de la

densité bactérienne en fonction de la concentration en antibiotique, ce qui permet une détermination directe de paramètre comme la concentration bactériostatique (EC_{STATIC}), paramètre clé de la quantification de l'effet des antibiotiques. En utilisant cette approche de modélisation, nous avons montré que la cefquinome est plus puissante que l'amoxicilline (les ratios EC_{STATIC} amoxicilline / EC_{STATIC} cefquinome sont de 7 pour des inocula de 10^7 UFC/mL de *P.multocida* et de 99 pour des inocula de 10^7 UFC/mL d'*E.coli*). Cependant, cette notion de puissance des antibiotiques, qui ne prend en compte que l'effet thérapeutique n'est pas suffisante et la notion de sélectivité qui combine les effets thérapeutiques mais également les effets adverses est un paramètre plus pertinent. Dans cette étude, nous avons donc proposé un nouvel index en s'appuyant sur la notion d'index thérapeutique classiquement utilisé en pharmacologie, pour pouvoir quantifier la sélectivité des antibiotiques.

Pour ce faire, nous avons fixé les objectifs de l'antibiothérapie de la manière suivante: efficacité maximale contre le pathogène et impact minimal sur le microbiota intestinal. Nous avons donc défini une concentration en antibiotique produisant 90% de l'effet maximal antibactérien contre *P.multocida* (EC_{90}^{pm}) comme l'objectif à atteindre et une concentration produisant au maximum l'effet bactériostatique contre *E. coli* (EC_{STATIC}^{coli}) comme seuil évitant l'effet adverse. Comme nous l'avons signalé précédemment, de telles approches sont utilisées pour d'autres médicaments et notamment pour le développement des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) (Knights, Mangoni et al.). Nous avons vu que les SI sont inférieurs à 1 pour la cefquinome et de 5.78 pour l'amoxicilline pour des inocula de 10^7 UFC/mL.

2.5.3. Amélioration de l'indice de sélectivité pour les antibiotiques vétérinaires

Afin d'améliorer les index de sélectivité nous avons également réalisé nos expérimentations avec des inocula pathogènes de petite taille (10^5 UFC/mL). En effet, plusieurs études montrent que les antibiotiques sont plus puissants lorsqu'ils agissent contre des inocula de faibles tailles (Soriano, Ponte et al. 1990; Thomson and Moland 2001; Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Udekwu, Parrish et al. 2009; Nannini, Stryjewski et al.). Nous avons également montré comme toutes ces études que nos deux antibiotiques sont plus puissants contre de petits inocula (10^5 UFC/mL) que contre de gros inocula (10^7 UFC/mL) de *P.multocida*. Ce gain de puissance des deux antibiotiques contre un faible inoculum pathogène permet d'améliorer grandement leur SI (2.36 et 47.69 respectivement

pour la cefquinome et l'amoxicilline). Cela montre que la sélectivité pharmacodynamique est dépendante de la taille de l'inoculum pathogène. De plus, ces résultats étayent les études qui montrent les avantages d'un traitement antibiotiques utilisant de faibles doses durant les phases précoces de l'infection (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949; Ferran, Kesteman et al. 2009; Ferran, Toutain et al.).

2.6. Conclusion

Actuellement, dans l'objectif de protéger la santé publique, les autorités encouragent l'utilisation préférentielle en médecine vétérinaire des antibiotiques "d'ancienne génération"(comme l'amoxicilline) plutôt que des antibiotiques de "dernière génération" (comme la cefquinome) mais cette stratégie a déjà montré ses limites en médecine humaine (Amyes, Walsh et al. 2007). Dans cette étude, nous avons proposé un nouvel indicateur, visant à déterminer, en plus de leur effet thérapeutique, les effets adverses des antibiotiques, particulièrement sur le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux. Celui-ci constitue potentiellement le principal réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (Andremont 2003; Phillips, Casewell et al. 2004).

Il convient de souligner que, dans nos expériences, nous avons seulement évalué une sélectivité pharmacodynamique grâce à de simples expériences *in vitro* et non une sélectivité thérapeutique globale, *in vivo*. Des expérimentations complémentaires permettant d'évaluer l'impact réel des antibiotiques sur le microbiote intestinal pourraient se révéler très intéressantes. Ainsi, la mesure de l'exposition aux concentrations libres d'antibiotique dans les différents segments du tube digestif doit être déterminée pour proposer un indice de sélectivité thérapeutique globale. En outre, pour affiner notre index pharmacodynamique, il serait nécessaire d'évaluer les effets «matrices» possibles (pH, O₂ ...) de la flore intestinale sur l'action pharmacodynamique des antibiotiques testés. À notre connaissance, aucun index n'est actuellement utilisé pour les antibiotiques et nous proposons ici d'introduire un tel index de sélectivité en médecine vétérinaire afin de faciliter le développement d'antibiotiques permettant de limiter l'émergence de la résistance aux antibiotiques et permettre ainsi une utilisation plus rationnelle des antibiotiques chez les animaux.

2.7. Manuscrit 1

1 Assessment of the selectivity of veterinary antibiotics on
2 the target pathogen vs. commensal flora: development
3 of a pharmacodynamic selectivity index for public health
4 protection

5

6 Maleck V. Vasseur^{1,2}, Aude A. Ferran^{1,2}, Pierre-Louis Toutain^{1,2} and Alain Bousquet-Mélou^{1,2*}

7

8 **Adresse**

9 ¹: INRA, UMR1331, Toxalim, Research Center in Food Toxicology, F-31027 Toulouse,
10 France.

11 ²: Université de Toulouse, INPT, ENVT, UMR1331, Toxalim, F-31076 Toulouse, France.

12 * Corresponding author. Mailing address : UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de
13 Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87 614, F-31076 Toulouse, France. Phone: +33 (0) 5
14 61 19 39 25. Fax: +33 (0) 5 61 19 39 17. E-mail: a.bousquet-melou@envt.fr

15

16

17

18 **Abstract**

19 **Background:** In terms of public health, an optimal use of antibiotic drugs in
20 veterinary medicine should have a minimal impact on animal gut flora and be as
21 selective as possible on the target pathogen. The aim of the present study was to
22 develop a selectivity index for the rational development of veterinary antibiotics.

23 **Results:** To illustrate our proposal, we compare by *in vitro* approaches, the
24 antimicrobial selectivity of two beta-lactam antibiotics namely amoxicillin (an old beta-
25 lactam) and cefquinome, (a recent fourth generation cephalosporin). Selectivity was
26 assessed using *E.coli*, an intestinal commensal bacterium in condition for which the
27 two tested antibiotics were able to eradicate a low or a large inoculum of *P.multocida*,
28 a typical veterinary lung pathogen. From killing curve obtained with amoxicillin and
29 cefquinome on *P.multocida* and *E.coli* inocula of 10^7 CFU/mL, we modelled
30 antibacterial effects by a sigmoid E_{max} inhibition model. A selectivity index
31 ($SI=EC_{STATIC\ E.c} / EC_{90\ P.m.}$) was used to express antibiotic concentrations allowing no
32 more than a bacteriostatic effect on *E.coli* while eradicating at least 90 % of
33 *P.multocida*. We found that the SI was higher for amoxicillin than for cefquinome. The
34 same experiments were carried out on a lower inoculum of *P.multocida*.
35 **Conclusions:** We found that the SI were higher for low (10^5 CFU/mL) than for the
36 high (10^7 CFU/mL) pathogen inoculum indicating that an early antibiotic treatment
37 could be more selective when the targeted bacterial burden is still low.

38

39 **Key words:**

40 Inoculum size, amoxicillin, cefquinome, *Pasteurella multocida*, *E.coli*.

41

42 **Background**

43

44 The main challenge of the sustainable use of antibiotics in animals consists in
45 minimizing the threat for public health, *via* the transmission of bacterial resistance to
46 antibiotics from animal to man. The probably most critical reservoir of resistance in
47 animals is their intestinal microbiota, from which it exists a possible transmission to
48 humans of either antibiotic resistant food-borne zoonotic pathogens, such as
49 *Salmonella*, *Campylobacter* or *E. coli* [1], and/or resistance genes located on mobile
50 genetic elements and harboured by all commensal - pathogenic or non-pathogenic -
51 bacteria [2, 3]. Like in human medicine, the final objective of an antimicrobial therapy
52 is to help the immune defences of the infected host to eradicate the targeted
53 pathogens, and until now, all veterinary antibiotic treatments have been designed to
54 optimise this objective.

55 Conversely, the antibiotic dosage regimens used today in animals have not been
56 optimized by taking into account the risk for human health such as defined above,
57 and they can even be deleterious for this reason, like any class of drugs that would
58 be developed without considering some adverse effects.

59 The ability of drugs to produce different pharmacological effects is described by two
60 pharmacodynamic properties, specificity and selectivity. Specificity refers to the
61 ability of a drug to produce one action but not another one; it has an absolute sense,
62 as it cannot change whatever the conditions. Selectivity also refers to the ability of a
63 drug to produce an action rather than another one, but in this case it has a relative
64 sense, as increasing the drug concentrations can lead to the drug producing the
65 second action. In that sense, selectivity is directly linked to the drug's relative
66 potencies for producing different effects, traducing that the drug concentrations

67 required to produce an effect (EC_{50} , EC_{90} ...) are (much) lower than those required to
68 produce another one.

69 In the case of antibiotics, specificity can refer to the spectrum of activity (broad or
70 narrow) that is a fixed property, based on the drug's mechanism of action. In parallel,
71 selectivity describes the fact that within a given class, the antibiotic can be more
72 potent against one bacterial species or strain compared to another one. Drug
73 potency is classically described by EC_{50} , which are (more or less) directly linked to
74 MIC in the case of antibiotics [4-6].

75 *In vivo*, an additional and major component of drug selectivity is the pharmacokinetic
76 one. Indeed pharmacokinetics, which determines the ability of a given dosage
77 regimen to produce different intensities of drug exposure in different organs or
78 tissues, can strongly impact drug selectivity in the situations where the sites of
79 therapeutic actions (the *in vivo* locations of the drug targets) have anatomical location
80 different to those of the unwanted adverse actions. In the context of animal
81 antibiotherapy described above, the former being pathogenic inocula at the sites of
82 infection and the latter being the gut microbiota. Whereas pharmacodynamic
83 selectivity depends on the drug-bug interactions, pharmacokinetic selectivity is
84 influenced by the route of administration – for example, oral *versus* non oral
85 administration - and by the dosage regimens, which together determine the final
86 concentrations at the different sites of action.

87 Recent improvements in dosage regimens were linked to pharmacodynamic
88 investigations, enabling to define the antibiotic concentration levels that are
89 associated with the higher probability of favourable outcomes. In particular, *in vitro*
90 studies and *in vivo* models of infection provided an increasing understanding of the
91 impact of the pathogen inoculum size on antimicrobial activity, and demonstrated that

92 antibiotics can be more potent against low rather than high bacterial inoculum.
93 Therefore, it might hypothesized that the inoculum effect could impact the pathogen-
94 to-commensal selectivity of veterinary antibiotics.

95 In the present work, we compared the pharmacodynamic selectivity of two beta-
96 lactam antibiotics namely amoxicillin and cefquinome, a recent fourth-generation
97 cephalosporin marketed in animals. *Pasteurella multocida* was chosen as a
98 prototypic pathogen responsible for lung infection in animals and *Escherichia coli*, as
99 the representative of the commensal *Enterobacteriaceae* of digestive tract of
100 mammals. Antibacterial activities of amoxicillin and cefquinome were assessed
101 against low (10^5 CFU/mL) and high (10^7 CFU/mL) inocula of *Pasteurella multocida*,
102 representing bacterial burden in early and late steps of pulmonary infection.

103 **Results**

104

105 **Susceptibility testing**

106 The MIC of amoxicillin for *P. multocida* and *E. coli* were 0.125 and 4 µg/mL,
107 respectively. The MIC of cefquinome for *P. multocida* and *E. coli* were 0.016 and
108 0.064 µg/mL, respectively.

109

110 **Killing curves**

111 The time-kill curves obtained with the high (10^7 CFU/mL) inocula of *P. multocida* and
112 *E. coli* exposed to amoxicillin and cefquinome are shown in figure 1. For this
113 inoculum size, in the absence of antimicrobial drug, *P. multocida* and *E. coli* grew
114 exponentially during 8 and 4 hours to 10^9 CFU/mL and remained stable up to the end
115 of the incubation time.

116 For *P. multocida*, a concentration of 4-fold the MIC of both amoxicillin and cefquinome
117 maintained bacterial density between 10^7 and 10^8 CFU/mL *i.e.* was bacteriostatic,
118 whereas higher concentrations produced net bacterial killing (Figure 1, panels A and
119 C). In addition, the lowest bactericidal concentration (99.9% reduction of initial
120 inoculum) was 16-fold the MIC for both amoxicillin and cefquinome (Figure 1, panels
121 A and C).

122 For *E. coli*, a concentration of 4-fold the MIC of both antibiotics produced bacterial
123 counts below 10^8 CFU/mL and higher concentrations (over 8 fold the MIC) allowed
124 bacterial killing. In addition, the lowest bactericidal concentration (99.9% reduction of
125 initial inoculum) was 8-fold the MIC for amoxicillin and 4-fold the MIC for cefquinome
126 (Figure 1, panels B and D).

127

128 Mean inoculum growth and antibacterial activities

129 Mean Inoculum Growth *versus* antibiotic concentration are presented in figure 2. The
130 curves were fitted to the pharmacodynamic model described in equation 2, and the
131 estimated parameters are given in Table 1. For both bacteria strains, the EC_{STATIC} of
132 cefquinome was lower than that of amoxicillin. EC_{STATIC} of amoxicillin was 4.2 fold the
133 MIC for both bacterial species, whereas EC_{STATIC} of cefquinome was 2.7 and 4.7 fold
134 the MIC for *E.coli* and *P.multocida*, respectively. For *P.multocida*, ΔI_{MIN} , which is the
135 parameter expressing the capacity of the antibiotic to reduce the initial bacterial
136 inoculum, was almost identical for amoxicillin and cefquinome (-2.91 vs -2.80 log
137 CFU/mL).

138 By considering *P.multocida* (10^7 CFU/mL) as a target pathogen to eradicate and
139 *E.coli* (10^7 CFU/mL) as a bacterium to preserve, we compared for each antibiotic the
140 relation between drug concentrations and mean inoculum changes (Figure 2). For
141 amoxicillin (Figure 2A), the curve representing antibacterial activity against
142 *P.multocida* was shifted to the left compared to the activity against *E.coli*, meaning
143 that amoxicillin was more potent against *P.multocida* than *E.coli*. Moreover, Figure
144 2A indicated that amoxicillin concentration achieving 90% of maximal activity against
145 *P.multocida* (EC_{90}^{pm}) was without any effect against *E.coli* inoculum. For cefquinome,
146 Figure 2B showed an overlap between the curves representing antibacterial activity
147 against *P.multocida* and *E.coli*, exemplified by the observation that cefquinome
148 concentration achieving 90% of maximal activity against *P.multocida* (EC_{90}^{pm})
149 produced a significant killing effect against *E.coli* inoculum.

150

151 Quantification of pharmacodynamic selectivity

152 We built the selectivity index (SI) according to Equation 3 in order to quantify the

153 difference of antibacterial activities between both bacterial species. Antimicrobial
154 drug concentrations giving 90% of maximal antibacterial effect on *P. multocida* (EC_{90}^{pm})
155 were computed using equation 4 and they are reported in Table 2. Selectivity index
156 calculated from equation 3 was 5.78 for amoxicillin, indicating that the concentration
157 achieving the "lowest acceptable level of desired effect" was about 5-6 times lower
158 than the concentration producing the "highest acceptable level of adverse effect"
159 (grey area, Figure 2A). In contrast, SI value was 0.74 for cefquinome ($EC_{STATIC}^{coli} <$
160 EC_{90}^{pm} , Figure 2B), confirming the overlap of concentrations ranges producing the
161 desired and unwanted effects.

162

163 **Antibacterial activity against low inoculum of pathogenic bacteria**

164 *In vitro* antibacterial activities of amoxicillin and cefquinome were assessed against a
165 lower initial inoculum (10^5 CFU/mL) of *P. multocida* (Figure 3). In the absence of
166 antibiotic, the initial *Pasteurella* inoculum grew exponentially to 10^9 CFU/mL at 10
167 hours and then remained stable until the end of the incubation. The concentration
168 equal to MIC allowed maintaining bacterial density below 10^8 CFU/mL and higher
169 concentrations produced bacterial killing. The lowest bactericidal concentration
170 (99.9% reduction of initial inoculum) was 8-fold the MIC for both amoxicillin and
171 cefquinome (Figure 3).

172 The relations between Mean Inoculum Growth and antibiotic concentrations were
173 fitted to the pharmacodynamic model described in equation 2 and the results are
174 shown in figure 4 and table 3. EC_{STATIC} of amoxicillin and cefquinome against low
175 (10^5 CFU/mL) inoculum of *P. multocida* were 1.44- and 1.62-fold the respective MIC,
176 which was about 3 times lower than for the high (10^7 CFU/mL) inoculum (Tables 1
177 and 3). The values of EC_{90}^{pm} determined using equation 4 were 0.35 and 0.72 μ g/mL

8

178 for amoxicillin and cefquinome (Table 4), *i.e.* 8- and 3-fold lower than the EC_{90}^{pm}
179 obtained against the higher inocula of 10^7 CFU/mL, respectively.

180 The values of selectivity indexes when incorporating antibacterial activity against low
181 size *P. multocida* inocula were 47.7 and 2.36 for amoxicillin and cefquinome
182 respectively (Figure 4 and Table 4), indicating an increase of antibiotic selectivity
183 when acting on a low rather than on a high pathogenic inoculum (grey area, Figure
184 4).

185

186

187 **Distribution of selectivity index**

188 We considered the distribution of MIC of amoxicillin for *P. multocida* and *E. coli* as
189 given by EUCAST in order to calculate different values of the selectivity index,
190 reflecting some situations at population level. The SI values were obtained using
191 equation 7 and presented in Table 5. For *E. coli*, the bacteria to preserve, we only
192 have taken into account the bacteria which were considered as sensible to
193 amoxicillin ($MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$). We considered two scenarios for each inoculum size of
194 *P. multocida* (10^5 and 10^7 CFU/mL). For all the situations, we chose to fix, for *E. coli*,
195 the critical concentration of amoxicillin at the MIC of 50% of the sensible strains (*i.e.*,
196 $4 \mu\text{g/mL}$). For *P. multocida*, we fixed the critical amoxicillin concentration to attain at
197 the MIC of 50 or 90% (*i.e.*, 0.25 and $0.5 \mu\text{g/mL}$ respectively). For the high pathogenic
198 inoculum, we estimated the SI at 2.94 and 1.47 for 50% and 90% of the *P. multocida*
199 strains respectively. For the low pathogenic inoculum, we estimated the SI at 23.72
200 and 11.86 for 50% and 90% of the *P. multocida* strains respectively (Table 5).

201

202

203 **Discussion**

204

205 The aim of this study was to investigate optimal properties required for the use of
206 antibiotics in animals. Antimicrobial resistance being recognized as an increasing
207 threat for human health, antimicrobial therapy in animals should now be re-assessed
208 in the light of its consequences for human health. All bacterial commensal flora
209 harboured by animals can serve as reservoirs for antimicrobial resistance
210 determinant, such as those present in the oro-pharyngeal area, the skin, or the distal
211 segments of the intestines. Among these reservoirs, the intestinal microbiota has
212 been recognized as the critical bacterial ecosystem involved in the emergence and
213 spread of antimicrobial resistance at risk for human health. Consequently, the
214 ultimate goal of a prudent use of veterinary antibiotics should be to minimise their
215 adverse effects on gut microbiota while obtaining desired effects on the target
216 pathogen. In the present experiment, we developed an index to assess and quantify
217 the pharmacodynamic component for an optimal selectivity of veterinary antibiotics,
218 warranting the combination of acceptable efficacy against animal pathogens and
219 minimal risks for human health. We selected *Pasteurella multocida* as a typical
220 pathogen representative of pulmonary infection in pig and cattle and we selected
221 *E.coli*, an indicator bacteria regularly used to survey impact of antibiotic on
222 commensal *Enterobacteriaceae*.

223 Two beta-lactam antibiotics - amoxicillin and cefquinome - were chosen to contrast
224 the selectivity of an ancient and a new antibiotic, which have the same mechanism of
225 action.

226 Benefit-risk balance :

227 - Benefit « here and now » for the patient,

228 - Risk disconnected, because not the same population, not the same time frame
229 "others and later"

230 The MIC of amoxicillin for the tested *Pasteurella multocida* and *E.coli* strains were
231 0.125µg/mL and 4µg/mL respectively corresponding to the modal MIC for these
232 antibiotics. MIC of cefquinome for the *P.multocida* strain was similar to the MIC₉₀ for
233 *P.multocida* [8] and to the MIC₄₅ for *E.coli* [9].

234

235 ... may support the optimization of dosage regimens and generate hypotheses on
236 how to minimize the emergence of resistance for new and established antibiotics ...

237

238 The killing curves over 24 hours were used as pharmacodynamic endpoint because
239 they reflect both the extent and the rate of antibiotic killing activity and take into
240 account bacteria in different physiological conditions (such as persister bacteria).

241 According to Regoes and Ankomah [10, 11], we used a reparametrization of the
242 classical pharmacodynamic Emax model based on the variation of bacterial density
243 as a function of antibiotic concentration, allowing the direct estimation of the
244 bacteriostatic concentration (EC_{STATIC}), a pivotal parameter for the quantification of
245 antibiotic effects.

246 Using this modelling approach, it was shown that cefquinome is a more potent
247 substance than amoxicillin (amoxicillin EC_{STATIC} / cefquinome EC_{STATIC} ratio of 7 for
248 10⁷ CFU/mL *P.multocida* and of 99 for 10⁷ CFU/mL *E.coli* respectively). However,
249 potency related to therapeutic effect is not the only relevant parameter to consider for
250 selecting a drug, as an appropriate *in vivo* dosing regimen requires being both
251 efficacious and safe. Selectivity, which combines potencies related to both
252 therapeutic and adverse effects, is a much more relevant parameter for screening

253 candidate drugs. In the present experiments we propose a new index, homogenous
254 to a classical therapeutic index, to quantify the pharmacodynamic selectivity of
255 antibiotics, with particular focus for antibiotics used in animals.

256 From the objectives of an antibiotherapy in animals we propose, *i.e.* optimal efficacy
257 against animal pathogens and minimal impact on animal gut microbiota, we defined
258 the potency for the therapeutic effect as the concentration able to achieve 90% of
259 maximal antibacterial effect against *P.multocida* (EC_{90}^{pm}) and the concentration
260 associated with bacteriostatic effect against *E. coli* (EC_{STATIC}^{coli}) for the unwanted effect.

261 A similar approach was already followed to assess selectivity of Non Steroidal Anti-
262 inflammatory Drugs (NSAIDs) regarding inhibition of the two enzymatic targets, the
263 cyclo-oxygenases COX-1 and COX-2, associated with therapeutic and adverse
264 effects ; this led to classify NSAIDs as "COX-2 selective" when the value of the
265 selectivity ratio is at least 100, and " COX-2 preferential" if its value is at least of 30
266 [12]. To our knowledge no such index is currently used for antibiotics and we suggest
267 here to introduce such a selectivity index in veterinary medicine to facilitate an
268 informed screening and use of antibiotics in animals.

269

270 The main difference between antibiotics and other classes of drugs when discussing
271 the question of selectivity is associated to the fact that selectivity cannot be
272 summarize by a single point estimate as for NSAIDs but can only be expressed by a
273 joint distribution taking into account the distribution of the susceptibility of the target
274 pathogen and distribution of the untargeted bacteria; then we propose to consider as
275 a selectivity index the quantile 10% of this joint distribution *i.e.*, that for more than
276 90% of the cases, the selectivity index should be actually higher than this critical
277 value of the 10th quantile.

278

279 When testing a large *Pasteurella inoculum* size (10^7 CFU/mL) corresponding to a
280 fully established infection, we estimated the SI to less than 1 for cefquinome and to
281 5.78 for amoxicillin *i.e.* to low or very low values indicating that none of the two tested
282 antibiotics can be considered as pharmacodynamically selective. When testing a
283 lower *Pasteurella inoculum* size (10^5 CFU/mL) corresponding to an early treatment
284 when symptoms are not yet expressed.

285 We first showed that the two investigated drugs were more potent than for a high (10^7
286 CFU/mL) inoculum load, in agreement with results of other studies [13-15]. More
287 importantly, we showed that the SI were larger (2.36 and 47.69 for cefquinome and
288 amoxicillin respectively) indicating that pharmacodynamic selectivity is an inoculum
289 size dependent variable rather than a fixed substance parameters. In addition, this
290 result supports the advantage to treat as early as possible any infection [16-19].
291 Interestingly, amoxicillin SI value of our experiments is almost equal to the median
292 value found in SI populational simulation, indicating that our results obtained for two
293 strains (one pathogen and one commensal) are closed to the majority of strains
294 found in whole population.

295 It should be stressed that in our experiments, we only evaluated a pharmacodynamic
296 selectivity and not an overall therapeutic selectivity; *in vivo*, the actual impact of any
297 antibiotic on gut flora will be also dependent of their actual free concentrations in the
298 gut microbiota. Thus, measurements of free antibiotic exposure in the different
299 segments of digestive tract of the different domestic species must be done to
300 propose an overall therapeutic selectivity index that is by essence is a PK/PD index.
301 Such overall PK/PD index could be easily obtained by scaling the proposed
302 pharmacodynamics index by the ratio of plasma vs. local intestinal concentration, the

13

303 free plasma concentration being the best surrogate of the target biophase
304 concentration [20]. In addition, to refine our pharmacodynamics index, it would be
305 necessary to assess the possible "matrix effect" (pH, O₂...) of the gut flora on the
306 pharmacodynamic action of tested antibiotics.

307

308 Traditionally, from a public health perspective, it is encouraged in veterinary medicine
309 to favour the use of old antibiotics (as amoxicillin) rather than the use of more recent
310 antibiotics (as cefquinome) but this strategy was shown to be flawed in man for
311 fluoroquinolones, cephalosporins [21]. The only sound approach to select the most
312 appropriate antibiotic (old or new) in veterinary medicine is to assess experimentally
313 their detrimental effect on gut flora for a given regimen (route of administration and
314 dosage level) *i.e.*, to assess their selectivity regarding the site of the therapeutic
315 action vs. the gut microbiota.

316

317

318 **Conclusion**

319 The advantage of our pharmacodynamic index is that it can be obtained with a
320 minimal experimental effort very early in a rational veterinary drug development and
321 then, it is suitable as a screening tool for the rational development of future veterinary
322 antibiotics.

323

324

325 **Methods**

326

327 **Bacterial strains:** *Escherichia coli* ATCC 25922 and a strain of *Pasteurella*
328 *multocida*, isolated from the trachea of a pig with clinical symptoms of a bacterial lung
329 infection, were used for all experiments. These two bacterial strains were selected
330 because they have a susceptibility to amoxicillin and cefquinome very close to those
331 of wild strains [9, 22].

332

333 **Antimicrobial drugs:** Amoxicillin sodium (Clamoxyl® 1g for injectable suspension,
334 GSK, France) and cefquinome sulphate (Cobactan® IV-IM 4.5%, Intervet, France)
335 were used for all the assays.

336

337 **MIC determination:** MIC were determined in triplicate for the two bacterial strains (*E.*
338 *coli* and *P. multocida*) by broth microdilution according to the CLSI reference
339 methods [23].

340

341 **Time-kill curves:** Suspensions of *P. multocida* or *E. coli* with 0.42-0.46 optical
342 density (600 nm), corresponding to 4.10^8 CFU/mL, were prepared in Mueller-Hinton
343 (MH) broth from an overnight culture. They were then diluted to prepare suspensions
344 containing 10^5 or 10^7 CFU/mL. These suspensions were incubated for one hour and
345 then different concentrations of amoxicillin or cefquinome (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32
346 and 64 fold the MIC) were added to the suspension. Samples of 500 μ L were
347 collected in each suspension at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h after administration of
348 the drug and centrifuged (3000g, 10 minutes, 20°C). The supernatants were
349 discarded to prevent carry-over of the antimicrobial drug activity and the bacterial

350 pellets were resuspended in 500 μ L of fresh MH broth for bacterial counting. Serial
 351 10-fold dilutions were plated on MH agar and counting was performed after
 352 incubation at 37°C for overnight. Each experiment was performed in triplicate. The
 353 limit of quantification (LOQ) of the bacterial concentration was 100 CFU/mL.

354

355 **Determination of mean inoculum:** From each time-kill curve, we determined the
 356 area under the log CFU/mL *versus* time curve (AUC) from 0 to 24 hours by the
 357 trapezoidal approach. When bacterial counts were under the LOQ (100 CFU/mL),
 358 they were fixed at 10 CFU/mL. We then divided each AUC by the duration of
 359 incubation (24 hours), giving an average inoculum size over the time interval.

360

361 **Mean Inoculum Growth:** The Mean Inoculum Growth was defined as following:

$$362 \quad \Delta I(a) = I(a) - I_{\text{BASAL}} \quad (\text{Equation 1})$$

363 where $I(a)$ (log CFU/mL) is the mean inoculum obtained with the antibiotic
 364 concentration a , and I_{BASAL} (log CFU/mL) is the initial inoculum size.

365

366 **Modelling of the Mean Inoculum Growth:** The Mean Inoculum Growth was
 367 modelled as a function of the antibiotic concentration (a) using a sigmoid dose-
 368 response effect model (WinNonlin® software, Pharsight, Mountain view):

$$369 \quad \Delta I(a) = \Delta I_{\text{MAX}} \frac{(\Delta I_{\text{MAX}} - \Delta I_{\text{MIN}}) \times \left(\frac{a}{\text{EC}_{\text{STATIC}}} \right)^T}{\left(\frac{a}{\text{EC}_{\text{STATIC}}} \right)^T + \frac{\Delta I_{\text{MIN}}}{\Delta I_{\text{MAX}}}} \quad (\text{Equation 2})$$

370 where $\Delta I(a)$ (log CFU/mL) is as previously defined, ΔI_{MAX} (log CFU/mL) is the
 371 maximal Mean Inoculum Growth obtained without antibiotic, ΔI_{MIN} (log CFU/mL) is
 372 the minimal Mean Inoculum Growth obtained when increasing antibiotic

373 concentrations (maximal bacterial killing), EC_{STATIC} ($\mu\text{g/mL}$) is the antibiotic
 374 concentration producing no net growth of the mean inoculum *i.e.*, $I(EC_{\text{STATIC}}) = I_{\text{BASAL}}$
 375 and $\Delta I(EC_{\text{STATIC}}) = 0$, and γ is the sigmoid coefficient of the curve. This model was
 376 developed in a previous study [11] as a reparametrisation of the classical sigmoid-
 377 Emax model.

378

379 **Selectivity index:** To quantify amoxicillin and cefquinome selectivity, a selectivity
 380 index (SI) was defined as the ratio of drug concentration producing the highest
 381 acceptable level of adverse effect over drug concentration producing the lowest
 382 acceptable level of desired effect:

383

$$384 \quad SI = \frac{\text{Antibiotic concentration producing the highest acceptable level of adverse effect}}{\text{Antibiotic concentration producing the lowest acceptable level of desired effect}}$$

385

386 In the context of this study, SI was written as follows:

$$387 \quad SI = \frac{EC_{\text{STATIC}}^{\text{coli}}}{EC_{90}^{\text{pm}}} \quad (\text{Equation 3})$$

388 where the highest acceptable level of adverse effect was defined by $EC_{\text{STATIC}}^{\text{coli}}$ which
 389 is the antimicrobial concentration producing a bacteriostatic effect against *E.coli*, the
 390 indicator bacteria of the *Enterobacteriaceae* gut reservoir, and the lowest acceptable
 391 level of desired effect was defined by EC_{90}^{pm} which is the antimicrobial concentration
 392 producing 90% of its maximal antibacterial effect against the lung pathogen
 393 *P.multocida*.

394 EC_{90}^{pm} was obtained from the following equation, which gives the effective
 395 concentration (EC) producing any given percentage of the maximal antibacterial
 396 effect:

$$397 \quad EC_{x\%} = EC_{STATIC} \times \left(\frac{x_{\%}}{x_{\%} - 100} \right)^{\frac{1}{\gamma}} \times \left(\frac{\Delta I_{MIN}}{\Delta I_{MAX}} \right)^{\frac{1}{\gamma}} \quad (\text{Equation 4})$$

398 where $EC_{x\%}$ ($\mu\text{g/mL}$) is the antibiotic concentration (a) producing a given percentage
 399 ($x\%$) of the maximal antibacterial effect E_{MAX} ($E_{MAX} = \Delta I_{MAX} - \Delta I_{MIN}$); EC_{STATIC} , ΔI_{MIN} ,
 400 ΔI_{MAX} and γ are as previously defined.

401

402 **Computation of a population pharmacodynamic Selectivity Index:**

403 By assuming a proportional relation between effective concentrations of antibiotics
 404 and MIC, EC_{STATIC} for *P.multocida* and *E.coli* were expressed as multiple of their
 405 respective MIC:

406

$$407 \quad EC_{STATIC}^{coli} = \alpha \times MIC_{coli} \quad (\text{Equation 5})$$

$$408 \quad EC_{STATIC}^{pm} = \beta \times MIC_{pm} \quad (\text{Equation 6})$$

409

410 By incorporating equations 4, 5 and 6 into equation 3, we obtained:

411

$$412 \quad SI = \frac{\alpha \times MIC_{coli}}{\beta \times MIC_{pm} \times \left(\frac{\Delta I_{MIN}^{pm}}{\Delta I_{MAX}^{pm}} \right)^{\frac{1}{\gamma_{pm}}}} \quad (\text{Equation 7})$$

413

414 Equation 7 was used with the distributions of MIC of amoxicillin for *P.multocida* and
415 *E.coli* published by EUCAST (http://www.eucast.org/mic_distributions/) for computing
416 the SI at population level. .

417 REFERENCES

418

- 419 1. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M,
420 Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F *et al*: **Food-borne diseases - the challenges of 20 years**
421 **ago still persist while new ones continue to emerge**. *Int J Food Microbiol*, 139 Suppl 1:S3-
422 15.
- 423 2. Andremont A: [Consequences of antibiotic therapy to the Intestinal ecosystem]. *Ann Fr*
424 *Anesth Reanim* 2000, 19(5):395-402.
- 425 3. Salyers AA, Gupta A, Wang Y: **Human Intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic**
426 **resistance genes**. *Trends Microbiol* 2004, 12(9):412-416.
- 427 4. Mouton JW, Vinks AA: **Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in**
428 **vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory**
429 **concentration versus stationary concentration**. *Clin Pharmacokinet* 2005, 44(2):201-210.
- 430 5. Mouton JW, Vinks AA: **Relationship between minimum inhibitory concentration and**
431 **stationary concentration revisited: growth rates and minimum bactericidal**
432 **concentrations**. *Clin Pharmacokinet* 2005, 44(7):767-768.
- 433 6. Bulitta JB, Ly NS, Yang JC, Forrest A, Jusko WJ, Tsuji BT: **Development and qualification**
434 **of a pharmacodynamic model for the pronounced inoculum effect of ceftazidime**
435 **against Pseudomonas aeruginosa**. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53(1):46-56.
- 436 7. Ungemach FR, Muller-Bahrdt D, Abraham G: **Guidelines for prudent use of antimicrobials**
437 **and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine**. *Int J Med Microbiol*
438 2006, 296 Suppl 41:33-38.
- 439 8. ANSES, ANMV, **Liste des médicaments vétérinaires autorisés classés par ordre**
440 **alphabétique de leur nom, COBACTAN LA 7,5 %** [<http://www.ircp.anmv.anses.fr/>]
- 441 9. Aarestrup FM, Hasman H, Veldman K, Mevius D: **Evaluation of eight different**
442 **cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in Salmonella enterica and**
443 **Escherichia coli**. *Microb Drug Resist*, 16(4):253-261.
- 444 10. Ankomah P, Levin BR: **Two-Drug Antimicrobial Chemotherapy: A Mathematical Model**
445 **and Experiments with Mycobacterium marinum**. *PLoS Pathog*, 8(1):e1002487.
- 446 11. Regoes RR, Wiuff C, Zappala RM, Garner KN, Baquero F, Levin BR: **Pharmacodynamic**
447 **functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens**.
448 *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(10):3670-3676.
- 449 12. Knights KM, Mangoni AA, Miners JO: **Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs:**
450 **Implications for understanding toxicity**. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 3(6):769-776.
- 451 13. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH, Corey GR, Fowler VG, Jr., Murray BE:
452 **Determination of an inoculum effect with various cephalosporins among clinical**
453 **isolates of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus**. *Antimicrob Agents Chemother*
454 2010, 54(5):2206-2208.
- 455 14. Soriano F, Ponte C, Santamaria M, Jimenez-Arriero M: **Relevance of the inoculum effect of**
456 **antibiotics in the outcome of experimental infections caused by Escherichia coli**. *J*
457 *Antimicrob Chemother* 1990, 25(4):621-627.
- 458 15. Thomson KS, Moland ES: **Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in**
459 **tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae**. *Antimicrob*
460 *Agents Chemother* 2001, 45(12):3548-3554.
- 461 16. Eagle H: **The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the**
462 **curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci,**
463 **and Treponema pallidum**. *J Exp Med* 1949, 90(6):595-607.
- 464 17. Eagle H, Magnuson HJ, Fleischman R: **Relation of the Size of the Inoculum and the Age of**
465 **the Infection to the Curative Dose of Penicillin in Experimental Syphilis, with Particular**
466 **Reference to the Feasibility of its Prophylactic Use**. *J Exp Med* 1947, 85(4):423-440.
- 467 18. Ferran AA, Kesteman AS, Toutain PL, Bousquet-Melou A:
468 **Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the**
469 **selection of resistance in Escherichia coli by a quinolone in a mouse thigh bacterial**
470 **infection model**. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53(8):3384-3390.
- 471 19. Ferran AA, Toutain PL, Bousquet-Melou A: **Impact of early versus later fluoroquinolone**
472 **treatment on the clinical, microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung**
473 **model of Pasteurella multocida infection**. *Vet Microbiol* 2011, 148(2-4):292-297.

20

- 474 20. Toutain PL, Lees P: **Integration and modelling of pharmacokinetic and**
475 **pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine.** *J Vet*
476 *Pharmacol Ther* 2004, **27**(6):467-477.
- 477 21. Amyes SG, Walsh FM, Bradley JS: **Best in class: a good principle for antibiotic usage to**
478 **limit resistance development?** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(5):825-826.
- 479 22. [<http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init>]
- 480 23. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for**
481 **Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.M100-**
482 **S15 CLSI, Villanova,PA, USA 2009.**

Table 1 Pharmacodynamic parameters^a of ΔI curves of 10^7 CFU/mL Inoculum

	Antibiotic drug	EC _{STATIC} ^b (µg/mL)	MIC/EC _{STATIC}	γ^c	ΔI_{MAX}^d (Log CFU/mL)	ΔI_{MIN}^e (Log CFU/mL)
<i>P. multocida</i>	amoxicillin	0.53±0.03	4.24	1.50±0.16	2.07±0.11	-2.91±0.16
	cefquinome	0.075±0.002	4.68	2.32±0.16	2.01±0.06	-2.80±0.07
<i>E. coli</i>	amoxicillin	16.69±1.23	4.17	1.92±0.28	2.55±0.21	-5.52±0.29
	cefquinome	0.168±0.005	2.63	3.49±0.29	2.33±0.10	-5.03±0.09

^a Mean±SE

^b Antibiotic drug concentration producing bacteriostatic effect.

^c Sigmoid coefficient of the curve.

^d Maximal augmentation of initial bacterial inoculum.

^e Maximal diminution of initial bacterial inoculum.

Table 2 Values of selectivity Index for *P. multocida* inoculum of 10^7 CFU/mL

	EC ₉₀ ^{pm} ^a (µg/mL)	EC _{STATIC} ^{coli} ^b (µg/mL)	SI = $\frac{EC_{STATIC}^{coli}}{EC_{90}^{pm}}$
Amoxicillin	2.89	16.69	5.78
Cefquinom ^e	0.23	0.17	0.74

^a Antibiotic drug concentration producing 90% of the antibacterial effect on *P. multocida*.

^b Antibiotic drug concentration producing bacteriostatic effect on 10^7 CFU/mL *E. coli*.

Table 3 Pharmacodynamic parameters^a of ΔI curves of 10^8 CFU/mL *P. multocida* Inoculum

Antibiotic drug	EC _{STATIC} ^b (µg/mL)	MIC/EC _{STATIC}	γ^c	ΔI_{MAX}^d (Log CFU/mL)	ΔI_{MIN}^e (Log CFU/mL)
amoxicillin	0.18±0.01	1.44	2.19±0.37	3.68±0.26	-1.77±0.13
cefquinome	0.026±0.001	1.62	1.92±0.14	3.71±0.13	-2.85±0.08

^a Mean±SE

^b Antibiotic drug concentration producing bacteriostatic effect.

^c Sigmoid coefficient of the curve.

^d Maximal augmentation of initial bacterial inoculum.

^e Maximal diminution of initial bacterial inoculum.

Table 4 Values of selectivity Index for *P.multocida* inoculum of 10⁷ CFU/mL

	EC ₉₀ ^{pm} ^a (µg/mL)	EC _{STATIC} ^{coli} ^b (µg/mL)	SI = $\frac{EC_{STATIC}^{coli}}{EC_{90}^{pm}}$
Amoxicillin	0.35	16.69	47.69
Cefquinom	0.072	0.17	2.36

^a Antibiotic drug concentration producing 90% of the antibacterial effect on *P.multocida*.

^b Antibiotic drug concentration producing 35% of the antibacterial effect on 10⁷ CFU/mL *E.coli*.

Table 5 Determination of selectivity Index from EUCAST distribution values of MIC for amoxicillin

	MIC value (µg/mL)	Inoculum size (CFU/mL)	SI values
<i>E.coli</i> MIC ₅₀ ^a	4	10 ⁷	-
<i>P.multocida</i> MIC ₅₀ ^b	0.25	10 ⁷	2.94
<i>P.multocida</i> MIC ₉₀ ^c	0.5	10 ⁷	1.47
<i>P.multocida</i> MIC ₅₀ ^b	0.25	10 ⁶	23.72
<i>P.multocida</i> MIC ₉₀ ^c	0.5	10 ⁵	11.86

^a MIC value of amoxicillin for 50% of tested sensible *E.coli* strains.

^b MIC value of amoxicillin for 50% of tested *P.multocida* strains.

^c MIC value of amoxicillin for 90% of tested *P.multocida* strains

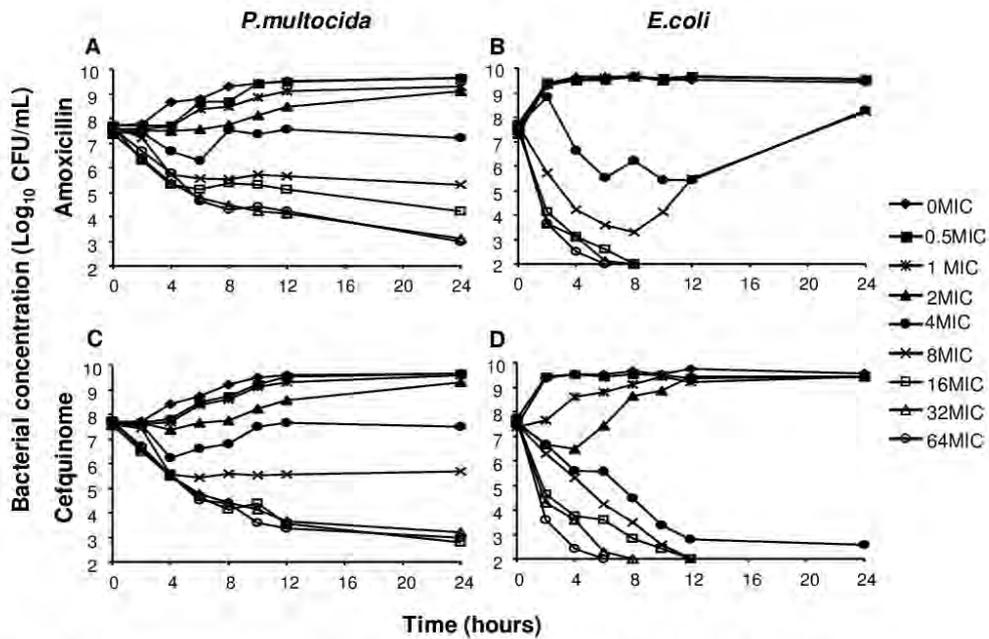


Figure 1 Killing curves of amoxicillin (A, B) and cefquinome (C, D) against 10⁷ CFU/mL *P.multocida* (A, C) and *E.coli* (B, D). Antibiotic concentrations are expressed in MIC multiple: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64.

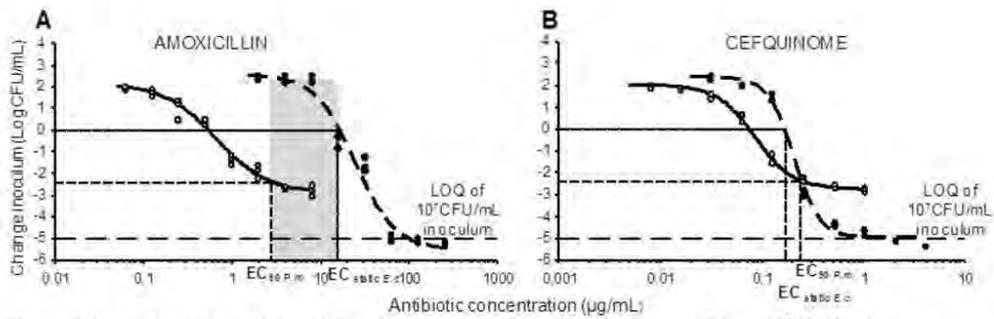


Figure 2 *In vitro* antibacterial activity of amoxicillin (A) and cefquinome (B) on 10^7 CFU/mL *E.coli* (—) and *P.multocida* (---). A) The grey area corresponds to the concentration range between EC_{STATIC} of amoxicillin for *Escherichia coli* ($EC_{STATIC}^{E.c.}$) and EC_{90} of amoxicillin for *Pasteurella multocida* ($EC_{90}^{P.m.}$). B) No grey area: EC_{STATIC} of cefquinome for *Escherichia coli* ($EC_{STATIC}^{E.c.}$) was lower than EC_{90} of cefquinome for *Pasteurella multocida* ($EC_{90}^{P.m.}$) Observed data (circles) were fitted by equation 2.

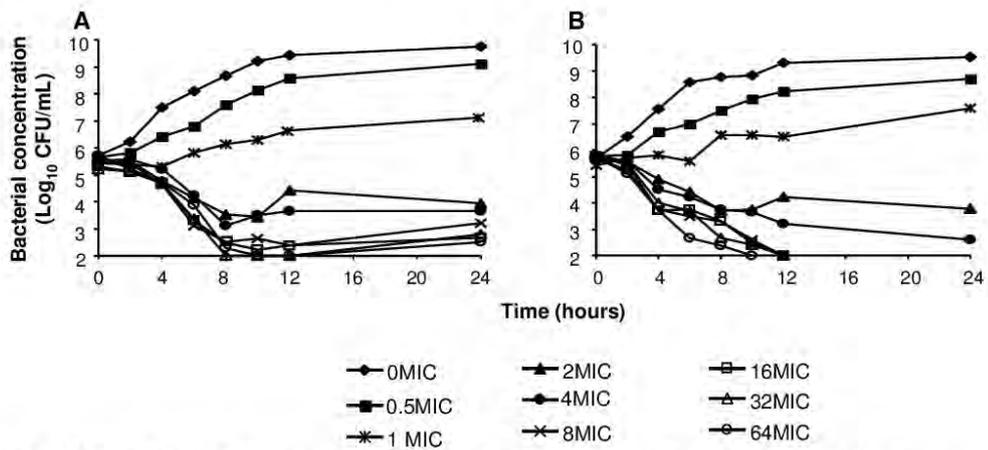


Figure 3 Killing curves of amoxicillin (A) and cefquinome (B) against 10^5 CFU/mL *P.multocida*. Antibiotic concentrations are expressed in MIC multiple: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64.

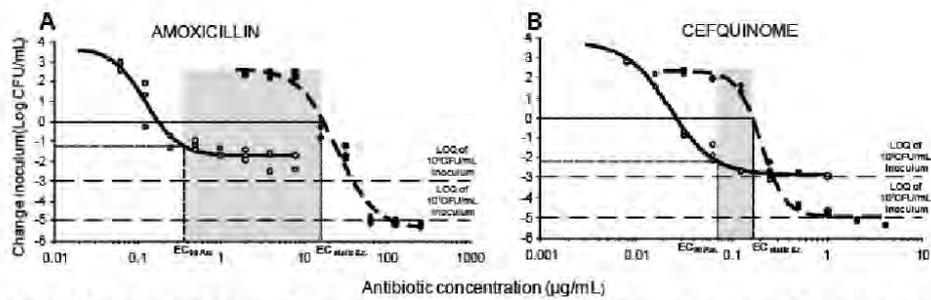


Figure 4 *In vitro* antibacterial activity of amoxicillin (A) or cefquinome (B) on 10^7 CFU/mL *E.coli* (—) and 10^5 CFU/mL *P.multocida* (---). In panels A and B, the grey area corresponds to the concentration range between EC_{STATIC} for *Escherichia coli* (EC_{STATIC}^{coli}) and EC_{90} for *Pasteurella multocida* (EC_{90}^{pm}). Observed data (circles) were fitted by equation 2.

Chapitre 3

ETUDE EXPERIMENTALE

**Impact de la taille de la charge bactérienne
et de la précocité du traitement sur la
guérison clinique et microbiologique d'une
infection pulmonaire**

CHAPITRE 3 - ETUDE EXPERIMENTALE

3. Impact de la taille de la charge bactérienne et de la précocité du traitement sur la guérison clinique et microbiologique d'une infection pulmonaire

Cette partie du travail de thèse a donné lieu à un manuscrit en préparation intitulé: « Impact of inoculum size and early antibiotic treatment on the clinical and microbiological outcomes in experimental pneumonia: implications for dosage regimens » (voir paragraphe 3.7).

3.1. Introduction

Les enjeux de santé publique liés à l'antibiorésistance et le rôle clé joué par la flore commensale du tube digestif dans cette problématique (Andremont 2003) se traduisent par de nouvelles exigences vis-à-vis de l'antibiothérapie, chez l'Homme et chez les animaux. Un ensemble de mesures ont été proposées pour réduire la résistance aux antibiotiques, dans une perspective globale qualifiée «d'éco-evo» (Baquero, Coque et al.), parmi lesquelles des stratégies visant la conception de nouveaux schémas posologiques pour les antibiotiques qui permettraient d'atteindre simultanément l'efficacité clinique mais également de minimiser l'apparition et l'émergence de résistances bactériennes aux antibiotiques au sein des flores commensales (Canton and Morosini 2011; Martinez, Papich et al. 2012).

Dans le contexte de la réduction de l'antibiorésistance en lien avec l'efficacité clinique des antibiotiques, un certain nombre d'études ont été menées, notamment avec des antibiotiques de la classe des fluoroquinolones, qui ont démontré que l'émergence de mutants résistants au niveau du pathogène visé pouvait être prévenue par l'augmentation des doses d'antibiotiques (Canton and Morosini 2011; Martinez, Papich et al. 2012). Cependant, des doses d'antibiotiques plus importantes sont susceptibles d'exercer une pression de sélection accrue sur les flores commensales, qui favoriserait la sélection de souches résistantes (Fantin, Duval et al. 2009), ou la colonisation de la flore intestinale par des souches résistantes exogènes (de Lastours, Cambau et al. 2012).

Parallèlement, un ensemble d'études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence le rôle déterminant que la taille des inocula de bactéries pathogènes pouvait jouer sur l'efficacité du traitement antibiotique (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949; Morrissey and George

1999; Jumbe, Louie et al. 2003; Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Ferran, Dupouy et al. 2007; Ferran, Kesteman et al. 2009; Kesteman, Ferran et al. 2009; Udekwu, Parrish et al. 2009; Ferran, Toutain et al. 2011).

Dans le cas des fluoroquinolones, la relation directe entre la taille des inocula bactériens à éradiquer et la probabilité de présence de sous-populations de mutants résistants explique pourquoi des doses plus élevées sont requises contre un inoculum de grande taille par rapport à un inoculum de plus faible taille (Jumbe, Louie et al. 2003; Canton and Morosini 2011). Récemment, cette influence de la charge pathogène sur l'efficacité d'un traitement par une fluoroquinolone a été mise en relation avec la chronologie de déclenchement du traitement antibiotique, à des stades plus précoce ou plus tardif de l'infection (Ferran, Toutain et al. 2011). Ces travaux ont démontré que les doses requises pour la guérison clinique et microbiologique d'une infection pulmonaire étaient beaucoup moins élevées lorsque les traitements étaient initiés à un stade précoce de l'infection.

Les études *in vitro* que nous avons menées précédemment sur l'amoxicilline et la cefquinome ont mis en évidence le même type de relation entre la taille des inocula bactériens et l'efficacité des antibiotiques.

Nous avons donc voulu explorer l'impact de cet « effet inoculum » - en lien avec la chronologie de déclenchement du traitement - sur l'efficacité clinique et bactériologique des deux antibiotiques dans un modèle d'infection pulmonaire chez la souris.

3.2. Développement d'un modèle d'infection pulmonaire à *P.multocida* chez la souris

3.2.1. Problématique et objectifs

L'objectif de ce travail était de développer un modèle d'infection pulmonaire présentant des caractéristiques compatibles avec les objectifs fixés.

En effet, les modèles d'infections utilisés classiquement chez les rongeurs, en particulier les infections pulmonaires, provoquent généralement des infections sévères, mortelles, et d'évolution rapide.

Au vu de nos objectifs, il s'agissait d'obtenir un modèle d'infection qui puisse être initié avec une charge bactérienne de relativement faible taille, avec une vitesse d'évolution suffisamment lente pour pouvoir intervenir à différents stades, l'un plus précoce et l'autre plus tardif.

Pour ce faire, nous avons utilisé une stratégie de contamination naturelle par voies aériennes, grâce à un système de nébulisation des suspensions bactériennes puis d'inhalation en milieu confiné, au moyen d'un équipement présenté dans la figure 16 (Inhalation Exposure System, IES).



Figure 16 : Inhalation Exposure System (IES).

3.2.2. Matériels et méthodes

3.2.2.1. Animaux utilisés

Des souris femelles Swiss (Charles River, L'Arbresle, France) ont été utilisées durant toutes nos expérimentations qui ont été conduites en accord avec le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" qui a été adopté et promulgué par l'U.S. National Institutes of Health. Notre numéro d'agrément pour l'expérimentation animale est le suivant : C 31 555 24 et a été délivré par le Ministère de l'Agriculture Français

3.2.2.2. Modalité de contamination pulmonaire

Les souris ont été placées dans un système d'inhalation (Inhalation Exposure System, IES, model 099CA4224, Glas-Col®, IN, USA) où 10 mL de suspension de *P. multocida* contenant $5 \cdot 10^9$ UFC/mL ont été chargés dans la chambre de nébulisation. Le temps de préchauffage, de nébulisation, de repos et de décontamination ont été respectivement de 15, 120, 30 et 15 min.

3.2.2.3. Etude du modèle d'infection pulmonaire

Quarante-deux souris ont été infectées avec *P. multocida* puis sacrifiées par une injection par voie intrapéritonéale de pentobarbital sodique (DolethalND, Vétoquinol, France) Les souris ont été sacrifiées à différents temps : 0 (3 souris), 24 (3), 48 (6), 72 (9), 96 (8), 120 (6) et 144 heures (7) afin de déterminer la charge bactérienne pulmonaire des animaux en fonction du temps post-infection. Lorsque des souris sont mortes entre les temps de sacrifice, la détermination de la charge bactérienne pulmonaire n'a été effectuée que sur des animaux ne présentant pas encore de rigidité cadavérique. Les poumons des animaux ont été prélevés de manière aseptique puis ont été mixés dans 10 ml de NaCl à 0,9%. Les homogénats ont été centrifugés (3000 g, 10 min) et les culots ont été remis en suspension dans 2,5 ml de NaCl à 0,9%. Des dilutions sériées au dixième ont été ensuite réalisées et dix microlitres de ces dilutions ont été ensuite étalés en triplicate sur des géloses MH-agar. Les colonies ont été comptées après 24 h d'incubation à 37°C (ou après 24 heures supplémentaires si elles étaient trop petites). La limite de détection était de 100 UFC/poumon.

3.2.3. Résultats

L'évolution de la croissance bactérienne dans les poumons des souris infectées est présentée dans la

Figure 17. La charge bactérienne présente dans les poumons des souris à $t=0h$ a été très reproductible d'un animal à l'autre (4.43 à 4.48 LogUFC/poumon, $n=3$). Vingt-quatre heures après l'infection, toutes les souris étaient asymptomatiques et la population bactérienne présente dans les poumons des animaux était stable (4.23 à 4.60 LogUFC/poumon, $n=3$). A partir de 48-72h après l'infection, des souris ont été retrouvées mortes et leurs charges bactériennes ont été estimées à 8.43 à 9.67 LogUFC/poumon (moyenne de 9.24 ± 0.55 , $n=8$). Les souris présentant des symptômes cliniques ont été observées à 72-96 heures post-infection. Les charges bactériennes ont alors été estimées de 6.57 à 7.85 LogUFC/poumon (moyenne de 7.38 ± 0.55 , $n=7$). Un total de 21 souris sans symptômes cliniques a été sacrifié entre 48 et 144 heures après l'infection. Les charges bactériennes ont varié alors entre des niveaux indétectables (<2 LogUFC / poumon) à 6.43 LogUFC/poumon (moyenne de 3.04 ± 1.45). Les tailles moyennes d'inoculum ont été statistiquement différentes entre les trois groupes (sain, malade et mort ; $P < 0.05$; ANOVA).

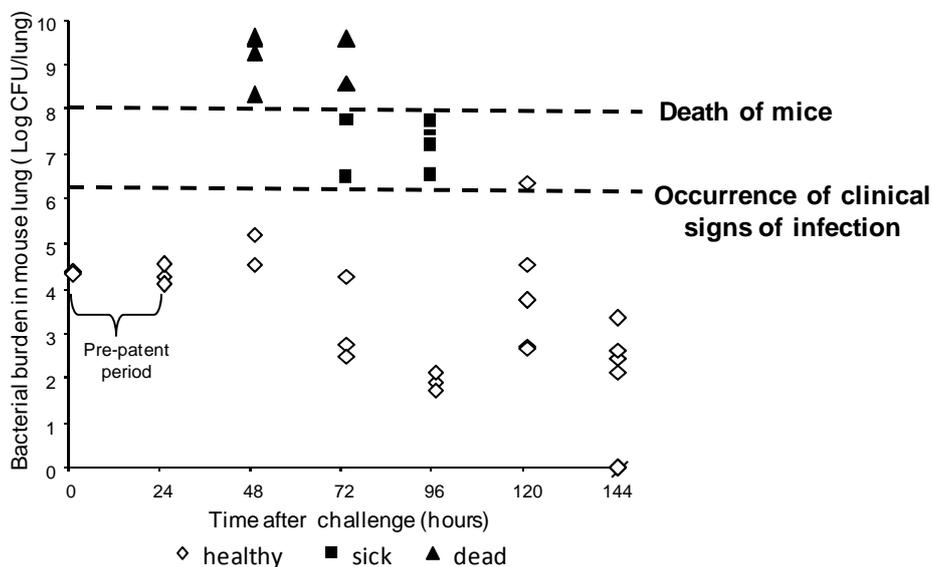


Figure 17 : Croissance de *Pasteurella multocida* en fonction du temps dans les poumons de souris.

Les symboles représentent l'état physiopathologique de souris: \diamond souris asymptomatiques, \blacksquare souris malades, souris mortes \blacktriangle .

3.2.4. Conclusion

Au final, nous avons développé un modèle murin d'infection pulmonaire à *P. multocida* qui présente des caractéristiques compatibles avec les objectifs de traitement à différents stades d'infection.

L'évolution de la maladie infectieuse est relativement lente : les premiers symptômes ont été observés au cours du 2ème jour post-infection.

Il est intéressant de noter qu'une corrélation peut être observée entre la taille de la charge bactérienne et les catégories « cliniques » du type: « absence de symptômes », « présence de symptômes », mortalité. En effet, les souris asymptomatiques présentaient toutes des charges pulmonaires inférieures à 10^6 UCF/mL, les souris avec symptômes avaient des charges pulmonaires comprises entre 10^6 UCF/mL et 10^8 UCF/mL, et les souris mortes présentaient des charges supérieures à 10^8 UCF/mL.

Ce résultat est important, car à notre connaissance il est le premier à valider sur des bases expérimentales les relations entre l'évolution temporelle d'une infection, celle de la charge bactérienne responsable de l'infection, et l'apparition des signes cliniques.

Au vu de ces résultats, le moment du traitement précoce des animaux a été fixé à 24h post-infection.

3.3. Détermination des posologies adaptées à une infection installée : étude pharmacocinétique et approche PK/PD

3.3.1. Problématique et objectifs

Notre objectif était de déterminer chez la souris les doses d'amoxicilline et de cefquinome efficaces dans un cadre de traitement classique, c'est-à-dire initié après observation des symptômes cliniques de la maladie infectieuse.

Nous nous sommes appuyés sur l'approche PK/PD, qui indique que les doses des bêta-lactamines doivent être capables de produire des valeurs de l'indice $T_{>CMI}$ supérieures à 50% de l'intervalle de dosage pour garantir une efficacité clinique et bactériologique.

Cette approche nécessite donc de disposer de données sur la pharmacocinétique de nos deux antibiotiques chez la souris.

3.3.2. Matériels et méthodes

3.3.2.1. Antibiotiques utilisés

De l'amoxicilline trihydrate (Clamoxyl © LA, 150mg/ml, Pzifer Santé Animale, France) et de la cefquinome sulfate (Cobactan © LA 7,5%, 75mg/ml, Intervet, France) ont été utilisés pour ces expérimentations. Les solutions ont été diluées dans de l'huile de maïs (Sigma, France) à différentes concentrations pour obtenir un volume d'injection suffisants (100µL/mouse).

3.3.2.2. Détermination de la cinétique de l'amoxicilline et de la cefquinome

Trente souris ont été utilisées pour déterminer la cinétique de l'amoxicilline et de la cefquinome. Les souris ont été infectées comme décrit précédemment et 24 heures plus tard une dose unique d'amoxicilline (50 mg/kg) ou de cefquinome (5 mg/kg) a été injectée par voie sous cutanée aux animaux. Des groupes de trois souris ont été anesthésiées avec 3% d'isoflurane (Aerrane ©, Baxter France) mélangé à de l'O₂ à différents temps après l'administration. Le sang de chaque animal a été recueilli par ponction intracardiaque et centrifugé (7000g, 10 minutes, 4°C). Le plasma a été conservé à -80°C jusqu'à la réalisation du dosage.

Les concentrations plasmatiques d'amoxicilline et de cefquinome ont été déterminées par LC/MS/MS. Pour l'amoxicilline, la limite de quantification était de 20 ng/ml et la plage de

précision comprise entre 98-106%. Les gammes de précision intra-jour et inter-jour étaient respectivement de 5.22 à 7.4% et de 6.86 à 11.8%. Pour la cefquinome, la limite de quantification était de 10 ng/mL et la plage de précision comprise entre 96-104%. Les gammes de précision intra-jour et inter-jour ont été respectivement de 6.72 à 11.7% et de 10.7 à 15.1%.

Les concentrations d'antibiotiques en fonction du temps ont été ajustées par une équation correspondant à un modèle bicompartimental avec administration par voie extravasculaire. L'ajustement des données a été effectué grâce à WinNonlin® 5.3 (Pharsight, Mountain View).

3.3.3. Résultats

Les concentrations plasmatiques observées et prédites de l'amoxicilline (50 mg/kg) et de la cefquinome (5 mg/kg) chez les souris infectées et asymptomatiques sont présentées dans la

Figure 18, et les paramètres pharmacocinétiques déterminés sont présentés dans le Tableau 10. Le temps de demi-vie a été estimé à 5.8 h pour l'amoxicilline et 3.4 h pour la cefquinome, en raison du fait que des formulations longue-action ont été utilisées. En effet, les formulations classiques des deux antibiotiques ont des temps de demi-vie d'élimination chez la souris inférieures à 20-30 min (voir section 1.2.4.2.), ce qui rend impossible la transposition aux autres espèces des paramètres PK/PD associés aux schémas posologiques. Les temps pendant lesquels les concentrations plasmatiques des antibiotiques ont été supérieures à leur CMI correspondante ($T_{>CMI}$) ont été de 16.5 et 13 h respectivement pour les doses de 50 mg/kg d'amoxicilline et de 5 mg/kg de cefquinome (Tableau 11).

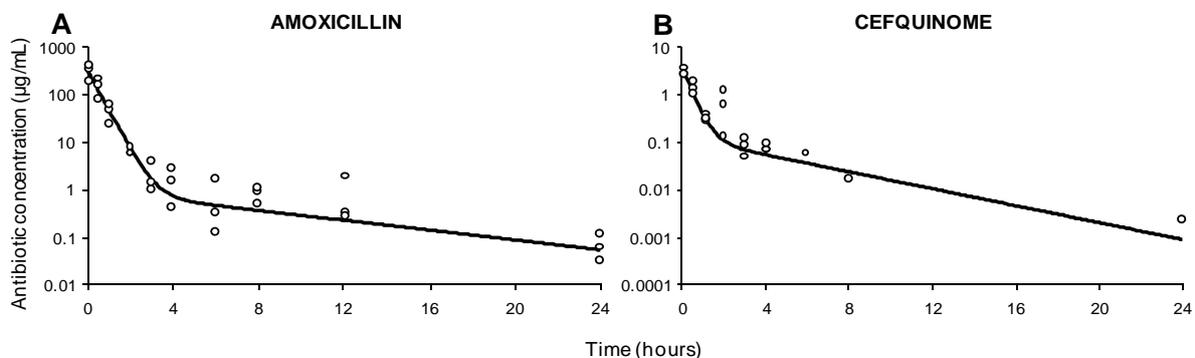


Figure 18 : Profils de concentrations plasmatiques d'amoxicilline et de cefquinome chez la souris. A) Amoxicilline, 50 mg/kg. B) Cefquinome, 5 mg/kg. (o) Concentrations observées, (-) concentration prédite.

Tableau 10 : Paramètres pharmacocinétique et indices PK/PD de l'amoxicilline et de la cefquinome chez la souris après une injection par voie sous-cutanée.

Antibiotique	Amoxicilline	Cefquinome
Dose (mg/kg)	50	5
AUC _[0-∞] (µg*hr/mL)	163	2
C _{max} (µg/mL)	277	2.8
T _{1/2elim} (hr)	5.8	3.4
CL/F (mL/hr/kg)	306	2430
C _{average} (µg/mL)	6.79	0.083
CMI <i>P. multocida</i> (µg/mL)	0.125	0.016

AUC (Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques).

C_{max} est la concentration plasmatique maximale observée.

T_{1/2elim} est le temps de demi-vie d'élimination terminal.

CL/F est la clairance d'élimination plasmatique apparente (Dose/ AUC_[0-∞]).

C_{average} est la concentration moyenne d'antibiotique sur 24h.

En supposant une relation de dose-proportionnalité pour les deux antibiotiques, nous avons simulé les profils de concentrations correspondant à différentes doses d'amoxicilline et de cefquinome afin d'estimer les posologies pour lesquelles les T_{>CMI} atteignaient 50% de l'intervalle de dosage (T_{>CMI} = 50%, critère d'efficacité PK/PD classiquement utilisé pour les bêta-lactamines)(Toutain, del Castillo et al. 2002). Ces doses sont de 50 mg/kg/jour pour l'amoxicilline et 10 mg/kg/jour pour et la cefquinome.

Tableau 11 : Valeurs des T_{>MIC} pour les différentes doses d'amoxicilline et de cefquinome.

Antibiotique	Amoxicilline			Cefquinome		
dose (mg/kg)	50	25	5	10	5	1
T _{>MIC} (h)	16.5	0.7	3.2	12.9	9.2	1.9
T _{>MIC} (% de l'intervalle de dosage)	69	45	13	54	38	8

T_{>MIC} est le temps pendant lequel les concentrations plasmatiques en antibiotique est supérieur à la CMI.

3.3.4. Conclusion

Cette étude de pharmacocinétique chez la souris nous a permis de déterminer les doses d'amoxicilline et de cefquinome susceptibles de traiter efficacement une infection bactérienne dans cette espèce. Nous avons utilisé une approche PK/PD classique, qui indique que l'efficacité des bêta-lactamines est corrélée avec l'indice T_{>CMI}. Ces doses seront utilisées dans l'étude d'efficacité.

3.4. Détermination des posologies adaptées à une charge bactérienne faible (traitement précoce)

Les études réalisées *in vitro* (Chapitre 2) ont démontré l'existence d'un effet inoculum sur l'activité antibactérienne de l'amoxicilline et de la cefquinome. Nous avons utilisé les données obtenues pour estimer les doses d'amoxicilline et de cefquinome susceptibles d'être efficaces *in vivo* contre des inocula bactériens de petite taille.

Pour cela, nous avons utilisé la relation qui lie une dose avec les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un médicament :

$$\frac{\text{Dose}}{\tau} = \frac{\text{Cl}}{\text{F}} \times \text{C}_{\text{CIBLE}}$$

où Dose est la dose nominale, τ est l'intervalle d'administration, Cl est la clairance plasmatique du médicament, F est la biodisponibilité de la formulation, et C_{CIBLE} la concentration efficace.

Cette relation est à l'origine de l'approche PK/PD utilisée pour la détermination des posologies. Elle indique que pour une même molécule et une même formulation, les doses sont proportionnelles aux concentrations requises pour obtenir un effet thérapeutique.

Au cours des études *in vitro*, nous avons déterminé les CE_{90} (concentrations produisant 90% de l'effet antibactérien maximal) de l'amoxicilline et de la cefquinome contre des inocula de *P.multocida* de 10^7 UFC/mL et 10^5 UFC/mL. Les résultats sont synthétisés dans le tableau suivant.

Antibiotique	Inoculum (Log UFC/mL)	EC_{90} ($\mu\text{g/mL}$)	Ratio
Amoxicilline	7	2.89	8.3
	5	0.35	
Cefquinome	7	0.23	3.2
	5	0.072	

Nous avons calculé les ratios entre les CE_{90} obtenu pour les inocula de grande et de petite taille : ils sont d'environ 8 pour l'amoxicilline et 3 pour la cefquinome.

Si l'on substitue la C_{CIBLE} de l'équation X par la CE_{90} *in vitro*, il apparait que les doses efficaces contre un inoculum de petite taille pourraient être 8 fois plus faibles (pour

l'amoxicilline) ou 3 fois plus faibles (pour la cefquinome) que les doses efficaces contre un inoculum de grande taille.

Nous avons émis l'hypothèse que les doses d'amoxicilline et de cefquinome estimées précédemment selon les critères PK/PD appliqués aux bêta-lactamines (50 et 10 mg/kg) correspondaient aux doses requises contre des inocula de grande taille.

Nous avons divisé ces doses par 10 pour estimer les doses à tester face à des inocula de petite taille, en prenant en compte au côté de l'effet inoculum (interaction antibiotique-bactérie) le rôle potentiellement favorable de la stimulation du système immunitaire des animaux au cours de la phase précoce de l'infection (avant dépassement ou épuisement de ces capacités).

Les doses testées face à des inocula de petites tailles (phase précoce de l'infection) sont donc : 5 mg/lg pour l'amoxicilline et 1 mg/kg pour la cefquinome.

3.5. Comparaison des posologies antibiotiques ajustées à la taille de l'inoculum

3.5.1. Matériels et méthodes

3.5.1.1. Groupe témoin

Vingt souris ont été infectées. L'état clinique de chaque animal a été évalué deux fois par jour pendant sept jours.

3.5.1.2. Groupes traitement classique

Six groupes de dix souris ont été infectés. Les souris ont été observées deux fois par jour pour une évaluation clinique et le traitement antibiotique a été initié lorsqu'un animal présentait des signes cliniques de l'infection (toux, yeux fermés, immobilité, dos voûté). Le traitement consistait en une injection quotidienne par voie sous-cutanée pendant quatre jours d'amoxicilline ou de cefquinome.

Pour l'amoxicilline, les posologies suivantes ont été testées :

- 50 mg/kg/j, la posologie estimée selon l'approche PK/PD décrite précédemment,
- 25 mg/kg/j, correspond à la moitié de la dose estimée selon l'approche PK/PD,
- 5 mg/kg/j, correspondant à la dose sélectionnée pour le traitement précoce.

Pour la cefquinome, les posologies suivantes ont été testées :

- 10 mg/kg/j, la posologie estimée selon l'approche PK/PD décrite précédemment,
- 5 mg/kg/j, correspond à la moitié de la dose estimée selon l'approche PK/PD,
- 1 mg/kg/j, correspondant à la dose sélectionnée pour le traitement précoce.

3.5.1.3. Groupes traitement précoce

Quatre groupes de dix souris ont été infectées. Vingt-quatre heures après l'infection, toutes les souris de chaque groupe ont reçu une injection sous-cutanée quotidienne pendant quatre jours d'amoxicilline ou de cefquinome (cefquinome, 0,5 ou 1 mg/kg/jour; amoxicilline, 2,5 ou 5 mg/kg/jour). L'état clinique des animaux a été évalué deux fois par jour pendant sept jours.

Pour l'amoxicilline, les posologies suivantes ont été testées :

- 5 mg/kg/j, la posologie ajustée à une charge bactérienne faible, selon l'approche décrite précédemment,

- 2.5 mg/kg/j, correspond à la moitié de la dose ajustée à une charge bactérienne faible.

Pour la cefquinome, les posologies suivantes ont été testées :

- 1 mg/kg/j, la posologie ajustée à une charge bactérienne faible, selon l'approche décrite précédemment,
- 0.5 mg/kg/j, correspond à la moitié de la dose ajustée à une charge bactérienne faible.

3.5.1.4. Evaluation de la charge bactérienne pulmonaire

Pour tous les groupes, les souris vivantes au 7^{ème} jour après l'infection ou après le début du traitement, ont été euthanasiées par une injection par voie intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Dolethal ND, Vétoquinol, France) et de la charge bactérienne pulmonaire a été déterminée comme dans la section 3.5.2..

3.5.2. Résultats

Les résultats cliniques et bactériologiques obtenus dans les différents groupes sont présentés dans les

Figure 19 et Figure 20.

3.5.2.1. Groupe témoin

Pour le groupe témoin, 60% (12/20) des souris sont tombées malades et tous ces animaux sont morts durant les sept jours après l'infection (Figure 19). Parmi les 40% de souris asymptomatiques (8/20), vingt-cinq pour cent (5/20) hébergeaient *P.multocida* dans leurs poumons 7 jours après l'infection avec une charge moyenne de 4.73 ± 1.12 LogUFC/poumon, et quinze pour cent (3/20) ne présentaient aucune bactérie détectable dans leurs poumons symptômes cliniques 7 jours après l'infection.

3.5.2.2. Groupes traitement classique

Pour chacun des six groupes, 60 à 70% des souris infectées ont présenté des symptômes cliniques durant les 7 jours après l'infection. Ces animaux ont été traités au moment de la détection de ces symptômes.

Pour l'amoxicilline, 100% et 85,7% des souris traitées respectivement avec les doses de 50 et 25 mg/kg/jour ont été cliniquement guéries 7 jours après l'infection (Figure 19 B), alors que toutes les souris malades traitées avec la dose de 5 mg/kg/jour sont mortes.

La guérison microbiologique (absence de bactéries pulmonaires) a été observée au 7^{ème} jour post-infection chez 66.6% et 57.1% des souris traitées respectivement avec les doses de 50 et 25 mg/kg/jour (Figure 19 B). Les souris ne présentant pas de guérison microbiologique au 7^{ème} jour post-infection avaient une charge bactérienne de 3.71 ± 0.41 LogUFC/poumon (n=2) et de 4.11 ± 2.73 LogUFC/poumon (n=4) respectivement pour les doses de 50 et 25 mg/kg/jour. Pour le groupe 5 mg/kg/jour, les souris mortes présentaient une charge bactérienne pulmonaire moyenne de 8.21 ± 1.56 LogUFC/poumon (n=4).

Pour la cefquinome, 100% et 83,3% des souris traitées respectivement avec les doses de 10 et 5 mg/kg/jour ont été cliniquement guéries 7 jours après l'infection (Figure 19 B), alors que toutes les souris malades traitées avec la dose de 1 mg/kg/jour sont mortes.

La guérison microbiologique (absence de bactéries pulmonaires) a été observée au 7^{ème} jour post-infection chez 83,3% et 50% des souris traitées respectivement avec les doses de 10 et 5 mg/kg/jour (Figure 19 B). Les souris ne présentant pas de guérison microbiologique au 7^{ème} jour post-infection avaient une charge bactérienne de 3,42 LogUFC/poumon (n=1) et de 4.46 ± 1.75 LogUFC/poumon (n=4) respectivement pour les doses de 10 et 5 mg/kg/jour. Pour le groupe 1 mg/kg/jour, les souris mortes présentaient une charge bactérienne pulmonaire moyenne de 8.46 ± 2.03 LogUFC/poumon (n=3).

3.5.2.3. Groupes traitement précoce

Aucune souris infectée ne présentait de symptôme clinique au moment du traitement (24h post-infections).

Pour les groupes amoxicilline, 100% et 80% des souris traitées n'ont développé aucun symptôme clinique pendant les six jours suivant le début du traitement, après avoir reçu respectivement des doses de 5 ou 2.5 mg/kg/jour (Figure 19 A). Au 7^{ème} jour post-infection, aucune bactérie n'a été détectée dans les poumons de 90% (n = 9) et de 55,5% (n = 6) des souris traitées respectivement avec des doses d'amoxicilline de 5 et 2.5 mg/kg/jour (Figure 19 A). Les souris ne présentant pas de guérison microbiologique au 7^{ème} jour post-

infection avaient une charge bactérienne pulmonaire moyenne de 2.56 LogUFC/poumon (n=1) et de 3.78±2.20 LogUFC/poumon (n=4) respectivement pour les doses de 5 et 2.5 mg/kg/jour.

Pour les groupes cefquinome, 100% et 90% des souris traitées n'ont développé aucun symptôme clinique pendant les six jours suivant le début du traitement, après avoir reçu respectivement des doses de 1 ou 0.5 mg/kg/jour (Figure 19 A). Au 7^{ème} jour post-infection, les bactéries pathogènes ont été éliminées chez 100% des souris traitées avec la dose de 1 mg/kg/jour de cefquinome. Pour la dose de 0.5 mg/kg/jour, 60% des souris présentaient une guérison bactériologique au 7^{ème} jour post-infection (Figure 19 A). Les souris ne présentant pas de guérison microbiologique au 7^{ème} jour post-infection avaient une charge bactérienne pulmonaire moyenne de 3.92±2.51 logUFC/poumon, n=4).

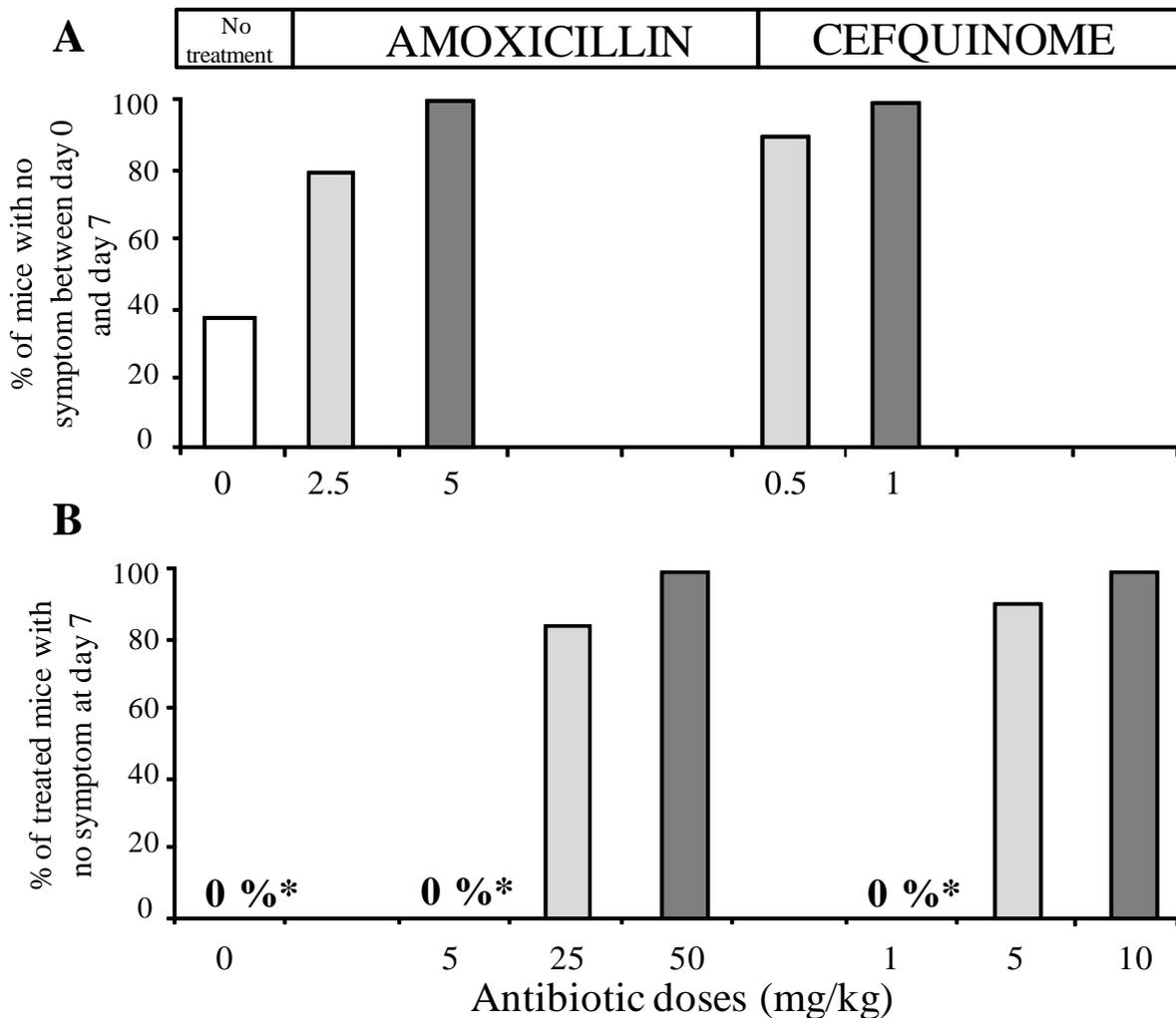


Figure 19 : Efficacités cliniques pour les différents groupes de traitement.

(* Toutes les souris sont mortes dans les 7 jours)

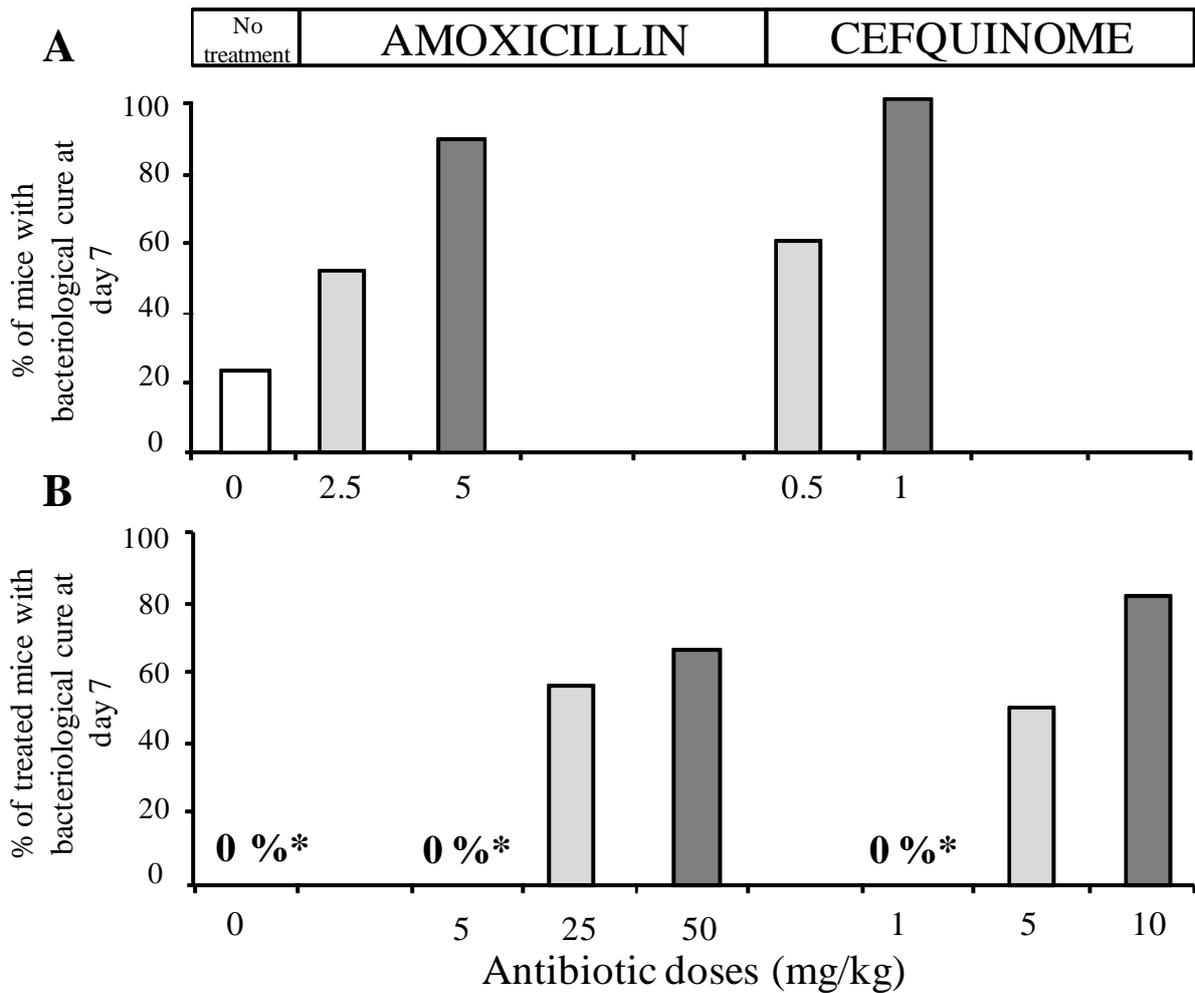


Figure 20 : Guérison bactériologique pour les différents groupes de traitement.
 (* Toutes les souris sont mortes dans les 7 jours).

3.5.3. Conclusion

Lorsque des doses d'amoxicilline et de cefquinome adaptées à une charge bactérienne faible ont été administrées à un stade précoce d'une infection pulmonaire, les résultats – que ce soit en termes de guérison clinique ou bactériologique – ont été identiques voire supérieurs aux résultats obtenus avec des doses adaptées à une charge bactérienne plus forte et administrées à un stade plus tardif (stade clinique) de l'infection pulmonaire.

3.6. Discussion

Dans cette étude, nous avons confirmé l'hypothèse selon laquelle un traitement antibiotique initié au cours des phases précoces de l'infection nécessite des doses d'antibiotiques bien inférieures à celles requises dans le cadre curatif classique.

Un ensemble de travaux *in vitro et in vivo* ont montré que, pour un certain nombre d'antibiotiques, la susceptibilité des agents pathogènes est dépendante de la taille de l'inoculum bactérien (Udekwi, Parrish et al. 2009), ou que les antibiotiques sont beaucoup plus puissants lorsqu'ils ciblent des charges pathogènes faibles par rapport à des charges pathogènes élevées (Jumbe, Louie et al. 2003; Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Ferran, Kesteman et al. 2009; Kesteman, Ferran et al. 2009; Kesteman, Perrin-Guyomard et al. 2010). Un des mécanismes pouvant expliquer cet effet pourrait être une augmentation de l'hétérogénéité génétique et phénotypique de la population bactérienne, conduisant au sein des gros inocula bactériens à la présence de sous-populations porteuses de mutations conférant une résistance génétique aux antibiotiques et/ou à l'activation des mécanismes de persistance/tolérance aux antibiotiques au sein de la population (Balaban, Merrin et al. 2004; Lewis 2010; Luidalepp, Joers et al. 2011).

Le caractère générique de l'impact de la taille des inocula sur l'activité des antibiotiques que nous avons observés avec *Pasteurella multocida* est souligné par des résultats similaires obtenus avec d'autres espèces bactériennes Gram-négatives telles que *Escherichia coli* (Ferran, Kesteman et al. 2009), *Klebsiella pneumonia* (Kesteman, Ferran et al. 2009; Kesteman, Perrin-Guyomard et al. 2010) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Jumbe, Louie et al. 2003; Mizunaga, Kamiyama et al. 2005).

Les conséquences de ce phénomène sur l'efficacité des antibiotiques selon la chronologie de déclenchement du traitement antibiotique (stades plus précoce ou plus tardif de l'infection), n'avaient été explorées jusqu'à présent que pour la classe des fluoroquinolones (Ferran, Toutain et al. 2011).

Presque toutes les études *in vivo* explorant l'influence de la taille des inocula bactériens sur l'efficacité des antibiotiques ont été réalisées en inoculant directement des charges bactériennes de taille initiale basse ou élevée, et en traitant les animaux à des temps post-infection fixés. L'étude de Ferran *et al.* (Ferran, Toutain et al. 2011) a été, à notre connaissance, la première, après les travaux historiques de Harry Eagle, (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949) à utiliser un modèle dans lequel un inoculum de faible taille était inoculé aux animaux et où les traitements antibiotiques ont été initiés à différents stades du développement naturel de l'infection. Nous avons utilisé la même stratégie, avec des modifications visant à rapprocher le modèle expérimental de conditions « naturelles » d'infection. Tout d'abord, le mode de contamination choisi (inhalation d'un aérosol bactérien)

est plus proche de la contamination naturelle que les modèles classiques, qui utilisent souvent des administrations intra-trachéales (Griffith and Dudley 2007). Cette technique très reproductible a permis l'obtention d'un inoculum pulmonaire initial d'environ 10^4 UFC/poumon, mais également d'un temps de développement de l'infection pulmonaire beaucoup plus lent. Dans ces conditions, nous avons pu mettre au point un protocole où le traitement des animaux malades a été initié dès les premiers signes cliniques plutôt qu'à un temps fixe post-infection. En contrepartie, ce protocole d'infection beaucoup moins sévère ne provoque que 60% de développement d'infection chez les animaux. Ce phénomène reflète la variabilité naturelle du développement d'une infection chez des animaux immunocompétents, ce qui confère à ce modèle des similitudes avec les épisodes infectieux qui se développent dans les élevages. D'après des observations effectuées deux fois par jour, nous avons établi que les signes cliniques de l'infection ont été détectés entre 48-96 h après l'infection. Pendant cette période, les charges bactériennes moyennes dans les poumons étaient environ six cents fois plus élevées que celles mesurées à 24h post-infection (Figure 20). Afin de déterminer les schémas posologiques pour les traitements antibiotiques classiques sur une base rationnelle, des études pharmacocinétiques ont été effectuées pour calculer les doses nécessaires pour atteindre une valeur de $T_{>CMI}$ de 50% de l'intervalle de dosage (Craig 1998; Toutain, del Castillo et al. 2002; Andremont 2003; Craig 2003; Canton and Morosini 2011; Muller, Punt et al. 2013). L'hypothèse d'une relation dose-proportionnalité requise pour les calculs avait déjà été démontrée pour l'amoxicilline chez les animaux malades (Godoy, Castells et al. 2011).

Les doses déterminées de cette manière pour le traitement des animaux malades ont permis de confirmer que le $T_{>CMI}$ était un indice PK/PD prédictif pour déterminer l'efficacité des bêta-lactamines. En effet, réduire de moitié les doses efficaces prédites, a réduit à la fois le $T_{>CMI}$ et l'efficacité microbiologique et clinique des traitements (Figure 20). Cependant, dans notre détermination des doses pour les traitements antibiotiques de type classique, nous n'avons pas pris en compte l'impact de la maladie sur la pharmacocinétique des antibiotiques. En effet, il a été démontré pour l'amoxicilline et la cefipime (céphalosporine de 4^{ème} génération comme la cefquinome) (Pawar and Sharma 2008; Godoy, Castells et al. 2011), qu'une infection ou un syndrome inflammatoire pouvaient entraîner une surexposition plasmatique à l'antibiotique par rapport aux animaux sains. Cela signifie que les doses que nous avons calculé à partir des souris qui ont été infectées mais qui ne présentaient aucun signe clinique étaient susceptibles de produire des valeurs plus élevées de $T_{>CMI}$ chez les souris présentant des signes cliniques.

Lorsque les traitements de type précoces ont été testés, d'excellents résultats ont été obtenus que ce soit pour les guérisons cliniques et bactériologiques en dépit du fait que les $T_{>CMI}$ pour ces schémas posologiques étaient beaucoup plus faibles que 50% du temps de l'intervalle de dosage. Ces données ainsi que d'autres études (Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Udekwa, Parrish et al. 2009) montrent que la taille de la charge bactérienne ciblée par les antibiotiques devrait être prise en compte dans l'établissement des valeurs seuils des indices PK/PD.

Des études récentes ont mis en évidence le rôle joué dans les infections bactériennes par l'interaction entre la charge microbienne et le système immunitaire, en particulier le rôle de clairance bactérienne des granulocytes. En effet, Drusano *et al.* (Drusano, Fregeau et al. 2010; Drusano, Vanscoy et al. 2011) ont montré, chez un modèle infectieux murin, que la destruction des bactéries pathogènes par les granulocytes était un phénomène saturable, avec des tailles d'inoculum pathogène de demi-saturation comprises entre 6.03 et 6.08 LogUFC/g (de poids vif). Ceci est très intéressant car nous avons observé que les charges bactériennes associées à la présence ou l'absence de symptômes cliniques chez nos souris infectées étaient respectivement plus élevées que 6.57 LogUFC/poumon ou inférieures à 6.43 LogUFC/poumon (Figure 20).

Enfin, le besoin de doses d'antibiotiques plus élevées pour les animaux présentant des signes cliniques d'infection pourrait s'expliquer en partie par la nécessité, face à une charge bactérienne importante, de produire un effet bactéricide d'amplitude supérieure pour pouvoir baisser le nombre de colonies en dessous des valeurs de saturation des granulocytes, et restaurer les capacités du système immunitaire à exercer pleinement son rôle dans la guérison de l'infection (Drusano, Fregeau et al. 2010; Drusano, Vanscoy et al. 2011).

3.7. Manuscrit 2

1 Impact of early antibiotic treatment on the clinical and
2 microbiological outcomes in experimental pneumonia:
3 implications for dosage regimens

4

5

6

7 Maleck V. Vasseur^{1,2}, Aude A. Ferran^{1,2}, Marlène Z. Lacroix^{1,2}, Pierre-Louis Toutain^{1,2} and Alain
8 Bousquet-Mélou^{1,2*}

9

10 **Address**

11 ¹ : INRA, UMR1331 TOXALIM, F-31027 Toulouse, France.

12 ² : Université de Toulouse, INPT, ENVT, EIP, UPS, F-31076 Toulouse, France.

13 * Corresponding author. Mailing address: UMR1331 Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de

14 Toulouse, 23 chemin des Capelles, BP 87 614, F-31076 Toulouse, France. Phone: +33 (0) 5 61

15 19 39 25. Fax: +33 (0) 5 61 19 39 17. E-mail: a.bousquet-melou@envt.fr

16 **ABSTRACT**

17 We evaluated the impact on the clinical and microbiological outcomes of the delay in the onset of
18 antimicrobial treatment during the time course of an infectious disease. In immunocompetent
19 mice, we developed an original model of pulmonary infection by air-borne contamination, with
20 *Pasteurella multocida* as pathogenic agent. After initial bacterial loads of 4.46 ± 0.03
21 LogCFU/lung, the natural time-development of the disease was associated with the growth of
22 bacterial loads, from mean counts of 4.41 ± 0.21 Log/CFU/lung at 24h post-challenge, to mean
23 counts of 7.38 ± 0.55 LogCFU/lung at 72-96h post-challenge on mice exhibiting clinical
24 symptoms. Two beta-lactams, amoxicillin and cefquinome, a fourth-generation cephalosporin
25 developed for food producing animals, were evaluated. The impact of the bacterial inoculum size
26 on antimicrobial activity was assessed during time-kill experiments. Both antibiotics were much
27 more potent against lower inocula of 10^5 CFU/mL than higher inocula of 10^7 CFU/mL, with EC_{50}
28 and EC_{90} 5- to 10-fold lower against the low inocula. After pharmacokinetic studies in infected
29 mice, the doses required to treat sick mice were determined from PK/PD indices for beta-lactams,
30 and the doses for early interventions were 10-fold lower based on previous in vitro experiments.
31 For both antibiotics, we showed that early treatments initiated at 24h post-challenge produced
32 equivalent clinical cure rates (100%) and higher microbiological cure rates with doses 10-fold
33 lower than those required during later treatments in sick mice. These findings might have clinical
34 implications for the management of patients with high bacterial burdens, and also contribute to
35 the promotion of innovative antimicrobial therapies in animals.

36

37 **INTRODUCTION**

38 Bacterial resistance to antimicrobials has become a worldwide problem and an increasing threat
39 to human health.

40 From knowledge on interaction between pathogens and drugs, leading to selective pressure, and
41 emergence and spread of resistant bacteria responsible for further infections and treatment failure.

42 The solution is to give higher doses, allowing to adequately expose the less susceptible bacteria
43 harboured in a large bacterial population, mutant preventive concentration for fluoroquinolones

44 However, the large antibiotic amounts used, as a combination of daily doses time number of days
45 of treatment

46 Problem with the selective pressure of other bacterial flora, such as the commensal digestive flora

47 To combine both objectives, recent recommendations for dosage regimens follow the “slogan”:

48 “Hit hard and fast, then leave as soon as possible.”

49

50 The use of antimicrobial agents is regarded as the main cause of this situation as the inadequate
51 exposure of bacteria to antibiotics may lead to the selection of resistant bacteria, not only at the
52 site of infection but also in all bacterial flora that are unselectively exposed to antibiotics,

53 including the commensal intestinal microbiota (1). In this context a set of strategies may be
54 proposed, such as a global “eco-evo” perspective taking into account both the ecology and

55 evolution of antimicrobial resistance (2), but also by targeting the design of dosage regimens that
56 simultaneously achieve clinical efficacy, and minimize the emergence and spread of resistance in

57 all commensal flora (3, 4). To be achieved, these objectives require a better understanding of the

58 key factors that govern antimicrobial activity and therapeutical outcomes. Among these factors,

59 the impact of the pathogen inoculum size has been investigated in in vitro study or in vivo models
60 of infection (5-14).

61 In particular, the influence of the increasing pathogen load to eradicate, as a consequence of the
62 natural development of the infection was studied in a rat model of pneumonia, by inoculating the
63 same low initial inoculum to all animals and by treating with a fluoroquinolone at early or late
64 stages of the infection progress (9). It was shown that the early treatments targeting low pathogen
65 loads were efficacious with doses much lower than those required for a later intervention. In
66 addition, mathematical models incorporating several key factors that contribute to the emergence
67 and spread of antimicrobial resistance identified that the early initiation of antibiotic treatment
68 was a major factor for the prevention of the emergence and spread of resistance (15).

69 Whereas the natural presence of resistant mutants in very large inocula could explain treatment
70 failure with fluoroquinolones (3), it could not explain the same observations made with other
71 antibiotics such as beta-lactams. For example, at the beginning of antibiotic era, Eagle (5, 6) had
72 established that for penicillin the required efficacious dose for treating experimental infections
73 caused by various Gram-positive bacteria was heavily dependent on the pathogen load to be
74 eradicated.

75 The aim of the present study was to explore, using a new rodent model of air-borne lung
76 infection, the impact of the delay of therapeutic intervention during the time course of an
77 infectious disease on the efficacy of different antibiotic dosage levels.

78

79

80

81 We aimed at identifying strategies allowing better use of antimicrobial agents by obtaining
82 clinical cure and resistance prevention with two beta-lactams.

83 We firstly optimized drug dosing regimens with PK/PD indices and we wondered if such
84 regimens allowed clinical cure of mice whatever time of treatment.

85 By in vitro experiments, we explored the difference of bactericidal concentrations in function of
86 inoculum sizes suggesting that PK/PD doses could not be optimal whatever inoculum sizes.
87 In the perspectives to reduce antibiotic consumption, other parameter than MIC and PK should be
88 taken into account to administer as low dose as necessary to obtain antibacterial effect.
89

90 **MATERIALS AND METHODS**

91

92 **Bacterial strains:** We used a strain of *Pasteurella multocida* isolated from a pig with clinical
93 symptoms of a bacterial lung infection.

94

95 **Antimicrobial drugs:** Sodium amoxicillin powder (Clamoxyl[®] 1g for injectable suspension,
96 GSK, France) and cefquinome sulphate powder (Cobactan[®] IV-IM 4.5%, Intervet, France) were
97 used for MIC and time-kill curve determinations. Amoxicillin trihydrate (Clamoxyl[®] L.A.,
98 150mg/mL, Pzifer Santé Animale, France) and cefquinome sulphate (Cobactan[®] LA 7.5%,
99 75mg/mL, Intervet, France) were used for the in vivo experiments. Solutions were diluted in corn
100 oil (Sigma, France) at different concentrations to obtain an injection volume of 100µL/mouse.

101

102 **MIC determination:** The MIC of amoxicillin and cefquinome for the *P.multocida* strain were
103 determined in triplicate by broth microdilution according to the CLSI (16).

104

105 **Time-kill curves:** Suspensions of *P. multocida* with 0.42-0.46 optical density (600 nm),
106 corresponding to 4.10^8 CFU/mL, were prepared in Mueller-Hinton (MH) broth after overnight
107 culture. They were then diluted to prepare suspensions containing 10^5 or 10^7 CFU/mL. These
108 suspensions were incubated for one hour and then different concentrations of amoxicillin or
109 cefquinome (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 fold the MIC) were added to the suspension. Samples
110 of 500 µL were collected in each suspension at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h after administration
111 of the drug and centrifuged (3000g, 10 minutes, 20°C). The supernatants were discarded to
112 prevent carry-over of the antimicrobial activity and the bacterial pellets were resuspended in 500
113 µL of fresh MH broth for bacterial counting. Serial 10-fold dilutions were plated on MH agar and

6

114 counting was performed after incubation at 37°C for overnight. Each experiment was performed
 115 in triplicate. The limit of quantification (LOQ) of the bacterial concentration was 100 CFU/mL.

116

117 **Antibacterial effect:** The antibacterial effect was determined as the ratio of the areas under the
 118 bacterial count-time curves in the presence and absence of antibiotic over 24 hours. The maximal
 119 antibacterial effect corresponded to the minimal ratio of areas under curve without antibiotic and
 120 with the highest tested antimicrobial concentration.

$$121 \text{ Antibacterial_effect (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{AUC}_{[0-24h]_{\text{with_ATB}}}}{\text{AUC}_{[0-24h]_{\text{without_ATB}}}} \right) \quad (\text{Equation 1})$$

122

123 **Modeling of the antibacterial effect:** The relationship between the antimicrobial concentrations
 124 and antibacterial effect was analysed using the following model:

$$125 E = \frac{E_{\max} \times C^{\gamma}}{C^{\gamma} + EC_{50}^{\gamma}} \quad (\text{Equation 2})$$

126 where E(%) is the antibacterial effect at concentration C, E_{\max} (%) the maximal effect, C(μg/mL)
 127 the antimicrobial concentration, EC_{50} (μg/mL) the concentration producing 50% of maximal
 128 effect and γ the sigmoid coefficient. Fitting was performed using WinNonlin[®] 5.3 (Pharsight,
 129 Mountain view).

130

131 **Animals:** Female Swiss mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were used for all
 132 studies. The experiments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of
 133 Laboratory Animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health and
 134 under the agreement number C 31 555 24 for animal experimentation from the French Ministry
 135 of Agriculture.

136

137 **Lung aerial infection model:** Female Swiss mice were placed in an Inhalation Exposure System
138 (IES, model 099CA4224, Glas-Col®, IN, USA) and 10 mL of a *P. multocida* suspension
139 containing 5.10^9 CFU/mL was loaded in the Nebulizer-Venture Unit. The IES was programmed
140 with Preheat, Nebulizing, Cloud Decay, and Decontamination times of 15, 120, 30 and 15 min,
141 respectively.

142

143 **Pharmacokinetics:** Thirty mice were used for pharmacokinetic study of amoxicillin and
144 cefquinome. Mice were infected as described above and 24 hours later a single dose of
145 amoxicillin (50mg/kg) or cefquinome (5mg/kg) was subcutaneously injected between the
146 shoulders of each animal.

147 Groups of 3 mice were anesthetized with 3% isoflurane (Aerrane®, Baxter France) in O₂ at 5 min
148 and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 h after dosing. Terminal blood samples (one per animal) were
149 collected by intracardiac puncture and centrifuged (7000g, 10 minutes, 4°C). Plasma was stored
150 at -80°C until assay.

151 **Amoxicillin assays:** Amoxicillin plasma concentrations were assayed by LC/MS/MS using a
152 ThermoFinnigan Surveyor® HPLC system with a LCQ Deca XP Max® ion trap mass
153 spectrometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, Mass, USA). The limit of quantification
154 (LOQ) was 20ng/mL and the accuracy range was 98-106%. The ranges of intra-day and inter-day
155 coefficients of variation for precision were 5.22-7.04% and 6.86-11.8% respectively.

156 **Cefquinome assays:** Cefquinome plasma concentrations were assayed with an Acquity ultra
157 performance liquid chromatography (UPLC®) coupled to a Xevo® triple quadrupole mass
158 spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The LOQ was 10ng/mL and the accuracy range was

8

159 96-104%. The ranges of intra-day and inter-day coefficients of variation for precision were 6.72-
160 11.7% and 10.7-15.1% respectively.

161 Data analysis: A naïve pooling approach was used to fit the antibiotic concentrations versus time
162 profiles to a bicompartamental model with extravascular administration. The fitting procedure was
163 performed using WinNonlin® 5.3 (Pharsight, Mountain View).

164

165 **Kinetics of *P.multocida* loads:** Forty-two mice were infected with *P.multocida* and sacrificed by
166 an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (DolethalND, Vetoquinol, France) at 0(3
167 mice), 24(3), 48(6), 72(9), 96(8), 120(6) and 144 h (7) to count bacteria in the lungs. Lung
168 bacterial counts were also carried out on mice that died before rigor mortis occurred. The lungs
169 were aseptically removed and homogenized in 10 mL of 0.9% NaCl. The homogenates were
170 centrifuged (3000g, 10 min) and the pellets were resuspended in 2.5 mL of 0.9% NaCl. Ten
171 microliters of successive 10-fold dilutions of homogenates were then plated in triplicate on MH-
172 agar. The colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C (or after a further 24 h if too
173 small). The limit of detection was 100 CFU/lung.

174

175 **Antibiotic treatments:**

176 Control group: Twenty mice were infected with *P.multocida*. The clinical status of each animal
177 was evaluated twice daily over seven days.

178 Early treatments: Four groups of ten mice were infected with *P.multocida*. Twenty-four hours
179 after the challenge, all the mice of each group received antibiotic treatment by a daily
180 subcutaneous injection between the shoulders for four days: two groups received cefquinome (0.5
181 or 1 mg/kg/day) and two groups received amoxicillin (2.5 or 5 mg/kg/day). After the beginning
182 of the challenge, the clinical status of animals was evaluated twice daily over seven days.

183 Late treatments: Six groups of ten mice were infected with *P. multocida* with the IES. The mice
184 were observed for clinical evaluation twice a day and the antibiotic treatment was launched when
185 an animal showed clinical signs of infection (coughing, closed set eyes, immobility, quilted coat
186 or hunched), consisting of a daily subcutaneous injection between the shoulders over four days.
187 Three groups received cefquinome (1, 5 or 10 mg/kg/day) and three groups received amoxicillin
188 (5, 25 or 50 mg/kg/day). Mice that had not expressed any clinical symptoms for seven days after
189 the challenge were not treated. The clinical status of all animals (treated and untreated) was
190 evaluated twice a day for seven days after challenge.

191 In all the experiments, mice that were alive at day 7 post-challenge or after the beginning of the
192 treatment, were sacrificed by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (DolethalND,
193 Vetoquinol, France) and the lung bacterial load was determined.

194

195 **RESULTS**

196

197 **Susceptibility testing**

198 The MIC of cefquinome and amoxicillin for the tested *P. multocida* strain were 0.016 and 0.125
199 $\mu\text{g/mL}$ respectively.

200

201 **Killing curves**

202 The time-kill curves obtained with the high (10^7 CFU/mL) and low (10^5 CFU/mL) inocula of *P.*
203 *multocida* exposed to amoxicillin and cefquinome are shown in Figure 1. In absence of
204 antimicrobial drug both inoculum sizes of *P. multocida* grew exponentially to 10^9 CFU/mL and
205 remained stable up to the end of the incubation time.

206 For the high inoculum, a concentration of 4-fold the MIC of both amoxicillin and cefquinome
207 maintained bacterial density between 10^7 and 10^8 CFU/mL i.e. was bacteriostatic, whereas higher
208 concentrations produced net bacterial killing (Figure 1, panels A and B).

209 For the low inoculum, amoxicillin or cefquinome concentrations equal to MIC maintained the
210 bacterial density below 10^8 CFU/mL and higher concentrations produced bacterial killing. The
211 lowest bactericidal concentration (99.9% reduction of initial inoculum) was 8-fold the MIC for
212 both amoxicillin and cefquinome (Figure 1, panels C and D).

213

214 **Quantitative determination of antibacterial effects of amoxicillin and cefquinome for the**
215 **two inoculum sizes**

216 The different killing curves were used to establish a relationship between antibiotic concentration
217 and antibacterial effects, using a sigmoid E_{max} model (see Equation 2 and Figure 2). The
218 estimated pharmacodynamics parameters are given in Table 1. For both inoculum sizes, the EC_{50}

219 were lower for cefquinome, reflecting the higher potency of the cephalosporin compared to the
220 aminopenicillin. For both antibiotics, EC_{50} were about 4-5 times lower for a low inoculum (Table
221 1), indicating a higher potency of both drugs against a low compared with a high bacterial
222 inoculum. Moreover, the concentrations giving a 90% antibacterial effect (EC_{90}) were 8-fold and
223 3-fold lower against a low than against a high inoculum, for amoxicillin and cefquinome,
224 respectively (Table 1).

225

226 **Pharmacokinetics of amoxicillin and cefquinome in mice and selection of dosage regimens**

227 The observed and predicted plasma concentrations of amoxicillin (50 mg/kg) and cefquinome (5
228 mg/kg) following subcutaneous injection in infected and asymptomatic mice are shown in Figure
229 3, and the pharmacokinetic parameters are presented in Table 2. The terminal half-lives were 5.8h
230 for amoxicillin and 3.4h for cefquinome, due to the fact that long-acting formulations were used.
231 Indeed, both elimination half-lives are lower than 20-30 min after classical formulations, which
232 was not compatible with a twice-daily rhythm of administration. The times during which plasma
233 antibiotic concentrations were above the corresponding MIC ($T_{>MIC}$) were 16.5 and 13 h for
234 amoxicillin and cefquinome, respectively (Table 3).

235 Assuming dose-proportionality for both drugs, we simulated different amoxicillin and
236 cefquinome plasma concentration profiles to determine the doses for which $T_{>MIC}$ could attain
237 50% of the dosing interval ($T_{>MIC}=50\%$) (17). These doses were about 50 and 10 mg/kg/day for
238 amoxicillin and cefquinome, respectively.

239

240 **Growth of *P. multocida* inocula in mice**

241 The time-course of bacterial growth in the lungs of control mice is shown in Figure 4. The
242 bacterial load present in the lungs at $t=0h$ (at the end of the cycle of infection in the IES) was

243 very reproducible, about 4.43-4.48 LogCFU/lung (n=3). Twenty-four hours post-challenge, all
244 mice were asymptomatic and the total bacterial population was steady (4.23-4.60 LogCFU/lung,
245 n=3). Recently dead mice were observed at 48 and 72h post-challenge, and in those the bacterial
246 loads were 8.43-9.67 LogCFU/lung, with a mean of 9.24 ± 0.55 LogCFU/lung (n=8). Mice with
247 clinical symptoms were observed at 72 and 96h post-challenge. Bacterial loads were 6.57-7.85
248 LogCFU/lung, with a mean of 7.38 ± 0.55 LogCFU/lung (n=7). A total of 21 mice with no clinical
249 symptoms were sacrificed between 48 and 144h post-challenge. Bacterial loads ranged from
250 undetectable levels (< 2 LogCFU/lung) to 6.43 LogCFU/lung, with a mean of 3.04 ± 1.45
251 LogCFU/lung. The mean inoculum sizes were statistically different between the three groups
252 ($P < 0.05$; ANOVA).

253

254 **Clinical and microbiological outcomes**

255 i) Control group:

256 For the control group with no antibiotic, 60% (12/20) of the mice became ill and all these animals
257 died within the seven days after the challenge. Twenty-five percent (5/20) of challenged mice
258 showed no clinical sign of infection but had detectable bacterial loads in their lungs at day 7 after
259 the challenge, the mean bacterial load being 4.73 ± 1.12 LogCFU/lung. Fifteen percent (3/20) of
260 challenged mice had neither clinical symptom nor detectable bacteria in their lungs at day 7 post-
261 challenge.

262

263 ii) Early treatments

264 All animals exposed to *P. multocida* in the IES showed no clinical sign of infection at the time of
265 treatments (24h post bacterial challenge).

266 In the two amoxicillin groups (2.5 or 5mg/kg/day, Figure 5A), 80% and 100% of treated mice did
267 not present any clinical sign of infection during the six post-treatment days (7 post-challenge
268 days), respectively. At day 7 post-challenge, no bacteria were detected in the lungs of 55.5%
269 (n=6) and 90% (n=9) of mice treated with the 2.5 and 5 mg/kg/day amoxicillin doses,
270 respectively (Figure 6A). Mice with no microbiological cure at day 7 had a mean bacterial load of
271 3.78 ± 2.20 LogCFU/lung (n=4) and 2.56 LogCFU/lung (n=1) for the 2.5 and 5mg/kg/day doses,
272 respectively.

273 In the two cefquinome groups (0.5 or 1 mg/kg/day, Figure 5A), 90% and 100% of treated mice
274 presented no clinical sign of infection during the six post-treatment days (7 post-challenge days),
275 respectively. Four mice treated with the 0.5mg/kg/day cefquinome dose had no microbiological
276 cure at day 7 post-challenge, with a mean bacterial load of 3.92 ± 2.51 logCFU/lung (n=4).
277 Bacteria were eradicated in the lungs of all the mice treated with 1 mg/kg/day cefquinome.

278

279 iii) Treatments of symptomatic animals

280 In the six groups, 60-70% of infected mice showed clinical signs of infection during the 7 days
281 following bacterial challenge, and were then treated with amoxicillin or cefquinome at the time of
282 detection of the clinical symptoms (between 72h and 96h post-challenge).

283 For amoxicillin, 85.7% and 100% of mice treated with the 25 and 50 mg/kg/day doses were
284 clinically cured at day 7 post-challenge, respectively (Figure 5B), while all the sick mice treated
285 with the 5 mg/kg/day dose died before day 7 post-challenge.

286 In addition, at day 7 after the challenge, 57.1% and 66.6% of treated mice had a microbiological
287 cure with the 25 and 50 mg/kg/day doses, respectively (Figure 6B). Mice with no microbiological
288 cure at day 7 had bacterial loads of 4.11 ± 2.73 LogCFU/lung (n=4) and 3.71 ± 0.41 LogCFU/lung

289 (n=2) for the 25 and 50 mg/kg/day doses, respectively. In the 5 mg/kg/day group, the dead mice
290 had a mean bacterial load of 8.21 ± 1.56 Log CFU/lung (n=4).
291 For cefquinome, 83.3% and 100% of mice treated with the 5 and 10 mg/kg/day doses were
292 clinically cured at day 7 post-challenge, respectively (Figure 5B). All sick mice treated with the 1
293 mg/kg/day dose died before day 7 post-challenge.
294 In addition, 50% and 83.3% of treated mice showed a microbiological cure at day 7 post-
295 challenge for the 5 and 10 mg/kg/day doses, respectively (Figure 6B). Mice with no
296 microbiological cure had a bacterial load of 4.46 ± 1.75 LogCFU/lung (n=4) and 3.42
297 LogCFU/lung (n=1) for the 5 and 10 mg/kg/day doses, respectively. In the 1 mg/kg/day group,
298 the dead mice had a mean bacterial load of 8.46 ± 2.03 Log CFU/lung (n=3).
299

300 **DISCUSSION**

301 In this study, we observed that the delay in the onset of antibiotic treatment during the time
302 course of an infectious disease had a crucial impact on the efficacy of the antibiotics for a given
303 dosage regimen. In order to evaluate both clinical and microbiological outcomes, we developed
304 an original model of pneumonia in immunocompetent mice using *Pasteurella multocida* as the
305 pathogenic agent. Although *Pasteurella multocida* is only found in humans in wound infections
306 caused by dogs and cats bites, it is one of the main pathogens responsible for respiratory disease
307 and pneumonia in cattle and swine, that are treated with antibiotics of critical importance in
308 human medicine such as macrolides, fluoroquinolones and cephalosporins. One of the tested
309 beta-lactams, cefquinome, is a fourth-generation cephalosporin used in food producing animals,
310 which has a molecular structure very close to that of cefpirome (cyclopentapyridin vs
311 cyclohexapyridin moiety).

312 We decided to develop an experimental model of infection enabling us to test the hypothesis that
313 an antibiotic treatment initiated early during the natural time-course of the disease could be
314 efficacious with doses much lower than those required at a later stage, when animals present
315 overt clinical symptoms. We supposed that the main biological determinant of this effect was the
316 size of the bacterial load at the beginning of the treatment. A set of published works support this
317 hypothesis, showing that the *in vitro* pathogen susceptibilities for many antibiotics are inoculum
318 size dependent (14), or that *in vivo*, antibiotics are much more potent when targeting low versus
319 high pathogen loads in rodent infection models (8, 10-12, 18).

320 Almost all these *in vivo* studies were performed by directly inoculating animals with bacterial
321 loads of low or high initial sizes, and by treating at fixed post-challenge times. The study of
322 Ferran et al. (9) was, to our knowledge, the first after the “historical” works of Eagle (5, 6) to use
323 a model in which a low size inoculum was given and treatments were initiated at different times

324 of the natural time-development of the infectious disease. In the present study the same strategy
325 was used, with two modifications aimed at bringing the experimental model closer to clinical
326 settings: (i) firstly, the contamination pathway was more “natural” than classical models: air-
327 borne versus intra-tracheal (19), which resulted in a highly reproducible initial bacterial load of
328 about 10^4 CFU/lung, and (ii) secondly, after a slower and more realistic time-development of the
329 pulmonary infection, the treatment of sick animals was initiated at the first signs of illness rather
330 than at a fixed post-challenge time. An important characteristic of this more realistic
331 experimental setting is that the impact of two variables, bioburden and time (or “age” of the
332 infection), was merged. About 60% of challenged mice became sick, reflecting the natural
333 variability of illness development when a low initial contaminating load is used in
334 immunocompetent animals. This feature was probably inevitable because the main goal of our
335 model was to obtain a soft progression of the disease to allow different times for testing the
336 treatment onset. We established from the twice-a-day observations of mice that the clinical signs
337 of infection were detected between 48-96 h after the challenge. At these times, the mean bacterial
338 loads in the lungs were about six-hundred-fold higher than those measured at 24h post-challenge,
339 the time of early treatments (Figure 4).

340 In order to determine the fully curative dosage regimens for sick mice on a rational basis,
341 pharmacokinetic studies were carried out to calculate the doses required to attain a value of $T_{>MIC}$
342 of 50% of the dosing interval (1, 3, 17, 20-22). The assumption of dose-proportionality required
343 for calculations had previously been demonstrated for amoxicillin in diseased animals (23).
344 Treatment of sick animals first confirmed that $T_{>MIC}$ was an efficient PK/PD index for predicting
345 the efficacy of beta-lactams, because halving the predicted efficacious doses reduced both the
346 $T_{>MIC}$ and the microbiological/clinical efficacy (Table 3; Figures 5 and 6). Interestingly, in a
347 recent work correlating plasma exposure to a cephalosporin with microbiological and clinical

348 cure of nosocomial pneumonia in humans (22), results from clinical trials showed that 50% and
349 90% of cure were associated with $T_{>MIC}$ values of 47% and 96% of the dosing interval,
350 respectively. In our work, the highest doses that were tested in sick animals produced
351 microbiological cure rates and $T_{>MIC}$ that were in the range of the results obtained by Muller et al.
352 (22). These doses were sub-optimal in terms of microbiological cure, meaning that the
353 differences between efficacious doses in early versus later conditions were probably not over-
354 estimated.

355 In our initial dose determination for sick mice, we did not take into account the impact of the
356 disease on the drugs pharmacokinetics. It has been shown for amoxicillin and the cephalosporin
357 cefipime (23, 24), that infectious or inflammatory disease resulted in a plasma over-exposure
358 compared to healthy animals. This means that the doses we calculated from mice that were
359 infected but without clinical signs were likely to produce higher values of $T_{>MIC}$ in sick mice than
360 those anticipated. On the other hand, the presence of infectious exudate in the lung could have
361 reduced the ability of the drug to reach its site of action, meaning that similar $T_{>MIC}$ values would
362 not produce similar antimicrobial activities and therapeutic outcomes. Nevertheless our goal was
363 not to estimate the best doses of amoxicillin and cefquinome in infected mice, but rather to obtain
364 reasonably efficacious doses allowing relevant comparisons with the early treatment setting.

365 The amoxicillin and cefquinome dosage regimens for early intervention were obtained by
366 dividing by 10 the PK/PD-based curative doses in sick mice. The hypothesis that efficacious
367 doses could be lower in early compared to later interventions, with both situations being
368 characterized by different bacterial loads facing antibiotics, was supported by a set of in vivo
369 observations on the influence of the inoculum size on the efficacy of fluroquinolones or beta-
370 lactams against various Gram-positive or Gram-negative pathogens (8, 10-12, 18). In particular,

371 Mizunaga et al. (12) determined that in *Pseudomonas aeruginosa* infected mice, that ED₅₀s of 3
372 carbapenems were 12 to 50 lower when the initial bacterial inoculum was 100-fold lower.

373 We performed time-kill experiments with the *Pasteurella multocida* strain to evaluate in vitro the
374 influence of inoculum size on the antibacterial activity of amoxicillin and cefquinome. We
375 showed that both antibiotics were more potent against a low versus high inoculum, as indicated
376 by the shift to the left of the concentration-effect curves (Figure 2), as well as the calculated EC₅₀
377 and EC₉₀ for antibacterial effect (Table 1). Similar results in terms of shift of potency associated
378 with inoculum size were obtained by Bulitta et al. (25) with colistin against several *Pseudomonas*
379 *aeruginosa* strains. Interestingly, the EC₅₀ of both drugs were equal to the corresponding MIC (1
380 and 1.25 times the MIC) with the low inoculum of 10⁵ CFU/mL, and equal to five times the MIC
381 (5.34 and 5.25 times the MIC) with the high inoculum of 10⁷ CFU/mL. These results are
382 consistent with those of Udekwu et al. (14), showing that MIC values are bacterial density
383 dependent and that, we quote: “treatments based on the classic PK/MIC index that may be
384 effective in treating low-density infections may fail to, or require extensive amounts of time to,
385 clear higher density infections”. Moreover, as also indicated in (14), the lower amount of
386 antibiotic molecules per bacterial cell when CFU counts increase should probably not influence
387 antimicrobial activity, given the enormous values of this number.

388 Altogether, the data from previously published in vivo and in vitro studies as well as our in vitro
389 results were used to support the choice of testing ten-fold lower doses for early treatments
390 compared to the treatment of sick animals, within the general PK/PD framework linking
391 efficacious doses with efficacious concentrations,.

392 When early interventions were tested, excellent results were obtained for both clinical and
393 bacteriological endpoints despite the fact that the T_{>MIC} for the selected dosage regimens were
394 much lower than 50% of the dosage interval (Table 3). As pharmacokinetic studies were

395 performed in infected mice with the same time frame as early treatments (24h post-challenge),
396 these $T_{>MIC}$ calculations were not biased by different pathophysiological status. As previously
397 indicated, the influences of the inoculum size and the stage of the infectious disease are merged
398 in our experimental model. On the other hand, both variables are naturally linked by the time
399 dimension underlying their development, as well as by the cross-influence they probably exert on
400 each other. Finally, along with others (12, 14), our data highlight that the size of the bacterial load
401 targeted by antimicrobials is probably an important characteristic to be factored in establishing
402 target values of PK/PD indexes that efficiently predict dosing regimen efficacy.

403 An increasing volume of data supports the hypothesis that the increased size of bacterial inocula
404 correlates with an increased genetic and phenotypic heterogeneity of the population, leading high
405 inocula to harbor subpopulations of antibiotic resistant mutants and/or persisters tolerant to
406 antibiotics (26-28). Persisters are formed through a combination of stochastic and deterministic
407 events, and the combined effects of age and size of inocula might contribute to an increase in the
408 likelihood of such subpopulations being present (27, 28). Even if persisters are described as
409 major components of chronic infections associated with biofilms, that could play the role of
410 protective habitat allowing persisters to escape the immune response, they also explain a part of
411 the loss of antimicrobial activity against high inocula of planktonic bacteria that is classically
412 observed in acute time-kill experiments (27, 29).

413 Recent studies have highlighted the role played in bacterial infections by the interaction between
414 bioburden and the immune system, in particular the bacterial clearance by granulocytes. Indeed,
415 Drusano et al.(30, 31) established in mice models of infection that the kill of bacterial pathogens
416 by granulocytes was saturable, with half-saturating inoculum sizes ranging from 6.3 to 6.8
417 LogCFU/g. Interestingly, we observed that bacterial loads associated with the presence or
418 absence of clinical symptoms were higher than 6.57 LogCFU/lung or lower than 6.43

419 LogCFU/lung, respectively (Figure 2), in the range of these half-saturating counts. Finally, the
420 need of higher antibiotic doses for sick animals in a later stage of the disease might in part be
421 explained by the simultaneous presence of a decreased “intrinsic” antimicrobial activity due to
422 the inoculum-size effect, and of the need to produce net bacterial killing of sufficient amplitude
423 to drop colony counts below saturating values, allowing the immune system to fully exert its role
424 in infection cure (30, 31).

425 The present results on the in vivo impact of inoculum size on antimicrobial activity and
426 therapeutic outcomes were obtained using one strain of *Pasteurella multocida*, but their generic
427 relevance is strongly supported by similar findings obtained with other Gram-negative bacterial
428 species such as *Escherichia coli* (Ferran, 2009), *Klebsiella pneumonia* (Kesteman, 2009, 2010) or
429 *Pseudomonas aeruginosa* (Jumbe 2003; Mizugana 2005).

430 These findings, combined with other studies, have clearly clinical implications, for example for
431 early interventions in the context of nosocomial infections in hospitalized patients. More
432 developed discussions on these topics can be found elsewhere (6, 12, 13). Our point of view is
433 that the recognition of the combined roles of inoculum size and age of infection in antimicrobial
434 therapy, summarized for the sake of simplicity by stating that early interventions require lower
435 doses versus later interventions requiring higher doses, would mainly contribute to human
436 medicine by stimulating researches aimed at improving the management of patients with greater
437 bacterial burdens. Conversely moving towards the reduction of antibiotic doses, even in a context
438 of earlier interventions with appropriate molecules, would probably not be applicable in human
439 medicine (excepted through reduction of treatment duration).

440 The situation is quite different in veterinary medicine. Indeed, the urgent need to preserving the
441 effectiveness of antibiotics for human health requires a considerable reduction in antibiotic
442 consumption in animals, while maintaining effective control of infectious disease outbreaks in

443 herds. Moreover, stakes of disease control are at the group/herd level rather than at the individual
444 level. For these reasons, we consider that our studies should contribute to the promotion of
445 innovative antimicrobial therapies, characterized by targeted and individual treatments, but only
446 after early detection/diagnosis, and thus requiring lower doses, and by parenteral routes to avoid
447 unwanted impact of intestinal microbiota. This approach should replace the current, but no longer
448 acceptable strategies of systematic and collective oral treatments of entire groups or herds. Such
449 new strategies could not be successful without further researches and the development of
450 appropriate methodologies for early detection and diagnostic of illness, but it is a vital objective
451 for veterinary antimicrobial therapy.
452

453 REFERENCES

- 454 1. **Andremont A.** 2003. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic
455 resistance. *ASM News* **69**:601-607.
- 456 2. **Baquero F, Coque TM, de la Cruz F.** Ecology and evolution as targets: the need for
457 novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents*
458 *Chemother* **55**:3649-3660.
- 459 3. **Canton R, Morosini MI.** 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following
460 exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* **35**:977-991.
- 461 4. **Martínez MN, Papich MG, Drusano GL.** 2012. Dosing regimen matters: the
462 importance of early intervention and rapid attainment of the
463 pharmacokinetic/pharmacodynamic target. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2795-2805.
- 464 5. **Eagle H.** 1949. The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the
465 curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci, and
466 *Treponema pallidum*. *J Exp Med* **90**:595-607.
- 467 6. **Eagle H, Magnuson HJ, Fleischman R.** 1947. Relation of the Size of the Inoculum and
468 the Age of the Infection to the Curative Dose of Penicillin in Experimental Syphilis, with
469 Particular Reference to the Feasibility of Its Prophylactic Use. *J Exp Med* **85**:423-440.
- 470 7. **Ferran A, Dupouy V, Toutain PL, Bousquet-Melou A.** 2007. Influence of inoculum
471 size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant
472 prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4163-
473 4166.
- 474 8. **Ferran AA, Kesteman AS, Toutain PL, Bousquet-Melou A.** 2009.
475 Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the
476 selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial
477 infection model. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3384-3390.
- 478 9. **Ferran AA, Toutain PL, Bousquet-Melou A.** 2011. Impact of early versus later
479 fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a
480 mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* **148**:292-297.
- 481 10. **Jumbe N, Louie A, Leary R, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Freeman C,**
482 **Kahn JB, Bush K, Dudley MN, Miller MH, Drusano GL.** 2003. Application of a
483 mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial
484 populations during therapy. *J Clin Invest* **112**:275-285.
- 485 11. **Kesteman AS, Ferran AA, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain**
486 **PL, Bousquet-Melou A.** 2009. Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma
487 exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a
488 rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4740-4748.
- 489 12. **Mizunaga S, Kamiyama T, Fukuda Y, Takahata M, Mitsuyama J.** 2005. Influence of
490 inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro
491 activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob*
492 *Chemother* **56**:91-96.
- 493 13. **Morrissey I, George JT.** 1999. The effect of the inoculum size on bactericidal activity. *J*
494 *Antimicrob Chemother* **43**:423-425.
- 495 14. **Udekwi KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR.** 2009. Functional
496 relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob*
497 *Chemother* **63**:745-757.

- 498 15. **D'Agata EM, Dupont-Rouzeyrol M, Magal P, Olivier D, Ruan S.** 2008. The impact of
499 different antibiotic regimens on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria. *PLoS*
500 *One* **3**:e4036.
- 501 16. 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial
502 Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. M100-S15 CLSI, Villanova, PA,
503 USA.
- 504 17. **Toutain PL, del Castillo JR, Bousquet-Melou A.** 2002. The pharmacokinetic-
505 pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci*
506 **73**:105-114.
- 507 18. **Kesteman AS, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain PL, Bousquet-**
508 **Melou A.** 2010. Emergence of resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intestinal tract
509 during successful treatment of *Klebsiella pneumoniae* lung infection in rats. *Antimicrob*
510 *Agents Chemother* **54**:2960-2964.
- 511 19. **Griffith D, Dudley MN.** 2007. Animal models of infection for the study of antibiotic
512 pharmacodynamics. In Nightingale CH, Ambrose PG, Drusano GL, Murakawa T (ed.),
513 *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*.
- 514 20. **Craig WA.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for
515 antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* **26**:1-10; quiz 11-12.
- 516 21. **Craig WA.** 2003. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to
517 the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am* **17**:479-
518 501.
- 519 22. **Muller AE, Punt N, Mouton JW.** 2013. Optimal exposures of ceftazidime predict the
520 probability of microbiological and clinical outcome in the treatment of nosocomial
521 pneumonia. *J Antimicrob Chemother* **68**:900-906.
- 522 23. **Godoy C, Castells G, Marti G, Capece BP, Perez F, Colom H, Cristofol C.** 2011.
523 Influence of a pig respiratory disease on the pharmacokinetic behaviour of amoxicillin
524 after oral ad libitum administration in medicated feed. *J Vet Pharmacol Ther* **34**:265-276.
- 525 24. **Pawar YG, Sharma SK.** 2008. Influence of *E. coli* lipopolysaccharide induced fever on
526 the plasma kinetics of cefepime in cross-bred calves. *Vet Res Commun* **32**:123-130.
- 527 25. **Bulitta JB, Yang JC, Yohann L, Ly NS, Brown SV, D'Hondt RE, Jusko WJ, Forrest**
528 **A, Tsuji BT.** 2010. Attenuation of colistin bactericidal activity by high inoculum of
529 *Pseudomonas aeruginosa* characterized by a new mechanism-based population
530 pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2051-2062.
- 531 26. **Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S.** 2004. Bacterial persistence as a
532 phenotypic switch. *Science* **305**:1622-1625.
- 533 27. **Lewis K.** 2010. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* **64**:357-372.
- 534 28. **Luidalepp H, Joers A, Kaldalu N, Tenson T.** 2011. Age of inoculum strongly
535 influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered
536 persistence. *J Bacteriol* **193**:3598-3605.
- 537 29. **Lewis K.** 2012. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance.
538 *Handb Exp Pharmacol*:121-133.
- 539 30. **Drusano GL, Fregeau C, Liu W, Brown DL, Louie A.** 2010. Impact of burden on
540 granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model. *Antimicrob Agents*
541 *Chemother* **54**:4368-4372.
- 542 31. **Drusano GL, Vanscoy B, Liu W, Fikes S, Brown D, Louie A.** 2011. Saturability of
543 granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Antimicrob*
544 *Agents Chemother* **55**:2693-2695.
- 545

TABLE 1 Pharmacodynamic parameters^a of E_{max} curves of *P.multocida*

	Antibiotic drug	EC ₅₀ ^b (µg/mL)	γ ^c	EC ₉₀ ^d (µg/mL)
10 ⁵ CFU/mL	amoxicillin	0.126±0.008	2.31±0.321	0.35
	cefquinome	0.020±0.009	2.14±0.133	0.072
10 ⁷ CFU/mL	amoxicillin	0.668±0.043	1.47±0.109	2.89
	cefquinome	0.084±0.003	2.11±0.134	0.23

^a Mean±SE

^b Antibiotic drug concentration producing 50% of the antibacterial effect .

^c Sigmoid coefficient of the curve.

^d Calculated antibiotic drug concentration producing 90% of the antibacterial effect

TABLE 2 Pharmacokinetic parameters and PK/PD indices of amoxicillin and cefquinome in mice after subcutaneous injection.

Administered antibiotic	Amoxicillin	Cefquinome
Dose (mg/kg)	50	5
AUC _(0-∞) (µg*hr/mL)	163	2
C _{max} (µg/mL)	277	2.8
T _{1/2elim} (hr)	5.8	3.4
CL/F (mL/hr/kg)	306	2430
C _{average} (µg/mL)	6.79	0.083
MIC for <i>P.multocida</i> (µg/mL)	0.125	0.016

AUC (Area Under the plasma concentration Curve).

C_{max} is the observed maximal plasma concentration.

T_{1/2elim} is the terminal elimination half life.

CL/F is the apparent plasma clearance (Dose/ AUC_(0-∞)).

C_{average} is the mean antibiotic concentration over 24 hours.

TABLE 3 Values of the PK/PD index $T_{>MIC}$ for different dosing regimens of amoxicillin and cefquinome

Administered antibiotic	Amoxicillin			Cefquinome		
	dose (mg/kg)	50	25	5	10	5
$T_{>MIC}$ (h)	16.5	10.7	3.2	12.9	9.2	1.9
$T_{>MIC}$ (% of dosing interval)	69	45	13	54	38	8

$T_{>MIC}$ is the time above the MIC for the selected dosing regimen.

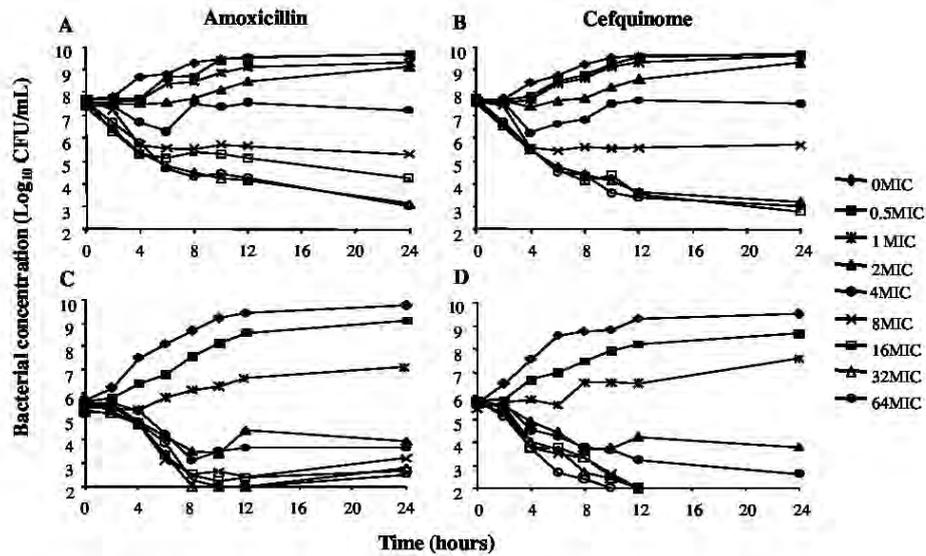


FIG. 1 Killing curves of amoxicillin (A, C) and cefquinome (B, D) against 10^7 CFU/mL (A, B) and 10^5 CFU/mL (C, D) inocula of *P. multocida*. Antibiotic concentrations are expressed in multiple of the MIC: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64.

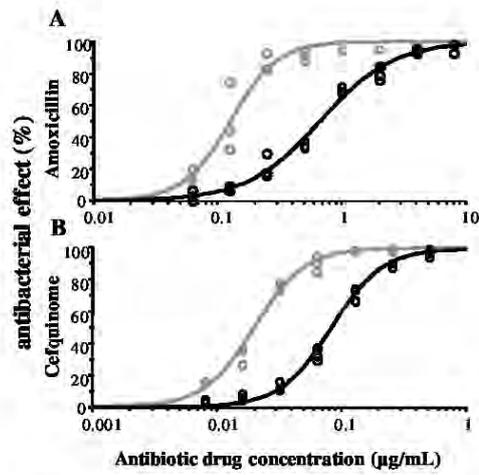


FIG. 2 Antibacterial effect of amoxicillin (panel A) and cefquinome (panel B) against 10^5 CFU/mL (--) and 10^7 CFU/mL (—) inoculum sizes of *P. multocida* . Circles (o) represent observed data and lines represent fitted data.

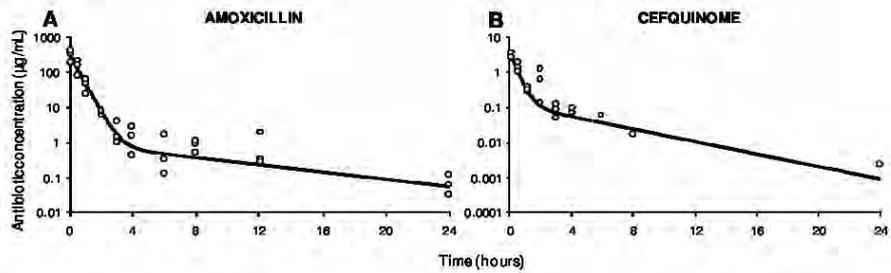


FIG. 3. Observed (o) and predicted (-) antibiotic plasma concentrations versus time in mice after a single subcutaneous administration. A) Amoxicillin, 50 mg/kg. B) Cefquinome, 5 mg/kg.

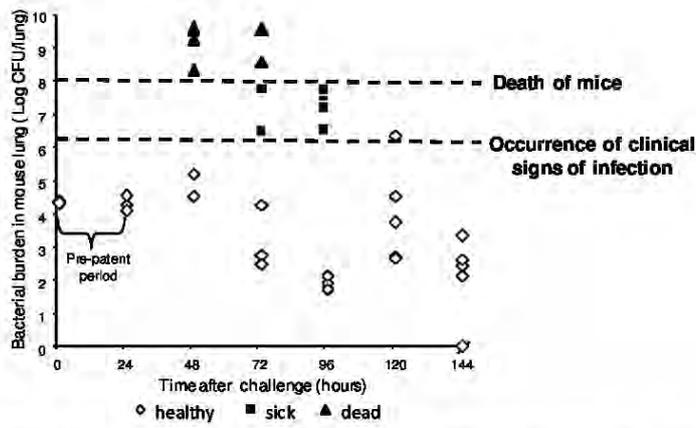


FIG. 4. Growth of *Pasteurella multocida* inocula versus time (h) in mouse lungs after an aerial challenge. Symbols representing pathophysiological status of mice: ◊ asymptomatic mouse, ■ sick mice, ▲ dead mice.

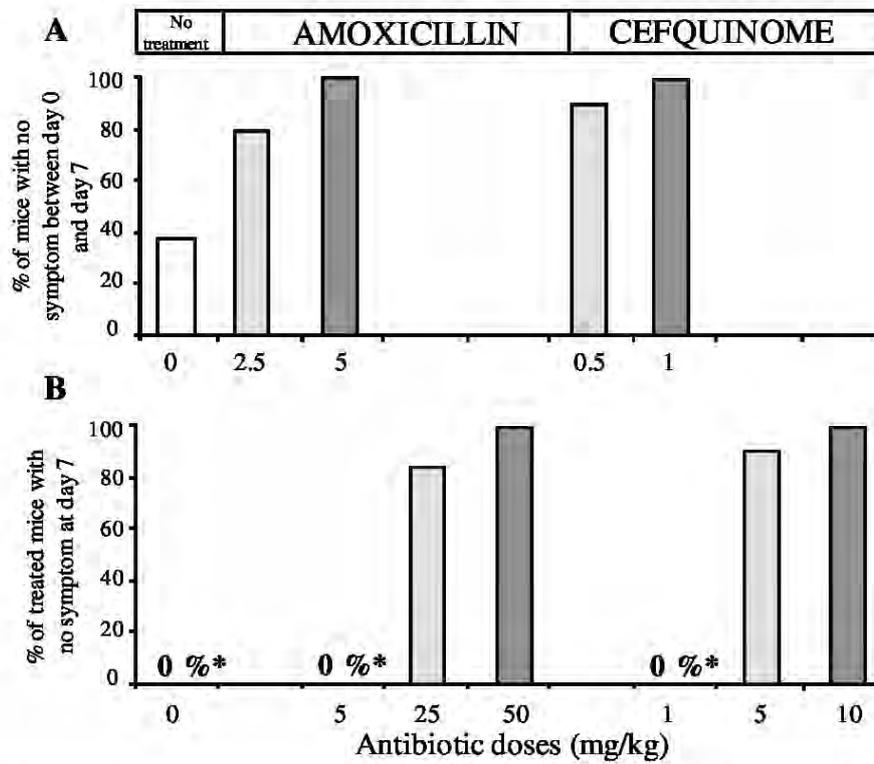


FIG. 5. Results of absence of clinical signs of infection for early (A) and late (B) treatment groups after 7 days. (*All mice died within 7 days).

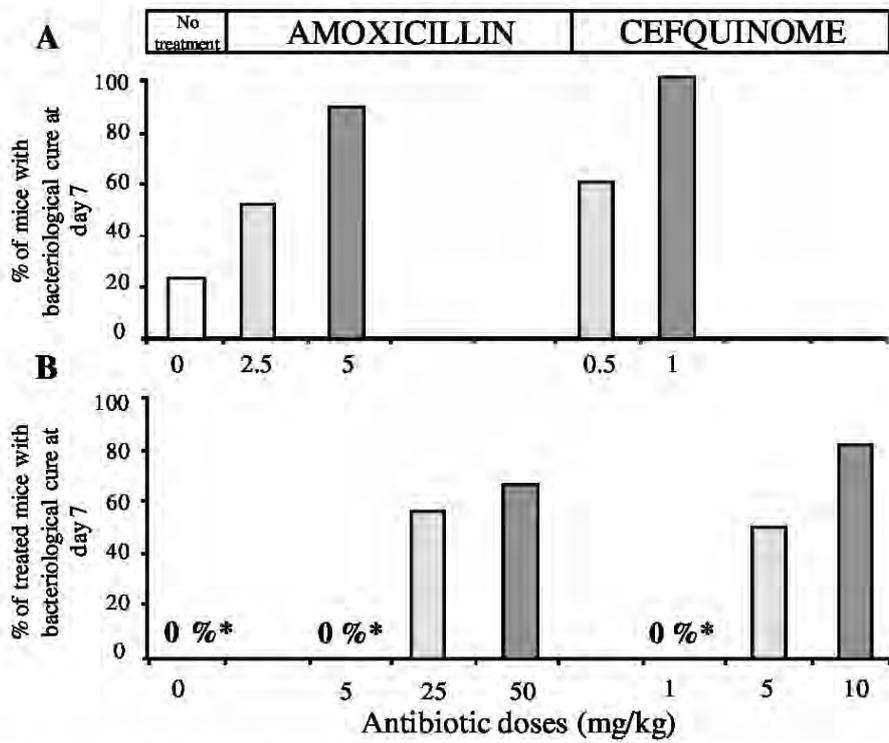


FIG. 6 : Results of bacteriological cure for early (A) and late (B) treatment groups after 7 days. (*All mice died within 7 days).

Chapitre 4

ETUDE EXPERIMENTALE

**Impact d'une dose de cefquinome adapté
au traitement précoce d'un petit inoculum
sur la guérison de l'infection et sur
l'émergence de résistances au sein de la
flore fécale**

CHAPITRE 4 - ETUDE EXPERIMENTALE

4. Impact d'une dose de cefquinome adaptée au traitement précoce d'un petit inoculum sur la guérison de l'infection et sur l'émergence de résistances au sein de la flore fécale

Cette partie du travail de thèse a donné lieu à un article intitulé : « Low or High Doses of Cefquinome Targeting Low or High Bacterial Inocula Cure *Klebsiella pneumoniae* Lung Infections but Differentially Impact the Levels of Antibiotic Resistance in Fecal Flora » publié dans la revue **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (voir paragraphe 4.7).

L'ensemble des travaux décrits dans ce chapitre a été réalisé à l'Anses, au sein du Laboratoire de Fougères.

4.1. Introduction

Nous avons montré précédemment qu'une dose de cefquinome adaptée à une charge bactérienne faible, et administrée à un stade précoce d'une infection pulmonaire, permettait d'obtenir des taux de guérison clinique et bactériologique au moins équivalents à ceux obtenus avec une dose plus élevée, nécessaire au traitement de l'infection à un stade plus tardif, caractérisé par des manifestations cliniques.

Par ailleurs, il est établi que la pression de sélection exercée par les antibiotiques est un facteur déterminant du développement des résistances bactériennes au sein du microbiote intestinal. La question se pose donc de savoir si la pression sélection exercée sur la flore digestive par une posologie adaptée à un traitement précoce est susceptible de provoquer ou pas l'émergence de résistances.

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de rat axénique dont le tube digestif a été colonisé par une flore fécale de porc contenant une souche d'*E.coli* porteuse d'un gène *ctx-m* présente en sous-dominance. Les rats gnotoxéniques obtenus ont ensuite été infectés afin de provoquer une infection pulmonaire à *Klebsiella pneumoniae*, avec des inocula de petite taille et de grande taille. Les posologies de cefquinome adaptées à la taille de l'inoculum et précédemment validées chez les souris infectées par *P. multocida* ont été administrées et nous avons évalué conjointement sur les mêmes animaux leur efficacité clinique et leur impact sur l'émergence d'entérobactéries résistantes au sein de la flore digestive.

4.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries utilisées

4.2.1. Problématique et objectifs

Le but de cette section est de déterminer la sensibilité aux céphalosporines de la souche de *Klebsiella pneumoniae* utilisée comme pathogène pulmonaire et de la souche d'*Escherichia coli* (porteuse d'un gène *ctx-m*) utilisée comme marqueur de résistance au sein du microbiote intestinal.

4.2.2. Matériels et méthodes

4.2.2.1. Souches bactériennes utilisées

La souche *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 a été choisie comme pathogène pulmonaire. La souche *Escherichia coli* 09F000898, isolée en 2008 à partir de fèces de porc, a été choisie pour être inoculée dans le tube digestif de nos animaux. Cette souche possède un plasmide codant pour une bêta-lactamase CTX-M du groupe 1, appartenant au phylogroupe A et présentant un phénotype BLSE.

4.2.2.2. Antibiotiques utilisés

De la poudre de cefquinome sulfate (Fluka Analytical, France) et de la poudre de cefotaxime sodique (Fluka Analytical, France) ont été utilisées.

4.2.2.3. Détermination de la CMI

Les CMI de la cefquinome pour *K. pneumoniae* ATCC 43816 et du cefotaxime pour *Escherichia coli* 09F000898 ont été déterminées en triplicate par microdilution en milieu liquide conformément aux méthodes de référence du CLSI (2009).

4.2.3. Résultats

La CMI de la cefquinome pour *K. pneumoniae* ATCC43816 a été de 0.125 µg/mL et la CMI du cefotaxime pour *E.coli* 09F000898 a été supérieure à 2 µg/mL, confirmant que cette souche est bien résistante au cefotaxime.

4.3. Pharmacocinétique de la cefquinome chez le rat et détermination des schémas posologiques

4.3.1. Problématique et objectifs

Nous avons réalisé une étude de la pharmacocinétique de la cefquinome chez le rat afin de déterminer la dose de cefquinome efficace dans un cadre de traitement classique, c'est-à-dire initiée après observation des symptômes cliniques de la maladie infectieuse.

Comme précédemment, nous nous sommes appuyés sur l'approche PK/PD, qui indique que les doses des bêta-lactamines doivent être capables de produire des valeurs de l'indice $T_{>CMI}$ supérieures à 50% de l'intervalle de dosage pour garantir une efficacité clinique et bactériologique.

Cette approche nécessitait donc de disposer de données sur la pharmacocinétique de la cefquinome chez le rat.

4.3.2. Matériels et méthodes

4.3.2.1. Animaux utilisés

Des rats mâles OFA (Janvier, Saint Berthevin, France) ont été utilisés. Toutes nos procédures ont reçu l'approbation du comité d'éthique français (numéro d'autorisation: 13/11/12-2) et ont été exécutées conformément aux normes établies pour l'expérimentation animale par le Ministère de l'Agriculture Français (numéro d'agrément C35 137 26).

4.3.2.2. Réalisation de la cinétique

Six rats mâles OFA pesant entre 250 et 300 g (Janvier, Saint Berthevin, France) ont été cathétérisés au niveau de la veine fémorale. Deux jours après l'opération, les rats ont reçu une dose unique de 10 mg/kg de cefquinome (Cobactan © 2,5%, 25mg/ml, Intervet, France) par voie sous-cutanée et au niveau du dos.

Des échantillons de sang (250 μ L) ont été prélevés à 0.08, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 12 h après l'administration. Après chaque ponction de sang, un volume de sérum physiologique équivalent au volume de sang collecté a été injecté aux animaux. Les animaux ont été euthanasiés après la dernière prise de sang par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (DolethalND, Vétoquinol, France). Les échantillons de sang ont été centrifugés à 7000g pendant 10 min à 4°C et le plasma a été conservé à -80°C jusqu'au dosage. Les dosages de cefquinome ont été réalisés comme décrit dans la section 3.

4.3.2.3. Analyse des données

L'analyse des données a été réalisée par une approche de type populationnelle (modèle non-linéaire à effets mixtes). Un modèle monocompartimental avec administration extravasculaire a été utilisé pour décrire l'évolution des concentrations de cefquinome en fonction du temps et un modèle d'erreur constante a été utilisé pour estimer la variabilité. L'ajustement des données a été effectué en utilisant le logiciel Monolix® 4.1.4 (Lixoft®, Orsay, France).

4.3.3. Résultats

Les profils de concentration plasmatique de cefquinome consécutivement à une injection unique de 10 mg/kg par voie sous-cutanée chez le rat sont présentés dans la Figure 21 et les paramètres pharmacocinétique sont présentés dans le Tableau 13. L' $AUC_{[0-\infty]}$ a été de 10.9 mg*h/mL et le temps de demi-vie d'élimination a été estimé à 0.68 h.

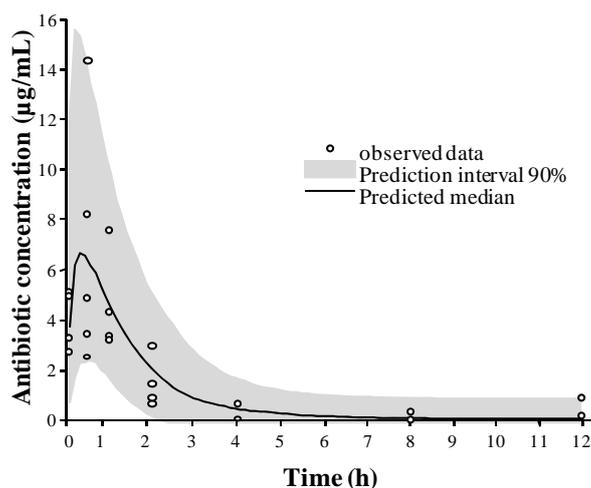


Figure 21 : Concentrations plasmatiques de cefquinome en fonction du temps chez les rats.
Les concentrations observées (○) et la moyenne prédite (-) sont ici représentées.

Tableau 13 : Paramètres pharmacocinétiques de population de la cefquinome chez le rat après une injection par voie sous-cutanée.

Paramètres	valeurs populationnelles	Variabilité interindividuelle (%)
Dose (mg/kg)	10	-
Ka (1/hr)	5.53	115
V/F(mL/kg)	900	49.6
CL/F (mL/hr/kg)	912	26.8
AUC _[0-∞] (µg*hr/mL)	10.9	-
T _{1/2elim} (hr)	0.68	-

Ka est la constant d'absorption

V/F est le volume de distribution apparent

CL/F est la clairance d'élimination plasmatique apparente

AUC (Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques; Dose/CL/F).

T_{1/2elim} est la demi-vie d'élimination terminale ($\ln 2 * V/F/CL/F$).

En supposant une relation de dose-proportionnalité pour cet antibiotique, nous avons simulé différents profils de concentration plasmatique de cefquinome pour pouvoir déterminer les doses à appliquer pour le traitement classique, pour lesquelles le T_{>CMI} doit atteindre la valeur cible de 50% de l'intervalle de dosage (T_{>CMI}=50%). Nous avons ainsi estimé que le schéma posologique de cefquinome dans le cadre du traitement classique devait être de 50 mg/kg,

En supposant une relation de dose-proportionnalité pour la cefquinome, nous avons simulé les profils de concentrations correspondant à différentes doses de cefquinome afin d'estimer la posologie pour laquelle le T_{>CMI} atteignait la valeur cible de 50% de l'intervalle de dosage (T_{>CMI} = 50%). Cette posologie est de 50 mg/kg deux fois par jour (Tableau 14).

Tableau 14 : Valeurs des indices PK/PD pour différentes doses de cefquinome chez le rat.

Paramètres PK/PD	dose (mg/kg)	
dose (mg/kg)	50	5
T _{>MIC} (h)	6	3.9
T _{>MIC} (% de l'intervalle de dosage)	50	32.5

T_{>MIC} est le temps où les concentrations plasmatiques d'antibiotique sont supérieures à la CMI pour une dose déterminée.

4.3.4. Conclusion

En conclusion, nous avons pu déterminer grâce à notre étude pharmacocinétique le schéma posologique à appliquer chez nos animaux dans le cadre du traitement antibiotique classique. En ce qui concerne le traitement antibiotique de type précoce, nous nous sommes appuyés sur les résultats *in vitro* obtenus dans la section 3 et nous avons ainsi également appliqué un facteur de réduction des doses par 10 dans le cadre du traitement de type précoce. Les animaux recevant le traitement précoce ont ainsi reçu une dose de 5 mg/kg deux fois par jour.

4.4. Evaluation de l'efficacité des différents types de traitement antibiotiques sur la guérison des animaux

4.4.1. Problématique et objectifs

Nous avons voulu déterminer l'efficacité des différents schémas posologiques que nous avons déterminé dans la section 4.3 sur la guérison clinique et microbiologique des animaux

4.4.2. Matériels et méthodes

4.4.2.1. Animaux utilisés

Des rats mâles OFA axéniques pesant de 100 à 150 g (Charles River, L'arbresle, France) ont été utilisés. Les animaux ont été hébergés individuellement dans différents isolateurs stériles, avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les rats ont été nourris *ad libitum* avec de l'aliment complet irradié (R03-40; UAR, Villemoisson, France) et ont été hydratés avec de l'eau distillée stérilisée. Toutes nos procédures ont reçu l'approbation du comité d'éthique français (numéro d'autorisation: 13/11/12-2) et ont été exécutées conformément aux normes établies pour l'expérimentation animale par le Ministère de l'Agriculture Française (numéro d'agrément C35 137 26).

4.4.2.2. Vérification de l'état axénique des animaux

Des fèces ont été prélevées chez les animaux dès leur arrivée en provenance du fournisseur et un jour avant l'implantation de la flore (8 jours après leur arrivée). Les fèces ont ensuite été diluées au dixième dans du bouillon tryptone-sel et ont été homogénéisées. Le statut axénique a été vérifié sous atmosphère anaérobie en étalant l'homogénat sur des géloses Columbia supplémentées avec du sang de mouton et en l'incubant dans du bouillon Thioglycolate avec Résazurine. Il a également été déterminé sous atmosphère aérobie en étalant les homogénats sur des géloses cœur-cerveau (BHI) supplémentées avec du sang de mouton et également en diluant les homogénats dans du bouillon Thioglycolate avec Résazurine et dans des géloses foie-viande. Les souches *E. faecium* ATCC 19434 (témoin anaérobie) et *E. coli* ATCC 25922 (témoin aérobie) ont été utilisées comme contrôles.

4.4.2.3. Implantation de la flore digestive:

Les fèces d'un porc EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques, Anses, Laboratoire de Ploufragan) ont été utilisées pour ces expériences. Deux grammes de matières fécales et 1 mL d'une suspension contenant 5×10^5 UFC/mL d'*E.coli* 09F000898 ont été dilués dans 17 ml de bouillon Thioglycolate avec Resazurine. La suspension a été homogénéisée et un millilitre a été inoculé par voie intragastrique aux rats axéniques. Les animaux ont ensuite été laissés au repos pendant trois semaines afin de stabiliser leur flore digestive. De plus, un gramme de fèces a été dilué dans 5 mL de bouillon tryptone-sel et 1 mL de cette solution a été dilué au $10^{\text{ème}}$ de manière successive et ces dilutions ont été étalées sur des géloses Mac Conkey supplémentées avec 2 µg/mL de céfotaxime (CTX) afin de vérifier l'absence d'entérobactéries résistantes au céfotaxime dans les fèces du porc donneur. La limite de quantification des bactéries a été de 10 UFC/g de fèces.

4.4.2.4. Infection des animaux

L'infection pulmonaire a été réalisée selon un protocole classique décrit dans la littérature (Bakker-Woudenberg, de Jong-Hoenderop et al. 1979; Kesteman, Ferran et al. 2009; Kesteman, Perrin-Guyomard et al. 2010). Les rats ont été anesthésiés avec un mélange kétamine/médétomidine (Imalgene 1000 [Merial SAS, Villeurbanne, France] et Domitor [Pfizer, Paris, France]). Un sondage intra-trachéal a été réalisé et une suspension saline de 0.05 mL contenant $0, 2 \times 10^6$ ou 2×10^{10} UFC/mL de *K. pneumoniae* ATCC 43816 a été inoculée dans les poumons des animaux.

4.4.2.5. Antibiotique utilisé

De la cefquinome sulfate (Cobactan © 2,5%, 25mg/ml, Intervet, France) a été utilisé pour ces expérimentations. Pour le groupe de traitement précoce, le Cobactan © a été dilué dans de l'huile de maïs (Sigma, France) afin d'obtenir un volume d'injection suffisant (≈ 100 µL/rat).

4.4.2.6. Traitement antibiotique

4.4.2.6.1. Groupe contrôle flore digestive

Les 3 rats de ce groupe ont reçu par voie intra-trachéale une solution saline ne contenant aucune *K. pneumoniae*. Ils ont ensuite reçu deux fois par jour pendant 4 jours, une injection par voie sous-cutanée de sérum physiologique d'un volume correspondant à une injection d'une dose de 50 mg/kg de cefquinome.

4.4.2.6.2. Groupe infecté avec un fort inoculum

Les 8 rats de ce groupe ont été infectés avec un inoculum 10^9 UFC de *K. pneumoniae*. Après l'infection, l'état clinique de chaque animal a été évalué tous les jours, matin et soir.

Quatre animaux n'ont pas été traités et les quatre autres rats ont une dose de cefquinome de 50 mg/kg deux fois par jour pendant quatre jours. Le traitement était initié lorsqu'un animal exprimait des signes cliniques d'infection (toux, yeux fermés fixés, immobilité, dos rond, poils piqués). Les administrations ont été réalisées par voie sous-cutanée au niveau du dos.

4.4.2.6.3. Groupe infecté avec un faible inoculum

Les 8 rats de ce groupe ont été infectés avec un inoculum de 10^5 UFC de *K. pneumoniae*. Après l'infection, l'état clinique de chaque animal a été évalué tous les jours, matin et soir.

Quatre animaux n'ont pas été traités et les quatre autres rats ont une dose de cefquinome de 5 mg/kg deux fois par jour pendant quatre jours. Le traitement a été initié 24 heures après l'inoculation intra-trachéale. Les administrations ont été réalisées par voie sous-cutanée au niveau du dos.

4.4.2.6.4. Détermination de la charge bactérienne pulmonaire

Trois semaines après le début des traitements antibiotiques, les rats ont été euthanasiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (DolethalND, Vétoquinol, France). Les poumons des animaux ont ensuite été prélevés de manière

aseptique et homogénéisés dans 10 mL de NaCl à 0.9%. Les homogénats ont été centrifugés à 3000g pendant 10 minutes et les culots ont été remis en suspension dans 2.5 ml de NaCl à 0.9%. Les suspensions ont été ensuite soumises à des dilutions sériées au 10^{ème}. Dix microlitres de chaque dilution ont ensuite été étalés en triplicate sur des géloses MH. Les colonies ont été comptées après 24 h d'incubation à 37 ° C. La limite de détection a été de 100 UFC/poumon et les animaux qui ne présentaient aucune bactérie détectable ont été considérés comme microbiologiquement guéris.

4.4.3. Résultats

4.4.3.1. Groupe contrôle flore digestive

Les 3 rats n'ont présenté aucun signe clinique d'infection durant toute l'expérimentation. De plus, tous les rats de ce groupe n'ont présenté aucune bactérie dans leurs poumons.

4.4.3.2. Groupe infecté avec un fort inoculum

Les 8 rats du groupe ont présenté des signes cliniques d'infection entre 12 et 48 heures après l'initiation de l'infection.

Les 4 rats non traités sont morts entre 24 et 72 heures post-infection.

Les 4 rats traités ont présenté une guérison clinique. Trois semaines après le début du traitement antibiotique, aucun rat ne présentait de bactéries dans ses poumons.

4.4.3.3. Groupe infecté avec un faible inoculum

Les 4 rats non traités ont présenté des signes cliniques d'infection entre 48 et 72 heures après l'initiation de l'infection. Ils sont tous morts entre 72 et 120 heures post-infection.

Les 4 rats traités (24h post-infection) n'ont présenté aucun signe clinique, que ce soit avant ou après le traitement antibiotique. Trois semaines après le début du traitement antibiotique, aucun rat ne présentait de bactéries dans ses poumons.

4.4.4. Conclusion

Les deux schémas posologique de cefquinome testés, adaptés à des tailles d'inocula bactériens de petite et de grande taille, se sont donc avérés efficaces pour traiter les animaux infectés.

4.5. Impact des différents types de traitement antibiotique sur la flore digestive des animaux

4.5.1. Problématique et objectifs

Le but de cette section est de déterminer l'impact des traitements antibiotique de type précoce et classique sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de la population d'entérobactéries des animaux traités.

4.5.2. Matériels et méthodes

Les fèces ont été prélevées chez les animaux des groupes *faible inoculum*, *fort inoculum* et *contrôle flore digestive* aux jours -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 16, 19 et 23 après l'initiation du traitement antibiotique. Des échantillons de fèces de 0.2 à 0.3 g ont été homogénéisés dans 1 mL de sérum physiologique. Des dilutions sériées au 10^{ème} ont été réalisées à partir des homogénats. Cent microlitres de chacune de ces dilutions ont été ensuite étalés en duplicate sur des géloses MacConkey et sur des géloses Mac Conkey supplémentées avec 2 µg/mL de céfotaxime. Les colonies ont été comptées après 24 h d'incubation à 37 ° C. La limite de détection a été de 100 UFC/g de fèces.

4.5.3. Résultats

L'impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur la flore des entérobactéries est présenté dans la Figure 22. Les trois groupes (*groupe faible inoculum*, *groupe fort inoculum* et *groupe contrôle flore digestive*) n'ont pas présenté de variation significative du nombre d'entérobactéries totales que ce soit avant, pendant et après la fin du traitement. Les numérations sont restées stables autour de 10⁸ UFC/mL (Figure 22 A). Pour les entérobactéries résistantes au céfotaxime (CTX-R), les trois groupes de traitement présentaient un nombre de bactéries autour de 10⁴ UFC/mL entre 2 jours avant et 1 jour après la première injection de cefquinome. Pour le groupe fort inoculum traité avec une dose de 50 mg/kg/12h, le nombre d'entérobactéries CTX-R est passé de 10⁴ UFC/mL à 10⁸ UFC/mL entre le 1^{er} jour et le 4^{ème} jour après la première injection de cefquinome. Ce nombre est resté stable autour de 10⁸ UFC/mL entre le 4^{ème} et le 16^{ème} jour puis il a lentement diminué jusqu'au 23^{ème} jour après l'initiation du traitement. Pour le groupe faible inoculum traité avec une dose de 5 mg/kg/12h, ainsi que pour le groupe contrôle, le nombre d'entérobactéries CTX-R est resté stable autour de 10⁴ UFC/mL entre le 1^{er} et le 23^{ème} jour suivant l'initiation du traitement (Figure 22 B).

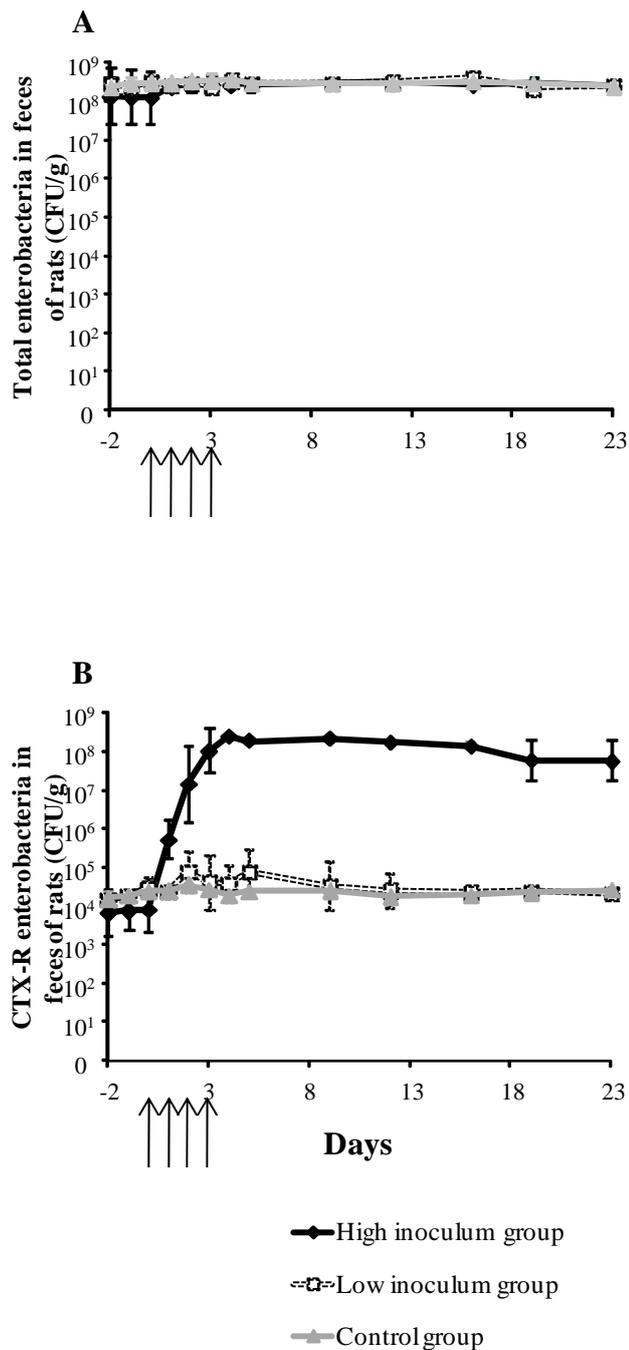


Figure 22 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur les *Enterobacteriaceae* fécales de rats.

(A) *Enterobacteriaceae* totales, (B) *Enterobacteriaceae* résistantes au céfotaxime. Les flèches indiquent les jours d'administration de la cefquinome. Les courbes indiquent les moyennes obtenues pour chaque groupe de traitement et les barres d'erreurs indiquent les écart-types

La

Figure 23 présente l'évolution de la proportion des entérobactéries CTX-R dans les 3 groupes.

Cette proportion était d'environ 10^{-4} entre le 2^{ème} jour avant et le 1^{er} jour après la première injection de cefquinome. Pour le groupe fort inoculum traité avec une dose de 50 mg/kg/12h, la proportion moyenne d'entérobactéries CTX-R est passée de 10^{-4} à 1 entre le 1^{er} jour et le 4^{ème} jour après la première injection de cefquinome et est resté stable autour de 1 entre le 4^{ème} et le 16^{ème} jour puis a lentement diminué jusqu'au 23^{ème} jour après l'initiation du traitement. Pour les deux autres groupes, la proportion moyenne d'entérobactéries CTX-R est restée stable autour de 10^{-4} entre le 1^{er} et le 23^{ème} jour après la première injection de cefquinome (

Figure 23).

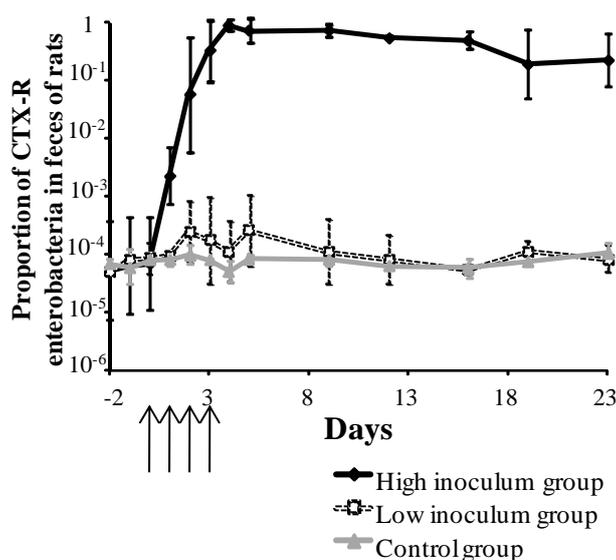


Figure 23 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur l'émergence des *Enterobacteriaceae* fécale céfotaxime résistantes chez le rat.

Les flèches indiquent les jours d'administration de la cefquinome. Les courbes indiquent les moyennes obtenues pour chaque groupe de traitement et les barres d'erreurs indiquent les écarts-types.

4.5.4. Conclusion

En conclusion, nous avons observé que le traitement à la dose de 50 mg/kg/12h était associé avec une amplification massive des entérobactéries CTX-R, qui se maintenait pendant au moins deux semaines post-traitement.

A l'inverse, le traitement à la dose de 5 mg/kg/12h n'a pas provoqué d'amplification des entérobactéries CTX-R, ont été maintenues à un taux identique à celui mesuré avant traitement ou chez les animaux contrôles.

4.6. Discussion

Dans cette étude, nous avons observé qu'une dose de cefquinome adaptée au traitement d'une charge bactérienne faible était capable de combiner la guérison clinique d'une infection pulmonaire avec une absence d'amplification de résistances bactériennes au niveau de la flore digestive des animaux traités. A l'inverse, la dose requise pour guérir une infection caractérisée par une charge bactérienne importante a provoqué une amplification massive et durable d'entérobactéries CTX-R.

Afin d'étudier simultanément l'impact d'une antibiothérapie sur une flore pathogène et sur la flore commensale intestinale, nous avons développé un modèle d'infection pulmonaire chez des rats gnotoxéniques, hébergeant une flore digestive contrôlée.

Le modèle d'infection pulmonaire avec *Klebsiella pneumoniae* avait déjà été utilisé précédemment (McColm, Shelley et al. 1986; Roosendaal, Bakker-Woudenberg et al. 1986; Kesteman, Ferran et al. 2009; Kesteman, Perrin-Guyomard et al. 2010). Il a été mis en place chez des rats axéniques, qui ont reçu une flore digestive ne possédant qu'une seule souche bactérienne résistante aux antibiotiques, et ce grâce à l'utilisation d'une flore fécale de porc EOPS complétée d'une souche d'*E.coli* possédant un gène de résistance de type CTX-M, c'est-à-dire codant pour une bêta-lactamase présentant un phénotype BLSE. Nous avons choisi la flore fécale de porc en lien avec les applications potentielles de nos recherches en antibiothérapie porcine, mais également parce que la flore digestive de porc est un bon modèle pour l'extrapolation à l'Homme (Labib, Hummel et al. 2006). Nous avons utilisé une souche d'*E.coli* exprimant une CTX-M du groupe 1 parce que cette famille de gène de résistance de type BLSE est régulièrement mise en évidence dans les fèces de porcs charcutiers (Agero, Aarestrup et al. ; Meunier, Jouy et al. 2006; Liu, Wei et al. 2007). De plus, les infections bactériennes associées à ce type de BLSE ont récemment pris chez l'Homme des proportions pandémiques (Canton and Coque 2006; Livermore, Canton et al. 2007).

Cette étude est la première, à notre connaissance, à proposer un modèle intégratif permettant d'étudier l'impact d'une céphalosporine à la fois sur la guérison des animaux et sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore intestinale.

Comme pour l'étude du chapitre 3, nous avons intégré des données de pharmacocinétique de la cefquinome chez le rat avec l'approche PK/PD pour déterminer un schéma posologique efficace contre une infection cliniquement établie. Nous n'avons pas testé plusieurs schémas posologiques comme dans le cas du modèle souris, mais les résultats obtenus confirment que le $T_{>CMI}$ est un indice PK/PD prédictif de l'efficacité d'un traitement aux bêta-lactamines.

Pour ce qui concerne le modèle gnotoxénoque, nous avons observé qu'une fois la flore intestinale implantée et stabilisée, la souche *E. coli* CTX-R est restée en sous dominance (0,01%) au sein de cette flore. Chez les rats traités avec la dose adaptée à une charge bactérienne élevée, la population d'entérobactéries CTX-R a été amplifiée de manière massive. Il est à noter que l'administration de l'antibiotique a été réalisée par voie parentérale, confirmant les résultats d'études antérieures réalisées chez le porc avec de l'ampicilline (Bibbal, Dupouy et al. 2007; Zhang, Huang et al. 2013). Cavaco *et al* (Cavaco, Abatih et al. 2008) avaient également observé chez des porcs sains qu'une administration de cefquinome à la dose recommandée entraînait l'émergence d'entérobactéries endogènes résistantes au céfotaxime. Le caractère massif et durable (plus de 2 semaines dans notre modèle) de l'amplification des souches CTX-R est remarquable si l'on extrapole ce phénomène, pour une espèce de rente comme le porc, en termes de quantité cumulée de souches porteuses de gènes de résistance (sur des éléments génétiques mobiles) qui seraient excrétées dans les litières, lisiers et l'environnement. Ces résultats soulignent donc l'importance cruciale de la pression de sélection associée à une antibiothérapie qui peut s'exercer sur le microbiote intestinal et amplifier son rôle de réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (Andremont 2003; Phillips, Casewell et al. 2004; Sommer, Dantas et al. 2009; Baquero and Coque 2011; Baquero 2012).

L'information la plus originale de ce travail est la démonstration qu'une antibiothérapie avec une posologie adaptée à un traitement précoce lorsque la charge bactérienne est encore faible, peut combiner succès thérapeutique et absence d'amplification de résistances au sein de la flore intestinale. Les applications potentielles les plus prometteuses de ce type d'antibiothérapie précoce concernent les animaux d'élevage. Elles devraient s'appuyer sur l'élaboration d'outils et de méthodologies de détection précoce des infections bactériennes (Timsit, Assie et al. 2011).

4.7. Article 1



Low or High Doses of Cefquinome Targeting Low or High Bacterial Inocula Cure *Klebsiella pneumoniae* Lung Infections but Differentially Impact the Levels of Antibiotic Resistance in Fecal Flora

Maleck V. Vasseur,^{a,b,c} Michel Laurentie,^c Jean-Guy Rolland,^c Agnès Perrin-Guyomard,^c Jérôme Henri,^c Aude A. Ferran,^{a,b} Pierre-Louis Toutain,^{a,b} Alain Bousquet-Mélou^{a,b}

INRA, UMR1331 TOXALIM, Toulouse, France^a; Université de Toulouse, INPT, ENVT, EIP, UPS, Toulouse, France^b; Anses, Laboratoire de Fougères, Fougères, France^c

The combination of efficacious treatment against bacterial infections and mitigation of antibiotic resistance amplification in gut microbiota is a major challenge for antimicrobial therapy in food-producing animals. In rats, we evaluated the impact of cefquinome, a fourth-generation cephalosporin, on both *Klebsiella pneumoniae* lung infection and intestinal flora harboring CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. Germfree rats received a fecal flora specimen from specific-pathogen-free pigs, to which a CTX-M-producing *Escherichia coli* strain had been added. *K. pneumoniae* cells were inoculated in the lungs of these gnotobiotic rats by using either a low (10^5 CFU) or a high (10^9 CFU) inoculum. Without treatment, all animals infected with the low or high *K. pneumoniae* inoculum developed pneumonia and died before 120 h postchallenge. In the treated groups, the low-inoculum rats received a 4-day treatment of 5 mg/kg of body weight cefquinome beginning at 24 h postchallenge (prepatent phase of the disease), and the high-inoculum rats received a 4-day treatment of 50 mg/kg cefquinome beginning when the animals expressed clinical signs of infection (patent phase of the disease). The dose of 50 mg/kg targeting the high *K. pneumoniae* inoculum cured all the treated rats and resulted in a massive amplification of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. A dose of 5 mg/kg targeting the low *K. pneumoniae* inoculum cured all the rats and averted an outbreak of clinical disease, all without any amplification of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. These findings might have implications for the development of new antimicrobial treatment strategies that ensure a cure for bacterial infections while avoiding the amplification of resistance genes of human concern in the gut microbiota of food-producing animals.

Antimicrobial resistance is a major threat to human health, and the overuse of antibiotics in both human patients and animals is considered to be the main factor leading to the selection of resistant bacteria. It is also increasingly recognized that the gut microbiota constitutes one of the main reservoirs of resistance genes among commensal bacterial ecosystems (1–4), and that the antibiotic doses currently used in human and animal patients have not been optimized to prevent the collateral selection of antimicrobial resistance in the gut microbiota or its colonization by exogenous resistant strains (3, 5).

An examination of the interactions between antibiotics, pathogens, and the commensal flora, as well as an increased understanding of the key factors governing antimicrobial activity and resistance selection, might lead to the development of strategies combining maximal efficacy with minimal impact on the commensal bacterial ecosystems (2, 6, 7). For example, recent studies demonstrated that the degree of amplification of antimicrobial resistance in the gut microbiota was directly correlated with the magnitude of the antibiotic dose, regardless of the route of administration (8, 9).

Interestingly, some other studies have shown that the *in vitro* efficacy of antimicrobials can depend on the size of the bacterial inoculum, with drugs being more potent against low than against high inocula (10–12). It was subsequently shown *in vivo* that lower antibiotic doses given in the early prepatent phase of an infection, when the pathogen burden was still low, were as effective as higher doses administered during the patent phase of infection, as characterized by overt clinical symptoms and a high bacterial burden (13–17).

Therefore, we postulated that such prepatent phase adjusted

doses might combine efficacy against the early infection and the mitigation (or absence) of resistance amplification in the gut microbiota.

To test this hypothesis, we evaluated the impact of two antibiotic dosage regimens selected to eradicate either high or low pulmonary pathogen burdens on the gut microbiota. For that purpose, we developed a model of pneumonia using *Klebsiella pneumoniae* in germfree rats previously colonized by fecal flora obtained from specific-pathogen-free (SPF) pigs, to which was added an *Escherichia coli* strain carrying an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) of the CTX-M group. We used cefquinome, a fourth-generation cephalosporin (possessing a molecular structure similar to that of cefpirome), which is marketed for veterinary use only for the treatment of pulmonary infections in food-producing animals.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. *K. pneumoniae* strain ATCC 43816 was used to establish lung infections. *E. coli* strain 09F000898 was isolated from pig feces. It belongs to the phylogroup A and harbors a plasmid carrying a group 1 CTX-M beta-lactamase. This *E. coli* strain and a sample of feces from an

Received 8 October 2013 · Returned for modification 17 November 2013
Accepted 29 December 2013

Published ahead of print 6 January 2014

Address correspondence to Alain Bousquet-Mélou, a.bousquet-melou@envt.fr

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02135-13

Downloaded from http://aac.asm.org/ on February 20, 2014 by guest

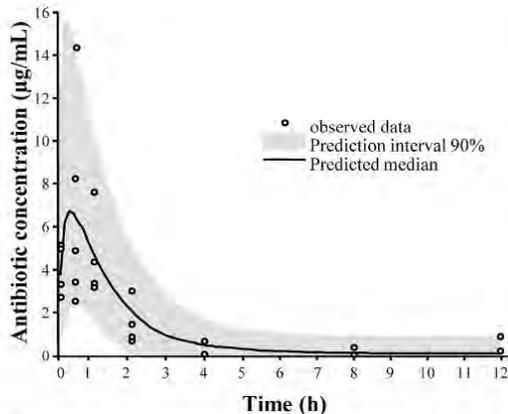


FIG 1 Observed and predicted median cefquinome plasma concentrations versus time in rats after a single subcutaneous administration.

SPF pig were simultaneously inoculated into the digestive tract of each germfree rat. The MIC of cefquinome was 0.125 µg/ml for *K. pneumoniae* and 64 µg/ml for the CTX-M-producing *E. coli*.

Animals. Male OFA rats (Janvier, Saint Berthevin, France) were used for pharmacokinetic studies. Germfree male OFA rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were used for all other studies. The protocol was approved by the French ethics committee (authorization no. 13/11/12-2).

Pharmacokinetic study. A pharmacokinetic study was performed with six male OFA rats. The rats were subcutaneously injected with 10 mg/kg of body weight of cefquinome (Cobactan; Intervet), and blood samples were collected at several times, centrifuged, and stored at -80°C until the time of the assay. A sparse data analysis was performed with a nonlinear mixed effect model (one-compartment structural model with extravascular administration and constant error model) to fit the concentration-time profiles with Monolix 4.1.4 (Lixoft, Orsay, France).

Pneumonia model in gnotobiotic rats. Germfree OFA male rats were inoculated intragastrically with 1 ml of a suspension containing a fecal sample from an SPF pig and 5×10^8 CFU/ml of the CTX-M-producing *E. coli*. The absence of cefotaxime-resistant (CTX-R) *Enterobacteriaceae* was checked in the SPF pig fecal samples after plating on MacConkey agar supplemented with cefotaxime (2 µg/ml). Pulmonary infection was induced in these rats as previously described (17–19). Briefly, the trachea of each rat was cannulated under general anesthesia, and the lungs were inoculated with 0.05 ml of a saline suspension of *K. pneumoniae* contain-

TABLE 1 Population pharmacokinetic parameters of cefquinome in rats after subcutaneous injection

Parameter ^a	Population value	Interindividual variability (%)
Dose (mg/kg)	10	
Ka (1/h)	5.53	115
V/F (ml/kg)	900	49.6
CL/F (ml/h/kg)	912	26.8
AUC _(0-∞) (µg × h/ml)	10.9	
T _{1/2elim} (h)	0.68	

^a Ka, absorption rate constant; V/F, apparent volume of distribution; CL/F, apparent plasma clearance; AUC, area under the plasma concentration curve; T_{1/2elim}, terminal half-life.

TABLE 2 Values of the PK/PD index $T_{>MIC}$ for two cefquinome doses

$T_{>MIC}$ parameter	Dose (mg/kg of body weight)	
	50	5
Time (h)	6	3.9
% of dosing interval	50	32.5

ing 2×10^6 CFU/ml (low inoculum; $n = 8$ rats) or 2×10^{10} CFU/ml (high inoculum; $n = 8$ rats). The control rats ($n = 8$) were inoculated with saline only. The clinical status of each infected rat was recorded twice daily.

In the high-inoculum group, 4 rats were treated and 4 rats were not treated. Treatment was launched when an animal expressed clinical signs of infection (coughing, close-set eyes, immobility, quilted coat, or hunched posture) and consisted of a subcutaneous injection of 50 mg/kg of cefquinome twice daily for 4 days (day 0 to day 3). In the low-inoculum group, 4 rats were not treated, and 4 rats received 5 mg/kg of cefquinome subcutaneously twice daily for 4 days beginning at day 0, starting at 24 h after challenge (day 0 to day 3). Stool samples were collected daily, starting 2 days before the antibiotic treatment (day -2) up to 23 days after the treatment (D23).

Bacterial counts. The counts of total and resistant *Enterobacteriaceae* organisms were obtained from each stool sample (in duplicate) after plating serial dilutions of fecal samples on MacConkey agar only or supplemented with 2 µg/ml CTX. The colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C. The lowest level of detection was 100 CFU/g feces.

At day 23, each surviving rat was euthanized and its lungs were aseptically removed and homogenized in 10 ml of 0.9% NaCl. The homogenates were centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 min, and the pellets were resuspended in 2.5 ml of 0.9% NaCl. The counts of *K. pneumoniae* organisms were obtained after plating serial dilutions of lung homogenates on Mueller-Hinton agar. The colonies were counted after 24 h of incubation at 37°C. The lowest level of detection was 100 CFU/lung, and the rats were considered to be microbiologically cured if they were found to have counts below this level.

RESULTS

Pharmacokinetics of cefquinome in OFA rats. The observed and predicted plasma concentrations of cefquinome in rats (10 mg/kg dose, subcutaneous administration) are shown in Fig. 1, and the pharmacokinetic parameters are presented in Table 1. From these results, and assuming dose proportionality, we simulated different cefquinome plasma concentration profiles to determine the pivotal curative dose giving a time (h) concentrations are above the MIC ($T_{>MIC}$) equal to 50% of the dosing interval (20). The dose was 50 mg/kg for a twice-daily administration schedule (Table 2).

Pneumonia. In the low-inoculum group, the 4 untreated rats presented clinical signs of infection between 48 and 72 h postchallenge and died between 72 and 120 h postchallenge. The animals receiving the 5-mg/kg cefquinome dose presented no signs of infection before and after treatment, and they were microbiologically cured (defined as absence of lung *K. pneumoniae*) at day 23. In the high-inoculum group, the 8 rats presented clinical signs of infection between 12 and 48 h postchallenge. Four rats were treated when clinical signs occurred, and the 4 untreated rats died between 24 and 72 h postchallenge. All the rats receiving the 50-mg/kg cefquinome dose were clinically cured, and they were microbiologically cured at day 23 (absence of lung *K. pneumoniae*).

Fecal flora. Total *Enterobacteriaceae* fecal counts remained stable at around 10^8 CFU/g in all rats from day -2 to day 23 (not shown). The CTX-R *Enterobacteriaceae* fecal counts are shown in Fig. 2. In the three groups of rats (patent phase dose, prepatent

Downloaded from http://aac.asm.org/ on February 20, 2014 by guest

Vasseur et al.

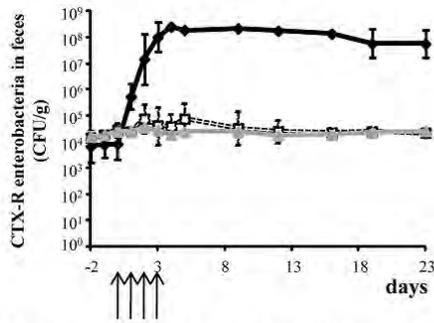


FIG 2 Impact of the different cefquinome dosage regimens on cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* in the fecal flora of rats before, during, and after treatment. ◆, Patent-phase-adjusted dose (50 mg/kg of body weight); □, prepatent-phase-adjusted dose (5 mg/kg); ▲, control untreated group. Data are means \pm standard deviations (SDs). The arrows indicate the days of antibiotic administration.

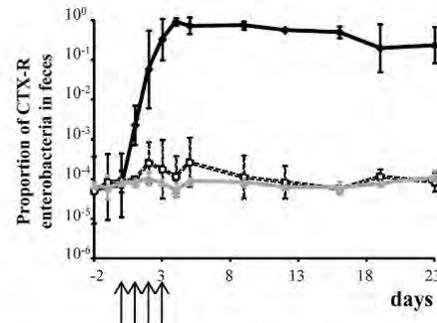


FIG 3 Impact of the different cefquinome dosage regimens on the proportion of cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* in the fecal flora of rats before, during, and after treatment. ◆, Patent-phase-adjusted dose (50 mg/kg); □, prepatent-phase-adjusted dose (5 mg/kg); ▲, control untreated group. Data are means \pm SDs. The arrows indicate the days of antibiotic administration.

phase dose, and control groups), the basal CTX-R *Enterobacteriaceae* fecal counts were around 10^4 CFU/g between day -2 and day 0. For the patent phase dose group, the CTX-R *Enterobacteriaceae* counts increased to $>10^8$ CFU/g between day 1 and day 4, remained stable between day 4 and day 16, and slightly decreased to $<10^8$ CFU/g at day 23. For the prepatent phase dose and control groups, the CTX-R *Enterobacteriaceae* counts remained stable at 10^4 CFU/g between day 1 and day 23 (Fig. 2). The mean percentage of CTX-R *Enterobacteriaceae* mirrored the absolute counts, because the total counts were unchanged (Fig. 3). In the three groups, the basal CTX-R percentage was around 0.01% between day -2 and day 0. For the patent phase dose group, the basal CTX-R percentage increased from 0.01% to 100% between day 1 and day 4, remained at 100% between day 4 and day 16, and decreased to $<100\%$ at day 23 (Fig. 3). For the prepatent phase dose and control groups, the CTX-R percentage remained stable at around 0.01% between day 1 and day 23.

DISCUSSION

In the present study, we developed an original model allowing a concomitant assessment of the impact of antibiotics on lung pathogens and intestinal microbiota. Our main result was to demonstrate that a cefquinome treatment targeting a low pathogenic inoculum was able to fully cure a lung infection caused by *K. pneumoniae*, all without any measurable amplification of intestinal CTX-R *Enterobacteriaceae*.

First, we showed that early treatment targeting a low *K. pneumoniae* inoculum in the lungs was efficacious with a much lower dose (the prepatent phase adjusted dose) than that required against a high *K. pneumoniae* inoculum in sick animals (the patent phase adjusted dose). We observed in another rodent model of pneumonia that the prepatent phase adjusted dose of cefquinome was not active (100% mortality) in sick animals harboring a high pathogen load (M. V. Vasseur, A. A. Ferran, M. Z. Lacroix, P. L. Toutain, and A. Bousquet-Mélou, submitted for publication). This finding is supported by those of previous studies using various classes of antibiotics or bacterial species (13–17, 19) and reinforces the generic relevance of this so-called inoculum effect. A

combination of several mechanisms might explain this effect, such as (i) the inoculum size dependency of antimicrobial activity as demonstrated *in vitro* for several antibiotics (11, 12) and (ii) the impact of pathogen burden on the saturable granulocytic clearance of bacteria (21, 22). For the early interventions, we decided to use a cefquinome dosage regimen that was 10-fold lower than the curative one used in sick rats. In previous *in vitro* experiments, we determined that the antimicrobial activity of cefquinome was higher against low than against high bacterial inocula (M. V. Vasseur, A. A. Ferran, M. Z. Lacroix, P. L. Toutain, and A. Bousquet-Mélou, submitted for publication). In addition, a set of published works on the influence of inoculum size on the *in vivo* efficacy of fluoroquinolones or beta-lactams against various Gram-positive or Gram-negative pathogens (11, 15, 17, 19, 23) supports the hypothesis that efficacious doses can be lower in early than in later interventions. In particular, Mizunaga et al. (11) determined that the 50% effective doses (ED_{50} s) of 3 carbapenems were 12 to 50 times lower in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice when the initial bacterial inoculum was 100-fold lower.

The ability of prompt antibiotic treatments to eliminate growing but still small pathogen loads might be taken into consideration and have practical consequences for both human therapy and control of infectious outbreaks in food-producing animals. Indeed, one current strategy of infectious disease control at the herd level, called metaphylaxis or control, consists of very early administration of antibiotics during a collective infectious episode while most animals in the group are still in their prepatent phase of infection. However, two main characteristics of this strategy support the opinion that it probably generates an excessive consumption of antibiotics: (i) all animals in the group are treated, even when a proportion of animals does not become ill, meaning that antibiotics are not indicated at that time for those animals, and (ii) the doses used in this situation are those cleared by the marketing authority for treating animal patients with established bacterial infections, characterized by overt clinical signs and a high bacterial burden. Therefore, in the context of limiting antibiotic use in food animal production, our objective was to test if antibiotic dosage regimens adjusted to the early prepatent phase of an infection contribute to a reduction in the amount of antibiotics used.

Moreover, given the key role played by the gut microbiota in the amplification and spread of antimicrobial resistance from food-producing animals to humans, it was necessary to evaluate if the prepatent phase adjusted dosage regimen produced a differential impact on such commensal flora compared to a classical (patent phase adjusted) dosage regimen. As cefquinome is mainly used in pigs, and because the intestinal flora is very different between rats and pigs, we used a model of gnotobiotic rats harboring porcine fecal flora samples enriched with a CTX-R *E. coli* strain. Indeed, it has been shown that the implanted flora were stable and comparable to natural flora from the sampled individuals (24, 25). No measurable enrichment of CTX-R *Enterobacteriaceae* was observed with the prepatent phase adjusted dose, whereas rapid and massive amplification of CTX-R *Enterobacteriaceae* was observed with the patent phase adjusted dose. Cavaco et al. (26) demonstrated the emergence of CTX-R *Enterobacteriaceae* after cefquinome administration in healthy pigs by using the dose recommended for the treatment of respiratory infections. Here, we confirmed in sick animals that the cefquinome dose used for treating a fully established infection led to a rapid amplification of indigenous CTX-R *Enterobacteriaceae*. These results support the hypothesis that the gut microbiota is likely to be an important site for the amplification of antibiotic resistance, when a selective pressure is exerted by classical antibiotic treatments (1–4). We also showed in our experiments that this reservoir might release high levels of CTX-R *Enterobacteriaceae* into the environment for a long period (≥ 20 days) after the antibiotic selective pressure ended. Woerther et al. (27) recently pointed out that exposure to antibiotics might impact the carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* at the community level, in association with other factors, such as the exchanges of resistant strains or horizontal transfer of plasmids. Such observations support the objective of reducing global antibiotic exposure at the herd level. Moreover, in the context of human health protection, the most realistic objective is probably not to reduce the proportion of animals carrying ESBL-producing *Enterobacteriaceae* but rather to suppress antibiotic-driven resistance amplification that might result in massive excretion of CTX-R *Enterobacteriaceae* from the gastrointestinal (GI) tracts of animals into the environment or at slaughter.

Other recent studies have investigated the impact of manipulating therapeutic regimens on the amplification of antimicrobial resistance in the gut microbiota. For example, Zhang et al. (8) recently demonstrated that both the doses and routes of administration of tetracycline and ampicillin influenced the levels of antibiotic resistance found in the gut microbiota. On the other hand, when testing six different dosing regimens covering a 3-fold range of ciprofloxacin doses in humans, Fantin et al. (5) observed no measurable differences in the probability of the emergence of resistance in the gut microbiota. In their subjects, they measured antibiotic stool concentrations high enough to exceed the mutant preventive concentrations (MPC) for the dominant *Enterobacteriaceae* flora, associated with a transient disappearance of the total *Enterobacteriaceae* flora during the treatment and an appearance of resistant strains several days after the end of the treatment, when ciprofloxacin concentrations dropped to below the MPC (3, 5). However, it might be speculated that much lower ciprofloxacin doses produce different impacts on resistance amplification in gut microbiota, as was shown in piglets by Nguyen et al. (9), using a 10-fold range of ciprofloxacin doses. Obviously, such low doses do not produce any advantage if they cannot cure infected patients.

Second, the picture of resistance development in the gut microbiota is different for classical doses of beta-lactams, such as ampicillin or cefquinome, for which resistance amplification in gut microbiota occurs as soon as the first day of treatment, as seen in the present study and elsewhere (8, 26, 28, 29). These results are probably explained by the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of beta-lactam drugs, which are excreted in the GI tract to a lesser extent than fluoroquinolones, leading to lower intestinal concentrations that are unable to kill highly resistant strains, such as those harboring ESBL genes.

All together, our results suggest that prepatent phase adjusted doses might constitute a promising strategy for the optimization of antibiotic dosage regimens by providing a way to ensure the control of infectious diseases in food-producing animals while minimizing the animal reservoirs of resistance genes of human concern.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marlène Lacroix and Sylvie Puel for performing analytical assays.

REFERENCES

- Andremont A. 2003. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 69:601–607.
- Baquero F, Coque TM, de la Cruz E. 2011. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3649–3660. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00013-11>.
- de Lastours V, Cambau E, Guillard T, Marcade G, Chau F, Fantin B. 2012. Diversity of individual dynamic patterns of emergence of resistance to quinolones in *Escherichia coli* from the fecal flora of healthy volunteers exposed to ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.* 206:1399–1406. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis511>.
- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:28–52. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg483>.
- Fantin B, Duval X, Massias L, Alavoine L, Chau F, Retout S, Andremont A, Mentré F. 2009. Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria. *J. Infect. Dis.* 200:390–398. <http://dx.doi.org/10.1086/600122>.
- Martinez MN, Papich MG, Drusano GL. 2012. Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:2795–2805. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05360-11>.
- Cantón R, Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:977–991. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x>.
- Zhang L, Huang Y, Zhou Y, Buckley T, Wang HH. 2013. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3659–3666. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00670-13>.
- Nguyen TT, Chachaty E, Huy C, Cambier C, de Gunzburg J, Mentré F, Andremont A. 2012. Correlation between fecal concentrations of ciprofloxacin and fecal counts of resistant *Enterobacteriaceae* in piglets treated with ciprofloxacin: toward new means to control the spread of resistance? *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:4973–4975. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06402-11>.
- Ferran A, Dupouy V, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. 2007. Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4163–4166. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00156-07>.
- Mizunaga S, Kamiyama T, Fukuda Y, Takahata M, Mitsuyama J. 2005. Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on *in vitro* activities and *in vivo* efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:91–96. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki163>.

Vasseur et al.

12. Udekwi KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:745–757. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn554>.
13. Eagle H. 1949. The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*. *J. Exp. Med.* 90: 595–607. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.90.6.595>.
14. Eagle H, Magnuson HJ, Fleischman R. 1947. Relation of the size of the inoculum and the age of the infection to the curative dose of penicillin in experimental syphilis, with particular reference to the feasibility of its prophylactic use. *J. Exp. Med.* 85:423–440. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.85.4.423>.
15. Ferran AA, Kesteman AS, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. 2009. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3384–3390. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01347-08>.
16. Ferran AA, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. 2011. Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical, microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet. Microbiol.* 148:292–297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.005>.
17. Kesteman AS, Ferran AA, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. 2009. Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4740–4748. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00608-09>.
18. Bakker-Woudenberg IA, de Jong-Hoenderop JY, Michel MF. 1979. Efficacy of antimicrobial therapy in experimental rat pneumonia: effects of impaired phagocytosis. *Infect. Immun.* 25:366–375.
19. Kesteman AS, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. 2010. Emergence of resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intestinal tract during successful treatment of *Klebsiella pneumoniae* lung infection in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 2960–2964. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01612-09>.
20. Craig WA. 2003. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 17:479–501. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00065-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00065-5).
21. Drusano GL, Fregeau C, Liu W, Brown DL, Louie A. 2010. Impact of burden on granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4368–4372. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00133-10>.
22. Drusano GL, Vanscoy B, Liu W, Fikes S, Brown D, Louie A. 2011. Saturability of granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2693–2695. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01687-10>.
23. Jumble N, Louie A, Leary R, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Freeman C, Kahn JB, Bush K, Dudley MN, Miller MH, Drusano GL. 2003. Application of a mathematical model to prevent *in vivo* amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *J. Clin. Invest.* 112:275–285. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200316814>.
24. Hazenberg MP, Bakker M, Verschoor-Burggraaf A. 1981. Effects of the human intestinal flora on germ-free mice. *J. Appl. Bacteriol.* 50:95–106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb00874.x>.
25. Mallett AK, Bearne CA, Rowland IR, Farthing MJ, Cole CB, Fuller R. 1987. The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet on the human gut microflora. *J. Appl. Bacteriol.* 63:39–45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02415.x>.
26. Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L. 2008. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3612–3616. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00354-08>.
27. Woerther PL, Angebault C, Jacquier H, Clermont O, El Mniai A, Moreau B, Djossou F, Peroz G, Catzeflis F, Denamur E, Andreumont A. 2013. Characterization of fecal extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a remote community during a long time period. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5060–5066. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00848-13>.
28. Bibbal D, Dupouy V, Ferré JP, Toutain PL, Fayet O, Prère MF, Bousquet-Mélou A. 2007. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of *bla*_{TEM} genes in swine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4785–4790. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00252-07>.
29. Bibbal D, Dupouy V, Prère MF, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. 2009. Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2999–3006. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02143-08>.

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on February 20, 2014 by guest

Chapitre 5

ETUDE EXPERIMENTALE

**Impact des différentes modalités de
traitement antibiotique sur la flore
digestive de porc**

CHAPITRE 5 - ETUDE EXPERIMENTALE

5. Impact des différentes modalités de traitement antibiotique sur la flore digestive de porc

5.1. Introduction

Dans la continuité des travaux décrits dans les chapitres 3 et 4, nous avons voulu déterminer sur une espèce cible, et en présence d'une flore digestive naturelle, si des posologies de cefquinome correspondant aux deux stratégies de traitement comparées, produisaient les mêmes effets en termes d'émergence de résistance chez les entérobactéries de la flore fécale.

La posologie recommandée dans le cadre de l'Autorisation de mise sur le marché (AMM) de la cefquinome chez le porc (2 mg/kg/j) a été choisie comme posologie de référence.

La posologie associée à la stratégie de traitement à un stade précoce de l'infection, avec une dose adaptée à une taille d'inoculum plus faible, a été fixée arbitrairement en appliquant le critère utilisé et validé dans les modèles de rongeurs, c'est-à-dire en divisant par 10 la dose AMM (0.2 mg/kg/j).

5.2. Matériels et Méthodes

5.2.1. Antibiotique et animaux utilisés

De la cefquinome sulfate (Cobactan © 2,5%, 25mg/ml, Intervet, France) a été utilisée pour nos expérimentations.

Vingt-trois porcelets charcutiers sains âgés de sept semaines (IFIP, station expérimentale de Villefranche de Rouergue) qui n'ont jamais reçu de traitement antibiotique ont été utilisés pour nos expérimentations. Les animaux ont été hébergés séparément dans des cases individuelles, ont été nourris une fois par jour, et hydratés de manière *ad libitum*.

5.2.2. Traitements antibiotiques

Trois groupes d'animaux ont été constitués :

- un groupe contrôle de 6 porcelets qui ont reçu une injection intramusculaire quotidienne de sérum physiologique pendant trois jours,
- un groupe de 9 porcelets qui ont reçu une injection intramusculaire quotidienne de cefquinome à la dose recommandée par l'AMM de 0.2 mg/kg/jour, pendant trois jours,
- un groupe de 8 porcelets qui ont reçu une injection intramusculaire quotidienne de cefquinome à la dose de 0.2 mg/kg/jour pendant trois jours.

5.2.3. Détermination de la résistance au sein de la flore digestive

Des échantillons de fèces ont été prélevés sur chaque animal, soit au niveau de l'ampoule rectale, soit après défécation spontanée, à différents jours avant (J-1, J0) et après (J1, J2, J3, J4, J6, J8, J10, J12, J14, J20) le début du traitement à la cefquinome. Pour chaque animal et chaque jour de prélèvement, 2 grammes de fèces ont été homogénéisés avec 18 mL d'eau peptonée, contenant 30% de glycérol, grâce à un Bag-Mixer (Interscience, Saint-Nom, France). Des dilutions sériées au 10^{ème} de ces homogénats ont été réalisées puis 100 µL de chacune de ces dilutions ont été étalés sur des géloses Mac Conkey contenant 0 ou 2 µg/mL de céfotaxime. Les entérobactéries ayant poussées en présence de 2 µg/mL de céfotaxime ont été qualifiées de résistantes d'après les valeurs standards. du CLSI (CLSI 2011) et de la Société Française de Microbiologie (<http://www.sfm.asso.fr>). Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24 h. La limite de détection a été de 100 UFC/g de fèces. Les comptages d'entérobactéries effectués sur les boites contenant ou non du céfotaxime ont permis de calculer la proportion d'entérobactéries résistantes pour chaque animal et pour chaque temps de prélèvement.

5.3. Résultats

L'impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur la flore des entérobactéries des porcs est présenté dans les Figure 24 et Figure 25. Les trois groupes (contrôle, 0.2 mg/kg et 2 mg/kg) n'ont pas présenté de différences significatives du nombre d'entérobactéries totales, qui est resté stable autour de 10^8 UFC/g avant, pendant et après le traitement (Figure 24 A).

Pour les entérobactéries résistantes au céfotaxime (CTX-R), les animaux des trois groupes de traitement présentaient un nombre moyen de bactéries autour de 10^5 UFC/g entre le 1^{er} jour avant et le 1^{er} jour après le début du traitement.

Pour le groupe du traitement AMM (2 mg/kg/j), le nombre moyen d'entérobactéries CTX-R a augmenté de 10^5 UFC/g à 10^7 UFC/g entre le 1^{er} jour et le 3^{ème} jour après le début du traitement, est restée stable autour de 10^7 UFC/g entre le 4^{ème} et le 14^{ème} jour après la première injection de cefquinome et a finalement lentement diminué autour de 10^6 UFC/g jusqu'au 20^{ème} jour après le début du traitement. Pour le groupe du traitement à 0.2 mg/kg/j et le groupe contrôle, les comptages d'entérobactéries CTX-R sont restés stable autour de 10^5 UFC/g entre le 1^{er} et le 20^{ème} jour après le début du traitement (Figure 24).

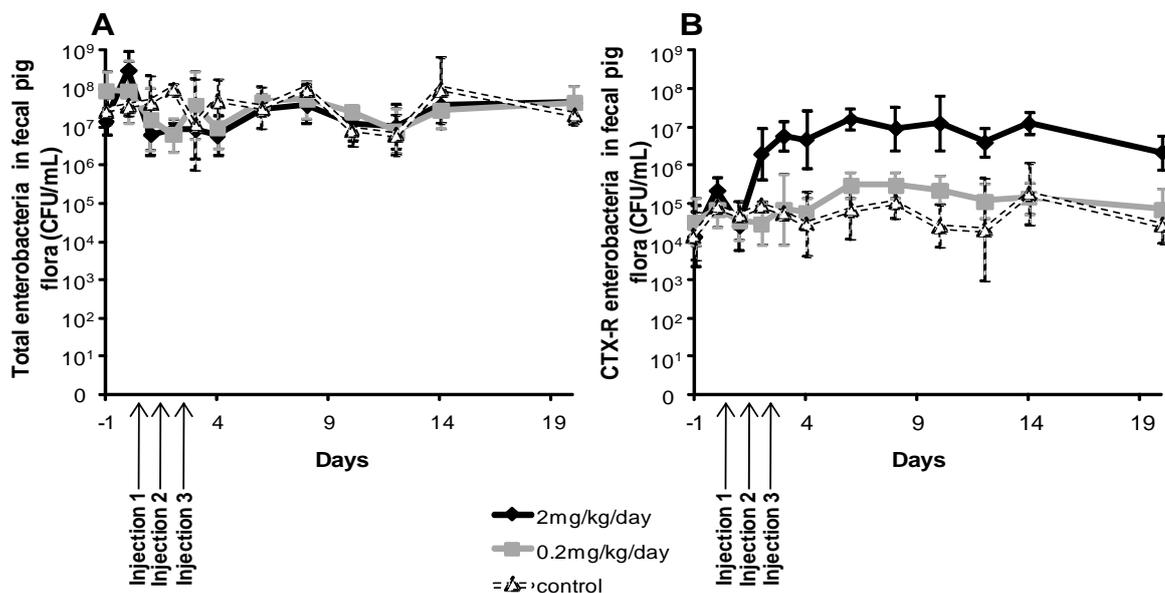


Figure 24 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur les entérobactéries fécales de porcs.

(A) flore totale, (B) flore céfotaxime-résistante. Les flèches indiquent les jours de traitement antibiotique. Les courbes indiquent les moyennes obtenues pour chaque groupe de traitement et les barres d'erreurs indiquent les écart-types.

La Figure 25 présente l'évolution de la proportion des entérobactéries CTX-R dans les 3 groupes.

Cette proportion était d'environ 10^{-3} entre le 1^{er} jour avant et le 1^{er} jour après le début du traitement.

Pour le groupe contrôle, la proportion moyenne d'entérobactéries CTX-R est restée stable autour de 10^{-3} entre le 1^{er} et le 20^{ème} jour après le début du traitement.

Pour le groupe du traitement AMM (2 mg/kg/j), la proportion moyenne d'entérobactéries CTX-R est passée de 10^{-3} à 1 entre le 1^{er} jour et le 3^{ème} jour avant de diminuer lentement jusqu'à 10^{-1} au 20^{ème} jour après la première injection de cefquinome. A partir de J2, une différence significative avec le groupe contrôle été mise en évidence (ANOVA mesures répétées, $p < 0.05$).

Pour le groupe du traitement à 0.2 mg/kg/j, la proportion moyenne d'entérobactéries CTX-R a montré une tendance en hausse entre J-1 ($< 10^{-3}$) et J3 (10^{-2}), puis est restée stable et a diminué à partir de J12. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative (ANOVA mesures répétées, $p > 0.05$) avec le groupe contrôle.

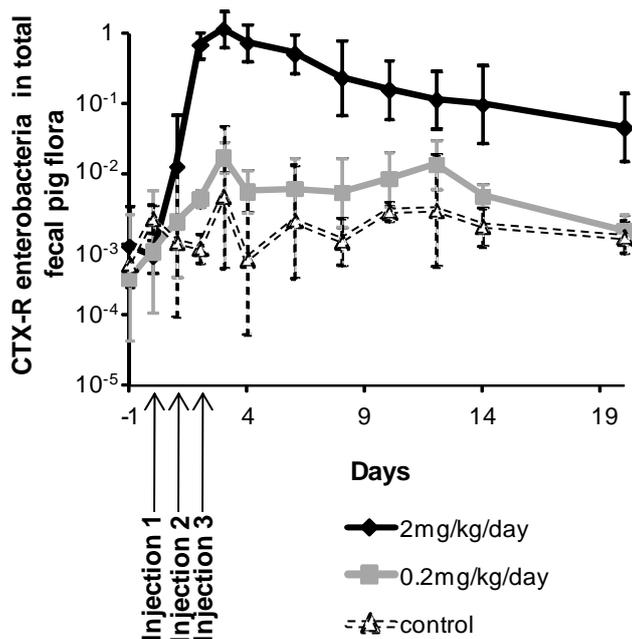


Figure 25 : Impact des différentes modalités de traitement à la cefquinome sur l'émergence d'entérobactéries céfotaxime-résistantes au sein de la flore fécale de porc.

Les flèches indiquent les jours de traitement antibiotique. . Les courbes indiquent les moyennes obtenues pour chaque groupe de traitement et les barres d'erreurs indiquent les écart-types.

5.4. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que des doses différentes de cefquinome administrée par voie parentérale produisaient des effets différents sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore digestive de porcs. Alors qu'un traitement utilisant les doses curatives recommandées chez le porc provoquait une amplification importante et durable d'entérobactéries résistantes au cefotaxime, une dose 10 fois plus faible était associée avec une absence d'amplification des résistances. Le choix de cette dose a été fondé sur la stratégie de traitement précoce d'une infection que nous avons validé au moyen de modèles d'infection chez les rongeurs. Nous avons déterminé la dose du traitement de type précoce en nous basant sur le même rationnel que celui que nous avons utilisé dans les chapitres 3 et 4. Nous avons donc choisi de diviser la dose de cefquinome administrée dans le cadre d'un traitement curatif chez le porc (2 mg/kg/j) par un facteur 10.

Dans cette étude, nous avons voulu validé, sur espèce cible, les résultats que nous avons obtenus sur nos modèles expérimentaux. En effet, comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, l'espèce porcine est l'espèce consommant le plus d'antibiotiques en médecine vétérinaire et l'étude de l'émergence de bactéries résistantes au sein du microbiote de cette espèce, consécutivement à un traitement antibiotique, nous est apparue comme des plus pertinentes. En revanche, nous n'avons pas utilisé de modèle infectieux durant cette étude et ce dans le but de quantifier dans un premier temps l'effet propre des différents types de traitement antibiotique sur le microbiote intestinal des animaux. L'impact de l'état physiopathologique sur l'exposition intestinale aux antibiotiques ainsi que l'efficacité de la dose adaptée aux phases précoces de l'infection devront cependant être déterminées chez le porc au cours d'études ultérieures.

Nous avons montré, comme d'autres études (Bibbal, Dupouy et al. 2007; Zhang, Huang et al. 2013) que quelque soit la voie d'administration de l'antibiotique, celui-ci peut exercer sur pression de sélection au niveau intestinale, qui impacte la flore digestive. Cependant, cet impact est dépendant de la dose d'antibiotique administrée. L'impact de la posologie recommandé par l'AMM sur les entérobactéries du microbiote intestinal est en accord avec l'étude de Cavaco *et al* (Cavaco, Abatih et al. 2008). Comme nous l'avons montré au cours de l'étude bibliographique, les porcelets utilisés hébergeaient des entérobactéries résistantes au céfotaxime et ce même en l'absence de tout traitement antibiotique dans leur historique de santé. Cet élément confirme, une fois de plus l'absence d'étanchéité entre les différentes populations de bactéries et leurs différentes niches écologiques possibles.

En conclusion, cette étude a montré sur une espèce d'intérêt agronomique qu'un traitement antibiotique utilisant des doses plus faible – potentiellement adaptées au traitement d'infection à un stade précoce - ne présentait pas d'impact visible en termes d'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore commensale digestive, contrairement à un traitement utilisant des doses d'antibiotique plus élevées, recommandées pour le traitement d'infections au stade clinique. Cependant, l'utilisation de techniques d'investigation plus sensibles (biologie moléculaire) permettrait à la fois d'identifier les gènes conférant les phénotypes de résistance des bactéries commensales résistantes, de pouvoir quantifier plus finement cette résistance (PCR quantitative sur les gènes de résistance identifiés) mais également de déterminer si les différentes modalités de traitement antibiotique impactent l'équilibre des différentes espèces bactériennes composant le microbiote intestinal.

Enfin, la confirmation de l'efficacité du traitement de type précoce sur un modèle infectieux chez le porc permettant l'établissement d'une infection à partir d'un faible inoculum pathogène (modèle proche des conditions terrain) permettrait d'envisager l'application de ce type de traitement en médecine vétérinaire, notamment dans le cadre de la métaphylaxie.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Au cours des soixante dernières années, l'utilisation massive des antibiotiques en médecine vétérinaire a fait l'objet de controverse quant à sa contribution à l'émergence de bactéries résistantes et à la transmission de cette résistance à l'Homme (Aarestrup and Wegener 1999; Swartz 2002; Bywater 2004; Phillips, Casewell et al. 2004). De plus, au cours de ces dernières années, la mise en évidence du microbiote intestinal des animaux et de l'Homme comme principal réservoir potentiel de gènes de résistance et donc comme principal enjeu de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire sur la santé publique, rend nécessaire soit le développement de nouveaux antibiotiques à usage vétérinaire n'impactant pas le microbiote intestinal des animaux, soit le développement de nouvelles modalités de traitement pour les animaux. L'objectif de ce travail de thèse était donc de déterminer, par l'utilisation d'approches PK/PD, une méthode *in vitro* de screening des antibiotiques permettant d'évaluer à la fois leur impact sur les microbiotes pathogènes et commensaux mais également de déterminer l'efficacité d'un nouveau type de traitement antibiotique à la fois sur la guérison des animaux infectés mais également sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de leur flore commensale digestive.

Dans la première partie de ce travail, nous avons développé un indice pharmacodynamique permettant d'évaluer la sélectivité des antibiotiques à partir d'une approche *in vitro*, consistant à la réalisation de cinétique de bactéricidie sur des inocula représentant soit un pathogène, soit une bactérie commensale. Nous avons utilisé *P.multocida* et *E.coli* respectivement comme bactérie pathogène et comme bactérie commensale afin de réaliser notre preuve de concept. Nous avons également utilisé deux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, l'amoxicilline et la cefquinome afin de déterminer s'il existait une différence de sélectivité entre les antibiotiques « d'ancienne génération » et les antibiotiques de dernière génération. Nous avons donc réalisé des courbes de bactéricidie en utilisant les deux antibiotiques sur des inocula de 10^7 UFC/mL de *P.multocida* et d'*E.coli*. Nous avons ensuite modélisé l'effet antibactérien de chaque antibiotique en utilisant un modèle d'inhibition E_{max} sigmoïde. Un indice de sélectivité ($SI = EC_{STATICEd} / EC_{90Pm}$) a été défini pour exprimer le rapport entre les concentrations d'antibiotiques permettant d'obtenir au maximum l'effet bactériostatique sur *E.coli* et les concentrations d'antibiotiques permettant l'éradication d'au moins 90% de *P.multocida*. Nous avons constaté que le SI était plus élevé pour l'amoxicilline que pour la cefquinome. Les mêmes expériences ont été réalisées sur des inocula plus petits de *P.multocida* (10^5 UFC/mL). Nous avons constaté que le SI était plus élevé pour les petits (10^5 UFC/mL) que

pour les gros (10^7 UFC/mL) inocula pathogènes indiquant qu'un traitement antibiotique durant les phases précoces de l'infection, où l'inoculum pathogène est de faible taille, pourrait permettre de protéger la flore commensale digestive de l'action de l'antibiotique.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons évalué l'impact de la dose d'antibiotique et du moment de l'initiation du traitement sur la guérison clinique et microbiologique des animaux au cours des différentes phases de l'infection. Nous avons développé un modèle original d'infection pulmonaire chez des souris immunocompétentes par contamination aérienne, en utilisant *Pasteurella multocida* comme agent pathogène. Dans un premier temps, nous avons déterminé la cinétique de la charge bactérienne pulmonaire chez les animaux. Ainsi, la charge bactérienne initiale était de $4,46 \pm 0,03$ LogUFC/poumon, de $4,41 \pm 0,21$ LogUFC/poumon à 24h post-infection et de $7,38 \pm 0,55$ LogUFC/poumon entre 72 et 96h après l'infection chez les souris présentant des symptômes cliniques. Une nouvelle fois, nous avons utilisé l'amoxicilline et la cefquinome comme antibiotiques pour traiter nos animaux. Après avoir réalisé la cinétique des deux antibiotiques sur des souris infectées, nous avons déterminé les doses nécessaires pour traiter les souris présentant des signes cliniques d'infection à partir d'un critère PK/PD permettant d'évaluer l'efficacité des antibiotiques temps dépendant, tels que les bêta-lactamines, le $T_{>CMI}$. Afin de déterminer les doses efficaces dans le cadre d'un traitement antibiotique de type précoce, c'est-à-dire initié durant les phases précoces de l'infection, au moment où l'inoculum pathogène est encore de faible taille, nous nous sommes basés sur les courbes de bactéricidie effectuées dans la première partie et nous avons déterminé que ces doses étaient 10 fois plus faibles que dans le cadre du traitement curatif. Nous avons montré que les traitements antibiotiques de type précoce, initiés 24heures après l'infection des animaux étaient aussi efficaces en termes de guérison clinique et plus efficaces en termes de guérison microbiologique élevés avec que les traitements antibiotiques classiques initiés chez les souris malades. Ces résultats montrent l'importance critique de la charge bactérienne sur l'efficacité des traitements antibiotiques et ceci pourrait contribuer également au développement de traitements antibiotiques novateurs chez les animaux.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons évalué l'impact, à la fois sur la guérison des animaux mais également sur l'émergence d'entérobactéries résistantes au sein de la flore intestinale, des traitements antibiotiques de type précoce et classique. Nous avons utilisé des rats axéniques aux nous avons inoculé par voie intragastrique un mélange de flore fécale de porc EOPS et d'une *E. coli* exprimant une bêta-lactamase de type CTX-M en sous dominance. Nous avons utilisé un modèle d'infection pulmonaire par instillation intra-trachéale en utilisant *Klebsiella pneumoniae* comme agent pathogène. Nous avons utilisé deux charges bactériennes pathogènes initiales, une faible (10^5 UFC) et une élevée (10^9 UFC), afin de mimer les charges bactériennes respectivement présentes au cours des

phases précoces et tardives de l'infection. La cefquinome a été utilisée pour traiter les animaux. Nous avons réalisé la cinétique de la cefquinome chez le rat afin de déterminer les doses d'antibiotique efficaces afin de traiter les animaux ayant déclaré des signes cliniques d'infection. Nous avons utilisé le critère PK/PD $T_{>CMI}$ cible afin de déterminer les doses curatives et nous nous sommes basés sur le même rationnel que l'étude précédente (dose divisée par 10) afin de déterminer les doses employées dans le cadre du traitement de type précoce. Nous avons ainsi montré que le traitement de type précoce initié à 24h post-infection est aussi efficace en termes de guérison clinique que le traitement antibiotique de type classique. Cependant, le traitement précoce n'a eu aucune incidence sur l'émergence d'entérobactéries CTX-M au sein de la flore digestive des animaux, dont le taux est resté autour de 0,01% du nombre d'entérobactéries totales, alors que dans le cadre du traitement classique, celui-ci a provoqué une émergence du taux d'entérobactéries CTX-M de 0,01 à 100% du nombre d'entérobactéries totales. Ces résultats pourraient avoir des implications pour le développement de nouvelles stratégies de traitement antibiotique, notamment en médecine vétérinaire car il permet à la fois une réduction de la consommation d'antibiotique et également empêche l'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore digestive, principal réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons déterminé l'impact des traitements antibiotiques de type précoce et classique sur l'émergence d'entérobactéries résistantes au sein de la flore fécale de porc, espèce d'intérêt agronomique. Pour ce faire nous avons administré, à des porcs, des doses de cefquinome de 2mg/kg/j ou de 0.2mg/kg/j correspondant respectivement aux doses appliquées dans le cadre des traitements antibiotiques classiques et précoces. Nous avons confirmé que le traitement antibiotique de type précoce ne provoquait pas l'émergence d'entérobactéries résistantes à la céfotaxime (céphalosporine de troisième génération) au sein de la flore digestive des animaux alors que le traitement antibiotique de type classique a provoqué l'émergence à très haut taux (jusqu'à 100%) et pendant une longue période (plus de 20 jours après le début du traitement) d'entérobactéries résistantes à la céfotaxime au sein de la flore digestive des porcs traités. Ces résultats indiquent que le traitement antibiotique de type précoce pourrait se révéler potentiellement très intéressant chez les espèces de rente car il limiterait l'émergence de bactéries résistantes au sein du microbiote intestinal des animaux.

L'ensemble de ces résultats s'ils permettent d'apporter des éléments de réponse à un certain nombre de questions relatives à l'antibiothérapie vétérinaire, requiert néanmoins des confirmations ou des approfondissements.

Facteurs d'influence pouvant avoir un impact possible sur la sélectivité des antibiotiques

Le SI a été développé à la base en tant que technique de criblage *in vitro* permettant d'évaluer rapidement la sélectivité pharmacodynamique des antibiotiques. Cette sélectivité ne permet de déterminer que l'effet propre des antibiotiques à des niveaux d'exposition fixes sur les bactéries. Cependant, d'autres facteurs peuvent avoir une influence sur l'exposition aux antibiotiques des flores pathogènes et commensales. En effet, la sélectivité pharmacocinétique qui détermine les niveaux d'exposition aux antibiotiques des au sein des différents organes, détermine également de ce fait le niveau d'exposition des différentes flores bactériennes (pathogène et commensale) quand celles-ci ne possèdent pas la même localisation anatomique. L'utilisation de modèles *in vitro* ou *ex vivo* mimant l'élimination des antibiotiques ainsi que les niveaux d'exposition différentiels au sein des différents organes (Firsov, Ruble et al. 1997; Regoes, Wiuff et al. 2004; Ferran, Dupouy et al. 2007).

En ce qui concerne l'amélioration du SI, nous avons vu que celui-ci était grandement amélioré lorsque la taille de l'inoculum pathogène était réduite. Ce phénomène est dû à la présence de l'effet inoculum qui correspond à une puissance et une efficacité accrues de l'antibiotique lorsque celui-ci agit sur des inocula bactériens de plus faible taille. Ce phénomène a été mis en évidence par Harry Eagle et observé pour de nombreux antibiotiques agissant contre des souches bactériennes de plusieurs espèces (Eagle, Magnuson et al. 1947; Mizunaga, Kamiyama et al. 2005; Udekwu, Parrish et al. 2009). Cependant, cet effet n'est pas retrouvé pour tous les antibiotiques, et ce même chez des antibiotiques d'une même famille agissant sur les mêmes souches bactériennes. Ainsi, les études de Balko *et al* et Nannini *et al* (Balko, Karlowsky et al. 1999; Nannini, Stryjewski et al. 2010) ont montré, chez les bêta-lactamines et plus particulièrement chez les céphalosporines, qu'en fonction des antibiotiques choisis, l'effet inoculum pouvait ou non être présent. De plus, l'état physiologique des bactéries comme les bactéries persistantes mais également les bactéries possédant des mécanismes de résistance et qui peuvent être présentes en sous dominance, à la fois, au sein des flores pathogènes et commerciales est une donnée à également prendre en compte.

Peut-on utiliser le traitement de type précoce dans le cadre de la métaphylaxie ?

Nous avons montré, comme d'autres études (Eagle, Magnuson et al. 1947; Eagle 1949; Ferran, Toutain et al. 2011), que notre traitement antibiotique de type précoce se

révélaient efficace dans le cadre expérimental (sections 3 et 4) et que ce type de traitement n'impactait pas la flore digestive des animaux en termes d'émergence de bactéries résistantes et ce dans le cadre expérimental (section 4) mais également sur espèce cible (section 5). Cependant, les résultats obtenus dans le cadre expérimental en termes d'efficacité clinique, doivent être confirmés sur espèce cible (porc, bovin, volaille). Une fois ces résultats confirmés, une validation des doses devra être réalisée au niveau réglementaire afin de pouvoir utiliser ce type de traitement dans le cadre de la métaphylaxie. Une autre solution afin de pouvoir utiliser ce type de traitement serait de mettre au point des systèmes permettant de détecter précocement les animaux atteints d'une infection bactérienne. De tels dispositifs sont actuellement en cours de développement notamment chez les bovins, afin de pouvoir détecter les épisodes fiévreux très précocement (Timsit, Assie et al. 2011).

Autres impacts possibles du traitement antibiotique de type précoce sur le microbiote intestinal

Nous avons vu que le traitement de type précoce ne provoquait pas l'émergence de bactéries résistantes, pourtant présentes en sous-dominance, au sein du microbiote intestinal. Cependant d'autres altérations ne sont pas à exclure. En effet, nous avons vu, au cours de l'étude bibliographique, que des traitements antibiotiques pouvaient induire des déséquilibres en termes de composition et de proportion des différentes espèces bactériennes présentes au sein de la flore commensale digestive. En effet, nous avons vu que chez certains animaux, l'administration de certains antibiotiques conduisait à l'émergence de bactéries pathogènes tels que des *Clostridium* au sein du microbiote intestinal, ce qui conduit à l'établissement d'une infection intestinale chez les animaux. Des études complémentaires utilisant des approches de biologie moléculaire sur les fèces des animaux traités pourraient conduire à évaluer cet impact.

Conclusion

En conclusion, cette thèse a permis de développer un indice pharmacodynamique permettant d'évaluer, *in vitro*, la sélectivité des antibiotiques et également de mettre en évidence qu'un traitement antibiotique utilisant de faibles doses et initié au cours des phases précoces de l'infection, au moment où la charge bactérienne est faible, était aussi efficace en termes qu'un traitement curatif classique et que celui-ci n'entraînait pas l'émergence de

bactéries résistantes au sein du microbiote intestinal des animaux traités. Cependant bien que ce la preuve de concept de ce type de traitement ait été réalisé sur des espèces modèles (souris, rat), et bien que l'impact de ce type de traitement ait été évalué au niveau de la flore commensale digestive d'une espèce cible potentielle (porc), l'efficacité, en termes de protection vis-à-vis de l'infection, de ce type de traitement n'a pas encore été validée sur une espèce cible potentielle. Une fois cette validation réalisée, ce type de traitement pourrait, par exemple, être utilisé dans le cadre de la métaphylaxie, ce qui réduirait de façon considérable la consommation d'antibiotique en médecine vétérinaire mais également l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques au sein du microbiote intestinal des animaux, qui est considéré comme le principal réservoir potentiel de gène de résistance aux antibiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2009). "Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.M100-S15 " CLSI, Villanova,PA, USA.
- (2012). Med'Vet 2012. Paris.
- Aarestrup, F. M. and H. C. Wegener (1999). "The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*." Microbes Infect **1**(8): 639-44.
- Aarts, H. J., K. S. Boumedine, et al. (2001). "Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria." Vet Res **32**(3-4): 363-80.
- Agero, Y., F. M. Aarestrup, et al. "Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage." J Antimicrob Chemother **67**(3): 582-8.
- Akwar, H. T., C. Poppe, et al. (2008). "Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia." Can J Vet Res **72**(2): 195-201.
- Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289**(1036): 321-31.
- Amyes, S. G., F. M. Walsh, et al. (2007). "Best in class: a good principle for antibiotic usage to limit resistance development?" J Antimicrob Chemother **59**(5): 825-6.
- Andersson, D. I. (2003). "Persistence of antibiotic resistant bacteria." Curr Opin Microbiol **6**(5): 452-6.
- Andersson, D. I. and D. Hughes (2011). "Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations." FEMS Microbiol Rev **35**(5): 901-11.
- Andremont, A. (2003). "Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance." ASM News **69**: 601-607.
- Ankomah, P. and B. R. Levin "Two-Drug Antimicrobial Chemotherapy: A Mathematical Model and Experiments with *Mycobacterium marinum*." PLoS Pathog **8**(1): e1002487.
- ANSES. "ANSES, ANMV, Liste des médicaments vétérinaires autorisés classés par ordre alphabétique de leur nom, COBACTAN LA 7,5 %." from <http://www.ircp.anmv.anses.fr/>.
- Atarashi, K., Y. Umesaki, et al. "Microbial influence on T cell subset development." Semin Immunol **23**(2): 146-53.
- Ateba, C. N. and C. C. Bezuidenhout (2008). "Characterisation of *Escherichia coli* O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa." Int J Food Microbiol **128**(2): 181-8.
- Azoulay-Dupuis, E., P. Moine, et al. (1996). "Amoxicillin dose-effect relationship with *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model and roles of in vitro penicillin susceptibilities, autolysis, and tolerance properties of the strains." Antimicrob Agents Chemother **40**(4): 941-6.
- Babic, M., A. M. Hujer, et al. (2006). "What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases." Drug Resist Updat **9**(3): 142-56.
- Bakker-Woudenberg, I. A., J. Y. de Jong-Hoenderop, et al. (1979). "Efficacy of antimicrobial therapy in experimental rat pneumonia: effects of impaired phagocytosis." Infect Immun **25**(1): 366-75.

- Balaban, N. Q., J. Merrin, et al. (2004). "Bacterial persistence as a phenotypic switch." *Science* **305**(5690): 1622-5.
- Balko, T., J. A. Karlowsky, et al. (1999). "Characterization of the inoculum effect with *Haemophilus influenzae* and beta-lactams." *Diagn Microbiol Infect Dis* **33**(1): 47-58.
- Baquero, F. (2012). "Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance." *Clin Microbiol Infect* **18 Suppl 4**: 67-73.
- Baquero, F. and T. M. Coque (2011). "Multilevel population genetics in antibiotic resistance." *FEMS Microbiol Rev* **35**(5): 705-6.
- Baquero, F., T. M. Coque, et al. "Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(8): 3649-60.
- Baquero, F. and C. Nombela (2012). "The microbiome as a human organ." *Clin Microbiol Infect* **18 Suppl 4**: 2-4.
- Bebrone, C. (2007). "Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily." *Biochemical Pharmacology* **74**(12): 1686-1701.
- Beceiro, A., S. Maharjan, et al. "False extended-spectrum {beta}-lactamase phenotype in clinical isolates of *Escherichia coli* associated with increased expression of OXA-1 or TEM-1 penicillinases and loss of porins." *J Antimicrob Chemother* **66**(9): 2006-10.
- Belloc, C., D. N. Lam, et al. (2005). "Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora." *J Appl Microbiol* **99**(4): 954-9.
- Belmar-Liberato, R., A. Gonzalez-Canga, et al. (2011). "Amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid resistance in veterinary medicine - the situation in Europe: a review." *Veterinarni Medicina* **56**(10): 473-485.
- Bibbal, D., V. Dupouy, et al. (2007). "Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces." *Appl Environ Microbiol* **73**(15): 4785-90.
- Bibbal, D., V. Dupouy, et al. (2009). "Relatedness of *Escherichia coli* strains with different susceptibility phenotypes isolated from swine feces during ampicillin treatment." *Appl Environ Microbiol* **75**(10): 2999-3006.
- Bielak, E., R. D. Bergenholtz, et al. (2011). "Investigation of diversity of plasmids carrying the blaTEM-52 gene." *J Antimicrob Chemother* **66**(11): 2465-74.
- Bingen, E., N. Lambert-Zechovsky, et al. (1990). "Bacterial counts in cerebrospinal fluid of children with meningitis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**(4): 278-81.
- Blaser, J., B. B. Stone, et al. (1987). "Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **31**(7): 1054-60.
- Bo, G. (2000). "Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins." *Clin Microbiol Infect* **6 Suppl 3**: 6-9.
- Boerlin, P., A. Wissing, et al. (2001). "Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs." *J Clin Microbiol* **39**(11): 4193-5.
- Bradford, P. A. (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." *Clin Microbiol Rev* **14**(4): 933-51, table of contents.
- Brakhage, A. A., Q. Al-Abdallah, et al. (2005). "Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors." *Phytochemistry* **66**(11): 1200-10.
- Bryskier, A. (1999). *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*. Paris, Ellipses.

- Bunner, C. A., B. Norby, et al. (2007). "Prevalence and pattern of antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* isolated from pigs reared under antimicrobial-free and conventional production methods." J Am Vet Med Assoc **231**(2): 275-83.
- Bush, K. (2001). "New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy." Clin Infect Dis **32**(7): 1085-9.
- Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(6): 1211-33.
- Bywater, R. J. (2004). "Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**(8-9): 361-3.
- Campo Esquisabel, A. B., M. C. Rodriguez, et al. "Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime." Clin Microbiol Infect **17**(12): 1817-22.
- Canton, R. and T. M. Coque (2006). "The CTX-M beta-lactamase pandemic." Curr Opin Microbiol **9**(5): 466-75.
- Canton, R. and M. I. Morosini (2011). "Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics." FEMS Microbiol Rev **35**(5): 977-91.
- Canton, R., M. I. Morosini, et al. (2008). "IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 53-62.
- Canton, R. and P. Ruiz-Garbajosa (2011). "Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes." Curr Opin Pharmacol **11**(5): 477-85.
- Carratala, J., A. Fernandez-Sevilla, et al. (1996). "Emergence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in fecal flora of cancer patients receiving norfloxacin prophylaxis." Antimicrob Agents Chemother **40**(2): 503-5.
- Cavaco, L. M., E. Abatih, et al. (2008). "Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome." Antimicrob Agents Chemother **52**(10): 3612-6.
- Chachaty, E., C. Bourneix, et al. (1993). "Shedding of *Clostridium difficile*, fecal beta-lactamase activity, and gastrointestinal symptoms in 51 volunteers treated with oral cefixime." Antimicrob Agents Chemother **37**(7): 1432-5.
- Charan, J., S. Mulla, et al. "New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern." Pan Afr Med J **11**: 22.
- Chevance, A., G. Moulin, et al. (2011). "Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2009." ANSES.
- Chia, J. H., L. K. Siu, et al. (2009). "Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency." J Chemother **21**(6): 621-6.
- CLSI (2011). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement." CLSI M100-S21 Vol.31 No.1: 44.
- Cohendy, M. (1912). "Expériences sur la vie sans microbes." Compt Rend **154**: 533-6.
- Colomer-Lluch, M., J. Jofre, et al. (2011). "Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples." PLoS One **6**(3): e17549.
- Corpet, D. E. (1993). "An evaluation of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora." Vet Microbiol **35**(3-4): 199-212.
- Costa, D., P. Poeta, et al. (2006). "Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal." J Antimicrob Chemother **58**(6): 1311-2.

- Coste, M., P. Gouet, et al. (1984). "Ampicillin inactivation in the caecum of axenic, gnotoxenic and conventional lambs: interaction with resistant or sensitive *Escherichia coli*." J Gen Microbiol **130**(6): 1325-30.
- Craig, W. A. (1998). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men." Clin Infect Dis **26**(1): 1-10; quiz 11-2.
- Craig, W. A. (2003). "Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid." Infect Dis Clin North Am **17**(3): 479-501.
- Dagan, R., K. P. Klugman, et al. (2001). "Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy." J Antimicrob Chemother **47**(2): 129-40.
- Dahmen, S., W. Mansour, et al. "Imipenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Is Associated to the Combination of Plasmid-Mediated CMY-4 AmpC beta-Lactamase and Loss of an Outer Membrane Protein." Microb Drug Resist.
- Datta, N. and P. Kontomichalou (1965). "Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae." Nature **208**(5007): 239-41.
- Davison, H. C., J. C. Low, et al. (2000). "What is antibiotic resistance and how can we measure it?" Trends Microbiol **8**(12): 554-9.
- de Lastours, V., E. Cambau, et al. (2012). "Diversity of individual dynamic patterns of emergence of resistance to quinolones in *Escherichia coli* from the fecal flora of healthy volunteers exposed to ciprofloxacin." J Infect Dis **206**(9): 1399-406.
- Delsol, A. A., M. Anjum, et al. (2003). "The effect of chlortetracycline treatment and its subsequent withdrawal on multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and commensal *Escherichia coli* in the pig." J Appl Microbiol **95**(6): 1226-34.
- Dewulf, J., B. Catry, et al. (2007). "Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors." Prev Vet Med **78**(3-4): 339-51.
- Dibner, J. J. and J. D. Richards (2005). "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action." Poult Sci **84**(4): 634-43.
- Domenech-Sanchez, A., L. Martinez-Martinez, et al. (2003). "Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3332-5.
- Donaldson, S. C., B. A. Straley, et al. (2006). "Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves." Appl Environ Microbiol **72**(6): 3940-8.
- Dortet, L., L. Poirel, et al. "New Delhi Metallo-beta-Lactamase 4-producing *Escherichia coli* in Cameroon." Emerg Infect Dis **18**(9): 1540-2.
- Dougherty, T. J. (1986). "Genetic analysis and penicillin-binding protein alterations in *Neisseria gonorrhoeae* with chromosomally mediated resistance." Antimicrob Agents Chemother **30**(5): 649-52.
- Dridi, B., D. Raoult, et al. "Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes." Anaerobe **17**(2): 56-63.
- Drusano, G. L., C. Fregeau, et al. (2010). "Impact of burden on granulocyte clearance of bacteria in a mouse thigh infection model." Antimicrob Agents Chemother **54**(10): 4368-72.
- Drusano, G. L., B. Vanscoy, et al. (2011). "Saturability of granulocyte kill of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 2693-5.
- Eagle, H. (1949). "The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*." J Exp Med **90**(6): 595-607.

- Eagle, H., H. J. Magnuson, et al. (1947). "Relation of the Size of the Inoculum and the Age of the Infection to the Curative Dose of Penicillin in Experimental Syphilis, with Particular Reference to the Feasibility of Its Prophylactic Use." J Exp Med **85**(4): 423-40.
- Edlund, C., L. Lindqvist, et al. (1988). "Norfloxacin binds to human fecal material." Antimicrob Agents Chemother **32**(12): 1869-74.
- Edlund, C. and C. E. Nord (2000). "Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections." J Antimicrob Chemother **46 Suppl A**: 41-48.
- Edlund, C., C. Stark, et al. (1994). "The relationship between an increase in beta-lactamase activity after oral administration of three new cephalosporins and protection against intestinal ecological disturbances." J Antimicrob Chemother **34**(1): 127-38.
- Edwards, C. A., B. I. Duerden, et al. (1985). "Metabolism of mixed human colonic bacteria in a continuous culture mimicking the human cecal contents." Gastroenterology **88**(6): 1903-9.
- EFSA (2008). "Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the EFSA on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard." The EFSA Journal.
- Endimiani, A., A. Rossano, et al. (2012). "First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland." Diagn Microbiol Infect Dis **73**(1): 31-8.
- Escoula, L., M. Coste, et al. (1982). "Small filter membrane bags for the study of antibiotic action in the digestive tract: bioavailability and in situ efficacy of ampicillin in the pig caecum." Res Vet Sci **33**(3): 338-42.
- Essack, S. Y. (2001). "The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases." Pharm Res **18**(10): 1391-9.
- Fantin, B., X. Duval, et al. (2009). "Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria." J Infect Dis **200**(3): 390-8.
- FDA (2012). "FDA takes steps to protect public health
" Agency working with animal, drug and medical communities to promote judicious antimicrobial use **888-INFO-FDA**.
- Fernandez Cuenca, F., C. Sanchez Mdel, et al. "Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*." Int J Antimicrob Agents **39**(6): 472-7.
- Ferran, A., V. Dupouy, et al. (2007). "Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin." Antimicrob Agents Chemother **51**(11): 4163-6.
- Ferran, A. A., A. S. Kesteman, et al. (2009). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model." Antimicrob Agents Chemother **53**(8): 3384-90.
- Ferran, A. A., P. L. Toutain, et al. (2011). "Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection." Vet Microbiol **148**(2-4): 292-7.
- Ferres, H. (1983). "Pro-drug of beta-lactam antibiotics." Drugs of today **19**: 499-538.
- Finegold, S. M., L. Ingram-Drake, et al. (1987). "Bowel flora changes in humans receiving cefixime (CL 284,635) or cefaclor." Antimicrob Agents Chemother **31**(3): 443-6.
- Firsov, A. A., M. Ruble, et al. (1997). "Net effect of inoculum size on antimicrobial action of ampicillin-sulbactam: studies using an in vitro dynamic model." Antimicrob Agents Chemother **41**(1): 7-12.

- Forrest, A., D. E. Nix, et al. (1993). "Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients." *Antimicrob Agents Chemother* **37**(5): 1073-81.
- Frana, T. S., A. R. Beahm, et al. (2013). "Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pork farms and visiting veterinary students." *PLoS One* **8**(1): e53738.
- Freter, R., E. Stauffer, et al. (1983). "Continuous-flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora." *Infect Immun* **39**(2): 666-75.
- Garcia-Alvarez, L., S. Dawson, et al. "Working across the veterinary and human health sectors." *J Antimicrob Chemother* **67 Suppl 1**: i37-i49.
- Garcia-Cobos, S., M. Arroyo, et al. (2013). "Novel mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Haemophilus parainfluenzae*: beta-lactamase-negative ampicillin resistance and inhibitor-resistant TEM beta-lactamases." *J Antimicrob Chemother*.
- Gellin, G., B. E. Langlois, et al. (1989). "Antibiotic resistance of gram-negative enteric bacteria from pigs in three herds with different histories of antibiotic exposure." *Appl Environ Microbiol* **55**(9): 2287-92.
- Gerber, A. U., W. A. Craig, et al. (1983). "Impact of dosing intervals on activity of gentamicin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocytopenic mice." *J Infect Dis* **147**(5): 910-7.
- Geuking, M. B., K. D. McCoy, et al. "The function of secretory IgA in the context of the intestinal continuum of adaptive immune responses in host-microbial mutualism." *Semin Immunol* **24**(1): 36-42.
- Gisby, J., B. J. Wightman, et al. (1991). "Comparative efficacies of ciprofloxacin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, and cefaclor against experimental *Streptococcus pneumoniae* respiratory infections in mice." *Antimicrob Agents Chemother* **35**(5): 831-6.
- Godoy, C., G. Castells, et al. (2011). "Influence of a pig respiratory disease on the pharmacokinetic behaviour of amoxicillin after oral ad libitum administration in medicated feed." *J Vet Pharmacol Ther* **34**(3): 265-76.
- Goessens, W. H., J. W. Mouton, et al. (2007). "Role of ceftazidime dose regimen on the selection of resistant *Enterobacter cloacae* in the intestinal flora of rats treated for an experimental pulmonary infection." *J Antimicrob Chemother* **59**(3): 507-16.
- Graf, J., Y. Kikuchi, et al. (2006). "Leeches and their microbiota: naturally simple symbiosis models." *Trends Microbiol* **14**(8): 365-71.
- Gregova, G., M. Kmetova, et al. (2012). "Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse." *Ann Agric Environ Med* **19**(1): 75-7.
- Griffith, D. and M. N. Dudley (2007). Animal models of infection for the study of antibiotic pharmacodynamics. *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. C. H. Nightingale, P. G. Ambrose, G. L. Drusano and T. Murakawa.
- Guamer, F. (2007). "[Role of intestinal flora in health and disease]." *Nutr Hosp* **22 Suppl 2**: 14-9.
- Gupta, K., T. M. Hooton, et al. (2005). "Isolation of fluoroquinolone-resistant rectal *Escherichia coli* after treatment of acute uncomplicated cystitis." *J Antimicrob Chemother* **56**(1): 243-6.
- Gupta, V. (2007). "An update on newer beta-lactamases." *Indian J Med Res* **126**(5): 417-27.
- Hammerum, A. M., A. R. Larsen, et al. "Patients transferred from Libya to Denmark carried OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Int J Antimicrob Agents* **40**(2): 191-2.
- Harmoinen, J., S. Mentula, et al. (2004). "Orally administered targeted recombinant Beta-lactamase prevents ampicillin-induced selective pressure on the gut microbiota: a

- novel approach to reducing antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 75-9.
- Hazenberg, M. P., M. Bakker, et al. (1981). "Effects of the human intestinal flora on germ-free mice." J Appl Bacteriol **50**(1): 95-106.
- Hazenberg, M. P., A. M. Pennock-Schroder, et al. (1986). "Reversible binding of polymyxin B and neomycin to the solid part of faeces." J Antimicrob Chemother **17**(3): 333-9.
- Hentges, D. J., A. J. Stein, et al. (1985). "Protective role of intestinal flora against infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice: influence of antibiotics on colonization resistance." Infect Immun **47**(1): 118-22.
- Hirayama, K. (1999). "Ex-germfree mice harboring intestinal microbiota derived from other animal species as an experimental model for ecology and metabolism of intestinal bacteria." Exp Anim **48**(4): 219-27.
- Hoyen, C. K., N. J. Pultz, et al. (2003). "Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **47**(11): 3610-2.
- Iliev, I. D., V. A. Funari, et al. "Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis." Science **336**(6086): 1314-7.
- Joossens, S., W. Reinisch, et al. (2002). "The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study." Gastroenterology **122**(5): 1242-7.
- Jumbe, N., A. Louie, et al. (2003). "Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy." J Clin Invest **112**(2): 275-85.
- Kaczmarek, F. S., T. D. Gootz, et al. (2004). "Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1630-9.
- Kang, M. S., Y. K. Kwon, et al. (2013). "Evidence for recent acquisition and successful transmission of blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* in South Korea." Antimicrob Agents Chemother.
- Kararli, T. T. (1995). "Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals." Biopharm Drug Dispos **16**(5): 351-80.
- Keller, N. P., G. Turner, et al. (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nat Rev Microbiol **3**(12): 937-47.
- Kelly, J. A., O. Dideberg, et al. (1986). "On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target." Science **231**(4744): 1429-31.
- Kennedy, S. (2008). "Epidemiology. Why can't we test our way to absolute food safety?" Science **322**(5908): 1641-3.
- Kesteman, A. S., A. A. Ferran, et al. (2009). "Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4740-8.
- Kesteman, A. S., A. Perrin-Guyomard, et al. (2010). "Emergence of resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intestinal tract during successful treatment of *Klebsiella pneumoniae* lung infection in rats." Antimicrob Agents Chemother **54**(7): 2960-4.
- Kimura, M., Y. Yamagishi, et al. (2010). "[Antimicrobial activity of oral quinolones against clinical isolates of *Bifidobacterium* group and *Clostridium difficile*]." Jpn J Antibiot **63**(2): 171-7.
- Knights, K. M., A. A. Mangoni, et al. "Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity." Expert Rev Clin Pharmacol **3**(6): 769-76.

- Knothe, H., P. Shah, et al. (1983). "Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*." Infection **11**(6): 315-7.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, et al. (2007). "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics." Cell **130**(5): 797-810.
- Konig, C., H. P. Simmen, et al. (1998). "Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid--implications for bactericidal activity of antibiotics." J Antimicrob Chemother **42**(2): 227-32.
- Labib, S., S. Hummel, et al. (2006). "Use of the pig caecum model to mimic the human intestinal metabolism of hispidulin and related compounds." Mol Nutr Food Res **50**(1): 78-86.
- Langlois, B. E., K. A. Dawson, et al. (1988). "Antimicrobial resistance of fecal coliforms from pigs in a herd not exposed to antimicrobial agents for 126 months." Vet Microbiol **18**(2): 147-53.
- Langlois, B. E., K. A. Dawson, et al. (1988). "Effect of age and housing location on antibiotic resistance of fecal coliforms from pigs in a non-antibiotic-exposed herd." Appl Environ Microbiol **54**(6): 1341-4.
- Leonard, F., A. Andremont, et al. (1989). "Use of beta-lactamase-producing anaerobes to prevent ceftriaxone from degrading intestinal resistance to colonization." J Infect Dis **160**(2): 274-80.
- Leski, T., G. J. Vora, et al. "Multidrug resistance determinants from NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in the USA." Int J Antimicrob Agents **40**(3): 282-4.
- Lewis, K. (2010). "Persister cells." Annu Rev Microbiol **64**: 357-72.
- Ley, R. E., D. A. Peterson, et al. (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." Cell **124**(4): 837-48.
- Li, X. B., W. X. Wu, et al. (2008). "Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in healthy piglets." J Vet Pharmacol Ther **31**(6): 523-7.
- Liebana, E., M. Batchelor, et al. (2006). "Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance." J Clin Microbiol **44**(5): 1630-4.
- Limbirt, M., D. Isert, et al. (1991). "Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin." Antimicrob Agents Chemother **35**(1): 14-9.
- Lindh, J. M., O. Terenius, et al. (2005). "16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts." Appl Environ Microbiol **71**(11): 7217-23.
- Liu, J. H., S. Y. Wei, et al. (2007). "Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China." Int J Antimicrob Agents **29**(5): 576-81.
- Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev **8**(4): 557-84.
- Livermore, D. M. (1998). "Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control." J Antimicrob Chemother **41 Suppl D**: 25-41.
- Livermore, D. M., R. Canton, et al. (2007). "CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe." J Antimicrob Chemother **59**(2): 165-74.
- Luidalepp, H., A. Joers, et al. (2011). "Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence." J Bacteriol **193**(14): 3598-605.

- Ma, D., M. Alberti, et al. (1996). "The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals." Mol Microbiol **19**(1): 101-12.
- Ma, J., J. H. Liu, et al. (2012). "Characterization of extended-spectrum beta-lactamase genes found among *Escherichia coli* isolates from duck and environmental samples obtained on a duck farm." Appl Environ Microbiol **78**(10): 3668-73.
- Mallett, A. K., C. A. Bearne, et al. (1987). "The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet on the human gut microflora." J Appl Bacteriol **63**(1): 39-45.
- Marshall, W. F. and J. E. Blair (1999). "The cephalosporins." Mayo Clin Proc **74**(2): 187-95.
- Martinez, M., P. L. Toutain, et al. (2006). The pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) relationship of antimicrobial agents. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. S. Giguère, J. Prescott, J. Desmond Baggot, R. Walker and P. Dowling. Oxford, Blackwell Publishing: 81-106.
- Martinez, M. N., M. G. Papich, et al. (2012). "Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target." Antimicrob Agents Chemother **56**(6): 2795-805.
- Massova, I. and S. Mobashery (1998). "Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **42**(1): 1-17.
- Mathew, A. G., A. M. Saxton, et al. (1999). "Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms." Appl Environ Microbiol **65**(6): 2770-2.
- Mattie, H. (2000). "Antibiotic efficacy in vivo predicted by in vitro activity." Int J Antimicrob Agents **14**(2): 91-8.
- McColm, A. A., E. Shelley, et al. (1986). "Evaluation of ceftazidime in experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia: comparison with other antibiotics and measurement of its penetration into respiratory tissues and secretions." J Antimicrob Chemother **18**(5): 599-608.
- Metlay, J. P., J. H. Powers, et al. (2006). "Antimicrobial drug resistance, regulation, and research." Emerg Infect Dis **12**(2): 183-90.
- Meunier, D., E. Jouy, et al. (2006). "CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France." Int J Antimicrob Agents **28**(5): 402-7.
- Miller, T. L. and M. J. Wolin (1981). "Fermentation by the human large intestine microbial community in an in vitro semicontinuous culture system." Appl Environ Microbiol **42**(3): 400-7.
- Mizunaga, S., T. Kamiyama, et al. (2005). "Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems." J Antimicrob Chemother **56**(1): 91-6.
- Mokracka, J., B. Gruszczynska, et al. (2012). "Integrans, beta-lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*." APMIS **120**(12): 950-8.
- Molbak, K. (2005). "Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens." Clin Infect Dis **41**(11): 1613-20.
- Molitoris, E., D. J. Fagerberg, et al. (1987). "Changes in antimicrobial resistance in fecal bacteria associated with pig transit and holding times at slaughter plants." Appl Environ Microbiol **53**(6): 1307-10.
- Moore, W. E., L. V. Moore, et al. (1987). "Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine." Appl Environ Microbiol **53**(7): 1638-44.

- Moro, M. H., G. W. Beran, et al. (2000). "Effects of heat stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine." J Appl Microbiol **88**(5): 836-44.
- Moro, M. H., G. W. Beran, et al. (1998). "Effects of cold stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine." Lett Appl Microbiol **27**(5): 251-4.
- Morrissey, I. and J. T. George (1999). "The effect of the inoculum size on bactericidal activity." J Antimicrob Chemother **43**(3): 423-5.
- Muller, A. E., N. Punt, et al. (2013). "Optimal exposures of ceftazidime predict the probability of microbiological and clinical outcome in the treatment of nosocomial pneumonia." J Antimicrob Chemother **68**(4): 900-6.
- Nannini, E. C., M. E. Stryjewski, et al. (2010). "Determination of an inoculum effect with various cephalosporins among clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 2206-8.
- Nguyen, T. T., E. Chachaty, et al. (2012). "Correlation between fecal concentrations of ciprofloxacin and fecal counts of resistant Enterobacteriaceae in piglets treated with ciprofloxacin: toward new means to control the spread of resistance?" Antimicrob Agents Chemother **56**(9): 4973-5.
- Nishino, K., E. Nikaido, et al. (2009). "Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*." Biochim Biophys Acta **1794**(5): 834-43.
- Nord, C. E., G. Rasmanis, et al. (2006). "Effect of dalbavancin on the normal intestinal microflora." J Antimicrob Chemother **58**(3): 627-31.
- Ojha, S. and M. Kostrzynska (2008). "Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays." Vet Res **39**(1): 4.
- Partridge, S. R. and R. M. Hall (2005). "Evolution of transposons containing blaTEM genes." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1267-8.
- Paterson, D. L. and R. A. Bonomo (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update." Clin Microbiol Rev **18**(4): 657-86.
- Pawar, Y. G. and S. K. Sharma (2008). "Influence of *E. coli* lipopolysaccharide induced fever on the plasma kinetics of cefepime in cross-bred calves." Vet Res Commun **32**(2): 123-30.
- Payne, S., G. Gibson, et al. (2003). "In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK." Curr Issues Intest Microbiol **4**(1): 1-8.
- Perrin-Guyomard, A., J. M. Poul, et al. (2006). "Impact of ciprofloxacin in the human-flora-associated (HFA) rat model: comparison with the HFA mouse model." Regul Toxicol Pharmacol **45**(1): 66-78.
- Philippon, A., G. Arlet, et al. (2002). "Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **46**(1): 1-11.
- Phillips, I., M. Casewell, et al. (2004). "Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data." J Antimicrob Chemother **53**(1): 28-52.
- Poole, K. (2004). "Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria." Clin Microbiol Infect **10**(1): 12-26.
- Poole, K. (2004). "Resistance to beta-lactam antibiotics." Cell Mol Life Sci **61**(17): 2200-23.
- Poole, K. (2005). "Efflux-mediated antimicrobial resistance." J Antimicrob Chemother **56**(1): 20-51.
- Prescott, J. (2006). Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. Antimicrobial therapy in veterinary medicine: 121-137.

- Qin, J., R. Li, et al. (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." *Nature* **464**(7285): 59-65.
- Rand, J. D., S. G. Danby, et al. (2002). "Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* **207**(1): 91-5.
- Rang, C. U., T. R. Licht, et al. (1999). "Estimation of growth rates of *Escherichia coli* BJ4 in streptomycin-treated and previously germfree mice by in situ rRNA hybridization." *Clin Diagn Lab Immunol* **6**(3): 434-6.
- Raum, E., S. Lietzau, et al. (2008). "Changes in *Escherichia coli* resistance patterns during and after antibiotic therapy: a longitudinal study among outpatients in Germany." *Clin Microbiol Infect* **14**(1): 41-8.
- Regoes, R. R., C. Wiuff, et al. (2004). "Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(10): 3670-6.
- Rolinson, G. N. (1998). "Forty years of beta-lactam research." *J Antimicrob Chemother* **41**(6): 589-603.
- Roosendaal, R., I. A. Bakker-Woudenberg, et al. (1986). "Continuous versus intermittent administration of ceftazidime in experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in normal and leukopenic rats." *Antimicrob Agents Chemother* **30**(3): 403-8.
- Rumney, C. J. and I. R. Rowland (1992). "In vivo and in vitro models of the human colonic flora." *Crit Rev Food Sci Nutr* **31**(4): 299-331.
- Rwego, I. B., T. R. Gillespie, et al. (2008). "High rates of *Escherichia coli* transmission between livestock and humans in rural Uganda." *J Clin Microbiol* **46**(10): 3187-91.
- Rybak, M. J. (2006). "Pharmacodynamics: relation to antimicrobial resistance." *Am J Infect Control* **34**(5 Suppl 1): S38-45; discussion S64-73.
- Salyers, A. A. and C. F. Amabile-Cuevas (1997). "Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?" *Antimicrob Agents Chemother* **41**(11): 2321-5.
- Salyers, A. A., A. Gupta, et al. (2004). "Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes." *Trends Microbiol* **12**(9): 412-6.
- Sanders, C. C. (1987). "Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics." *Annu Rev Microbiol* **41**: 573-93.
- Santella, G., S. Pollini, et al. "[Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates: an example of interaction between different mechanisms]." *Rev Panam Salud Publica* **30**(6): 545-8.
- Sawai, T., K. Matsuba, et al. (1979). "The bacterial outer-membrane permeability of beta-lactam antibiotics." *J Antibiot (Tokyo)* **32**(1): 59-65.
- Schwarz, S. and E. Chaslus-Dancla (2001). "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance." *Vet Res* **32**(3-4): 201-25.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg, et al. (2001). "Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production." *Int J Antimicrob Agents* **17**(6): 431-7.
- Scupham, A. J., L. L. Presley, et al. (2006). "Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine." *Appl Environ Microbiol* **72**(1): 793-801.
- Shanthi, M. and U. Sekar "Extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes." *J Assoc Physicians India* **58** Suppl: 41-4.
- Slyter, L. L., W. O. Nelson, et al. (1964). "MODIFICATIONS OF A DEVICE FOR MAINTENANCE OF THE RUMEN MICROBIAL POPULATION IN CONTINUOUS CULTURE." *Appl Microbiol* **12**: 374-7.
- Smith, K., K. D. McCoy, et al. (2007). "Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota." *Semin Immunol* **19**(2): 59-69.

- Sommer, M. O., G. Dantas, et al. (2009). "Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora." *Science* **325**(5944): 1128-31.
- Soriano, F., C. Ponte, et al. (1996). "Correlation of in-vitro activity and pharmacokinetic parameters with in-vivo effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia." *J Antimicrob Chemother* **38**(2): 227-36.
- Soriano, F., C. Ponte, et al. (1990). "Relevance of the inoculum effect of antibiotics in the outcome of experimental infections caused by *Escherichia coli*." *J Antimicrob Chemother* **25**(4): 621-7.
- Sorum, H. and M. Sunde (2001). "Resistance to antibiotics in the normal flora of animals." *Vet Res* **32**(3-4): 227-41.
- Sougakoff, W., S. Goussard, et al. (1988). "Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes." *Rev Infect Dis* **10**(4): 879-84.
- Soulsby, L. (2007). "Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus." *J Antimicrob Chemother* **60** Suppl 1: i77-8.
- Sparo, M., L. Urbizu, et al. (2012). "High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota." *Lett Appl Microbiol* **54**(2): 119-25.
- Spratt, B. G. (1978). "*Escherichia coli* resistance to beta-lactam antibiotics through a decrease in the affinity of a target for lethality." *Nature* **274**(5672): 713-5.
- Sullivan, A., C. Edlund, et al. (2001). "Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora." *Lancet Infect Dis* **1**(2): 101-14.
- Summers, A. O. (2002). "Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology." *Clin Infect Dis* **34** Suppl 3: S85-92.
- Sunde, M., K. Fossum, et al. (1998). "Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine." *Microb Drug Resist* **4**(4): 289-99.
- Sunde, M. and H. Sorum (1999). "Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine." *Microb Drug Resist* **5**(4): 279-87.
- Swartz, M. N. (2002). "Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin." *Clin Infect Dis* **34** Suppl 3: S111-22.
- Thomson, K. S. and E. S. Moland (2001). "Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(12): 3548-54.
- Thorsteinsdottir, T. R., G. Haraldsson, et al. (2010). "Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland." *Zoonoses Public Health* **57**(3): 189-96.
- Tian, G. B., H. N. Wang, et al. (2012). "Detection of clinically important beta-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China." *J Med Microbiol* **61**(Pt 2): 233-8.
- Timsit, E., S. Assie, et al. (2011). "Early detection of bovine respiratory disease in young bulls using reticulo-rumen temperature boluses." *Vet J* **190**(1): 136-42.
- Tipper, D. J. (1985). "Mode of action of beta-lactam antibiotics." *Pharmacol Ther* **27**(1): 1-35.
- Toutain, P. L., J. R. del Castillo, et al. (2002). "The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics." *Res Vet Sci* **73**(2): 105-14.
- Turnidge, J. and D. L. Paterson (2007). "Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints." *Clin Microbiol Rev* **20**(3): 391-408, table of contents.
- Udekwu, K. I., N. Parrish, et al. (2009). "Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics." *J Antimicrob Chemother* **63**(4): 745-57.

- Unno, T., D. Han, et al. (2010). "High diversity and abundance of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea." Sci Total Environ **408**(17): 3499-506.
- van den Bogaard, A. E. (2001). "[Human health aspects of antibiotic use in food animals: a review]." Tijdschr Diergeneeskde **126**(18): 590-5.
- Vedantam, G. and D. W. Hecht (2003). "Antibiotics and anaerobes of gut origin." Curr Opin Microbiol **6**(5): 457-61.
- Veilleux, B. G. and I. Rowland (1981). "Simulation of the rat intestinal ecosystem using a two-stage continuous culture system." J Gen Microbiol **123**(1): 103-15.
- Vollaard, E. J. and H. A. Clasener (1994). "Colonization resistance." Antimicrob Agents Chemother **38**(3): 409-14.
- Wang, H., J. C. McEntire, et al. (2012). "The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions." Rev Sci Tech **31**(1): 249-60.
- Wang, X., W. Liu, et al. "High Rate of New Delhi Metallo-beta-Lactamase 1-Producing Bacteria Infection in China." Clin Infect Dis.
- Yong, D., M. A. Toleman, et al. (2009). "Characterization of a New Metallo-beta-Lactamase Gene, bla(NDM-1), and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(12): 5046-5054.
- Zapun, A., C. Contreras-Martel, et al. (2008). "Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance." FEMS Microbiol Rev **32**(2): 361-85.
- Zemelman, R., C. Gonzalez, et al. (1984). "Resistance of *Aeromonas hydrophila* to beta-lactam antibiotics." J Antimicrob Chemother **14**(6): 575-9.
- Zhang, L., Y. Huang, et al. (2013). "Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota." Antimicrob Agents Chemother **57**(8): 3659-66.
- Zhao, S., D. G. White, et al. (2001). "Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3647-50.



TITRE ET RESUME EN ANGLAIS

TITLE: Determination of new modalities of beta-lactam treatments in veterinary medicine using PK/PD approaches for the public health protection: implication of pathogenic inoculum size.

SUMMARY: In recent years, the intestinal microbiota of humans and animals has been identified as the main potential reservoir of antibiotic resistance genes that could potentially be transmitted to human pathogens. In this context, we wanted to determine, through PK/PD approaches, tools and new modalities of antibiotic uses in veterinary medicine in order to reduce consumption but also their impact on the intestinal microbiota of animals in the ultimate goal to reduce the phenomenon of antibiotic resistance. In this context, we have developed by *in vitro* approaches, a pharmacodynamic index to evaluate the selectivity of antibiotics, *i.e.* their impact on both the pathogenic flora and intestinal microbiota. We have also developed rodent models of infection that have allowed us to test the impact of antibiotic treatments with amoxicillin and cefquinome, using low doses, initiated during the early steps of infection and targeting low pathogenic inoculum, on clinical outcomes of animals and on the emergence of resistant bacteria in the gut microbiota. Finally, we tested the impact of such treatment on the emergence of resistant bacteria in the intestinal flora of pigs, potential target specie. Our combined results allowed us to see that this modality of antibiotic treatment could be very interesting in veterinary medicine, particularly in the context of metaphylaxis

KEY-WORDS: Beta-lactam antibiotics, Amoxicillin, Cefquinome, Bacterial load, Metaphylaxis, Bacterial resistance, $T_{>MIC}$, PK/PD, Commensal flora.

TITRE ET RESUME EN FRANCAIS

AUTEUR : Maleck VASSEUR

TITRE : Détermination de nouvelles modalités d'utilisation des bêta-lactamines en médecine vétérinaire par des approches PK/PD en vue de la protection de la santé publique : implication de la taille de la charge bactérienne pathogène.

DIRECTEUR DE THESE : Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MELOU

CO-DIRECTEUR DE THESE : Monsieur de Docteur Michel LAURENTIE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

le 12 septembre 2014.

RESUME : Au cours des dernières années, le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux a été identifié comme étant le principal réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques pouvant potentiellement être transmis aux pathogènes humains. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer, par des approches PK/PD, des outils et de nouvelles modalités d'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire dans le but de réduire leur consommation mais également leur impact sur la flore digestive des animaux afin de réduire le phénomène d'antibiorésistance. Pour ce faire, nous avons développé, par des approches *in vitro* un indice pharmacodynamique permettant d'évaluer la sélectivité des antibiotiques, c'est-à-dire leur impact à la fois sur la flore pathogène et sur le microbiote intestinal. Nous avons également développé des modèles d'infection rongeurs qui nous ont permis de tester l'impact de traitements antibiotiques à l'amoxicilline et à la cefquinome, utilisant de faibles doses, initiés durant les phases précoces de l'infection et ciblant de faibles inocula pathogènes sur la guérison des animaux et sur l'émergence de bactéries résistantes au sein du microbiote intestinal. Enfin, nous avons testé l'impact de ce type de traitement sur l'émergence de bactéries résistantes au sein de la flore digestive de porcs, espèce cible potentielle. Nos résultats combinés nous ont permis de voir que cette modalité d'utilisation des antibiotiques pourrait se révéler très intéressante en médecine vétérinaire, notamment dans le cadre de la métaphylaxie.

MOTS-CLES : Bêta-lactamines, Amoxicilline, Cefquinome, Charge bactérienne, Métaphylaxie, Résistance bactérienne, $T_{>CMI}$, PK/PD, Microbiote intestinal,

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacologie

INTITULES ET ADRESSES DES LABORATOIRES :

UMR1331 TOXALIM, INRA-ENVT
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Laboratoire de Physiologie
23 Chemin des Capelles - BP 87614
31076 TOULOUSE Cedex 3

ANSES, Laboratoire de Fougères
10B rue Claude Bourgelat,
Javené - CS 40608
35306 FOUGERES Cedex
